

**EFFECTO DEL METODO DE COLECTA DE SEMEN Y DE PLASMA SEMINAL SOBRE  
LA SUPERVIVENCIA POSDESCONGELACION DE ESPERMATOZOIDES OVINOS**

**Alba Verónica Ledesma**

**Trabajo de tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al título de  
*MAGISTER SCIENTIAE en PRODUCCION ANIMAL***

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS-UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL  
PLATA**

**Balcarce, Argentina**

**MES 2012**

**EFFECTO DEL METODO DE COLECTA DE SEMEN Y DE PLASMA SEMINAL SOBRE  
LA SUPERVIVENCIA POSDESCONGELACION DE ESPERMATOZOIDES OVINOS**

**Alba Verónica Ledesma**

.....

**Ricardo Alberio, MV., PhD.**

**Director de Tesis**

**Comité Consejero**

.....

**Juan Aller, MV., MSci.**

.....

**Federico Hozbor, MV., Dr.**

.....

**Jorgelina Manes, MV., MSci.**

**EFFECTO DEL METODO DE COLECTA DE SEMEN Y DE PLASMA SEMINAL SOBRE  
LA SUPERVIVENCIA POSDESCONGELACION DE ESPERMATOZOIDES OVINOS**

**Alba Verónica Ledesma**

**Aprobada por:**

.....

**Ricardo Alberio MV, PhD.**

**Director de Tesis**

.....

**Jorge Cabodevila MV, Dr.**

**Evaluador externo**

.....

**Jorge Gil MV, PhD.**

**Evaluador externo**

.....

**Evaluador externo**

**ÍNDICE GENERAL**

<b>TEMA</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	III
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	IX
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	X
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	XI
<b>ÍNDICE DE GRÁFICOS</b>	XII
<b>RESUMEN</b>	XIV
<b>ABSTRACT</b>	XVI
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1. Hipótesis	4
1.2. Objetivos	4
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	5
2.1. Características reproductivas de la especie ovina	6
2.1.1. Melatonina y reproducción	6
2.1.2. La oveja	6
2.1.3. El carnero	7
2.2. Semen y eyaculado	7
2.2.1. El espermatozoide	
2.2.1.1. Composición de las membranas espermáticas	10
2.2.1.2. Maduración epididimaria	13
2.2.2. Espermatozoide eyaculado vs. Espermatozoide epididimario	15

2.2.3. Plasma seminal	16
2.2.3.1. Funciones del plasma seminal	16
2.2.3.2. Composición del plasma seminal	17
2.3. Principales cambios sufridos por el espermatozoide durante su tránsito por el aparato reproductor femenino	18
2.3.1. Capacitación e hiperactivación espermática	18
2.3.2. Hiperactivación	20
2.3.3. Reacción Acrosómica	21
2.4. Métodos de colecta de semen	22
2.4.1. Vagina artificial	22
2.4.2. Electroeyaculador	22
2.5. Preservación y almacenamiento de semen	23
2.5.1. Congelación de semen	23
2.5.2. Características generales de la criopreservación de espermatozoides	24
2.5.3. Efecto del descenso térmico sobre las estructuras celulares	25
2.5.4. Estructuras espermáticas perjudicadas durante la congelación	26
2.5.5. Protocolos actuales de congelación	29
2.5.6. Diluyentes y sustancias crioprotectoras	29
2.5.7. Protectores de membrana	32
2.5.8. Tasa de dilución	33
2.5.9. Cálculo de la dosis inseminante	34

