



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**Tratamientos posdescongelado del semen de carnero. Efecto de diferentes fracciones del plasma seminal sobre la cinética espermática.**

**Por  
Br. PARADA, Rodrigo**

**TESIS DE GRADO:** presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Dr. en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Producción animal.

**MODALIDAD:** Ensayo experimental.

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2019**

## PAGINA DE APROBACION

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

\_\_\_\_\_  
Dr. Rafael Aragunde

Segundo miembro (Tutor):

\_\_\_\_\_  
Dr. Jorge Gil

Tercer miembro:

\_\_\_\_\_  
Lic. MSc. Florencia Beracochea

Fecha:

\_\_\_\_\_

Autor:

\_\_\_\_\_  
Rodrigo Parada

## **AGRADECIMIENTOS**

- A la Dra. Alba Ledesma, por compartir el trabajo de campo y su conocimiento, aportando materiales a la redacción.
- Al personal de la EEMAC, en especial a Ignacio Arévalo, quien me enseñó a realizar extracción de semen y entrenó a los carneros.
- Al Dr. Jorge Gil, tutor de esta tesis por el apoyo a mi formación.
- A mi familia, sin ellos todo el proceso de realizar esta carrera no hubiese sido posible.
- A mi pareja, por el apoyo todos estos años para culminar mis estudios.

## Tabla de contenidos

<b>PAGINA DE APROBACION.....</b>	<b>2</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>3</b>
<b>INDICE DE TABLAS .....</b>	<b>7</b>
<b>INDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>7</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>8</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>11</b>
<i>Composición de eyaculado.....</i>	<i>11</i>
Características de los espermatozoides .....	13
<i>Colección del semen.....</i>	<i>14</i>
Métodos de colecta:.....	14
• Vagina artificial (VA) .....	14
• Electroeyaculador (EE).....	14
• Otros métodos de colección: .....	15
<i>Valoración del eyaculado.....</i>	<i>15</i>
Evaluación in vitro: .....	16
Aspecto y color.....	16
Volumen.....	16
Concentración espermática .....	17
Motilidad.....	18
Motilidad en masa (MM) .....	18
Motilidad individual .....	19
Morfología.....	20
Test de integridad de membranas: .....	21
Endosmosis o hipo-osmosis:.....	21
Fluorocromos:.....	22
Atributos asociados a la capacidad fecundante: .....	22
Evaluación in vivo .....	22
<i>Conservación del semen.....</i>	<i>23</i>
Criopreservación del semen .....	23
Objetivo de la criopreservación .....	23
Ventajas .....	23

Desventajas .....	24
Estrés espermático en la congelación .....	24
Estrés osmótico .....	24
Shock térmico .....	25
Estrés oxidativo .....	26
Curva térmica .....	26
<i>Diluyentes y función</i> .....	27
Sustrato energético .....	27
Agentes crioprotectores .....	27
Glicerol .....	28
Yema de huevo .....	28
Efecto buffer .....	29
Leche .....	29
Tris .....	30
Mantener una adecuada presión osmótica y balance electrolítico .....	30
Control de proliferación bacteriana .....	30
<i>Protocolo de criopreservación ovina</i> .....	30
<i>Descongelación espermática</i> .....	31
<i>Adición de plasma seminal (PS)</i> .....	32
<i>Adición de diferentes fracciones del plasma seminal</i> .....	33
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>35</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
<i>Objetivo generales</i> .....	35
<i>Objetivos particulares</i> .....	35
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
<i>Diseño experimental</i> .....	35
<i>Animales</i> .....	35
<i>Colecta y procesamiento del semen congelado</i> .....	36
<i>Obtención del plasma seminal</i> .....	37
<i>Obtención de fracción retenida</i> .....	37
<i>Descongelación del semen</i> .....	37
<i>Tratamientos pos-descongelado del semen</i> .....	37
<i>Evaluación del semen pos-descongelado</i> .....	38
<i>Análisis estadístico</i> .....	40
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
<i>Efecto del día de congelación:</i> .....	40
<i>Efecto del tiempo de incubación:</i> .....	40

<i>Efecto del tratamiento</i> .....	41
Efecto del tipo de proteína (PS vs FR) .....	41
Efecto del método de obtención de la proteína (VA vs EE).....	41
Efecto de la interacción proteína*método de obtención .....	41
<i>Efecto de la interacción tiempo*tratamiento:</i> .....	41
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>45</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>46</b>
<b>REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>47</b>

## INDICE DE TABLAS

TABLA 1. COMPONENTES QUÍMICOS DEL PS OVINO (GARNER Y HAFEZ, 2000).....	13
TABLA 2. CONCENTRACIÓN DE SEMEN DE CARNERO VALORADA POR SU APARIENCIA (EVANS Y MAXWELL, 1987). .....	16
TABLA 3 CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN OVINO. ....	17
TABLA 4 MOTILIDAD MASAL (EVANS Y MAXWELL, 1987). ....	19
TABLA 5 PORCENTAJE DE FERTILIDAD EN OVEJAS INSEMINADAS POR VÍA CERVICAL CON SEMEN OVINO CONGELADO-DESCONGELADO AL QUE SE LE AGREGO PLASMA SEMINAL (LEDESMA Y COL., 2015). ....	33
TABLA 6 PARÁMETROS DE REFERENCIA DEL CASA PARA CLASIFICAR LAS POBLACIONES. ....	39
TABLA 7 EFECTO DEL DÍA DE CONGELACIÓN SOBRE LOS PARÁMETROS EN ESTUDIO. ....	40
TABLA 8 VALORES OBTENIDOS PARA LA DIFERENTES VARIABLES DEL ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN PROTEÍNA*MÉTODO DE COLECTA.....	41
TABLA 9: VALORES OBTENIDOS PARA LA VSL ( $\mu\text{M}/\text{s}$ ) EN LA INTERACCIÓN TIEMPO*TRATAMIENTO. ....	42
TABLA 10: VALORES OBTENIDOS PARA LA DAP ( $\mu\text{M}$ ) EN LA INTERACCIÓN TIEMPO*TRATAMIENTO. ....	42
TABLA 11: VALORES OBTENIDOS PARA LA VAP ( $\mu\text{M}/\text{s}$ ) EN LA INTERACCIÓN TIEMPO*TRATAMIENTO.....	43
TABLA 12: VALORES OBTENIDOS PARA LA VCL ( $\mu\text{M}/\text{s}$ ) EN LA INTERACCIÓN TIEMPO*TRATAMIENTO. ....	43
TABLA 13: VALORES OBTENIDOS PARA LA BCF (HZ/S) EN LA INTERACCIÓN TIEMPO*TRATAMIENTO.....	44
TABLA 14: TOTAL DE ESPERMATOZOIDES PROGRESIVOS (%) SEGÚN TRATAMIENTO Y TIEMPO DE INCUBACIÓN (MEDIAS $\pm$ ERROR ESTÁNDAR). ....	44

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA: 1 PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE DIFERENTES FRACCIONES DEL PLASMA SEMINAL .....	36
FIGURA 2 VARIABLES CINEMÁTICAS DE MOVILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDAS POR LOS SISTEMAS CASA (WHO LABORATORY MANUAL FOR THE EXAMINATION AND PROCESSING OF HUMAN SEMEN. 5TH ED.). ....	39

## RESUMEN

La producción ovina enfrenta un escenario de mercados muy exigentes y altamente competitivos. Satisfacer las exigencias exige tecnificar la producción, entre los que están los nuevos recursos genéticos y biotecnologías reproductivas para su multiplicación. La Inseminación Artificial (IA) con semen congelado es una herramienta de vital importancia, con la dificultad de que el semen ovino es muy sensible a la criopreservación. Las técnicas de congelación de semen siguen siendo las mismas y poco se ha avanzado en mejorar la calidad seminal posdescongelado, bajando drásticamente su fertilidad potencial cuando inseminamos por vía cervical, una técnica sencilla que permite la masificación de la IA sin grandes costos. Diversos trabajos de investigación se han realizado con el objetivo de minimizar o revertir este efecto y poder lograr masificar la inseminación con semen congelado por vía cervical. Diversos autores sostienen que el plasma seminal (PS) previene o revierte algunos de los daños ocasionados en sus membranas, ya que mantiene los espermatozoides en estado no capacitado, prolongando su longevidad y mejorando la fertilidad potencial del semen congelado de carnero si lo tratamos con este fluido. Estos efectos se le atribuyen a diversas proteínas que contiene el PS, entre ellas la fracción proteica retenida (FR) adherida a las membranas de los espermatozoides para ejercer su efecto. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del método de obtención (electro: EE, o vagina artificial: VA) del PS o de la FR para tratar semen de carnero luego de la descongelación sobre los parámetros cinéticos de los espermatozoides. Para este trabajo se usaron 5 carneros de raza Corriedale clínicamente aptos, a los que se les extrajo semen por VA para realizar un pool de semen congelado de los 5 carneros. Posteriormente, se colectó semen para producir PS y FR por dos métodos (VA y EE). El PS se obtuvo clarificando el pool de eyaculados de los mismos carneros a 10.000 g/30 min (repetiendo el proceso con el sobrenadante), y la FR se obtuvo del pellet de espermatozoides (con doble lavado en PBS y extracción en TRIS-HCl). Los tratamientos del semen posdescongelado fueron los correspondientes a un diseño factorial entre la proteína del tratamiento (PS o FR) y el método de obtención (VA o EE), generando PSVA, PSEE, FRVA, FREE y un control con PBS para evaluar el efecto a los 15 y 45 minutos de incubación a 37°C. Se evaluaron los parámetros cinéticos del semen (CASA Androvision®) a los 15 y 45 minutos de incubados en cada uno de los tratamientos. Los parámetros cinéticos evaluados resultaron superiores en las muestras incubadas con PS comparadas con FR ( $P < 0,05$ ); el método de colecta con resultados superiores fue VA comparado con EE ( $P < 0,05$ ). El tiempo de incubación fue deletéreo para la cinética espermática, decayendo significativamente todos los parámetros de 15 a 45 minutos ( $P < 0,05$ ). Incubar el semen descongelado con PSVA fue el mejor tratamiento para preservar la calidad espermática.

Palabras clave: Plasma seminal, fracción retenida, criopreservación.

## SUMMARY

Sheep farmers face a highly demanding and competitive scenario. Meeting the demands requires technologies, among which are the use of genetic resources and reproductive biotechnologies for spread of superior animals. Artificial Insemination with frozen semen is an important tool, with the drawback that ram semen is very sensitive to cryopreservation. Freezing techniques remain the same and little progress has been made in improving post-thaw quality, lowering its potential fertility dramatically when using cervical AI, a simple low-cost technique that allows massive AI. Several studies have been carried out with the objective of minimizing or reversing the effects of freezing to use the thawed semen in massive cervical AI with frozen semen. Some authors argue that seminal plasma (PS) prevents or reverses some of the damage caused to sperm membranes, since it keeps sperm in an uncapacitated status thus prolonging its longevity and potential fertility. The effect is attributed to various proteins in the PS, including the retained protein fraction (FR) attached to the sperm membranes. The objective of the present work was to evaluate the effect of the collection method (electro: EE, or artificial vagina: VA) of the PS or the FR to treat ram semen after thawing on the sperm kinetic parameters. For this study, five healthy Corriedale rams were used to collect semen by VA and produce frozen semen doses pool of the five rams. Subsequently, semen was collected to produce PS and FR by two methods (VA and EE). The PS was obtained by clarifying the pooled ejaculates at 10,000 g / 30 min (repeating two times the process with the supernatant), and the FR was obtained from the sperm-rich pellet (by double washing in PBS and extraction in TRIS-HCl). The treatments after thawing the semen were those corresponding to a factorial design between the treatment protein (PS or FR) and the collection method (VA or EE), generating PSVA, PSEE, FRVA, FREE and a control with PBS to evaluate the effect at 15 and 45 minutes of incubation at 37 ° C. Kinetic parameters (CASA Androvision®) were evaluated at thawing, 15 and 45 minutes after incubation in each of the treatments. The kinetic parameters were higher in the samples incubated with PS compared to FR ( $P < 0.05$ ); the collection method with superior results was VA compared to EE ( $P < 0.05$ ). The incubation time was deleterious for sperm kinetics, significantly decreasing all parameters from 15 to 45 minutes ( $P < 0.05$ ). Incubation of thawed semen with PS obtained by VA was the best treatment to maintain frozen-thawed ram semen quality.

Keywords: seminal plasma, retained fraction, cryopreservation.

## INTRODUCCIÓN

Durante el 2018, ingresaron a Uruguay un total de 327 millones de dólares por conceptos de exportaciones de los productos que componen el rubro ovino. Pese a que dichos ingresos superaron a los del año anterior, la disminución del stock ovino pone en riesgo la capacidad de sostener mercados (Boletín exportaciones, SUL 2018). Este escenario es propicio para la aplicación de biotecnologías reproductivas, con el objetivo de producir más y mejores productos en base a biotipos más especializados.

Las biotecnologías de primera generación como la Inseminación Artificial (IA) y la preservación del semen, son dos herramientas que tienen un elevado potencial de retorno, pero aún siguen en bajos niveles de adopción en el país. La IA es la de mayor impacto a nivel de sistemas productivos comerciales si se aplican criterios adecuados de selección del donante de semen; permite el uso masivo de reproductores de valor genético, mediante el uso más intensivo del semen siendo más eficiente con la utilización de reproductores de alto merito genético.

La técnica de IA más difundida a nivel nacional fue la deposición del semen fresco en el cérvix uterino, pero la vía cervical tiene como limitante los bajos resultados de fertilidad obtenidos cuando se utiliza semen congelado (Maxwell y Salamon, 1993). Esto limita los programas de mejoramiento genético con semen congelado en la especie, pero la aparición de la técnica de IA por laparoscopia permitió obtener resultados satisfactorios con semen congelado (Evans y Maxwell, 1989). Sin embargo, esta técnica es relativamente costosa, compleja y no siempre disponible para todos los productores (Maxwell y col., 2006) por lo que su difusión no ha alcanzado los elevados niveles de aplicación que se habían logrado en los programas de IA con semen fresco aplicados por vía cervical. Sumándole a lo anterior, produce un alto grado de estrés sobre el animal, por lo que se la cuestiona desde el punto de vista del bienestar animal. Lo mencionado anteriormente, más el costo del equipo y la especialización necesaria del operador (Fernández Abella, 2015), hacen que se busquen técnicas alternativas que permitan el uso del semen congelado y que contemplen el bienestar animal. Éstas deben ser accesibles y de fácil aplicación a nivel comercial con el objetivo de poder masificar la IA, con semen congelado en ovinos.

Se sabe que el espermatozoide ovino es más sensible al estrés térmico por frío que el de otras especies (Fiser y Fairfull, 1989; Watson, 2000). El proceso de criopreservación y descongelación induce severos cambios al espermatozoide de mamíferos (Medeiros y col., 2002) debidos a: estrés térmico, mecánico, químico y osmótico (Holt y col., 1992; Holt y North, 1994; Watson, 1995), entre los que se encuentran cambios morfológicos en la organización, fluidez, permeabilidad y composición lipídica de la membrana del espermatozoide (Hammerstedt y col., 1990; Thomas y col., 1998; Bailey y col., 2000; Januskauskas y col., 2003; Guillaume y col., 2004) y la correspondiente reducción en la fertilidad del eyaculado (Ricker y col., 2006). Esto conlleva a una disminución de la viabilidad y motilidad espermáticas pos descongelación, sin embargo no explica totalmente la reducción de la fertilidad, por lo que se ha sugerido que puede deberse a pérdida de las proteínas de la membrana del espermatozoide, necesarias para la fertilización (Lessard y col., 2000). La membrana plasmática del espermatozoide sirve de barrera estructural y de interfase de “comunicación” con el medio extracelular (Harvey y col., 2001), lo que permite que se transmitan señales físico-químicas originadas de interacciones ligando-receptor

desde el medio exterior al interior de la célula (Olden y col., 1985). Por lo tanto, la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide es un elemento fundamental para el éxito de la fecundación. La disminución de la fertilidad potencial podría deberse a los daños ocasionados en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación (Aisen y col., 2002; Ruiz y col., 2007; Barbas y col., 2013). Estos daños en las membranas espermáticas alteran su función, causando una capacitación espermática prematura (Santiani, 2003; Ruiz y col., 2007). Consecuentemente los espermatozoides reducen su sobrevivencia en el tracto reproductivo de la hembra, disminuyendo las posibilidades de fecundar el ovocito (Aisen y col., 2002; Ruiz y col., 2007).

Desde hace algunos años se ha prestado atención a los efectos que ejerce el plasma seminal (PS) sobre la viabilidad espermática y la tasa de preñez cuando es añadido a los diluyentes para semen refrigerado o congelado. En la literatura se reportan efectos tanto benéficos como adversos sobre la adición del PS y la capacidad fertilizante de los espermatozoides preservados de varias especies (Maxwell y col., 2006). El PS a través de sus componentes interactúa con la membrana espermática, con efectos beneficiosos, mejorando la calidad *in-vitro* del semen y su fertilidad. Esto es tema recurrente y de investigación actual (Maxwell y col. 2006; Muiño-Blanco y col. 2008; Leahy y de Graaf 2012; Ledesma y col., 2013; Yeste, M., 2017; Torres, E., 2018). Las proteínas del PS afines a la membrana espermática, serían capaces de revertir los efectos nocivos de la criopreservación sobre la integridad de los espermatozoides, aunque son necesarios otros componentes del PS para conservar o mejorar su motilidad (Bernardini y col., 2008).

En base a los antecedentes previamente mencionados es que el objetivo de esta tesis fue evaluar la calidad espermática postdescongelación de carneros luego de adicionar diferentes fracciones del PS.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Composición de eyaculado

El semen de carnero está conformado por una fracción líquida o plasma seminal (74%) y una fracción celular (FC) que la conforman los espermatozoides (26%, Garner y Hafez, 2000).

El PS actúa como un medio de transporte para los espermatozoides, que los lleva desde los genitales del macho, al tracto reproductivo de la hembra. Este regula la osmolaridad y pH del eyaculado, aporta energía a los espermatozoides, protección antioxidante y regula la respuesta inmune del tracto reproductivo de la hembra (Troedsson y col., 2005; De Graff y col., 2014). Los diferentes productos del plasma seminal (Tabla. 1) no se limitan a un mismo origen o glándula. Tienen una gran variedad entre especie, entre individuos dentro de una misma especie, y además hay variaciones estacionales que son más evidentes en las especies de reproducción estacional (El Almay y Foote, R., 2001; Perez-Pe y col., 2001). Sus funciones incluyen ser vehículo y activador de los espermatozoides, proporcionar un medio rico en nutrientes y un sistema amortiguador de pH que se mantiene muy cercano a la neutralidad, colaborando así en la supervivencia de los espermatozoides después de que son depositados en el aparato reproductor de la hembra (Maxwell y col., 2006).

Al mismo tiempo, impide la capacitación espermática hasta el momento de contacto de los espermatozoides con el aparato reproductivo de la hembra (Maxwell y col., 2006).

El plasma seminal ovino está compuesto mayormente por secreciones de las glándulas sexuales accesorias. Durante la eyaculación, dichas secreciones son vertidas hacia la uretra generándose así un medio de suspensión de espermatozoides (Garner y Hafez, 2000). El PS es un líquido neutro e isotónico, cuya composición es compleja e interviene en la regulación de las funciones espermáticas. La importancia funcional del PS es cuestionable, dado que es posible inducir la preñez por inseminación empleando espermatozoides colectados del epidídimo. Sin embargo, el plasma seminal sí muestra ser un componente esencial en el apareamiento natural porque actúa como portador y protector de los espermatozoides (Garner y Hafez, 2000), situación que es más importante en el apareamiento de la oveja y la vaca, en las cuales el eyaculado es depositado en la vagina.

En el carnero, las glándulas vesiculares son grandes (4 cm de longitud, por 2 cm de ancho), secretan un líquido rico en proteínas entre otros componentes constituyendo hasta el 50% del eyaculado (Fernández Abella, 1993). La secreción de la glándula vesicular está constituida por componentes orgánicos e inorgánicos, estos últimos se encuentran en menor proporción, aunque existen cantidad considerable de sodio, potasio y cloro. Como componente orgánico se destacan las proteínas, fructosa y ácido cítrico (Salisbury y col., 1978). Las glándulas bulbouretrales o de Cowper producen un líquido viscoso, de pH alcalino que permite limpiar la uretra (Fernández Abella, 1993). Pero la próstata, el ámpula y las glándulas bulbouretrales son relativamente pequeñas aportando un volumen de PS menor con respecto a otras especies lo que determina un eyaculado más concentrado (Maxwell y col., 2006).

Las principales moléculas orgánicas presentes en el semen son fructosa, sorbitol, inositol, ácido cítrico, glicerilforilcolina, fosfolípidos, prostaglandinas y proteínas. La fructosa, deriva de la glucosa de la sangre, es el azúcar más fácilmente metabolizable y constituye la principal fuente de energía para los espermatozoides (Evans y Maxwell, 1989). De estos componentes, las proteínas han sido muy estudiadas (de Graff y col., 2014) y se han dividido en tres familias: las adhesinas espermáticas (spermadhesinas), las proteínas con fibronectina dominios tipos-2 (BSPs: Binder of Sperm Proteins) y las proteínas secretorias ricas en cisteína. La mayor parte de las proteínas del PS son producidas por las glándulas sexuales accesorias, y su concentración varía según la especie; el carnero presenta altas concentraciones de BSP y adhesinas (de Graff y col., 2014). Se considera que el PS posee propiedades decapacitantes, e incluso hay evidencia que revierte el proceso de capacitación (Gillian y col., 1997; Maxwell y Johnson, 1999; Perez-Pe y col., 2002). Se cree que su acción principal esta mediada por sus proteínas y la interacción de estas con la membrana del espermatozoide (Cardozo y col., 2009; Leahy y de Graaf, 2012). Las proteínas del PS están asociadas a eventos relacionados con la fertilización, la maduración espermática (Dacheux y Paguigon, 1980; Dacheux y col., 1998), capacitación espermática (Triphan y col., 2007), la interacción con el oviducto mediante la formación de reservorios espermáticos (Gwathmey y col., 2006; Apichela y col., 2014) e implicadas en la interacción espermatozoide-ovocito (Töpfer-Petersen y col., 1998).

Tabla 1. Componentes químicos del PS ovino (Garner y Hafez, 2000).

Componentes químicos	Valores (mg/100ml)
Ph	5,9-7,3
Proteínas	5000
Fructosa	250
Sorbitol	26-170
Ácido cítrico	110-270
Inositol	7-14
Glicerilfosforilcolina	1100-2100
Sodio	178 ± 11
Potasio	84 ± 4
Calcio	6 ± 2
Magnesio	6 ± 0.8
Cloruro	86

La FC se compone de una población heterogénea de espermatozoides y en ciertos casos por otras células somáticas como epiteliales de descamación o inflamatorias en ciertos casos.

#### *Características de los espermatozoides*

Cada espermatozoide se compone de tres estructuras básicas, la cabeza, pieza de conexión o cuello y la cola (Evans y Maxwell, 1990), todo incluido en una membrana plasmática. La cabeza del espermatozoide de los rumiantes es plana y en casi su totalidad está ocupada por el núcleo (Salisbury y col., 1978). El acrosoma es una estructura membranosa ubicada en la cabeza del espermatozoide. Tradicionalmente se creía, que durante la fertilización el acrosoma se sometía a una exocitosis altamente especializada denominada reacción acrosómica, la que permitiría la liberación de las enzimas capaces de penetrar la zona pelúcida (Senger, 2003). Jin y col. en el 2011 observó que los espermatozoides fertilizantes se someten a la reacción acrosómica antes de su contacto con la zona prelucida o durante su paso por ella. La cola o flagelo, es la responsable de proporcionar movimientos de propulsión en medios líquidos. Se puede dividir en tres piezas fundamentales: pieza media, principal y terminal. La cola está constituida por 9 pares de fibra contráctiles periféricas y un par central, estas dan lugar al movimiento de la cola. La pieza media es la región más gruesa de la cola; aloja al helicoide mitocondrial rodeando las fibras

contráctiles, a las que aporta la energía para el movimiento. La pieza principal esta revestida por una vaina fibrosa y constituye la fracción más larga de la cola. Por último la pieza terminal es relativamente corta y carece de vaina fibrosa (Salisbury y col., 1978).

#### Colección del semen

La colección de semen del carnero se realiza con varios propósitos, entre los más importantes: la evaluación de la capacidad reproductiva, para IA, o para preservación. Resulta de gran importancia la obtención de eyaculados de óptima calidad para programas de IA (Pérez García, 1958; Howard y Pace, 1988), maximizando la utilización de los sementales empleados en tales programas, consiguiéndose así una vida sexual prolongada para los mismos (Pérez García, 1958). Para obtener eyaculados de óptima calidad biológica, es necesario que los donantes se encuentren en óptimas condiciones sanitarias y nutricionales, y que el método empleado para la obtención sea aplicado correctamente (Pérez García, 1958; Hafez, 1989).

#### *Métodos de colecta:*

•Vagina artificial (VA): El método de obtención de semen más difundido para la mayoría de las especies de mamíferos es el de la VA (Cole y Cupps, 1984; Hafez, 1989). En la especie ovina este es uno de los métodos alternativos para la recogida del material seminal (Inskeep 1974). La VA intenta replicar la vagina de la hembra (Vijil, 1986; Howard y Pace, 1988; Evans y Maxwell, 1990), por lo que Bonadonna (1938) denominó a este método de recogida de semen como método parafisiológico. Los estímulos que se reproducen son el térmico (la temperatura del agua en la cámara interior de la VA), y la presión por los niveles de aire que se insuflan (López Pérez, 1987). El volumen y concentración por eyaculado disminuye con las sucesivas colectas. Se recomienda en carneros adultos un régimen de 3-5 colectas diarias, durante un periodo de 4-5 días, separados por periodos de 2-3 días de descanso, esto no reducirá sensiblemente la cantidad y calidad seminal (Evans y Maxwell, 1989). El mayor inconveniente que presenta la utilización de la vagina artificial es, la necesidad de entrenar a los donantes para que eyaculen dentro de dicho dispositivo (Inskeep, 1974; Evans y Maxwell, 1990).

•Electroeyaculador (EE): A finales del siglo XIX, se comenzó a utilizar los estímulos eléctricos para la obtención de semen, al comprobar que los individuos ejecutados en la silla eléctrica, eyaculaban simultáneamente a la descarga (Durán, 1980). Posteriormente, esta técnica se modificó adaptándose a las distintas especies animales. La forma y disposición de los electrodos ha evolucionado hasta llegar a los modelos actuales en los cuales, el electroeyaculador presenta un sólo vástago de aplicación rectal (Durán, 1980). Éste método es el más aceptado por la mayoría de los investigadores (Inskeep, 1974; Evans y Maxwell, 1990). Dicha metodología se basa en la estimulación eléctrica de los centros lumbares de la erección y eyaculación para obtener el semen. El EE permite obtener semen de animales no entrenados a la VA, así como de animales con patologías adquiridas que le impidan realizar el salto

(siempre que no sean hereditarias), por lo cual es ampliamente utilizada para obtener muestras para la evaluación de sementales de campo y especies no domésticas. La EE ejerce su acción estimulante directamente sobre los nervios pélvicos simpáticos y parasimpáticos y sobre las glándulas anexas del aparato reproductor, incrementando la proporción de PS y reduciendo, a su vez, la concentración espermática del eyaculado (Austin, y col., 1961). Sin embargo, observaciones realizadas mostraron que tanto el volumen como la concentración de los eyaculados obtenidos con EE pueden ser controlados mediante ajustes en la duración, la intensidad del estímulo y la colecta selectiva de las fracciones del eyaculado (PS y espermatozoides) (Ledesma y col., 2012). Es decir que, un buen ajuste del método (duración y relación estímulo/descanso y momento de obtención) según el individuo, permite obtener eyaculados cuantitativa y cualitativamente similares a los obtenidos con VA. La utilización de la EE presenta una serie de inconvenientes, tales como el riesgo de contaminación por orina (Inskeep, 1974), mayor estrés sobre los reproductores no acostumbrados al método, y no permite realizar más de 1 a 2 extracciones diarias. Existe la posibilidad de producir lesiones degenerativas en el sistema nervioso y muscular esquelético por las contracciones tan bruscas que se ocasionan con equipos menos desarrollados (Inskeep, 1974; Duran, 1980; Vijil, 1986; Evans y Maxwell, 1990). La electroestimulación generalmente permite obtener eyaculados con mayor concentración de proteínas de bajo peso molecular lo cual podría ser beneficioso para conservar la calidad del semen ovino criopreservado (Ledesma, y col., 2014).

•Otros métodos de colección: Se utilizan otras técnicas con el mismo propósito, de mayor o menor aceptación entre los distintos autores como los colectores vaginales (Pérez y Pérez, 1985), y otras técnicas de carácter experimental como las centesis genital (Dacheux y col., 1984), condones (Synnott y col., 1981), y fármacos (Capurro y Olaso, 2016).

La utilización de los colectores vaginales para la obtención de semen fue establecida por Roemmele, en Alemania. Esta metodología consiste en situar un colector dentro de la vagina destinado a recoger el eyaculado post-coito. Dubois, en Bélgica, perfeccionó la técnica diseñando un colector vaginal de vidrio con dos receptáculos para la obtención de semen en el carnero. A pesar de los resultados satisfactorios registrados por dicho autor, la utilización de este colector no se ha generalizado debido a inconvenientes como los causados por rotura del colector en el interior de la vagina de la hembra o por pérdida del material seminal por desviaciones anatómicas, así como por contaminación de la muestra (Pérez y Pérez, 1985).

#### Valoración del eyaculado

Permite valorar al reproductor como donante de semen y su potencial uso para la preservación de dosis de semen, así como estimar la calidad de las dosis preservadas.

La evaluación del eyaculado es vital para que solo se procesen y almacenen aquellos con alta probabilidad de fecundar (Eliot, 1978). Las técnicas puede ser *in vitro* (en el laboratorio), o *in vivo* en las que se evalúa la calidad del semen mediante la IA. La única prueba definitivamente válida de la calidad real de una muestra de semen la constituye la fertilidad de las hembras inseminadas (Cole y Cupps, 1984; Vijil y col., 1986; Hafez, 1989). No obstante, ésta metodología de evaluación es muy

onerosa en tiempo y recursos. Para evitar estos problemas existen técnicas de laboratorio que utilizadas correctamente aportan datos con distintos grados de relación con la capacidad fecundante del esperma de un determinado semental (Graham y col., 1980; Cole y Cupps, 1984; Foote, 1988). Para Graham y col. (1980) un ensayo ideal para la determinación de la calidad seminal debe reunir una serie de condiciones como: ser objetivo, repetible, fidedigno y económico.

*Evaluación in vitro:*

Aspecto y color

El examen macroscópico del semen de carnero es muy utilizado para obtener una idea aproximada de la densidad de espermatozoides (Tabla 2). Es una técnica muy práctica a nivel de campo, ya que no se necesita ningún instrumento para realizarla más que el entrenamiento. El color del semen debe ser blanco-lechoso o cremoso pálido, aquellos eyaculados que tengan color rojizo deben ser eliminados, ya que éste indica la posible presencia de sangre. Al igual que los colores grises o marrones en el semen, indican contaminación o infección (Gibbons y col., 1993). El eyaculado es inodoro, cualquier olor percibido es indicativo de una infección o contaminación con orina (Fernández Abella, 2015).

Tabla 2. Concentración de semen de carnero valorada por su apariencia (Evans y Maxwell, 1987).

<b>Valor</b>	<b>Color/Consistencia</b>	<b>Concentración (espermat./mL)</b>
5	Cremoso espeso	4.5-6.0 x10 <sup>9</sup>
4	Cremoso	3.5-4.5 x10 <sup>9</sup>
3	Crema liviana	2.5-3.5 x10 <sup>9</sup>
2	Lechoso	1.0-2.5 x10 <sup>9</sup>
1	Turbio	0.3-1.0 x10 <sup>9</sup>
0	Acuoso	Insignificante

Volumen

A partir de diversos reportes (Tabla 3), se sabe que en promedio el carnero tiende a eyacular una cantidad de semen que oscila entre 0,75 a 2 mL, conteniendo una alta concentración de espermatozoides. Vázquez, encontró que el volumen del eyaculado está correlacionado positivamente ( $r=0,68$ ;  $P<0,0001$ ) con el número de dosis procesables.

Tabla 3 Características del semen ovino.

Referencia	Volumen (mL)	Concentración (millones/mL)	Móviles (%)	Vivos con acrosoma (%)	Integridad de membrana (%)
<b>Garner y Háñez, 2000</b>	0,8 - 1,2	2000-3000	60-80		
<b>Paulenz y col., 2002</b>	0,75 -2,0	>3500	>70		
<b>Gil y col., 2003<sup>a</sup></b>	0,75 -2,0	> 2500	> 70		
<b>Santiani y col., 2004</b>			80-95	83-95	70-90
<b>Aisen y col., 2000</b>			79-88	90-95	

#### Concentración espermática

La concentración es el número de espermatozoides que se encuentra en el eyaculado por cada mililitro, ese dato junto con el volumen, define el número de hembras que pueden ser inseminadas con ese eyaculado. El semen es altamente concentrado, la cantidad de espermatozoides por mililitro varía según los distintos autores, ubicándose siempre por encima de 2000 millones (ver tabla 2). Por debajo de un millón se considera de baja fertilidad (Fernández Abella, 1987). Un gramo de tejido testicular de carnero es capaz de producir un promedio de 20 millones de espermatozoides por día, de donde se deduce, que un mayor volumen testicular, corresponde a mayor producción de espermatozoides (Sorensen, 1982). La concentración espermática de carnero varía de acuerdo, a la edad, la estación del año, la nutrición, raza, y actividad sexual. Por lo tanto, se observan variaciones entre individuos y entre colecciones de un mismo individuo (Evans y Maxwell, 1989).

Hay distintos métodos que permiten la determinación de la concentración espermática, entre ellos se menciona el recuento en cámara de Neubauer o por fotómetro. Ambos métodos son precisos; si bien el fotómetro mide absorbancia de luz permitiendo un recuento más rápido en comparación con la cámara de Neubauer, pero su costo es más elevado y puede no ser muy exacto. La cámara de conteo posee dos cuadrículas para evaluar la variación intraensayo en el conteo. El semen es diluido generalmente en una proporción 1:200 a 1:500, utilizando un diluyente con formol para que permita inmovilizar a los espermatozoides para contarlos y dispersarlos

uniformemente a fin de evitar la aglutinación de los mismos (Salisbury y col., 1978; Duran del Campo, 1980).

El método que utiliza un fotómetro, se basa en exponer una muestra de semen a un haz de luz y registrar la cantidad de luz absorbida por la misma. La concentración de la muestra será directamente proporcional a la absorbancia. El fotómetro debe ser calibrado con 10-15 conteos realizados en cámara de Neubauer de tal manera de obtener un gráfico de calibración para semen ovino (Rodríguez y col., 2008).

La combinación de métodos fluorescentes con un citómetro de flujo modificado para el análisis de esperma de diferentes especies es un método rápido, preciso que permite mejorar la evaluación del mejor semen. El citómetro de flujo evalúa la calidad, estructura, función y motilidad del esperma luego de ciclos de congelación/descongelación; valora daños en el esperma y su calidad para la fertilización (Laguado, 2007).

Otro método de estimación de la concentración, es el sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), que mide la concentración espermática mediante un software. La introducción de los sistemas CASA ha permitido realizar una evaluación morfométrica objetiva y cuantitativa del semen de diversas especies (Osorio, 2013).

### Motilidad

Para que un espermatozoide sea capaz de fecundar a un ovocito ha de reunir una serie de requisitos, entre ellos, tener motilidad progresiva. Dicho parámetro ha sido, y sigue siendo el más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis seminal. El movimiento activo de los espermatozoides es imprescindible para la colonización del oviducto durante la fase de transporte sostenido en el tracto genital de la hembra, y para que tenga lugar la fecundación. Además, la motilidad es una manifestación de viabilidad espermática y de integridad celular. Un eyaculado con un porcentaje bajo de espermatozoides móviles, o ausencia de motilidad, automáticamente será descartado para su conservación (Den Daas, 1992; Holt y Van Look, 2004).

Este parámetro se ha utilizado de forma tradicional como única prueba para la evaluación del semen de carnero, ya sea recién recogido o después de ser sometido a distintos procesos de conservación (Uwland, 1984). Una estimación visual de la motilidad debe ser realizada en todas las muestras de semen, porque permite identificar las muestras que probablemente presenten baja fertilidad (Graham, 2001). La motilidad es estudiada a través de los movimientos en masa e individual.

#### Motilidad en masa (MM)

Valora la formación y progresión de ondas producidas por el desplazamiento de los espermatozoides. Las ondas del movimiento masal sólo pueden ser observadas en eyaculados de alta concentración espermática, como es el caso de los pequeños rumiantes (Maxwell y Evans, 1990). Debe realizarse inmediatamente después de la obtención del eyaculado en condiciones isotermas y sin diluir el mismo (Duran del Campo, 1980; Evans y Maxwell, 1989). Es conveniente realizarla mediante microscopía óptica a 4-10x de una gota de semen puro sobre cubreobjetos templado

a 37°C, aunque se puede realizar la evaluación primaria a ojo desnudo, en la propia copa o tubo de recolección. La escala utilizada va de 0 a 5 (Tabla 4, Maxwell y Evans, 1987), donde 0 es la ausencia de movimiento y 5 cuando el movimiento es muy intenso; otras escalas generan utilizan otro rango de notas (0 a ++, Pérez y Pérez, 1986). La clasificación varía en función de la concentración de espermatozoides en el eyaculado, de la motilidad individual y vigor de ellos. Es aconsejable que el eyaculado tenga como mínimo una MM de 3 para su preservación.