2.6. Enfriamiento, equilibramiento y cristalización	35
2.7. Descongelación	36
2.8. Semen congelado/descongelado y fertilidad	37
2.9. Criopreservación y capacitación espermática	38
2.10. Diferencias en los eyaculados obtenidos con vagina artificial y electroeyaculador	39
2.11. Influencia del plasma seminal en la sobrevida espermática	40
2.12. Caracterización de proteínas presentes en el PS	43
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>47</b>
<b>3.1. MATERIALES</b>	<b>47</b>
3.1. 1. Lugar y período experimental	47
3.1.2. Drogas y/o reactivos	47
3.1.3. Obtención de los eyaculados	47
3.1.3.1. Vagina artificial	48
3.1.3.2. Electroeyaculador	48
3.1.4. Conformación del pool de semen	48
3.1.5. Obtención, procesamiento y conservación de plasma seminal y espermatozoides	49
3.1.6. Constitución de los grupos experimentales (Tratamientos)	50
3.1.7. Procedimiento de congelamiento y descongelamiento del semen	50
3.1.8. Lavado y acondicionamiento de los espermatozoides congelados/descongelados	51

<b>3.2. MÉTODOS</b>	<b>51</b>
3.2.1. Valoración cuali-cuantitativa de las muestras individuales	
de semen fresco	51
3.2.1.1. Volumen del eyaculado	52
3.2.1.2. Movilidad masal microscópica	52
3.2.1.3. Concentración espermática	52
3.2.2. Valoración cuali-cuantitativa del pool de semen fresco	
antes y después de los tratamientos	53
3.2.2.1. Movilidad espermática total	53
3.2.2.2. Movilidad individual rectilínea progresiva	53
3.2.2.3. Integridad de la membrana plasmática	53
3.2.2.4. Funcionalidad de la membrana plasmática	
del compartimiento flagelar	54
3.2.2.5. Funcionalidad mitocondrial	56
3.2.2.6. Prueba de decondensación de la cromatina espermática	57
3.2.3. Valoración del semen congelado/descongelado	59
3.2.4. Valoración del semen congelado/descongelado	
después del lavado	59
3.2.4.1. Estado del acrosoma según los diferentes patrones	
de la Prueba de la Clortetraciclina	59
3.2.4.2. Fecundación in-vitro heteróloga	61
3.2.5. Determinaciones realizadas en el plasma seminal	62

3.2.5.1. Concentración de proteína total en PS obtenido con vagina artificial y electroeyaculador	62
3.2.5.2. Caracterización de las proteínas del PS por electroforesis en geles de poliacrilamida	63
3.2.5.3. Determinación de la concentración de fructosa y minerales	64
3.3. Diseño experimental y análisis estadístico	64
3.3.1. Modelo experimental para analizar semen fresco	65
3.3.2. Modelo experimental para analizar semen congelado/descongelado	66
<b>4. RESULTADOS</b>	70
4.1. Material procesado	70
4.2. Evaluaciones realizadas en los eyaculados individuales	70
4.3. Evaluaciones realizadas sobre los pools de semen fresco	71
4.4. Evaluaciones realizadas en los pools de plasma seminal	72
4.5. Evaluaciones realizadas sobre los tratamientos pre-congelación (eyaculados reconstituidos)	74
4.6. Evaluaciones realizadas en las muestras congeladas/descongeladas	77
4.7. Evaluaciones realizadas después de pasar el semen por gradientes de Percoll	78
4.8. Concentración de proteínas en plasma seminal	81
4.9. Absorbancia relativa de las proteínas presentes en el plasma	

seminal obtenido con vagina artificial y con electroeyaculador	81
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>85</b>
5.1. Valoración cuali-cuantitativa de los eyaculados	
individuales obtenidos con electroeyaculador y con vagina artificial	85
5.2. Valoración cuali-cuantitativa de los pooles de semen fresco obtenidos	
con electroeyaculador y con vagina artificial	86
5.3. Valoración cuali-cuantitativa de los tratamientos	
previo a la congelación	87
5.4. Valoración cuali-cuantitativa de los tratamientos	
luego de su descongelación	90
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>94</b>
<b>7. ANEXO</b>	
7.1. Descripción de las drogas y/o reactivos utilizados en los experimentos	96
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>102</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Título	Página
Figura 1.	Estructura de un espermatozoide de mamífero	10
Figura 2.	Representación esquemática del espermatozoide y sus dominios	13
Figura 3.	Vagina artificial utilizada para extracción de semen en carneros	48
Figura 4.	Espermatozoides teñidos con eosina-nigrosina	54
Figura 5.	Espermatozoides sometidos a la prueba HOS	55
Figura 6.	Espermatozoides sometidos a la reacción de Rh 123	57
Figura 7.	Espermatozoides sometidos a la Prueba de Decondensación de la cromatina	58
Figura 8.	Espermatozoides congelados/descongelados expuestos a la Prueba de la CTC	61
Figura 9.	Ovocitos fecundados	62
Figura 10.	Metodología de obtención de plasma seminal	68
Figura 11.	Metodología de obtención de espermatozoides	69
Figura 12.	Bandas proteicas en plasma seminal obtenido con vagina artificial y con electroeyaculador. Electroforesis en geles de poliacrilamida	82