Tabla 4 Motilidad masal (Evans y Maxwell, 1987).

Valor	Clase	Descripción
5	Muy buena	Hondas densas de movimiento muy rápido. No pueden observarse espermatozoides individuales, 90% o más de los espermatozoides son activos.
4	Buena	Hondas y remolinos vigorosos, pero no tan rápidos. Alrededor del 75-80% de los espermatozoides son activos.
3	Aceptable	Hondas de movimientos lentos, espermatozoides individuales pueden ser observados, 50-65% de ellos activos.
2	Pobre	No aparecen ondas, pero se observan movimientos espermáticos, solo el 20-40% de los espermatozoides están vivos y su motilidad es pobre.
1	Muy pobre	Solo el 10% de los espermatozoides muestran algún signo de vitalidad.
0	Muertos	Sin movimiento, 0%

#### Motilidad individual

La movilidad individual es una de las pruebas que con mayor frecuencia se utilizan para evaluar la calidad seminal y en algunas especies parece estar correlacionada con la capacidad fertilizante del espermatozoide (Maxwell y Evans, 1990; Pomerol y Arrondo, 1994). Consiste en estimar el porcentaje (0-100%) de espermatozoides con movimiento en una muestra de semen diluido en una solución isosmótica (Evans y Maxwell, 1989; Fiser y Fairfull, 1989), determinando el porcentaje de espermatozoides móviles y su calidad de movimiento (Maxwell y Evans, 1990).

Los eyaculados de caneros se caracterizan por presentar alto porcentaje de espermatozoides móviles (70-90%). Entre los parámetros cinéticos, hay dos que parecen destacarse, sobre los demás como principales indicadores de movimiento espermático, que son la velocidad rectilínea (VSL) y el desplazamiento lateral de la cabeza (Hidalgo, 2004).

La motilidad espermática progresiva, es decir el movimiento con dirección de avance, se observa en espermatozoides que presentan una serie de atributos estructurales y fisiológicos altamente relacionados con la fertilidad (Gil y Olivera, 2004). El movimiento progresivo y normal es el que determina que el espermatozoide avance y pueda fecundar. La motilidad progresiva se expresa en porcentaje, lo cual varía según el autor entre 60 y 90% (Sorensen, 1982), para semen con motilidad de aceptable a muy buena. La valoración visual de la motilidad espermática es el método más simple, rápido y barato. Sin embargo, es altamente subjetivo, puesto que los resultados obtenidos dependen en gran parte de la habilidad y experiencia del técnico que evalúa la muestra (Rodríguez-Martínez, 2000; Phillips y col., 2004), y además, si se trabaja con muestras muy concentradas se tiende a sobrestimar el porcentaje de espermatozoides móviles. Por tanto, no es un método que, de forma fiable y repetible, permita predecir la capacidad fecundante de una muestra de semen (Saacke y White, 1972; Linford y col., 1976).

Actualmente, el análisis seminal clásico ha mejorado mediante la introducción de nuevas técnicas analíticas procedentes de otros campos de la investigación científica. Así, cada vez más autores están utilizando el sistema CASA para obtener un valor preciso y objetivo de la motilidad espermática y de la calidad del movimiento de los espermatozoides presentes en la muestra. La incorporación de estos métodos informáticos atenúa en gran parte el factor subjetivo del análisis seminal, y garantiza una mejor correlación con la capacidad fecundante del espermatozoide. Este sistema ha provisto de interesantes resultados sobre los porcentajes medios de motilidad y las diferentes sub poblaciones de espermatozoides que coexisten en una misma muestra (Mousa y col., 2002; Lamia y col., 2004; Muiño y col., 2008; Ticiano y col., 2010). Esta técnica es posible utilizarla tanto en semen fresco como en el congelado o refrigerado. En función de su progresividad, los espermatozoides son clasificados en: estáticos, móviles progresivos y móviles no progresivos.

### Morfología

El eyaculado de carnero colectado en estación reproductiva se caracteriza por presentar un bajo porcentaje de morfoanomalías (15-20%). Entre las morfoanomalías asociadas a la fertilidad reducida, se encuentran las cabezas anormales, espermatozoides decapitados, anomalías de la pieza intermedia, y colas dobladas o arrolladas en espiral, así como determinadas anomalías heredables (Hidalgo, 2004). La presencia de altos porcentajes de formas anormales parece estar asociada con una inmadurez sexual, a procesos degenerativos y patológicos, e incluso con un excesivo ritmo de recogida. Existen variaciones en la morfología espermática debido al estrés, factor individual, temperatura y estación del año (Hafez y Hafez, 2004).

Los valores de morfoanomalías aceptables para un eyaculado varían con la especie, así para el carnero, estos valores se hallan comprendidos entre el 15 (Uwland, 1984; Evans y Maxwell, 1989) y el 20% (Hafez, 1989). En esta especie, los

eyaculados con 20% o más de espermatozoides anormales no se utilizan en los programas de IA (Hafez y Hafez, 2004), y para la conservación de semen solo se utilizan eyaculados con menos del 10% de anomalías espermáticas (Evans y Maxwell, 1989). Existe una alta correlación negativa entre el porcentaje de formas anormales y el poder fecundante del semen (Fernández Abella, 2003).

El estudio de la morfología espermática ha utilizado tradicionalmente técnicas de tinción, entre las que destacamos la Eosina-nigrosina (Colas, 1980; Maxwell y Evans, 1990), cristal violeta (Carbonero, 1954; Derivauz, 1982;) y nitratos de plata (Cbinoy y col., 1992). La introducción de los sistemas CASA ha permitido realizar una evaluación morfométrica objetiva y cuantitativa del semen de diversas especies (Sancho y col., 1994; Gravance y col, 1995; Ball y Mohammed, 1995; Casey y col., 1997). Sin embargo, la fijación en suero salino formolado o en glutaraldehído al 2% en BL-I (sin tinción previa) y posterior observación en microscopio de contraste de fases, es el método más extendido para la detección rutinaria de formas anormales en animales domésticos (Memon y Ott, 1981; Volglmayr y col., 1983).

Se han establecido distintas clasificaciones de las anomalías espermáticas atendiendo a distintos criterios: a) dependiendo de si se originan en el testículo (primarias), a lo largo del tránsito epididimario o tras la eyaculación (secundarias) (Bloom, 1977; Barth y Oko, 1989); b) si están asociadas a infertilidad o no (mayores o menores, respectivamente) (Milovanov, 1938; Bloom, 1977); o c) de la región espermática implicada (anomalías de cabeza, pieza intermedia o cola). Cualquier anomalía, primaria o secundaria, si afecta a un número elevado de espermatozoides, puede llegar a comprometer la fertilidad del semen.

#### Test de integridad de membranas:

##### Endosmosis o hipo-osmosis:

Esta prueba está basada en las propiedades físicas y bioquímicas de la membrana plasmática. La inclusión de células espermáticas en una solución hipo-osmótica provoca el paso del agua a través de la membrana desde el medio extracelular hacia el interior del espermatozoide hasta alcanzar su equilibrio osmótico (Eckert y col., 1989), observándose cambios morfológicos a nivel de la cola, la cual se curva. Si la membrana se ha vuelto altamente permeable por diversos daños, no se observan dichos cambios. Es indicativo de la de la permeabilidad y resistencia de la membrana plasmática al medio, estando correlacionada positivamente con la fertilización del ovocito "in vitro" en semen fresco (Hauser y col., 1992). Se observan cambios en el porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva tras exponer a las células espermáticas a procesos de refrigeración, congelación y capacitación (Vázquez y col., 1989; Garde 1992; Donoghue y col., 1996; Correa y col., 1996).

La prueba de endosmosis consiste en evaluar después de incubar a 37°C durante 30 minutos al semen en un medio hipotónico, el cual en la especie ovina oscilan entre 75 (Vázquez, 1980) y 150 mOsm/Kg (Watson y Duncan, 1988), habiéndose observado que por debajo de dichas presiones los "lazos" formados en los flagelos se pierden al separarse de la membrana plasmática (Jeyendran y col., 1984). La identificación se puede hacer por microscopia de contraste de fases (Jeyendran y col., 1984), o con contadores electrónicos que clasifican los

espermatozoides de una muestra espermática en distintas subpoblaciones en función del tamaño (Vázquez, 1980).

Tinciones vitales: Actualmente existe toda una serie de técnicas destinadas a identificar espermatozoides vivos y muertos. Se han descrito numerosas tinciones basadas en la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática como por ejemplo la eosina/nigrosina (Colas, 1980) y Tripán Azul (Suttiyotin y Thawaiter, 1991), de tal manera que si el espermatozoide está vivo, la membrana celular actúa como barrera impidiendo el paso del colorante a través de ella, permaneciendo la célula sin teñirse.

#### Fluorocromos:

La introducción de la microscopia de fluorescencia en la determinación del estado vital del espermatozoide ha hecho aumentar la sensibilidad y resolución de las preparaciones destinadas a este fin, como es el caso de la utilización del naranja de acridina (Tejada, 1984; Hoshi y col., 1996) en la identificación del estado del ADN. Además, los fluorocromos permiten el conteo automatizado por citometría de flujo. El uso de fluorocromos integra el espectro de opciones para determinar diversos parámetros de la población espermática, ya que ligados a otras moléculas (aglutininas como el PNA y PSA) posibilitan la identificación de diferentes compartimentos y moléculas dentro de los espermatozoides. Otros atributos espermáticos que pueden ser evaluados a través de fluorocromos son la integridad de sus organelos como las mitocondrias, el acrosoma y su núcleo. Además, los fluorocromos permiten la evaluación de gran cantidad de células cuando se combinan con la citometría de flujo (Laguado, 2007; Martínez-Pastor y col., 2010).

#### Atributos asociados a la capacidad fecundante:

La fertilización *in vitro* (homóloga y heteróloga) también ha sido instrumento para la evaluación de la calidad espermática (García-Álvarez y col., 2009), así como la respuesta de los espermatozoides a proteínas solubilizadas de la zona pelúcida otros inductores (ionóforos) de capacitación y reacción acrosómica (Januskauskas y col., 1999).

#### Evaluación in vivo

El mejor sistema de estimar la fertilidad de los carneros, como en los demás mamíferos es la evaluación de los datos de la propia fertilidad in vivo como resultado de la IA o la monta natural. Hemos de tener en cuenta que para usar el porcentaje de preñez como medida de la fertilidad potencial de un reproductor, es importante un número suficiente de hembras. Además, en la fertilidad final también juega la fertilidad de la hembra y el factor ambiental. Un gran número de factores, entre los que se incluyen: la estación reproductiva, el nivel de nutrición de la hembra y el número de partos. La acción de todos estos factores supone que en los estudios de fertilidad haya una alta variabilidad atribuible a la hembra y por tanto es necesario inseminar un número elevado de animales para poder alcanzar niveles de significación adecuados (Amann, 1989). Esto hace que los ensayos in vivo lleven asociados largos tiempos de estudio hasta obtener resultados. Durante este período de tiempo se pueden producir cambios sustanciales en la fertilidad del macho motivados por diversos factores.

## Conservación del semen

Desde los primeros intentos de conservación de semen llevados a cabo por Spallanzani en 1776, pasando por el descubrimiento del glicerol como crioprotector (Polge y col., 1949), hasta el día de hoy, se ha logrado el desarrollo de técnicas que permiten almacenar semen por largos periodos de tiempo. La necesidad de desarrollar programas de mejoramiento genético así como facilitar el transporte de semen de diferentes centros de colección hasta los sitios de inseminación han estimulado la investigación en la conservación de semen de carnero.

La conservación de espermatozoides requiere de una reducción del metabolismo celular con el fin de prolongar su vida útil, esto se logra mediante la disminución de la temperatura espermática y el uso de sustancias protectoras que minimizan el daño celular (Evans y Maxwell, 1987). Se han desarrollado diferentes sistemas de conservación para corto, mediano y largo plazo. Para corto y mediano plazo se aplica la conservación del semen líquido a temperatura ambiente (enfriado) o a bajas temperaturas (refrigerado, Santiago Moreno y col., 2015).

Se han realizado investigaciones con semen fresco diluido y conservado a bajas temperaturas en las que se ha logrado buenos resultados. Sin embargo la congelación a muy bajas temperaturas ha demostrado ser el método más eficaz para la conservación del semen, logrando mantenerlo viable y funcional indefinidamente. Para la conservación a largo plazo se aplica la congelación tradicional, o la vitrificación o congelación ultrarrápida (Santiago Moreno, y col., 2015).

### *Criopreservación del semen*

#### Objetivo de la criopreservación

El objetivo principal de la criopreservación es el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular por un período prolongado de tiempo. Para lo cual, es necesario mantener el semen a temperaturas inferiores a  $-130^{\circ}\text{C}$  para detener completamente los procesos metabólicos (Medeiros y col., 2002). La supervivencia a la congelación es el producto de numerosos factores que interaccionan entre sí (Boiso, 2001). La criopreservación de cualquier material biológico se efectúa indispensablemente dentro de una solución que otorgue propiedades físico químicas favorables para la sobrevivencia durante la congelación y descongelación (Vila, 1984).

#### Ventajas

La criopreservación de semen de animales domésticos ofrece muchas ventajas en los sistemas de producción, particularmente en los programas de mejoramiento genético. El proceso de criopreservación produce un daño celular que disminuye el porcentaje de espermatozoides viables (Quinn y col., 1969). Consecuentemente, es de esperar que cuando se utiliza la inseminación artificial con semen congelado la fertilidad obtenida es menor en comparación a cuando se utiliza semen fresco (Watson, 2000).

### Desventajas

Los resultados de fertilidad obtenidos con semen congelado son inferiores a los encontrados en semen refrigerado, existiendo grandes variaciones dependiendo de la vía y sitio de inseminación, composición del diluyente, calidad del semen y su tratamiento, momento de la inseminación, estación del año y raza.

#### *Estrés espermático en la congelación*

En la fase inicial de la refrigeración, previa a la congelación, la temperatura de la suspensión espermática se reduce desde valores fisiológicos hasta valores ligeramente por encima de los 0 °C. Este cambio térmico va a poner de manifiesto la extrema sensibilidad de los espermatozoides, sobre todo, a los descensos bruscos de temperatura, más conocidos como “shock por frío” (Parks, 1992) o a los debidos a la temperatura final alcanzada, denominados como “daño por enfriamiento extremo” (“chilling injury”) (Watson, 1990, 1995). Así, el espermatozoide manifiesta pérdida de la integridad de membrana y de las funciones celulares al ser enfriado rápidamente en el rango de 20 a 0 °C, aunque por lo general, el daño resulta más severo entre 12 y 2 °C (Watson, 1995).

### Estrés osmótico

La cristalización en el medio extracelular da lugar a hielo puro, dejando los solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida. Este proceso recibe el nombre de crio-concentración del medio. La fracción líquida se hace hipertónica y en respuesta a la diferencia de gradientes de concentración, la célula se deshidrata (Boiso, 2001). Al ocurrir la cristalización, hay una liberación de energía en forma de calor latente de solidificación. Esto eleva transitoriamente la temperatura de la solución, y la disminución rápida de la temperatura resulta perjudicial para las células (Boiso, 2001). El punto eutéctico refleja la máxima concentración de solutos que puede alcanzarse justo antes que el agua y los solutos se solidifiquen conjuntamente (Grossmann y col., 1991). Cuando la temperatura baja hasta alcanzar el punto eutéctico, la fracción no congelada y los solutos se solidifican (Vila y Carretero, 1985).

Trabajos recientes manifiestan que el principal efecto del cristal, son los daños osmóticos, relacionados con las trabéculas entre cristales donde se concentran los solutos que se excluyen del cristal de hielo durante la congelación, y donde se disponen los espermatozoides, los cuales responden deshidratándose, para poder lograr el equilibrio osmótico con el medio extracelular (hiperosmótico), las características de estas trabéculas y la concentración de los solutos, dependen de la los cristales de hielo (característica y tamaño) (Santiago-Moreno y Galazar, 2019). Cuanto mayor sea la velocidad de enfriamiento, más pequeños serán los cristales de hielo. (Bóveda y col., 2018).

Se ha propuesto, entonces, que las membranas se desestabilizan inicialmente durante la etapa de congelación, tanto por efecto de las bajas temperaturas como por la exposición a altas concentraciones salinas, y ello resulta en una degeneración pos-descongelación, al combinarse nuevamente efectos letales de naturaleza térmica y osmótica (Holt y North, 1994).

### Shock térmico

La respuesta de los espermatozoides a los procesos de congelación descongelación varía entre las especies (Fiser, 1989), e incluso entre individuos dentro de una misma especie. Esto parece ser debido a diferencias en la composición de las membranas, lo cual determina requerimientos específicos entre especies en la composición de los diluyentes.

Es así que algunos componentes, como son los fosfolípidos y los ácidos grasos de la membrana espermática, son importantes en el grado de susceptibilidad de los espermatozoides de las distintas especies al choque térmico (Poulos y col., 1973; Darin-Bennett y col., 1974 y 1977). De hecho, espermatozoides de toro, cerdo y carnero, conocidos por su elevada susceptibilidad al choque térmico, presentan una elevada relación entre ácidos grasos poliinsaturados y saturados de aproximadamente 2,5 - 3,3, mientras que espermatozoides del hombre presentan una relación de 1. Dicha relación tiene un efecto significativo en algunas propiedades de los sistemas de membrana y está correlacionado con la sensibilidad del espermatozoide al choque térmico (Poulos y col., 1973). El choque térmico resulta de alteraciones en la organización de los lípidos de la membrana del espermatozoide o fases de transición lipídica (Drobnis y col., 1993). A la temperatura fisiológica, los fosfolípidos de membrana están en un estado fluido y sus cadenas de ácidos grasos son flexibles (De Leeuw y col., 1990). Cuando la temperatura de la membrana disminuye por debajo de la temperatura de transición de cada uno de los fosfolípidos individuales que la componen, éstos sufren la fase de transición termotrópica del estado líquido-cristalino al estado gel, comenzando a juntarse (Quinn, 1989). Concretamente, las cadenas de ácidos grasos toman rigidez y se aíslan en dominios de gel, de los cuales son excluidas las proteínas de la membrana que se concentran en áreas fluidas (De Leeuw y col., 1990). Este fenómeno afecta las funciones de las proteínas, por ejemplo, en los canales proteicos iónicos (Watson, 2000).

Además, durante la fase de enfriamiento hasta 5 °C, se han detectado cambios similares a la capacitación o "criocapacitación", siendo uno de los procesos responsables de las alteraciones morfofuncionales que sufren las células espermáticas. Los espermatozoides ovinos luego del proceso de congelamiento descongelamiento muestran un alto porcentaje de capacitación en comparación con espermatozoides de semen fresco (Maxwell y Watson, 1996; Pérez y col., 1996). En ese sentido, el porcentaje de espermatozoides capacitados en semen fresco varía entre 5 a 20%, mientras que en espermatozoides descongelados el porcentaje de capacitación puede llegar hasta 90% (Pérez y col., 1996), aunque varía entre 40 a 60% (Gil y col., 2000, 2003a, 2003b). *In vitro*, la capacidad fecundante de los espermatozoides ovinos descongelados está lista, mientras que los espermatozoides del semen fresco recién eyaculado requieren sobrellevar el proceso de capacitación (Gillan y Maxwell, 1999). Tanto en la capacitación fisiológica como en la criocapacitación, el resultado final va a ser la desestabilización de la membrana plasmática y la reacción acrosómica (Green y Watson, 2001). Tras la capacitación, el espermatozoide va a sufrir una drástica reducción de su vida útil, y en el caso de los espermatozoides criocapacitados una disminución manifiesta de su fertilidad, al sufrir dicho cambio fuera del aparato reproductor de la hembra (Green y Watson, 2001; Kaneto y col., 2002).

### Estrés oxidativo

Como ya ha sido mencionado previamente, cada uno de los pasos del proceso de crioconservación reduce la viabilidad y aumentan los fallos en la funcionalidad de los espermatozoides supervivientes (Parinaud y col., 1997; Chatterjee y Gagnon, 2001; Kankofer y col., 2005) que disminuyen su potencial fecundante. Estos daños son también debidos, en parte, al estrés oxidativo (Álvarez y Storey, 1992; O'Flaherty y col., 1997; Chatterjee y Gagnon, 2001) como ha sido demostrado en espermatozoides del carnero (Peris y col., 2007).

El estrés oxidativo es provocado por la formación de gran cantidad de especies reactivas al oxígeno (ROS) o moléculas que contienen radicales libres, debido a un mecanismo antioxidante deteriorado (Sikka, 2001; Agarwal y col., 2003). La concentración de ROS y de espermatozoides muertos se encuentran directamente relacionada, a medida que aumenta el primero, aumentan los espermatozoides muertos. (Peris y col., 2007; Bucak y col., 2009). El mecanismo de defensa contra la peroxidación de lípidos en el semen, es importante para el mantenimiento de la motilidad y viabilidad espermática (Bilodeau y col., 2001; Gadea y col., 2004). Sin embargo, esta capacidad antioxidante puede ser insuficiente para prevenir la peroxidación de lípidos durante el proceso de congelación/descongelación o verse reducida por efecto de la dilución del semen, ya que el plasma seminal también interviene en el mantenimiento del equilibrio entre la generación de ROS y su neutralización. En trabajos realizados con eyaculados de carnero, se observa que tras el proceso de congelación y descongelación, entre el 40 y 60 % de los espermatozoides preservan su motilidad, siendo apenas un 20-30% que se mantienen biológicamente íntegros.

### Curva térmica

La velocidad de congelamiento es un factor importante en la criopreservación. Cuando la velocidad de congelamiento es muy rápida, la célula no es capaz de deshidratarse lo suficiente (Boiso, 2001). Consecuentemente, se produce una inadecuada deshidratación y el agua que aún se encuentra en el interior de la célula forma cristales de hielo, que tienen un efecto letal para la célula (Mazur, 1984). Por el contrario, si la velocidad es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiendo llegar al colapso celular (Boiso, 2001), lo que lleva a la alteración de las proteínas, lípidos de membrana y formación de especies reactivas al oxígeno, con la consecuente peroxidación de la membrana lipídica (Katkov y Bolu, 2012). La deshidratación severa produce la desnaturalización de macromoléculas y una reducción excesiva del tamaño celular hasta el colapso irreversible de la membrana plasmática (Mazur, 1984). Por tanto, la velocidad de congelamiento debe ser lo suficientemente rápida para reducir el tiempo de exposición del espermatozoide a condiciones hiperosmóticas y al mismo tiempo, debe ser lo suficientemente lenta para permitir que ocurra la deshidratación celular. La supervivencia celular será máxima a una velocidad de congelamiento adecuada, que es específica para cada tipo celular. (Holt, 2000). La velocidad de congelamiento es de considerable importancia durante el "rango crítico de temperatura", definido como el período donde ocurre la formación de cristales de hielo y la consecuente deshidratación celular (Kumar y col., 2003).

Se considera, que el verdadero desafío al que se enfrenta la célula en el proceso de criopreservación lo constituye una franja de temperaturas de -10 a -25 °C, la cual afecta negativamente a su integridad, y por la que deben pasar en dos ocasiones, una vez durante el enfriamiento y otra durante la descongelación (Mazur, 1984).

### Diluyentes y función

Los diluyentes de semen para la criopreservación están compuestos por diferentes sustancias que cumplen las siguientes funciones: a) proveer nutrientes como fuente de energía, b) proteger a los espermatozoides del efecto dañino del enfriamiento, c) mantener un adecuado equilibrio del pH, d) mantener una adecuada presión osmótica y balance electrolítico, e) inhibir el crecimiento bacteriano, f) incrementar el volumen del semen para que pueda ser usado para múltiples inseminaciones y g) proteger a los espermatozoides durante el congelamiento (Háñez, 2000).

La mayoría de los diluyentes recomendados para la crioconservación del semen ovino son hipertónicos con respecto al plasma seminal (Watson, 1979; Fiser y col. 1981; Fiser y Fairfull, 1989). Estos diluyentes producen menos lesiones que los isotónicos (Mann, 1964), ya que inducen mayor deshidratación de la célula y en consecuencia reducen el volumen de agua intracelular y por tanto el hielo formado durante la congelación (Watson, 1979). Las tasas de supervivencia espermática pos-descongelación son superiores a las que se obtienen con medios isotónicos (Fiser y col., 1981).

### *Sustrato energético*

Para proveer energía al espermatozoide, los diluyentes de semen deben incluir azúcares del tipo monosacáridos, siendo lo más utilizados: glucosa, fructosa, lactosa y rafinosa (López Pérez, 1987; Fernández Abella, 1987). La principal fuente de energía para los espermatozoides es la fructosa, siendo el único carbohidrato presente en el semen ovino. Sin embargo, los espermatozoides también pueden metabolizar otros monosacáridos como la glucosa y manosa (Garner y Hafez, 2000). Estos carbohidratos además de proveer una fuente de energía, colaboran en el control de la presión osmótica, produciendo un medio hipertónico, causando la deshidratación de las células antes de la congelación, sugiriendo una mayor eficacia de los disacáridos frente a los monosacáridos (Aisen y col., 2002, Aboagla y Terada, 2003).

Según Molinia y col., (1994b) no existe diferencia entre el monosacárido utilizado para la criopreservación de semen.

### *Agentes crioprotectores*

Los agentes crioprotectores son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada (García y Vila, 1984), previniendo de esta forma el estrés osmótico. El descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará la máxima concentración de solutos a una menor temperatura, de forma que los espermatozoides estarán más deshidratados y el estrés osmótico al que

estarán sometidos será menor (Boiso, 2001). De esta manera, los agentes crioprotectores previenen la formación de hielo intracelular debido a la mayor deshidratación celular (Medeiros y col., 2002). Los crioprotectores se clasifican en dos grandes grupos: crioprotectores permeantes y no permeantes, de acuerdo a la permeabilidad a través de la membrana plasmática del espermatozoide (Boiso, 2001).

### Glicerol

El descubrimiento del glicerol como agente crioprotector se debe a Polge y col. (1949) y ha marcado un avance notable en la preservación del semen por medio de la congelación. El glicerol es el agente crioprotector permeante más usado en los protocolos de criopreservación de semen en las diferentes especies (Maxwell y Watson, 1996; Curry, 2000; Salamon y Maxwell, 2000; Bittencourt y col., 2004).

Esta sustancia ocupa simultáneamente la membrana y los compartimentos extra e intracelulares (Mazur, 1984). Sin embargo, Amann y Pickett (1987), así como Almlid y Johnson (1988), sugieren que su principal efecto crioprotector se ejerce a nivel extracelular. Su función a este nivel consiste en aumentar el volumen del medio extracelular y la proporción de agua en estado de no-congelación, haciendo disminuir las concentraciones de los electrólitos y por tanto, minimizando los “efectos de solución” (Mazur, 1984). Además, y mediante la estimulación osmótica de la deshidratación celular, el glicerol consigue disminuir el volumen del agua intracelular disponible para congelarse (Medeiros y col., 2002). Los efectos sobre la osmolaridad celular no son los únicos, el glicerol también parece ejercer un efecto directo en la membrana plasmática (Parks y Graham, 1992).

La mayoría de trabajos utilizan el glicerol en concentraciones entre 6 a 8% (Hellemann y Jara, 1997; Gil y col., 2000, 2003a, 2003b; El-Alamy y Foote, 2001). En un diluyente en base a Tris, la mejor motilidad post descongelamiento se obtiene con 6% de glicerol (Molinia y col., 1994a). Se ha sugerido que la concentración óptima de glicerol en el diluyente está relacionada a su concentración final en el espermatozoide (Salamon y Maxwell, 2000).

La mayoría de protocolos de congelamiento de semen ovino prefiere la adición del glicerol a los 5°C para evitar sus efectos tóxicos (Colas, 1975; Salamon y Maxwell, 2000), ya que a los 30°C la membrana espermática es más permeable y por lo tanto tiene un mayor efecto tóxico (Gao y col., 1997). Se presenta mayor reacción del acrosoma y mayor cantidad de espermatozoides capacitados cuando el glicerol se adiciona a los 15°C en comparación con la adición a los 5°C (Gil y col., 2003b). Singh y col. (1995) sostienen que la combinación de la lactosa con el glicerol, tiene un mejor efecto crioprotector que cuando se emplea únicamente glicerol. Esto puede deberse a la deshidratación producida por el efecto hipertónico de la lactosa (Aisen y col., 1990; 1995).

### Yema de huevo

La yema de huevo es un componente básico que está presente en casi todos los diluyentes para refrigeración y congelación, cuyas características protectoras contra el frío son conocidas desde los trabajos en 1940 de Phillips y Lardy, que comunicaron los efectos beneficiosos de la inclusión de yema de huevo en los

diluyentes usados para conservar espermatozoides bovinos a 5 °C. Su composición es una mezcla compleja compuesta principalmente de 68 % de lipoproteínas de baja densidad (LDL), 16 % lipoproteínas de alta densidad (HDL), 10 % de levetelinas y 4 % fosfivitinas (Dauphas y col., 2006). Para proteger a los espermatozoides del efecto dañino del enfriamiento y descongelamiento, se incluyen en los dilutores de semen a la yema de huevo (Watson, 1975; Watson y Martín, 1975; Salamon y Maxwell, 2000). Algunos fosfolípidos de la yema de huevo protegen la membrana espermática (Watson, 1981) al unirse a su superficie (Watson, 1975). De esta manera, la yema de huevo previene el daño peroxidativo (Jones y Mann, 1977).

Gil y col. (2003b) evaluaron diferentes concentraciones (entre 5 a 20 %) de yema de huevo en un diluyente a base a leche descremada. Ellos encontraron que el aumento en la concentración de yema de huevo en el diluyente no mostraba efectos favorables. Con respecto a dilutores en base a Tris, Molinia y col. (1994b) demostraron que con 18% de yema de huevo se obtienen mejores porcentajes de motilidad post descongelamiento. El-Alamy y Foote (2001) encontraron que concentraciones mayores a 20 % de yema de huevo tiene un efecto negativo en la motilidad espermática. Actualmente, se utilizan concentraciones entre 10 a 20% de yema de huevo para congelar semen ovino (Molinia y col., 1994a; Aisen y col, 1995, 2000, 2002; Hellemann y Jara, 1997; Gil y col., 2000; El Alamy y Foote, 2001).

Algunos autores están utilizando la yema de huevo clarificada, la cual se obtiene a través de un proceso de centrifugación de la yema de huevo fresco con la finalidad de separar sus dos fracciones principales: los gránulos y el plasma (yema de huevo clarificada), el cual se compone principalmente de 85 % de LDL y 15 % de livetelinas (Anton y col., 2003). La yema de huevo clarificada ha sido utilizado como crioprotector no penetrante en diluyentes para semen de caballo (Pillet y col., 2011), y de toro (Moussa y col., 2002), beneficiando la viabilidad espermática post-descongelación, por su alta concentración de LDL y por la eliminación de 32 de los componentes de la yema de huevo (gránulos y minerales) que se adhieren a la membrana y que tiene un efecto negativo en la motilidad y respiración espermática (Pace y Graham, 1974).

#### *Efecto buffer*

El pH óptimo varia con la temperatura de conservación y con los otros componentes del diluyente, de forma tal que el óptimo para un tampón fosfato es de 7,5 y para los diluyentes en base Tris y citrato es de 6,5-7,0 (Salisbury y col., 1978).

#### Leche

La leche de vaca, es utilizada para diluir semen de diferentes especies (Foote y col., 1993; 2002; Salamon y Maxwell, 2000; El Alamy y Foote, 2001; Paulenz y col., 2002; Gil y col., 2000; 2003a, 2003b; Santiani, 2003). Las proteínas de la leche actúan como amortiguadores contra cambios de pH y como agentes quelantes contra cualquier metal pesado presente (Salamon y Maxwell, 2000). La caseína, la principal proteína de la leche, también tiene un efecto antioxidante (Foote y col., 2002), y por tanto confiere protección a los espermatozoides durante la reducción de temperatura (Salamon y Maxwell, 2000). Sin embargo, otra proteína presente en la leche, la lactenina, es tóxica para los espermatozoides (Salamon y Maxwell, 2000), es por lo

que se recomienda calentar la leche previamente a temperaturas superiores a los 90°C, lo cual inactiva a esa proteína (Salamon y Maxwell, 2000; El-Alamy y Foote, 2001; Paulenz y col., 2002; Gil y col., 2003a, 2003b). El uso de leche tratada con altas temperaturas (UHT) es muy recomendado por su condición de esterilidad y por no requerir calentamiento previo (Salamon y Maxwell, 2000). Algunos estudios indican que no existen diferencias entre utilizar leche entera pasteurizada y leche descremada (Gil y col., 2000, 2003a, 2003b; El-Alamy y Foote, 2001; Paulenz y col., 2002).

### Tris

El Tris por su capacidad amortiguadora, osmótica y el ser de baja toxicidad, aun en altas concentraciones, es empleado en la criopreservación de semen para, entre otros aspectos, neutralizar los productos de desecho resultantes del metabolismo de los espermatozoides, y en particular al ácido láctico (Salamon y Maxwell, 1995). Los espermatozoides ovinos toleran un rango de concentraciones entre 100 a 400 mM (Salamon y Visser, 1972; Molinia y col., 1994b). En relación a los resultados obtenidos con diferentes concentraciones de Tris (100, 150, 200, 250 y 300 mM) en la criopreservación de semen de carnero, se ha encontrado una mejor motilidad progresiva a 150 mM (41 %) (Molinia y col., 1994b).

Por otro lado, Gil y col (2000) obtuvieron mejores resultados al emplear un medio en base a leche descremada (46.5 %) en comparación a otro en base a Tris (33.7 %).

### *Mantener una adecuada presión osmótica y balance electrolítico*

Por tal motivo se debe tener en cuenta la osmolaridad del diluyente porque esta afecta a la calidad espermática luego del descongelamiento. Se han obtenido buenos resultados post descongelamiento en medios con una osmolaridad entre 300 a 360 mOsm/kg (Molinia y col., 1994c) o entre 450 a 750 mOsm/kg (Fiser y col., 1981). La integridad de la membrana plasmática resiste hasta 1000 mOsm/kg en condiciones hiperosmóticas. No obstante, la motilidad y la integridad de membranas de los espermatozoides descongelados se alteran a niveles superiores a 600 mOsm/kg (Curry y Watson, 1994).

### *Control de proliferación bacteriana*

Para controlar la proliferación microbiana se utilizan distintos antibióticos, la asociación de penicilina y estreptomocina es uno de los más utilizados en ovinos (Evans y Maxwell, 1989).

### Protocolo de criopreservación ovina

Para la criopreservación del semen de carnero, el enfriamiento se da en dos fases, en la primera el semen diluido es enfriado hasta temperaturas de 5°C, para luego, en una segunda fase que permite la estabilización del semen diluido con la adición de sustancias crioprotectores (Salmon y Maxwell, 2000).

El período de disminución de temperatura de 35 a 5°C se da entre a 0,5 a 3 horas (Molinia y col., 1994a, 1994b; Gil y col., 2003a, 2003b) y tiene por finalidad el reducir la motilidad espermática (Fiser y Fairfull, 1986), como consecuencia de una

reducción del metabolismo del espermatozoide. Para permitir la estabilización celular, se mantiene el semen a 5°C por un período de 0,5 a 1,5 horas antes de iniciar el congelamiento (Molinia y col., 1994a, 1994b; Aisen y col., 2000). Por otro lado, Santiani (2003) sostiene que el estrés oxidativo se incrementa cuando se mantienen los espermatozoides a 5°C por períodos más prolongados, produciéndose una peroxidación lipídica de las membranas. Según Byrne y col. (2000), la velocidad de congelamiento de 5°C/minuto entre 5 a -25°C y 50°C/minuto entre -25°C a -130°C con posterior inmersión en nitrógeno líquido produce la mejor viabilidad en espermatozoides ovinos.

Santiago-Moreno y Galarza (2019) propusieron recientemente una rampa bifásica de 5 a -10 a una velocidad de 5°C/min, y de -10 a -130°C, una velocidad de 60°C/min, lo que permite una buena preservación de las variables cinéticas, así como la integridad de las membranas plasmáticas, mitocondrial y acrosomal.

El proceso de congelamiento empieza cuando, el semen en pajuelas equilibrado a 5°C se expone a los vapores de nitrógeno líquido (Salamon y Maxwell, 2000). Durante este proceso se atraviesa el "rango crítico de temperatura", que en el caso de espermatozoides ovinos, se produce entre los -10°C a -25°C (Salamon y Maxwell, 1995), tanto al congelar como al descongelar, y no durante el almacenamiento en nitrógeno líquido (Mazur, 1965). La reducción de la temperatura a 5°C/minuto durante el rango crítico durante el congelamiento parece ser la velocidad óptima de congelamiento del semen ovino. Otros sostienen que manteniendo las pajuelas 8 cm encima de nitrógeno líquido también permite reducir la temperatura dentro de las pajuelas a -150°C en 15 minutos (El-Alamy y Foote, 2001).