**ÍNDICE DE CUADROS**

<b>Número</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Cuadro 1.	Valores promedios de los componentes químicos en el plasma seminal ovino obtenido con vagina artificial	18
Cuadro 2.	Componentes de los diluyentes	31
Cuadro 3.	Patrones de viabilidad celular y funcionalidad de mitocondrias	56
Cuadro 4.	Estadística	65

## ÍNDICE DE TABLAS

Número	Título	Página
<b>Tabla 1.</b>	Eyaculados utilizados/ obtenidos en el experimento	70
<b>Tabla 2.</b>	Efecto del método de obtención de semen (vagina artificial o electroeyaculador) en ovinos, sobre los parámetros de calidad espermática en los eyaculados individuales (LSM $\pm$ EEM)	71
<b>Tabla 3.</b>	Efecto del método de obtención de semen (electroeyaculador o vagina artificial), en ovinos, sobre los parámetros de calidad espermática en los pools de semen (LSM $\pm$ EEM)	72
<b>Tabla 4.</b>	Efecto del método de obtención (electroeyaculador o vagina artificial) de plasma seminal ovino sobre las variables volumen, pH y osmolaridad (LSM $\pm$ EEM)	73
<b>Tabla 5.</b>	Concentración (mg/ml) de componentes en plasma seminal ovino colectado con vagina artificial y electroeyaculador (promedio $\pm$ DE)	73
<b>Tabla 6.</b>	Absorbancia relativa de las proteínas presentes en el plasma seminal obtenido con vagina artificial y con electroeyaculador	82

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Número</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Gráfico 1.</b>	Movilidad espermática total de espermatozoides ovinos colectados con electroeyaculador o con vagina artificial tratados con plasma seminal obtenido con electroeyaculador, vagina o sin plasma seminal, previo a su congelación	75
<b>Gráfico 2.</b>	Movilidad individual progresiva de espermatozoides ovinos colectados con electroeyaculador o con vagina artificial tratados con plasma seminal obtenido con electroeyaculador, vagina y sin plasma seminal previo a su congelación	75
<b>Gráfico 3.</b>	Espermatozoides ovinos colectados con electroeyaculador y con vagina artificial con membrana plasmática íntegra (tinción con eosina/nigrosina)	76
<b>Gráfico 4.</b>	Espermatozoides ovinos colectados con electroeyaculador y con vagina artificial con membrana plasmática funcional (Hos+)	77
<b>Gráfico 5.</b>	Espermatozoides ovinos congelados/descongelados colectados con electroeyaculador y con vagina artificial con membrana plasmática íntegra (tinción con eosina/nigrosina)	78
<b>Gráfico 6.</b>	Espermatozoides ovinos congelados/descongelados con membrana plasmática funcional (Hos+) luego de realizar un gradiente de Percoll	79
<b>Gráfico 7.</b>	Espermatozoides ovinos congelados/descongelados	80

obtenidos con electroeyaculador y con vagina artificial  
con reacción acrosómica

**Gráfico 8.**

Porcentaje de ovocitos bovinos fecundados por 81  
espermatozoides ovinos congelados/descongelados  
colectados con electroeyaculador o con vagina  
artificial

## RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo fueron determinar las diferencias en los eyaculados obtenidos con electroeyaculador (EE) y vagina artificial (VA) y evaluar el efecto del agregado de plasma seminal (PS) obtenido con EE y con VA sobre las características posdescongelación de espermatozoides (ESPZ) ovinos obtenidos con ambos métodos. Se colectó semen de cinco carneros *Corriedale* por 12 semanas durante la estación reproductiva, 2 veces/semana, alternando los métodos de colecta. Sólo los eyaculados que cumplieron con los estándares prefijados (volumen:  $\geq 0,5$  ml; concentración:  $\geq 6 \times 10^8$  ESPZ/ml y movilidad masal  $\geq 4$ ) fueron utilizados para formar un pool por método y sesión de colecta. Con los pooles generados en las primeras 6 semanas se obtuvo PS y se evaluó volumen, pH, osmolaridad, concentración de minerales (magnesio, calcio, sodio, potasio) y fructosa. En cuatro pooles se realizó determinación de proteínas totales y separación electroforética en geles de poliacrilamida. Con los eyaculados colectados con VA se realizó espermatocrito para conocer la relación PS/ESPZ (57% PS/43% ESPZ). Con los pooles de las últimas 6 semanas se obtuvo ESPZ y se realizaron evaluaciones de calidad espermática (viabilidad, movilidad total y progresiva, integridad y funcionalidad de la membrana plasmática, funcionalidad mitocondrial y estado de maduración de la cromatina nuclear). Posteriormente los pooles se dividieron en fracciones que determinaron seis tratamientos: T1=ESPZ colectados con VA+PS de VA; T2-ESPZ colectados con VA+PS de EE; T3-ESPZ colectados con VA+ solución de lavado; T4-ESPZ colectados con EE+PS de EE; T5-ESPZ colectados con EE+PS de VA; T6-ESPZ colectados con EE+ solución de lavado. En cada tratamiento se agregó el mismo volumen de PS. Luego de una breve incubación los eyaculados reconstituidos fueron sujetos a las evaluaciones ya mencionadas. Posteriormente los tratamientos fueron mezclados con el diluyente de congelación y envasados en pajuelas para ser conservados en nitrógeno líquido. Luego de la descongelación, a los tratamientos se les realizaron nuevamente las evaluaciones de calidad, además de la determinación del estado de capacitación y del potencial fecundante de los ESPZ. Los datos fueron analizados mediante el procedimiento PROC GLM (SAS, 2000). Los eyaculados individuales colectados con EE tuvieron mayor volumen, menor concentración y número total de ESPZ que los colectados con VA. Los parámetros seminales evaluados en los tratamientos, previo a su congelación, fueron similares en

los pooles obtenidos con ambas metodologías, excepto en el porcentaje de ESPZ con mitocondrias funcionales y de ESPZ con MP íntegra que fueron mayores para las muestras obtenidas con EE. El PS colectado con VA presentó mayor volumen, pH y menor osmolaridad que el PS obtenido con EE. En cuanto a la concentración de proteínas totales ésta fue similar para ambos métodos, sin embargo, fue diferente la distribución de las mismas, mientras que las proteínas de mayor peso molecular (60 a 225 kDa) fue mayor en el PS colectado con VA, las proteínas de menor peso (12-52 kDa) fue mayor en el PS colectado con EE. En la evaluación de los tratamientos luego de su descongelación sólo se detectó efecto del agregado del PS en la determinación del porcentaje de ESPZ con MP funcional. Los tratamientos conformados por PS obtenido con VA presentaron los mayores valores; por otro lado se determinó un efecto del método de obtención de ESPZ en el resto de las variables. Los tratamientos conformados por ESPZ colectados con EE tuvieron los porcentajes más elevados de ESPZ con MP íntegra, ovocitos bovinos fecundados y los menores porcentajes de células reaccionadas, independientemente del sustrato en el cual se encontraron suspendidos. En conclusión, el EE permite obtener eyaculados frescos con un porcentaje de ESPZ viables y mitocondrias funcionales superior al obtenido con VA. Además los ESPZ colectados con EE presentan, luego de la descongelación, mejor calidad y mayor potencial de fecundación *in vitro*.