#### Descongelación espermática

El proceso de descongelar el semen, es tan importante como el congelamiento, ya que los espermatozoides deben atravesar nuevamente el rango crítico de temperatura (Salamon y Maxwell, 2000). Por lo tanto, la velocidad de descongelación óptima debe minimizar los daños que se producen durante esa etapa, para evitar una inapropiada velocidad de transporte de solutos y agua a través de las membranas, así como el agrupamiento de microcristales intracelulares y crecimiento de hielo (Hammerstedt y col., 1990). Holt y col. (1992) comprobaron la aparición de alteraciones en la membrana plasmática que se manifestaban sólo durante esta etapa, y para las que sugirieron un mecanismo causal basado en el fenómeno de transiciones de fase de los lípidos de membrana, resaltando así la importancia de la descongelación en el ciclo de criopreservación.

En la mayoría de trabajos, la descongelación de pajuelas de semen ovino se ha realizado en baño maría a una temperatura que oscila entre 37-50°C por un período que va desde algunos segundos hasta 5 min. (Fiser y col., 1981; Molinia y col., 1994a, 1994b; Gil y col., 2000, 2003b; El-Alamy y Foote, 2001; Kumar y col., 2003). Por otro lado, el descongelamiento a una temperatura menor a 37°C previene el estrés osmótico y mantiene la integridad de membrana en espermatozoides bovinos (Correa y col., 1996).

## Adición de plasma seminal (PS)

A partir de los estudios realizados por Bedford y Chang (1961) en eyaculados frescos de conejo, se determinó que el PS podía revertir los cambios generados en los espermatozoides por la capacitación, y como consecuencia de ello prolongar la vida media y la funcionalidad del espermatozoide. Así surgió la hipótesis que la resuspensión de espermatozoides congelados/descongelados en PS podría revertir los cambios ocasionados por la congelación (criocapacitación). El agregado de PS al medio de descongelación tuvo un efecto favorable en la estabilización e integridad de las membranas plasmáticas y acrosomales y permitió mejorar las tasas de movilidad espermática en ovinos (Maxwell, y col., 1999; Domínguez, M. y col., 2008). Existe evidencia de que el PS puede prevenir (Perez Pé y col., 2001) o aún revertir (Barrios y col., 2000) los daños provocados por el enfriamiento o choque frío. El agregado de PS a los diluyentes incrementa la capacidad de los espermatozoides ovinos para penetrar el moco cervical *in vitro* (El-Hajj Ghaoui y col., 2007a, 2007b), así como la fertilidad del semen congelado-descongelado (Maxwell y Johnson, 1999). También se ha observado que aumenta la motilidad, la viabilidad, la integridad acrosómica y la actividad respiratoria de las mitocondrias de espermatozoides de carneros (Maxwell y col., 2006). Pérez Pé y col. (2002) reportaron que el PS reduce la fosforilación de la tirosina, asociado a los procesos de criocapacitación, es decir actuaría como factor decapacitante.

A pesar de los resultados *obtenidos in vitro*, los estudios de fertilidad *in vivo* con semen congelado/descongelado tratados con PS son escasos y contradictorios (Tabla 5). El agregado de 20% de PS a espermatozoides congelados/descongelados y depositados en el cuello uterino, posibilitó la obtención de tasas de gestación similares a las que se pueden obtener con semen fresco (50-60%) (Maxwell y Johnson, 1999; Domínguez, M y col., 2008). En otro trabajo, en el cual se agregó 30% de PS al semen de carnero refrigerado durante 24hs en una dilución en base Tris-yema de huevo, aumento casi un 20% la tasa de preñez en ovejas inseminadas transcervical (López Pérez y Pérez-Clariget, 2012). Sin embargo, O' Meara y col. no hallaron diferencias en los porcentajes de preñez en hembras inseminadas vía cervical con semen criopreservado tratado con PS. Estos autores postularon que la diferencia observada podría deberse a los métodos de preparación y selección espermática utilizados. Los trabajos en los cuales se reportó un efecto positivo sobre las tasas de preñez, emplearon en la inseminación artificial únicamente la población de espermatozoides móviles. Estos gametos fueron obtenidos a través de un procedimiento que implica, no solo la eliminación de los espermatozoides inmóviles, sino también la eliminación parcial o total del diluyente, facilitando de esta manera que las moléculas del PS interactúen con la membrana plasmática de los espermatozoides. Por otro lado, no debemos descartar que las diferencias individuales en la composición del PS modifiquen su efecto sobre los espermatozoides criopreservado, y de esta manera ser las causantes de las discrepancias en los resultados reportados (Muiño-Blanco y col., 2008).

Estudios indican que la suplementación de los espermatozoides de carnero con proteínas del PS antes del congelamiento mejora la viabilidad al post descongelado, observando un mayor efecto protector cuando el PS es colectado en la estación reproductiva y cuando la suplementación de las proteínas es directa al eyaculado. La menor protección observada cuando se agregan las proteínas al criodiluyente podría deberse a la unión de las mismas a la yema de huevo

disminuyendo su disponibilidad para unirse a las membranas espermáticas (Leahy y col. 2010). En otro trabajo se adicionó PS colectado en diferentes estaciones (otoño – invierno, primavera y verano) a muestras congeladas/descongeladas, es decir, la adición del mismo fue luego de descongelar las muestras (Domínguez y col., 2008). Estos autores observaron que el PS de otoño e invierno mejoraron la movilidad de los espermatozoides de carnero criopreservados. Esto podría deberse a la mayor cantidad de proteínas y diferente composición del PS colectado en otoño (Domínguez y col., 2008), reforzando la idea de que el PS es diferente de acuerdo a la estación del año.

Tabla 5 Porcentaje de fertilidad en ovejas inseminadas por vía cervical con semen ovino congelado-descongelado al que se le agrego plasma seminal (Ledesma y col., 2015).

PS (%)	Momento de agregado de PS	Ovejas inseminadas (Nº)	Ovejas preñadas (%)	Ovejas inseminadas Grupo control* (Nº)	Ovejas preñadas Grupo control* (%)	Referencia
20	Luego de la descongelación	92	51	94	28 <sup>B</sup>	Maxwell y col. (1999)
50	Antes de la congelación	30	86,6 <sup>A</sup>	30	76,6 <sup>B</sup>	Belibasaki y col. (2000)
20	Luego de la descongelación	72	31,4 <sup>A</sup>	72	17,4 <sup>A</sup>	O' Meara y col. (2007)

\*Grupo control: ovejas inseminadas con semen sin el agregado de PS.

AB Letras diferentes por filas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0,05$ ).

#### Adición de diferentes fracciones del plasma seminal

Los efectos beneficiosos del tratamiento con PS sobre el semen de carnero, han sido atribuidos a proteínas que se encuentran en el PS de esta especie (Leahy y col. 2010), las cuales en su mayoría son secretados por las vesículas seminales (Mann, Lutwak-Mann. 1981). En estudios posteriores se observó que el agregado de las proteínas del PS al medio de descongelación fue capaz de revertir los efectos perjudiciales de la exposición a bajas temperaturas, recuperando la permeabilidad de las células intactas (Barrios y col., 2000). Asimismo, el agregado de las mismas proteínas en el medio de congelación fue capaz de prevenir los efectos de la criopreservación en las membranas espermáticas, manteniendo la viabilidad espermática (Pérez-Pé y col., 2001). Domínguez y col. (2008), determinaron que la composición proteica del PS difiere según la estación del año, siendo el PS colectado

en otoño el que posee la mayor capacidad de revertir los daños antes mencionados, en coincidencia con lo reportado por Cardozo y col. (2006). Este efecto fue relacionado tanto a la presencia de una mayor concentración de proteínas totales en el PS, como a una diferencia en su perfil proteico. Ledesma y col. (2012), identificaron un grupo de proteínas del PS que tiene la capacidad de interactuar con los componentes de la membrana plasmática de espermatozoides criopreservados. Estas proteínas, identificadas como lactotransferrin, epididymal secretory protein E1, Synaptosomal-associated protein 29 (SNAP-29) y RSVP20, demostraron ser capaces de mejorar la movilidad y la ultraestructura mitocondrial de los espermatozoides sometidos a los procesos de congelación y descongelación. SNAP-29 y RSVP20 representan el 30% del contenido total de proteínas del PS ovino.

Se han detectado pérdidas de ocho puntos de proteína en el espermatozoide congelado, lo que supone que estos polipéptidos deben haberse perdido como resultado del daño inducido por el proceso de congelación-descongelación (Cardozo y col., 2009). Observaciones de otros investigadores han evidenciado que las proteínas del plasma seminal se adsorben a la superficie de la célula espermática, modificando las características funcionales del espermatozoide deteriorado y reproduciendo aquéllas de la célula viva (García-López, 1996; Ollero y col., 1997; Barrios y col., 2000).

Cardozo y col. (2009) encontraron diferencias significativas en cuanto a la calidad espermática de semen congelado-descongelado cuando se le adiciona proteínas del PS ovinos.

Recientemente se pusieron en manifiesto la importancia de diferentes proteínas de membranas, relacionadas con la difusión del agua, denominadas acuaporinas (AQPs), estas tienen efectos beneficiosos en el proceso de congelación-descongelación (Wang y col., 2006), estas hacen de sustrato energético durante la maduración y almacenamiento espermático (Yeung, 2010). El número de AQPs identificadas hasta el momento en los espermatozoides varía según la especie; por ejemplo en espermatozoides humanos se han identificado cuatro (Laforenza et al., 2017). Las proteínas presentes en el PS son capaces de proteger y/o reparar, al menos parcialmente, algunos daños producidos por el frío en la membrana del espermatozoide ovino (Barrios y col., 2000; Pérez-Pé y col., 2001; Barrios y col., 2005), así como inhibir la capacitación espermática (Luna y col. 2016). Este efecto se le atribuye a dos fracciones proteicas del plasma seminal (Barrios y col., 2005; Fernández-Juan y col., 2006) compuestas principalmente por dos proteínas llamadas RSVP14 y RSVP20.

Bernardini y col. (2011) estudiaron el efecto de dos fracciones de plasma seminal, una con proteínas y otra fracción libre de proteínas. Determinaron que el tratamiento del semen con proteínas del PS, fue capaz de mantener la motilidad progresiva de los espermatozoides, logrando el mismo efecto que cuando se trata con el PS completo. No obstante, no se logra este efecto cuando la fracción carece de proteínas. En este trabajo se observó que el 50% de las células que interactuaron con proteínas del PS presentaron la membrana de la cabeza del espermatozoide y las mitocondrias intactas, con buena condensación nuclear.

## **HIPÓTESIS**

El tratamiento pos descongelación del semen de carnero con plasma seminal o fracciones del mismo mejora los parámetros de motilidad espermática.

El método de obtención del plasma seminal o fracciones del mismo, afecta diferencialmente el efecto sobre los espermatozoides descongelados.

## **OBJETIVOS**

### Objetivo generales

Estudiar el efecto de las proteínas del PS (PS entero y FR), el método de obtención (VA o EE), y el tiempo de contacto (15 y 45 minutos), sobre la cinética espermática del semen de carnero descongelado.

### Objetivos particulares

Estudiar el efecto en la cinética espermática, del PS entero y de la FR “in vitro” sobre la calidad espermática del semen de carnero post-descongelado.

Estudiar el efecto en la cinética espermática, del método de colecta (EE vs VA) del PS y FR en el semen de carnero post-descongelado.

Estudiar el efecto en la cinética espermática del tiempo de contacto (15 y 45 minutos) con el PS o FR, de los espermatozoides descongelados de carnero.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio se llevó a cabo en la “Estación Experimental Mario Alberto Cassinoni”, km 363 de la ruta 3, Paysandú. Para el mismo se contó con el aval de la CHEA (Protocolo N° 645).

### Diseño experimental

Se realizó un experimento para evaluar el efecto del tratamiento del semen ovino a la descongelación, con plasma seminal (PS) o la fracción retenida (FR) en los espermatozoides de carnero. El modelo fue factorial (2x2x2), para evaluar el efecto del tratamiento posdescongelado con proteínas del plasma seminal (PS o FR), ambos obtenidos por dos métodos de colecta (VA y EE), y dos tiempos de incubación en dichos tratamientos (15 y 45 min).

### Animales

Para este ensayo se utilizaron cinco carneros de raza Corriedale, reproductivamente aptos, previo examen andrológico completo y acostumbramiento a la rutina de extracción de semen con vagina artificial y electroeyaculador.

## Colecta y procesamiento del semen congelado

Se colectaron 2 eyaculados de cada carnero diariamente (4 días de congelación) mediante vagina artificial (siete colectas). Luego de su extracción, se evaluó la motilidad masal (escala 1-5, Evans y Maxwell, 1987), aprobando para su uso a los eyaculados con escala de MM de 4 y 5. La concentración se determinó mediante fotómetro (SpermaCue, Minitube, Alemania) usando eyaculados con más de  $2,5 \times 10^9$  espermatozoide/mL. Luego de estar aprobados los eyaculados, se realizó un pool con el semen colectado, al que se le adicionó a 37°C progresivamente el diluyente Triladyl® (Minitube, Alemania) preparado según recomendación del fabricante y clarificado por centrifugación (1000 g/20 min). La dilución final fue hasta una concentración de  $400 \times 10^6$  espermatozoide/ml. Luego de diluido, se envaso en pajuelas de 0.25 mL a temperatura ambiente (20°C), y se procedió a descender lentamente la temperatura hasta 5°C en una heladera (0,25°C/min). Tras llegar a 5°C se equilibró por 2 horas más, y se congeló en vapores de nitrógeno líquido a 4 cm sobre el nivel del nitrógeno durante 10 minutos para finalmente sumergirlo en el mismo y acondicionarlo en tanque hasta su posterior evaluación. Se procesaron siete partidas de congelación para su posterior tratamiento y evaluación.

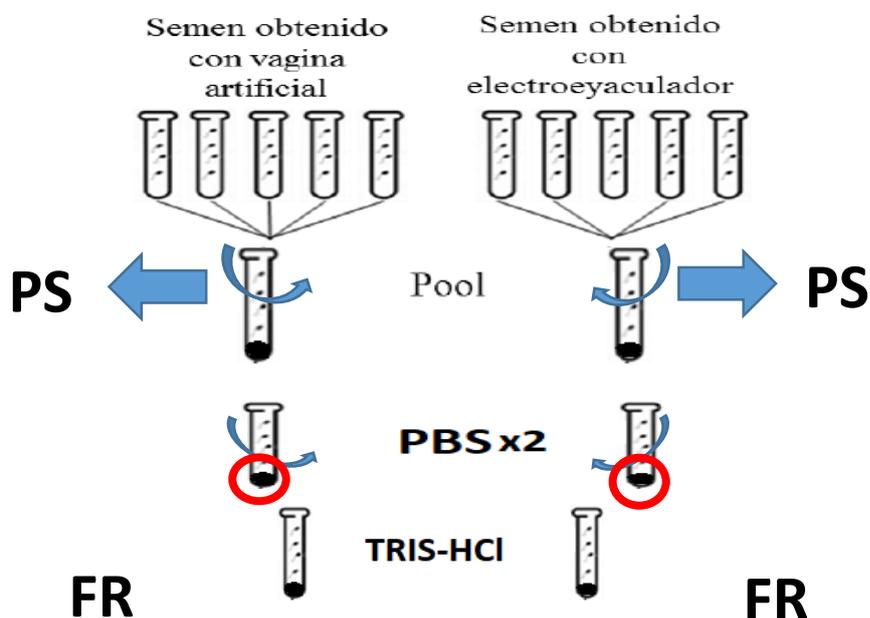


FIGURA: 1 Protocolo de obtención de diferentes fracciones del plasma seminal

### Obtención del plasma seminal

Se colectó semen de los mismos carneros donantes del semen congelado, alternando diariamente el método de colecta con VA o EE, realizándose tres extracciones con cada método. Para obtener el PS se centrifugó a 5°C a 10,000 g/15 min, el sobrenadante que surgió de este proceso se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El PS obtenido se almacenó en alícuotas a -85°C. Se obtuvo de ésta forma PS obtenido por VA (PSVA) y por EE (PSEE). El pellet compacto de espermatozoides de la primera centrifugación fue utilizado para obtener las proteínas de la FR (Figura N° 1).

### Obtención de fracción retenida

El pellet de spz. se resuspendió en PBS (pH 7, 1+9) luego de retirar el PS anteriormente descrito y se centrifugó a 5°C a 10.000 g/15 min, retirando el 90% del sobrenadante para eliminar residuos de PS, y se repitió el lavado. Para remover las proteínas del PS adheridas a los espermatozoides, se trató al pellet con los espermatozoides lavados con TRIS-HCl pH3 (buffer 10 mM glicina-HCl pH 3: glicina-ácido clorhídrico + 1.5 M cloruro de sodio). Se homogenizó durante 15 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 10,000 g/15 min y recuperó el 90% del sobrenadante al que se le llamó fracción de proteínas del plasma seminal retenida en las membranas de los espermatozoides (FR). Luego se neutralizó con 20µl de buffer 2M Tris-HCl pH 9, controlando el pH resultante a 7,5. Obteniéndose de ésta forma FR obtenido por VA (FRVA) y por EE (FREE) (Figura N° 1).

### Descongelación del semen

Para formar un pool de cada día de congelación, se descongelaron tres pajuelas en Baño de María a 37 °C durante 40 segundos. Luego se filtró en lana de vidrio estéril (con suficiente cantidad para una columna de 1 cm de lana comprimida en jeringas de 3 cc), para filtrar los espermatozoides muertos.

### Tratamientos pos-descongelado del semen

Se prepararon cinco alícuotas de 100 µL para cada uno de los siguientes tratamientos:

- 1-espermatozoides + 20 % v/v de PSVA
- 2-espermatozoides + 20% v/v de PSEE
- 3-espermatozoides + 20% v/v de FRVA
- 4-espermatozoides + 20% v/v de FREE
- 5-espermatozoides + PBS (control pH 7)

Posteriormente se homogeneizaron e incubaron a 37°C en baño maría durante 45 min.

## Evaluación del semen pos-descongelado

Se homogeneizó la muestra incubada y se evaluaron alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  a los 15 y 45 minutos de su incubación, en un sistema CASA (Adrovision®, Minitube, Tiefenbach, Alemania), tomando cuatro campos al azar, acumulando 400 espermatozoides para su estudio (eliminado los registros sobre 400 células).