## ABSTRACT

The objectives of this study were to determine the differences in ejaculates obtained with electroejaculation (EE) and artificial vagina (AV) and evaluate the effect of the addition of seminal plasma (SP) obtained with EE and VA on the characteristics of thawed ram spermatozoa (SZ) obtained with both methods. Semen was collected from five Corriedale rams for 12 weeks during the breeding season, 2 times per week, alternating the collection methods. Only ejaculates that met predetermined standards (volume  $\geq 0.5$  ml, concentration  $\geq 6 \times 10^8$  SZ/ml and mass motility  $\geq 4$ ) were used to form a pool by method and collection session. Semen samples of the first 6 weeks were pooled by method of collection, centrifuged and the supernatant recovered to obtain SP and evaluated on volume, pH, osmolarity, mineral concentration (magnesium, calcium, sodium, potassium) and fructose. In four pools were determined the total protein content and made electrophoretic separation in polyacrylamide gels. With ejaculates collected with VA was performed spermatocrit to determine the relationship SP/SZ (57%SP/43%SZ). Semen samples of the last 6 weeks were pooled by method of collection and washed to obtain SZ and evaluate sperm quality parameters (viability, total and progressive motility, integrity and functionality of the plasma membrane, mitochondrial function and maturation of nuclear chromatin). Then the pools were divided into fractions determined the six treatments: 1- SZ AV+SP AV; 2- SZ AV+SP EE; 3- SZ AV+ washing solution, 4- SZ EE+SP EE; 5- SZ EE+SP AV 6- SZ EE+ washing solution. In each treatment was added the same volume of SP. After a brief incubation, the reconstituted ejaculates were subject to the assessments mentioned above. All treatments were packing in straws ( $50 \times 10^6$  SZ/straw) and frozen. Straws were thawed at 37°C and were again carried out quality assessments, in addition to determining the state of capacitation and fertilizing potential of SZ. Data were analyzed using PROC GLM (SAS, 2000). Individual ejaculates collected with EE had a higher volume, lower concentration and total number of SZ than ejaculates collected with VA. The sperm parameters evaluated in the treatment prior to freezing were similar in both pools, except the percentage of SZ with functional mitochondria and SZ with full PM were higher for samples with EE. The SP collected with VA had a higher volume, pH and lower osmolarity than the SP obtained with EE. As to the total protein concentration was similar for both these methods, however, was different distribution of

the same, while the higher molecular weight proteins (60-225 kDa) was higher in the SP collected with VA, lower weight proteins (12-52 kDa) was higher in the SP collected with EE. In the evaluation of treatments after thawing, we only detected effect of SP addition in the percentage of SZ with functional PM. The treatments conformed by SP obtained with AV had the highest values. Furthermore, there was observed an effect of SZ obtaining method. Treatments conformed by SZ collected with EE had the highest percentages of PM integrity, bovine oocytes fertilized and the smaller percentage of reacted cells, regardless of the substrate on which were suspended. In conclusion, the EE allows obtaining fresh ejaculates with higher percentage of live SZ and functional mitochondria than ejaculates obtain with AV. Therefore, SZ collected with EE have, after thawing, better quality and higher fertilization *in vitro* ability.