Las variables registradas (parámetros WHO, Figura 2) fueron:

- DSL: Distancia de la trayectoria de la línea recta (punto inicial al punto final de la secuencia evaluada).
- DCL: Distancia de la trayectoria circular (punto inicial al punto final de la secuencia evaluada).
- DAP: Distancia de la trayectoria promedio (punto inicial al punto final de la secuencia evaluada).
- VSL: Velocidad rectilínea ( $\mu\text{m/s}$ ): velocidad media medida en una línea recta desde el principio hasta el final de la trayectoria recorrida. Se determina como la distancia en línea recta entre el primero y el último punto de la trayectoria y da el espacio recorrido en el período de observación. Es siempre el menor de los tres parámetros de velocidad en cualquier espermatozoide.
- VCL: Velocidad curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ): velocidad media medida punto a punto sobre el recorrido de la cabeza espermática. Es la distancia total que la cabeza del espermatozoide cubre en el período de observación y es siempre el mayor de los tres parámetros de velocidad.
- VAP: Velocidad media ( $\mu\text{m/s}$ ): velocidad media del recorrido del espermatozoide. Se determina como la distancia que el espermatozoide ha seguido en su trayectoria durante el período de observación. Puede parecer similar a la VSL.
- STR: Índice de rectitud: estima la proximidad del recorrido seguido por las células espermáticas a una línea recta y se calcula como cociente entre la velocidad media medida en una línea recta desde el primer punto hasta el último de la trayectoria recorrida (VSL) y la velocidad media del recorrido del espermatozoide (VAP)  $\rightarrow (VSL / VAP) \times 100$ .
- WOB: Índice de oscilación (%): estima la relación entre la trayectoria recorrida por el espermatozoide y la oscilación de la cabeza espermática y se calcula como cociente entre la velocidad media del recorrido del espermatozoide (VAP) y la velocidad media medida punto a punto sobre el recorrido de la cabeza espermática (VCL)  $\rightarrow (VAP / VCL) \times 100$  (Quintero-Moreno y col., 2003).
- LIN: Índice de linealidad: estima la proximidad de las trayectorias de las células espermáticas a una línea recta. Se calcula como el cociente entre la velocidad media medida en una línea recta (VSL) y la velocidad media medida punto a punto a lo largo del recorrido (VCL)  $\rightarrow (VSL / VCL) \times 100$ .
- ALH: Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide.
- BCF (Hz): Frecuencia de batido del flagelo por segundo.

En base a estos parámetros registrados, se clasificaron los espermatozoides según sus parámetros de motilidad en cinco poblaciones diferentes siguiendo la configuración de la Tabla N° 6 (WHO, 2010 clasifico los espermatozoides en 3

categorías: motilidad progresiva (son espermatozoides que se mueven activamente, ya sea de forma lineal o en círculos grandes, independientemente de la velocidad), motiles no progresivos (todos los parámetros de motilidad con ausencia de progresión) e inmóviles.

Tabla 6 Parámetros de referencia del CASA para clasificar las poblaciones.

Población	VSL ( $\mu/s$ )	VCL ( $\mu/s$ )	ALH ( $\mu$ )	Radio ( $\mu$ )	Rotación ( $\mu$ )
<b>Inmóviles</b>	< 12	< 60	< 1,5	< 9	< 7
<b>Motilidad local</b>	< 48	< 60	> 1,5		
<b>Motilidad progresiva circular</b>	> 48	> 60	> 1,5	> 9 > 90	> 7
<b>Motilidad progresiva lenta</b>	> 48	< 90	> 1,5	> 90	> 7
<b>Motilidad progresiva rápida</b>	> 48	> 90	> 1,5	> 90	> 7

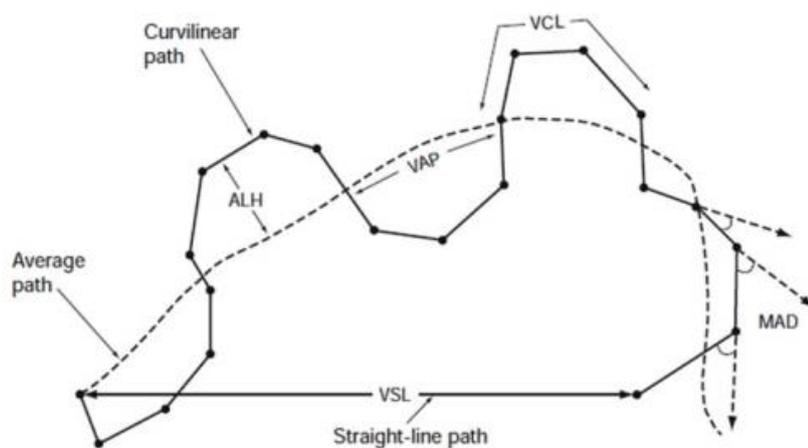


FIGURA 2 Variables cinemáticas de movilidad espermática medidas por los sistemas CASA (WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed.).

## Análisis estadístico

Para el análisis de la DAP, VCL, VSL, VAP, ALH y BCF se eliminaron las poblaciones Inmóviles y Motilidad Local. El modelo utilizado fue general lineal mixto para medias repetidas en el tiempo, tomando los efectos fijos del tratamiento con proteínas (PS y FR), método de obtención de las proteínas (VA y EE), y el tiempo de incubación (15 y 45 minutos). Se realizó el análisis utilizando el software InfoStat para el test de Fisher, con el procedimiento de corrección de valores de P por Sidak.

## RESULTADOS

La motilidad progresiva (media  $\pm$  error estándar) de las siete partidas de semen congelado (pooles iniciales de tres pajuelas luego de la descongelación y filtración, T<sub>0</sub> previo al tratamiento) fue de  $89,6 \pm 3,4$  con una concentración de  $49,05 \pm 16 \times 10^6$  spz./mL.

### Efecto del día de congelación:

El día de congelación fue una fuente de variación sobre algunas variables (Tabla 7). Los parámetros VAP, VCL, VSL, ALH y BCF tuvieron diferencias significativas entre el pool 3 y los restantes. Los restantes parámetros no difirieron significativamente entre días de congelación.

Tabla 7 Efecto del día de congelación sobre los parámetros en estudio.

Replicas	DAP	VAP	VCL	VSL	ALH	BCF
3	20,31 <sup>A</sup>	59,11 <sup>A</sup>	85,01 <sup>A</sup>	55,82 <sup>A</sup>	0,67 <sup>A</sup>	20,70 <sup>A</sup>
6	16,18 <sup>A</sup>	40,74 <sup>AB</sup>	59,87 <sup>AB</sup>	38,54 <sup>AB</sup>	0,50 <sup>B</sup>	14,06 <sup>B</sup>
5	14,63 <sup>A</sup>	38,42 <sup>B</sup>	59,01 <sup>AB</sup>	35,70 <sup>AB</sup>	0,52 <sup>AB</sup>	13,42 <sup>B</sup>
1	14,23 <sup>A</sup>	34,77 <sup>B</sup>	54,81 <sup>B</sup>	32,58 <sup>B</sup>	0,48 <sup>B</sup>	13,69 <sup>B</sup>
4	14,07 <sup>A</sup>	35,85 <sup>B</sup>	52,10 <sup>B</sup>	33,89 <sup>B</sup>	0,44 <sup>B</sup>	12,43 <sup>B</sup>
9	13,43 <sup>A</sup>	37,16 <sup>B</sup>	55,60 <sup>B</sup>	34,60 <sup>B</sup>	0,48 <sup>B</sup>	10,91 <sup>B</sup>
7	12,84 <sup>A</sup>	32,48 <sup>B</sup>	52,96 <sup>B</sup>	29,89 <sup>B</sup>	0,49 <sup>B</sup>	10,52 <sup>B</sup>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Efecto del tiempo de incubación:

Todos los parámetros evaluados disminuyeron significativamente entre 15 y 45 minutos de incubación. El porcentaje de spz. progresivos a los 15 minutos fue de  $52,0 \pm 0,02\%$  y  $27,9 \pm 0,02\%$  a los 45 min. ( $P < 0,05$ ).

Efecto del tratamiento

*Efecto del tipo de proteína (PS vs FR)*

Luego de la incubación con las proteínas, todos los parámetros evaluados fueron mayores ( $P < 0,05$ ) para las muestras incubadas con PS comparadas FR.

*Efecto del método de obtención de la proteína (VA vs EE)*

Las proteínas obtenidas mediante el método de VA dieron resultados mayores ( $P < 0,05$ ) comparados con EE.

*Efecto de la interacción proteína\*método de obtención*

No hubo efecto de la interacción (Tabla 8), por lo que para el análisis de las variables estadísticas fueron considerados como tratamientos independientes (PSVA, PSEE, FRVA, FREE y el control PBS).

*Tabla 8 Valores obtenidos para la diferentes variables del análisis de la interacción proteína\*método de colecta.*

TRATAMIENTO	DAP	VAP	VCL	VSL	ALH	BCF
PSVA	22,37 <sup>A</sup>	59,20 <sup>A</sup>	78.60 <sup>A</sup>	56,89 <sup>A</sup>	0,56 <sup>A</sup>	19,32 <sup>A</sup>
PSEE	16,47 <sup>AB</sup>	42,88 <sup>B</sup>	64,33 <sup>AB</sup>	40,68 <sup>B</sup>	0,53 <sup>A</sup>	17,46 <sup>AB</sup>
PBS	14,51 <sup>BC</sup>	38,13 <sup>BC</sup>	57,29 <sup>B</sup>	35,70 <sup>BC</sup>	0,49 <sup>A</sup>	13,91 <sup>BC</sup>
FRVA	12,37 <sup>BC</sup>	33,70 <sup>BC</sup>	54,89 <sup>B</sup>	30,82 <sup>BC</sup>	0,51 <sup>A</sup>	9,65 <sup>CD</sup>
FREE	9,77 <sup>C</sup>	25,04 <sup>C</sup>	44,44 <sup>B</sup>	22,35 <sup>BC</sup>	0,46 <sup>A</sup>	8,05 <sup>D</sup>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

*Efecto de la interacción tiempo\*tratamiento:*

Algunos parámetros (DAP, VAP, VCL y VSL; Tabla 9, 10, 11, 12 y 13) tuvieron diferencias significativas, con valores mayores ( $P < 0,05$ ) en el tratamiento PSVA a T15, y los valores más bajos en la FREE a T45. Esto lo podemos observar en las Tablas 9, 10, 11, 12 y 13.

Tabla 9: Valores obtenidos para la VSL ( $\mu\text{m/s}$ ) en la interacción tiempo\*tratamiento.

TRATAMIENTO	TIEMPO	MEDIAS
PSVA	15	79,60 <sup>A</sup>
PSEE	15	50,52 <sup>B</sup>
FRVA	15	48,13 <sup>B</sup>
PBS	15	44,30 <sup>B</sup>
FREE	15	34,94 <sup>BC</sup>
PSVA	45	34,18 <sup>BC</sup>
PSEE	45	30,84 <sup>BCD</sup>
PBS	45	27,10 <sup>BCD</sup>
FRVA	45	13,52 <sup>CD</sup>
FREE	45	9,76 <sup>D</sup>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p>0,05$ )

Tabla 10: Valores obtenidos para la DAP ( $\mu\text{m}$ ) en la interacción tiempo\*tratamiento.

TRATAMIENTO	TIEMPO	MEDIAS
PSVA	15	29,75 <sup>A</sup>
PSEE	15	20,02 <sup>B</sup>
FRVA	15	18,11 <sup>B</sup>
PBS	15	17,28 <sup>B</sup>
FREE	15	14,34 <sup>BC</sup>
PSVA	45	14,99 <sup>BC</sup>
PSEE	45	12,93 <sup>BCD</sup>
PBS	45	11,74 <sup>BCD</sup>
FRVA	45	6,64 <sup>CD</sup>
FREE	45	5,20 <sup>D</sup>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p>0,05$ )

Tabla 11: Valores obtenidos para la VAP ( $\mu\text{m/s}$ ) en la interacción tiempo\*tratamiento.

TRATAMIENTO	TIEMPO	MEDIAS
PSVA	15	82,17 <sup>A</sup>
PSEE	15	52,81 <sup>B</sup>
FRVA	15	51,40 <sup>B</sup>
PBS	15	46,92 <sup>B</sup>
FREE	15	37,76 <sup>BC</sup>
PSVA	45	36,22 <sup>BCD</sup>
PSEE	45	32,95 <sup>BCD</sup>
PBS	45	29,33 <sup>BCD</sup>
FRVA	45	16,00 <sup>CD</sup>
FREE	45	12,31 <sup>D</sup>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p>0,05$ )

Tabla 12: Valores obtenidos para la VCL ( $\mu\text{m/s}$ ) en la interacción tiempo\*tratamiento.

TRATAMIENTO	TIEMPO	MEDIAS
PSVA	15	100,78 <sup>A</sup>
FRVA	15	78,49 <sup>AB</sup>
PSEE	15	76,00 <sup>ABC</sup>
PBS	15	68,65 <sup>ABC</sup>
FREE	15	62,13 <sup>BCD</sup>
PSVA	45	56,42 <sup>BCDE</sup>
PSEE	45	52,65 <sup>BCDE</sup>
PBS	45	45,92 <sup>CDE</sup>
FRVA	45	31,30 <sup>DE</sup>
FREE	45	26,75 <sup>E</sup>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p>0,05$ )

Tabla 13: Valores obtenidos para la BCF (Hz/s) en la interacción tiempo\*tratamiento.

TRATAMIENTO	TIEMPO	MEDIAS
PSVA	15	22,23 <sup>A</sup>
PSEE	15	20,20 <sup>AB</sup>
PSVA	45	16,41 <sup>ABC</sup>
PBS	15	15,40 <sup>ABC</sup>
PSEE	45	14,72 <sup>ABC</sup>
FRVA	15	12,82 <sup>BCD</sup>
PBS	45	12,42 <sup>CD</sup>
FREE	15	10,82 <sup>CD</sup>
FRVA	45	6,47 <sup>D</sup>
FREE	45	5,27 <sup>D</sup>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

El porcentaje de la población espermática progresiva (la suma de rápidos, lentos y circulares) según el tratamiento y tiempo de incubación (15 y 45 minutos), se presenta en la tabla 14.

Tabla 14: Total de espermatozoides progresivos (%) según tratamiento y tiempo de incubación (medias  $\pm$  error estándar).

TRATAMIENTOS	Población Espermática		Progresivos Totales	
	15 min.	EEM	45 min	EEM
CONTROL	43,4 <sup>BC</sup>	0,030	34,4 <sup>D</sup>	0,027
PSVA	69,6 <sup>A</sup>	0,026	37,6 <sup>CD</sup>	0,028
PSEE	57,4 <sup>AB</sup>	0,029	40,26 <sup>CD</sup>	0,029
FRVA	36,8 <sup>CD</sup>	0,028	11,9 <sup>E</sup>	0,013
FREE	36,8 <sup>CD</sup>	0,028	11,9 <sup>E</sup>	0,013

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## DISCUSIÓN

Desde hace varios años se viene evaluando la posibilidad de incluir aditivos, tanto en los medios de congelación como de descongelación espermática, para prevenir o revertir los efectos indeseables de la criopreservación. Es así, que se ha reportado que el agregado de PS a los espermatozoides previo a su congelación o luego de su descongelación revirtió la fosforilación de proteínas en varias especies como porcinos (Vadnais y Althouse, 2011), ovinos (Pérez-Pé y col., 2001) y equinos (de Andrade y col., 2012).

Se ha descrito que el proceso de congelación - descongelación tiene un efecto negativo en la integridad y la funcionalidad de la membrana espermática. Esta membrana es fundamental para el metabolismo espermático y para que el espermatozoide lleve a cabo varios procesos involucrados en la fecundación (Manjunath y col., 2002). Se ha demostrado que el PS puede suprimir y revertir la capacitación (decapacitar espermatozoide previamente capacitados) (Cross, 1993). Esto podría deberse al efecto de adsorción a la membrana espermática que presentan proteínas específicas del PS. Proteínas como las BSP (posiblemente contenidas en la fracción 21-25), poseen la capacidad de adsorción a la membrana plasmática por su interacción con los fosfolípidos de la misma (Moura y col., 2007; Souza y col., 2008; Manjunath y col., 2009), lo que permite explicar en parte, el efecto de recuperación de la viabilidad espermática evidenciada por la fracción. El efecto decapacitante de éstas proteínas se encuentra asociado a su cantidad. Es posible que dosis más altas de la fracción, capaciten a los espermatozoides en lugar de inhibir su capacitación, lo que podría explicar el efecto negativo observado cuando se adicionaron dosis de la fracción, superiores a  $0,5 \text{ mg}/10^6$  espermatozoide. De esta manera, aunque existe recuperación de la viabilidad espermática, al adicionar proteínas semi-purificadas contenidas en la fracción 21-25, el efecto de recuperación post incubación, depende también de la cantidad adicionada y del medio de congelación empleado.

En esta misma línea, Carretero y col. (2016) evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de PS sobre el eyaculado: 0, 10, 50 y 100%. Para diferentes tiempos de incubación, las muestras con bajas concentraciones de PS (0 y 10%) tuvieron un mayor porcentaje de espermatozoides vivos con reacción acrosómica respecto de las muestras con altas concentraciones de PS.

Por su parte, Barrios y col. (2000), describió, en ovinos, que la adición del conjunto de proteínas del PS, tiene un efecto de recuperación de la viabilidad menor que el ejercido por la adición de la fracción 6 (con proteínas de 14 y 20 kDa), y que la adición de fracciones de PS, que contienen proteínas con pesos moleculares superiores a 60 kDa, no tiene mayor efecto en la recuperación de la viabilidad del semen ovino.

En este trabajo realizamos la evaluación cinética de los espermatozoides, por medio de un sistema computarizado, CASA, obteniendo resultados positivos con el tratamiento de PS, obtenido mediante VA en los siguientes parámetros: DAP, VAP, VCL, VSL y BCF, así como motilidad progresiva, coincidiendo con López-Perez y Perez Clariget (2012), que encontraron que el agregado de plasma seminal al semen de carnero refrigerado durante 24hs aumentó casi el 20% la tasa de preñez. Al mismo

tiempo Ledesma (2016) en su tesis de doctorado encontró mejoras cinéticas en el eyaculado tratado con PS, no así cuando lo suplementó con proteínas del mismo.

Los parámetros estudiados en el presente trabajo, tienen una correlación directa con la viabilidad espermática, y esta con la posibilidad que tienen los espermatozoides de llegar al óvulo y fecundarlo. Por lo que podemos decir que el semen tratado con PS obtenido por VA, sería más fértil, ya que sus espermatozoides tienen mayor recorrido, mayor velocidad y mayor vigor, lo que le ayudará a atravesar el moco cervical en una supuesta inseminación, llegar al óvulo y atravesar la zona pelúcida para realizar la fecundación.

La mejora en la motilidad se vincula a un mayor porcentaje de espermatozoides con membranas del acrosomas y mitocondrias intactas, y núcleos condensados luego de la criopreservación (Ledesma y col., 2014).

En cuanto al tiempo de incubación, como era de esperar fue descendiendo la viabilidad espermática. Los parámetros estudiados en el presente trabajo, tienen una correlación directa con la viabilidad espermática, y esta con la posibilidad que tienen los espermatozoides de llegar al óvulo y fecundarlo.

Debemos tener en cuenta que este trabajo fue realizado fuera de la estación reproductiva, donde hay evidencia científica que la composición proteica así como el perfil de estas es de menor calidad en esta época (Domínguez y col., 2008).

La ausencia de resultados positivos con los tratamientos de FR se puede atribuir a que no se agregó una fuente de soporte metabólico (energético) de los espermatozoides (Bernardini y col., 2011). Este estudio evaluó parámetros cinéticos *in vitro*, sería necesario evaluar *in vivo* con IA cervical para evaluar el impacto sobre la fertilidad de éstos tratamientos. Hay pocos trabajos y contradictorios sobre este aspecto.

Debe seguirse trabajando para lograr encontrar cuales son los componentes del plasma seminal que previenen y/o revierten los cambios que le ocasiona el frío a los espermatozoides. Y así poder lograr masificar el uso de la inseminación artificial con semen congelado por vía cervical de los ovinos, sin las limitantes que tienen la laparoscopia, y explotando las ventajas que tiene el uso de reproductores de alto mérito genético.

## CONCLUSIONES

- ✓ El tratamiento pos-descongelado con PS mejoró los parámetros cinéticos de los espermatozoides, confirmando la primera hipótesis.
- ✓ Los tratamientos con FR no nos arrojaron resultados positivos sobre la cinética espermática.
- ✓ El método de colecta por VA fue mejor comparado con EE, lo que confirma la segunda hipótesis.
- ✓ Sería suficiente con 15 minutos de contacto con el PS para aportar una mejora significativa de la cinética espermática.

## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. Abogala EME, Terada T. (2003). Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of reproduction* 69: 1245-1250.
2. Agarwal A, Salch RA, Bedaiwy MA. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproductive. *Fertil Steril* 79: 829-843.
3. Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, Larreguy D, Garde JJ, Vazquez I. (1995). Efecto comparativo de diluyo-conservadores de diferente composición y tonicidad sobre la criopreservación del semen ovino. *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.*10: 223-231.
4. Aisen EG, Cisale H, Fernandez H. (1990). Criopreservación de semen ovino. Nueva técnica. *Vet. Arg.* 7(63): 176-182.
5. Aisen EG, Medina V. (2000). Inseminación artificial de cabras Angora de la Patagonia con semen congelado. *Producción Ovina y Caprina* 25: 91-594.
6. Aisen EG, Medina VH, Venturino A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57: 1801-1808.
7. Almlid T, Johnson LA. (1988). Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J Anim Sci.* 66: 2899- 2905.
8. Álvarez J, Storey B. (1992). Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a model of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 13: 232-241.
9. Amann RP. (1989). Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *Journal of Andrology* 10:89–98.
10. Amann RP, Pickett BW. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7: 145-176.
11. Anton M, Martinet V, Dalgalarondo M, Beaumal V, David-Brian E, Rebesona AH. (2003). Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chem.* 83: 175-183.
12. Apichela S, Argañaraz M, Giuliano S, Zampin R, Carretero M, Miragaya M, Miceli D. (2014). Llama oviductal reservoirs: involvement of bulbourethral glands. *Andrología* 2014. 46(3): 290-295.
13. Austin J, Hupp E, Murphree R. (1961). Comparison of quality of bull semen collected in the artificial vagina and by electroejaculation. *J. Dairy Sci.* 44(12):2292-2297.
14. Barbas J, Marques C, Baptista M, Mascarenhas R, Pereira R, Cavaco-Gonçalves S. (2013). Fertilidad de carnero de raza Saloia con semen refrigerado o congelado. *Arch Zootec* 62: 303-306.
15. Barth AD, Oko RJ. (1989). *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Iowa State University Press.
16. Ball EA, Mohammed HO. (1995). Morphometry of stallion spermatozoa by computer-assisted image analysis. *Theriogenology.* 44: 367-377.
17. Barrios B, Fernández-Juan M, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. (2005). Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins which protect ram spermatozoa against coldshock. *J Androl.* 26:539-549.

18. Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez J.A. (2000). Seminal plasma proteins revert the coldshock damage on ram sperm membrane. *Biology of Reproduction* 63: 1531-1537.
19. Bedford J, Chang M. (1961). Removal of decapacitation factor from seminal plasma by high-speed centrifugation. *Am. J. Physiol.* 202: 179-181.
20. Bernardini, Hozbor, Alberio, Fornes, Cesari; (2008) Efecto de proteínas del plasma seminal sobre la motilidad y ultraestructura de espermatozoides de carnero post- descongelación. 53 Reunión Científica Anual SAIC. Mar del Plata.
21. Bernardini A, Hozbor F, Sanchez E, Fornés MW, Alberio RH, Cesari A. (2011). Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. *Theriogenology* 76: 436–447
22. Biodeau JF, Blanchette S, Gagnon C, Sirard MA. (2001). Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology* 56: 275-286.
23. Bittencourt R, Ribeiro A, Santos A, Fürst R, Texeira R, Chalhoub M. (2004). Freezing goat semen with glycerol and ethylene glycol as the cryoprotective agents. 15th Internacional Congress on Animal Reproduction. Porto Seguro, Brasil. 487 p.
24. Bloom E. (1977). Sperm morphology with reference to bull infertility. First All-India Symp. Anim. Reprod. pp: 61-81.
25. Boiso I. (2001). Principios básicos criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad.* 18: 127 – 131.
26. Bóveda P, Toledano A, Castaño C., Esteso M, López-Sebastián A, Rizos D, Santiago-Moreno J. (2018). Cryo-scanning and conventional electron microscopy of Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) sperm cryopreserved using slow and ultra-rapid cooling protocols. *Reproduction in Domestic Animals.*, 53(2): 113.
27. Bucak MN, Sariozkan S, Tuncer P.B, Uluta PA, Akçadag. (2009). Effect of antioxidant on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. *Small Ruminant Research* 81: 90-95.
28. Byrne GP, Lonergan P, Wade M, Duffy P, Donovan A, Hanrahan JP, Boland MP. (2000). Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Anim. Repro. Sci.* 62: 265-275.
29. Capurro S, Olaso M. (2016). Inducción farmacológica de la eyaculación ex copula en padrillos Holsteiner en entrenamiento. Tesis de grado UDELAR. P. 60.
30. Carbonero O. (1954). Técnicas de laboratorio. Ministerio de Agricultura. Dirección General de Ganadería: 9-12.
31. Cardozo J, Fernandez M, Forcada F, Abecia A, Muiño T, Cebrián JA. (2006). Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology* 66(4): 841- 850.
32. Cardozo J, Grasa P, Muiño M, Cebrian J. (2009). Adición de proteínas del plasma seminal ovino durante la congelación del espermatozoide y efectos sobre su motilidad y viabilidad. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria.* 10(1): 51-59.
33. Carretero MI, Giuliano SM, Arraztoa CC, Santa Cruz RC, Fumuso FG, Neild DM. (2016). Comparison of two cooling protocols for llama semen: with and without collagenase and seminal plasma in the medium. *Andrologia.* 10: 1111-12691.

34. Casey PJ, Gravance CG, Davis RO, Chabot DD, Liu IKM. (1997). Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. *Theriogenology* 47: 575-582.
35. Chatterjee S, Gagno C. (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod. Dev.* 59:451-458.
36. Colas G. (1975). Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J Reprod Fert.* 42:277-285.
37. Cola G. (1980). Variaciones estacionales en la calidad del esperma en Ile-de-France belier. 1. Estudio de la morfología celular y la motilidad de las masas. *Reprod. Nutr. Develop.* 20(6): 1789-1799.
38. Cole H, Cupps P. (1984). Reproducción de los animales domésticos. Ed. Acribia, Zaragoza. pp. 221-223.
39. Correa JR, Rodriguez MC, Patterson DJ, Zavos PM. (1996). Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity. *Theriogenology*. 46: 413-420.
40. Cross NL. (1993). Multiple effects of seminal plasma on the acrosome reaction of human sperm. *Mol Reprod Dev* 35:316-323.
41. Curry MR. (2000). Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction* 5: 46-52.
42. Curry MR, Waston PF. (1994). Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology*. 31, 39-46.
43. Dacheux J, Druart X, Foucheourt S, Syntin P, Gatti J, Okamura N, Dacheux F. (1998). Role of epididymal secretory proteins in sperm maturation with particular reference to the boar. *Journal Reproduction Fertility* 1998. 53: 99-107.
44. Dacheux J, Paquignon M. (1980). Relations between the fertilizing ability, motility and maturation process in the boar. *Annals NY Academic Science*. 438: 526-529.
45. Dacheux J, Pisselet G, Blanc M, Hocheream de Reviers M, Courrot M. (1984). Seasonal variations in rete testis fluid secretion and sperm production in different breeds of ram. *J. Reprod. Fertil.* 61: 363-371.
46. Darin-Bennett A, Poulos A, White I.G. (1974). The phospholipids and phospholipidbound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa. *J Reprod Fert.* 41: 471-474.
47. Darin-Bennett A, White I.G. (1977). Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*. 14: 466-470.
48. Dauphas S, Beaumal B, Riaublanc A, Anton M. (2006). Hen egg yolk low-density lipoproteins film spreading at the air-water and oil-water interface. *J. Agric. Food. Chem.* 54: 3733-3737.
49. De Andrade A, Zaffalon F, Celegnini E, Nascimento J, Bressan F.F, Martins S, Dearruda R. (2012). Post-thaw addition of seminal plasma reduces tyrosine phosphorylation on the surface of cryopreserved equine sperm, but does not reduce lipid peroxidation. *Theriogenology*. 77: 1866-1872.
50. De Graaf S, Rickard J, Pini T, Maddison J, Druart X, Leahy T. Emerging (2014) Roles of Seminal Plasma in Sperm Function. 9th Biennial Conference of the

- Association for Applied Animal Andrology, Newcastle: Association for Applied Animal Andrology. 93-101
51. Den Das N. (1992). Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim. Reprod. Sci.* 28: 8794.
  52. De Leeuw F.E, Colenbrander B, Verkleij A.J. (1990). The role membrane plays in cold shock and freezing injury. *Reprod Dom Anim Suppl.* 1: 95-104.
  53. Derivaux. (1982). "Reproducción de los animales domésticos". Ed. Acriba. Zaragoza (España). 537p.
  54. Dominguez MP, Falcinelli A, Hozbor F, Sanchez E, Cesari A, Alberio RH. (2008). Seasonal variation in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology* 69: 564-573.
  55. Donoghue AM, Garner DI, Donoghue DJ, Johnson LA. (1996). Assessment of the membrane integrity of fresh and stored tunkey spermatozoa using a combination of hypo-osmotic stress, fluorescent staining and flow cytometry". *Theriogenology*. 46: 153-163.
  56. Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchoroguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH. (1993). Cold shock damage is due to lipid phase 45 transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *The Journal Exp Zool* 265: 432-437.
  57. Duran Del Campo A. (1980). Anatomía, fisiología de la reproducción e inseminación artificial en ovinos. Editorial Hemisferio Sur: 262.
  58. Eckert R, Randall D, Auoustitne O. (1989). Fisiología animal. Ecl McGraw-Hill-Interamericana:: 65-100.
  59. El-Alamy, M. y Foote, R. (2001). Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. *Anim. Repro. Sci.* 65, 245-254.
  60. El-Hajj Ghaoui R, Thomson P, Leía T, Evans G, Maxwell W. (2007a) Autologous ram seminal plasma and its vesicle-free fraction improve motility characteristics and membrane status but not in vivo fertility of frozen thawed ram spermatozoa. *Reprod Domest Anim*; 42(5):541-549.
  61. El-Hajj Ghaoui R, Gillan L, Thomson PC, Evans G, Maxwell W.M. (2007b) Effect of seminal plasma fractions from entire and vasectomized rams on the motility characteristics, membrane status and in vitro fertility of ram spermatozoa. *J Androl*; 28(1):109-122
  62. Elliot F. (1978). Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. In: Salsbury G.W, VanDemark N.L, Lodge J.R. eds. Semen evaluation. San Francisco, USA, Freeman. Pp. 440-427.
  63. Evans, G., Maxwell, W. (1987). Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Sydney, Butterworths, 194 p.
  64. Evans G.; Maxwell W. (1989). Manejo y valoración del semen; inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza, ES, Acribia. Pp. 95-107.
  65. Evans G, Maxwell W. (1990). Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza: Ed Acribia. 204 p.
  66. Fernandez Abella D. (1987). Temas de reproducción ovina. Montevideo UdelaR. División de Ediciones y Publicaciones. 254p.
  67. Fernandez Abella D. (1993). Principios de fisiología reproductiva ovina. Editorial Hemisferio Sur; Universidad de la República. 247p.
  68. Fernández Abella, D. (2015). Tecnologías Reproductivas Bovinas y Ovinas. Montevideo, Hemisferio Sur. 200p.

69. Fernández-Juan M, Gallego M, Barrios B, Osada J, Cebrián-Pérez J.A, Muiño-Blanco T. (2006). Immunohistochemical localization of sperm-preserving proteins in the ram reproductive tract. *J Androl.* 27:588-595.
70. Fiser PS, Ainsworth L, Langford GA. (1981). Effect of osmolarity of skim milk diluents and thawing rate on cryosurvival of ram spermatozoa. *Cryobiology.* 18: 399-403.
71. Fiser PS, Fairfull RW. (1986). The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology.* 23: 518-524.
72. Fiser, PS.; Farifull, R. (1989). The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 26(1): 64-69. Fiser PS, Langford GA. (1981). The effect of Sodium Pentobarbital and storage time on preservation of ram spermatozoa motility at 5 °C. *Canadian Journal of Animal Science.* 61: 847-851.
73. Foote RH. (1988). Preservation and fertility prediction of spermatozoa. *llth. I.C.A.R. Dublin* 5:126-134.
74. Foote RH, Brockett CC, Kaproth MT. (2002). Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim. Repro. Sci.* 71: 13-23
75. Foote R, Chen Y, Brockett C, Kaproth M. (1993). Fertility of bull spermatozoa frozen in whole milk extender with trehalose, taurine, or blood serum. *J. Dairy Sci.* 76: 1908-1913.
76. Gadea J, Stellés E, Marco MA, Coy P, Matás C, Romar R, Ruiz S. (2004). Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation Effect of addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*, 62: 690-701.
77. Gao D, Mazur P, Criser J.K. (1997). Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. *Reproductive tissue banking: scientific principles.* Eds: Karow A.M. y Criser J-K. Academic press, San Diego, EEUU. pp263-328.
78. García-Lopez N, Ollero M, Cebrián JA, Muiño-Blanco T, (1996). Reversion of thermic-shock effect on ram spermatozoa by adsorption of seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B* 680(1-2): 137-143.
79. García J, Vila L. (1984). Criopreservadores: concepto y manejo. *Biología y Clínica Hematológica.* 6: 219-225.
80. Garde JJ. (1992). Congelación de semen en la especie ovina: Características biológicas de las dosis descongeladas. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de La U.C.M. (España): 137.
81. Garner D. y Háfes, E. (2000). Spermatozoa and Seminal Plasma. En: Háfes, E.S.E. and Háfes. B (eds), *Reproduction in farm animals*, 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, pp 96-109.
82. Gibbons A, Cueto M, Garcia-Vinent J, Wolff M, Arrigo J. (1993). Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. Manual de divulgación. *Comunicación Técnica de Producción Animal del INTA Bariloche* N° 200. 19 p.
83. Gil J, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. (2003b). Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology.* 59: 1241-1255.
84. Gil J, Olivera J. (2004). Preservación de semen de carnero a 5°C; resultados con diferentes diluyentes para la IA en majadas del Proyecto Merino Fino. In: *Distribución de Carneros Generados en el Núcleo Fundacional de Merino Fino*

- de la Unidad Experimental "Glencoe" (5ta, 2004, Tacuarembó). Trabajo presentado. Montevideo, INIA. Pp 8-10(Actividades de difusión no. 392)
85. Gil J, Rodríguez-leazoqui M, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. (2003a). Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*. 59, 1157-1170.
  86. Gil J, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. (2000). Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology*. 54, 93-108.
  87. Gillan L., Evans G., Maxwell, W. (1997) Capacitation status and fertility of fresh and frozen±thawed ram spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development* 9, 481-487.
  88. Gillan L, Maxwell W. (1999). The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *J Reprod Fertil. Supplement* 54: 271-283.
  89. Graham J. (2001). Assessment of sperm quality; a flow cytometric. *Animal Reproduction Science*. 68: 239-247.
  90. Grahame E, Schmehl M, Nelson D. (1980). Problems with laboratory assays. *Proc. 8° NAAB Tech. Conf. A.I. Reprod.:* 59-66.
  91. Gravance CG, Lewis KM, Casey PJ. (1995). Computer automated sperm head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa. *Theriogenology*. 44: 989-1002.
  92. Green CE, Watson PF. (2001). Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, 122: pp.889–98.
  93. Grossmann M, Aran B, Vega A, Santaló J. (1991). Hamster test: Utilització d'òcits criopreservants. 2es Jornades de Biologia de la Reuraducció. Barcelona
  94. Gwathmey T, Ignatz G, Mueller J, Manjunath P, Suarez S. (2006). Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biology of Reproduction*. 75: 501-507.
  95. Hafez E. (1989). Reproducción e inseminación artificial en animales. México Interamericana. 670p.
  96. Háfes E. (2000). Preservation and cryopreservation of gametes and embryos. *Reproduction in farm animals*, 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, pp 431-442.
  97. Hafez E, Hafez B. (2004). Reproducción e Inseminación artificial en animales. México, McGraw-Hill Interamericana. pp. 419-427.
  98. Hammerstedt R, Graham J, Nolan J. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *Journal of Andrology* 11(1): 73-88.
  99. Harvey S, Zhang Y, Landry F, Miller C, Smith J. (2001). Insights into a plasma membrane signature. *Physiological Genomics* 5(3): 129-136
  100. Hauser R, Yavetz H, Paz OF, Homonnai ZT, Amit A, Lessing JB, Preyser MR, Yogev L. (1992). The predictive fertilization value of the hypoosmotic swelling test (HOST) for fresh and cryopreserved sperm. *J. Assistcd Retirad. Genet.* 9(3): 265-270.
  101. Helleman C, Jara C. (1997). Efecto de un surfactante sobre la integridad de espermatozoides ovinos crioconservados. *Archi. Med. Vet.* 29: 153-160.
  102. Hidalgo M. 2004. Estudio del efecto de la congelación-descongelación sobre los parámetros morfométricos del espermatozoide de macho cabrío. Tesis Doctoral. España: Univ. de Córdoba. 225 p.

- 103.Holt W, Head M, North R. (1992). Freeze-Induced Membrane Damage in Ram Spermatozoa Is Manifested After Thawing-Observations with Experimental Cryomicroscopy. *Biology of Reproduction* 46(6): 1086-1094.
- 104.Holt WV. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62: 3-22.
- 105.Holt W, North R. (1994). Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biology of Reproduction* 51(3): 414-424.
- 106.Holt WV, Penfold LM. (2014). *Animal andrology: theories and applications*. In *Animal*.
- 107.Holt WV., Van Look, KJ. (2004). Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction*, 127(5):527-35.
- 108.Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Kimura Y, Sato A. (1996). The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Perd Steril*. 66 (4): 634-639.
- 109.Howard J, Pace M. (1988). Seminal evaluation and artificial insemination. In: *Fertility and infertility in veterinary practice*. J. Laing; W. Morgan; W. Wagner, eds. Baillier Tindal. London, U.K. pp 39-51.
- 110.Inskeep E. (1974). Artificial insemination and preservation of ram semen. *Artificial Insemination in Sheep Bulletin* 629. West Virginia University – Agricultural Experimental Station.
- 111.Januskauskas A, Gil J, Soderquist L, Háárd MGM, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. (1999). Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology* 52:641-658.
- 112.Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. (2003). Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology* 60:743-758.
- 113.Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Perez-Pelaez M, Grabo O, Zaneveld LJD. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.* 70: 219-228.
- 114.Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, Chiba K, Hirohashi N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA*; 108:4892–4896.
- 115.Jones R, Mann, T. (1977). Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *J Reprod Fert.* 50: 261-268.
- 116.Kaneto M, Harayama H, Miyake M, Kato S. (2002). Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins. *Animal of Reproduction Science*, 73, pp.197-209.
- 117.Kankofer M, Kolm G, Aurich J, Aurich C. (2005). Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. *Theriogenology* 63:1354-1365.
- 118.Katkov II, Bolu. (2012). Kinetic Vitrification of Spermatozoa of Vertebrates: What Can We Learn from Nature? In I. Katkov (Ed.), *Current frontiers in cryobiology*. Rijeka, Croatia: InTech. pp. 1–19

119. Kumar S, Millar JD, Watson P (2003). The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology* 46:246-253.
120. Laforenza U, Pellavio G, Marchetti A, Omes C, Todaro F, Gastaldi G, Gastaldi G. (2017). Aquaporin-Mediated Water and Hydrogen Peroxide Transport Is Involved in Normal Human Spermatozoa Functioning. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1): 66.
121. Laguado J. (2007). Aplicaciones de la citometría de flujo en microbiología, veterinaria y agricultura. *Rev. MVZ Córdoba* 12 (2): 1077-1095
122. Lamia A, Daniel T, Laëtitia J, Chantal T, Oliver G, Jean L.C, Marc A. (2004) Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using yolk LDL: a comparison with Optidyll, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 66: 895-907.
123. Leahy T, de Graaf S. (2012). Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. *Reproduction in Domestic Animals*. 47(4): 207-213.
124. Leahy T, Marti J, Evans G, Maxwell W. (2010). Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen-thawed spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 119: 147-153.
125. Ledesma A, Cesari A, Gil J, Hozbor F. (2014). Efecto del Método de Colecta Seminal sobre la composición proteica del Plasma Seminal Ovino. *Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal*. Buenos Aires.
126. Ledesma A, Manese J, Alberio R, Hozbor F. (2013). ¿Es posible mejorar la fertilidad del semen ovino criopreservado mediante la adición de plasma seminal? *Ediciones Taurus; Taurus*. 59(9): 1-10.
127. Ledesma A, Manese J, Ríos G, Hozbor F. (2012). El método de colecta de semen afecta la composición del plasma seminal. *Terceras Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal*. Capital Federal.
128. Ledesma A, Manes J, Rios G, Hozbor F. (2015). Effect of Seminal Plasma on Post-Thaw Quality and Functionality of Corriedale Ram Sperm Obtained by Electroejaculation and Artificial Vagina. *Reproduction in Domestic Animals* 50(3)
129. Lessard C, Parent S, Leclerc P, Bailey J, Sullivan R. (2000). Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *Journal of Andrology* 21(5): 700-707
130. Linford E, Glover FA, Bishop C, Stewart DL. (1976) The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *Journal of Reproduction and Fertility* 47(2):283-291.
131. López Pérez A. (1987). Evaluación de diferentes técnicas para la congelación de semen ovino. Tesis M. Sc. Cuautitlán Izcalli, México. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores. 97p.
132. López Pérez A, Pérez-Clariget R. (2012). Ram seminal plasma improves pregnancy rates in ewes cervically inseminated with ram semen stored at 5°C for 24 hours. *Theriogenology* 77: 395-399.
133. Luna Serrano E, Domingo J, Casao A, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA, Muñoz-Blanco T. (2016). Expression, cellular localization, and involvement of the

- pentose phosphate pathway enzymes in the regulation of ram sperm capacitation. *Theriogenology*. 86: 704-714.
134. Mann T. (1964). *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract*. Butler & Tanner Ltd., Frome, Gr. Britain.
  135. Mann T, Lutwak-Mann C. (1981). *Male Reproductive Function and Semen*.
  136. Manjunath P, Therien, I. (2002). Role of seminal plasma phospholipids binding proteins in sperm membrane lipids modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 53:109-119.
  137. Manjunath P, Lefebvre J, Wright W. (2009). New nomenclature for mammalian BSP genes. *Biol Reprod* 80: 394-397.
  138. Martínez-Pastor F, Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Anel L, De Paz P. (2010). Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reproduction in domestic animals*. 45:67-78.
  139. Maxwell W, de Graaf SP, El-Hajj Ghaoui R, Evans G. (2006) Seminal plasma affects on sperm handling and female fertility. *Society for Reproduction and Fertility Supplement*. 64: 13-38.
  140. Maxwell W, Johnson L. (1999). Physiology of spermatozoa at high dilution rates; the influence of seminal plasma. *Theriogenology*. 52: 1353-1362
  141. Maxwell W, Salamon S. (1993). Liquid storage of ram semen; a review. *Reproduction, Fertility and Development*. 5(6): 613-638.
  142. Maxwell W, Watson P. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Repro. Sci.* 42, 55-65.
  143. Mazur P. (1965). Causes of injury in frozen and thawed cells. *Journal of General Physiology*. 47: 347-369.
  144. Mazur P. (1984). Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mamalian ova and embryos. *Anim. Repr. Sci.* 28: 239-245.
  145. Medeiro C, Forell F, Oliveira A, Rodriguez J. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57(1): 327-344.
  146. Memon MA, Ott RS. (1981). Methods of semen preservation an Artificial Insemination in sheep and goats. *Anim. Prod.* 17(1): 19-25.
  147. Milovanov VK. (1938). *The artificial insemination of farm animals*. Seljhozgiz, Mowcow.
  148. Molina F, Evans G, Quintana-Casares P, Maxwell W. (1994b). Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluent on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 36: 113-122.
  149. Molina F, Evans G, Maxwell W. (1994a). Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pelletfreezing ram spermatozoa. *Theriogenology* 42: 849-858.
  150. Molina F, Evans G, Maxwell W. (1994c). In vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reprod. Nutr. Dev.* 34: 491– 500.
  151. Moura A, Chapman D, Killian A. (2007). Comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Anim Reprod Sci* 2008; 98:169-188.
  152. Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton NM. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by a easy method: cryoprotective effect on frozen – thawed bull semen. *Theriogenology* 57:1695- 1706.
  153. Muiño-Blanco T, Perez-pe R, Cebrian-Perez J. (2008). Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reproduction in Domestic Animals*. 43(4): 18-31.

154. Muiño R, Tamargo C, Hidalgo C.O, Peña A. I. (2008a). Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Animal Reproduction Science* 109: 27–39.
155. O'Flaherty C, Beconi M, Beorlegui N. (1997). Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia* 29: 269-275.
156. Olden K, Bernard B, Humphries M, Yeo K, White S, Newton S, Bauer H, Parent J. (1985). Function of glycoprotein glycans. *TIBS* 110: 78-82.
157. Ollero M, García-López N, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. (1997). Surface changes of ram spermatozoa by adsorption of homologous and heterologous seminal plasma proteins revealed by partition in an aqueous two-phase system. *Reproduction Fertility and Development* 9(4): 381-390.
158. Osorio C. (2013). Valoración computarizada de la integridad funcional de la membrana plasmática, motilidad y morfología espermática en semen criopreservado de búfalo. Programa de Maestría en Reproducción Animal. LUZ. Maracaibo. 106p.
159. Pace M, Graham P. (1974). Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J. Animal Science* 39(6): 1144-1149.
160. Parks JE, Grahan JK. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 8, 299-312.
161. Pérez-Pé R, Barrios B, Muiño-Blanco T, Cebrian J. (2001). Seasonal difference in ram seminal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography B*. 760: 113-121.
162. Pérez Garcia T. (1958). Importancia de la tecnología correcta en la obtención del semen bovino. *Revista del Patronato de Biología Animal*. 4:249-258.
163. Pérez-Pé R, Grasa P, Fernandez M, Peleato M, Cebrián-Pérez J, Muiño-Blanco T. (2002). Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked rams spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*. 61: 226-233.
164. Paulenz H, Söderquist L, Pérez-Pé R, Berg KA. (2002). Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*. 57: 823-836.
165. Pérez y Pérez F. (1985). Reproducción animal, inseminación artificial y transplante de embriones. Ed. Científico Médica. Madrid.
166. Pérez LJ, Valcárcel A, De las Heras MA, Moses D, Baldassarre H. (1996). Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology*. 46: 131-140.
167. Perinaud J, Le Lannou D, Vieitez G, Griveau JF, Milhet P, Richoilley G. (1997). Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit) following ejaculation. *Hum Reprod*. 12: 2434-2436.
168. Peris SI, Bilodeau JF, Dufour M, Bailey JL. (2007). Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol Reprod. Dev*. 74: 878-8902.
169. Phillips PH, Lardy. (1940). A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J. Dairy Sci*. 23: 399-404.
170. Phillips NJ, McGowan MR, Johnston SD, Mayer DG. (2004). Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. *Animal Reproduction Science* 81:47-46.

171. Pillet E, Duchamp G, Batellier F, Beaumal B, Anton M, Desherces S, Schmitt E, Magistrini M. (2011). Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology* 75: 105-114.
172. Polge C, Smith AU, Parkes A. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and deshydration at low temperatures. *Nature* 164: 666-668.
173. Pomerol JM, Arrondo JL. (1994). *Práctica andrológica*.
174. Poulos A, Darin-Bennett A, White IG. (1973). The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comp Biochem Physiol.* 46B: 541-549.
175. Quinn, PJ. (1989). Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* 21: 3-19.
176. Quinn PJ, White IG, Cleland RW. (1969). Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *J Reprod Fertil.* 18: 209 – 220
177. Ricker J, Linfor J, Delfino W, Kysar P, Scholtz E, Tablin F, Crowe J, Ball B, Meyers S. (2006). Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biology Reproduction* 74(2): 359-365
178. Rodríguez P, Franco E, Jiménez C. (2008). Estandarización de la prueba para espectrofotometría en la medición de concentración de semen bovino, equino, porcino, ovino y canino. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia.* 55:22-28.
179. Rodríguez-Martínez, H. (2000) Evaluation of frozen semen: traditional and new approaches. En: *Topics in bull fertility*.
180. Ruiz L, Santiani A, Sandoval R, Huanca W, Coronado L, Alzamora C. (2007). Efecto de dos antioxidantes (tempo y tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a tris. *Rev Inv Vet, Perú* 18: 99-106
181. Saacke RG, White JM. (1972). Semen quality tests and their relationship to fertility. *Proceeding, 4th Technical Conference National Association Animal Breeders (NAAB).* Columbia. pp. 22-27.
182. Salamon S, Maxwell W. (1995). Frozen storage of ram semen. *Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination.* *Anim. Reprod. Sci.* 37: 185-249
183. Salamon S, Maxwell W. (2000). Storage of ram semen. *Anim. Repro. Sci.* 62: 77-111.
184. Salamon S, Visser, D. (1972). Effect of composition of tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Aust. J. Biol. Sci.* 25: 605.
185. Salisbury G, Van Demark N, Lodge J. (1978). *Fisiología de la reproducción e inseminación artificial en los bovinos.* Zaragoza, ES, Acribia. 831p.
186. Sancho M, Perez F, Tablado L, Soler C. (1994) "Valoración morfológica y morfométrica, mediante el sperm-class analyzer, del semen eyaculado de morueco". 7ª Jornada Internacional de Reproducción Animal. Murcia, España. 131p.
187. Santiago-Moreno J, Castaño C, Toledano-Díaz A, Estes M.C, López-Sebastián A. (2015). Characterization of red-legged partridge (*Alectoris rufa*) sperm: seasonal changes and influence of genetic purity. *Poult Sci.* 94: 80-7.
188. Santiago-Moreno J, Galarza D. (2019). Criopreservación de espermatozoides en especies domésticas y silvestres: estado actual de los avances tecnológicos. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal* 3(2): pp21.

- 189.Santiani A. (2003). Criopreservación de semen ovino: efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis de Magíster. Temuco, Chile: Univ La Frontera. 95 p.Senger PL. (2003). Pathways to Pregnancy and Parturition. 2<sup>a</sup> ed. Washington. Current Conceptions, 373 p.
- 190.Sikka SC. (2001). Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem.* 8: 851-862.
- 191.Silvia R, Monzón S. (2005). Criopreservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes.
- 192.Singh MP, Sinha AK, Singh BK. (1995). Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenolav.* 43: 1047-1053
- 193.Sorensen AMJ. (1982). Evaluación de la aptitud reproductiva. Reproducción animal. Mc. GRAW-HILL. Mexico. 1-125p.
- 194.Souza C, Moura A, Killian G. (2008). Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Anim Reprod Sci* 105:72-89.
- 195.Suttiyotin D, Thwaiter CJ. (1991). The ability of trypan blue to differentiate live and dead ram spermatozoa. *Anim. Reorod. Sci.* 25: 209-224.
- 196.Synnott A, Fulkerson W, Lindsay D. (1981). Sperm output by rams asid distribution amongst ewes under conditions of continual mating. *J. Reurod. Fertil.,* 61: 355- 361.
- 197.Tejada RI, Michell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. (1984). A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil. Steril.* 42:87-91.
- 198.Thomas CA, Garner DL, DeJarnette JM, Marshall CE. (1998). Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biology of Reproduction* 58(3):786-793.
- 199.Ticiano GL. (2010) Effects of Extender and Equilibration Time on Post-Thaw Motility and Membrane Integrity of Cryopreserved Gyr Bull Semen Evaluated by CASA and Flow Cytometry. *Animal Reproduction Science* 120: 31-38.
- 200.Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela P, Ekhlasi- Hundrieser M, Dostalova Z, Sanz L, Calvete J. (1998) Spermadhesins: A new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* 1998. 30:217-224.
- 201.Triphan J, Aumuller G, Brandenburger T, Wilhelm B. (2007). Localization and regulation of plasma membrane Ca(2+)-ATPase in bovine spermatozoa. *European. Journal of Cell Biology.* 86: 265-273.
- 202.Torres, E., (2018). Efecto de la adición de plasma seminal antes y después de la congelación de espermatozoides colectados del conducto deferente de Alpaca sobre algunas características espermáticas.Tesis de grado, UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO (Peru). 94p.
- 203.Troedsson M, Desvougges A, Alghamdi A, Dahms B, Dow C, Hayna J, Valesco R, Collahan P, Macpherson M, Pozor M, Buhi W. (2005). Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science.* 89: 171–186.
- 204.Uwland J. (1984). Possibilities and limitations of semen evaluation for prognosis of male fertility. *The male in farm reproduction.* pp. 269-325.

205. Vadnais M, Althouse G. (2011). Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. *Theriogenology* 76: 1508-1516.
206. Vázquez I. (1980). Nueves métodos de valoración del semen en reproductores ovinos y porcinos. Tesis Doctoral, facultad de Veterinaria de la Universidad Conipltense de León. España.
207. Vázquez I, Caballero P, Nuñez R. (1989). Variaciones de la permeabilidad de membrana por efecto de la congelación del semen. *Endocrinología*. 36(4):159.
208. Vigil M., (2015). Efecto de la suplementación con zinc sobre la calidad espermática y la fertilidad del semen fresco y congelado y carneros Merino Australianos. Tesis de Grado. 68p.
209. Vigil, M, Gonzalo A, Ciudad C, Ruiz-Poveda L. (1986). Variables ambientales que determinan la calidad seminal de un verraco *Rev. Asoc. Nac. Porcinocult. Cient.*, 49: 71-83.
210. Vila L. (1984). Principios químico-físicos de la criopreservación de material biológico. *Biol Clin Hematol*. 6: 227 – 236.
211. Vila L, Carretero F. (1985). Manejo de congeladores programables. *Biol Clin Hematol*, 7:61-67.
212. Volglmayr J, Chartier D, Sawyer R. (1983). Viability of ram testicular spermatozoa following criopreservation in rete testis fluid. *Criobiology*. 20: 421-431.
213. Wang F, Feng X, Li Y, Yang H, MA T. (2006). Aquaporins as potential drug targets<sup>1</sup>. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(4): 395–401.
214. Watson PF. (1975). Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosome of frozen ram spermatozoa. *Vet. Rec*. 97: 12-15.
215. Watson PF. (1979) The preservation of semen in mammals. In: *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, Finn, C.A. Oxford University Press, Oxford, pp 283-350.
216. Watson PF. (1981). The effects of cold shock on sperma cell membrane. Effects of low temperaturas on biological membranes. En G.J Morris y A. Clark, eds. *Academis Press, New York*: 189-218.
217. Watson PF. (1990). Artificial insemination and tite preservation of semen. Lammins. GE(Ed.). *Marshall's Phvsiology of Reproduction*, 2:Reproduction in the male. Churchill Livinestone. Edimburgo: 747-859
218. Watson PF. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their postthawing function. *Reproduction Fertility and Development* 7(4): 871-891
219. Watson PF. (2000) The cause of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60-61: 481-492
220. Watson PF, Duncan AE. (1988). Effect of salt concentration and unfrozen wáter fractien on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Criobiology* 28: 131-142.
221. Watson PE, Martin IC. (1975). The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 degrees. *Aust J Biol Sci*. 28: 145-152.
222. Yeste M. (2017). State of the art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. *Animal Reproduction*, 14(1): pp 69-81.
223. Yeung C-H. (2010). Aquaporins in spermatozoa and testicular germ cells: identification and potential role. *Asian Journal of Andrology*, 12(4): 490–499.