## 1. INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) con semen congelado/descongelado es, en la actualidad, la herramienta biotecnológica más utilizada en los programas de mejoramiento genético de las especies de abasto. El uso masivo de la IA en la especie ovina se limita a la aplicación de semen fresco-refrigerado por la vía cervical, ya que el empleo de semen congelado/descongelado por la misma vía genera porcentajes de preñez cercanos al 30% (Maxwell *et al.*, 1999). Estos bajos resultados se deben a la complejidad de la anatomía del cérvix de la oveja, que impide la deposición del semen en el útero y a la reducida sobrevivencia del semen criopreservado, ya que este proceso y el posterior descongelado producen alteraciones en los espermatozoides (ESPZ) a nivel de membranas y mitocondrias que modifican su capacidad fecundante y aceleran su capacitación. Por ello, se han desarrollado alternativas para llegar al útero, forzando la entrada por el cérvix (inseminación transcervical) o por vía laparoscópica. Las tasas de preñez obtenidas con estas técnicas superan el 55% en majadas australianas (Maxwell; Evans, 2000). Sin embargo, los costos e invasividad de estas metodologías dificultan su implementación bajo condiciones de campo. En los últimos años, diversos trabajos se han realizado con el fin de aumentar la sobrevivencia de los ESPZ congelados-descongelados y mejorar los porcentajes de preñez en la IA por vía cervical (Byrne *et al.*, 2000; Gil *et al.*, 2003).

Los ESPZ del ovino se caracterizan por poseer una elevada sensibilidad a temperaturas por debajo de la corporal o fisiológica, debido a la composición bioquímica de sus membranas plasmáticas (Holt; North, 1984). Los efectos deletéreos de la congelación están vinculados con modificaciones en las membranas de los ESPZ, que producen la liberación de proteínas unidas en superficie (proteínas decapacitantes) y aumento de la permeabilidad, tal como ocurre durante la capacitación. Como consecuencia, estas células presentan una mayor concentración de calcio intracelular que aquellas que no fueron sometidas al proceso de congelación. El aumento de calcio intracelular forma parte de las cascadas de señalización que regulan la fisiología espermática (capacitación y reacción acrosomal). Por este motivo, el semen inmediatamente después de ser descongelado, tiene mayor número de ESPZ con excitocis acrosomal y signos moleculares de capacitación que el observado en

semen fresco (Bailey *et al.*, 2003; Pons-Rejraji *et al.*; 2009). La capacitación, si bien es necesaria para la fecundación, desestabiliza las membranas espermáticas y en consecuencia, cuando ocurre en un momento inadecuado acorta la vida media del espermatozoide. La fertilidad del semen congelado se ve comprometida por la proporción de ESPZ “crio-capacitados”.

El método de colecta de semen, previo a su criopreservación, es otro aspecto de relevancia en la IA. Comúnmente se realiza mediante el uso de vagina artificial (VA), método que permite obtener un eyaculado semejante al producido durante el servicio natural, aunque presenta como desventaja que requiere del entrenamiento previo de los animales y la posible dificultad de los mismos para lograr una eyaculación (falta de libido, lesiones traumáticas, etc.) (Terrill, 1940). La otra modalidad es el uso del electroeyaculador (EE) que permite obtener semen de un mayor número de animales en menor tiempo que con la VA, resolviendo las desventajas mencionadas para la VA (Foote, 2002).

Diversos autores (Austin *et al.*, 1961; Hulet *et al.*, 1964) han demostrado que existen diferencias entre los eyaculados de carnero obtenidos con ambos métodos, en la concentración espermática, volumen, pH, concentración de azúcares y minerales en plasma seminal (PS). Quinn *et al.* (1968) reportaron que el semen colectado con VA tiene mayor resistencia al daño causado por frío durante la congelación. Sin embargo, Marco-Jiménez *et al.* (2005) determinaron que la integridad acrosomal es mayor en los ESPZ colectados con EE, asimismo, algunos machos podrían presentar falta de libido después de ser colectados con EE y, en algunos casos, se produce salida retrógrada de orina que al unirse al eyaculado, causa la pérdida del mismo (Pineda *et al.*, 1987).

El plasma seminal (PS) de los mamíferos está compuesto por secreciones de las glándulas sexuales accesorias del aparato reproductor masculino así como, en menor proporción, por fluido epididimario (Mann; Lutwak-Mann, 1976). Durante la eyaculación, las secreciones glandulares se mezclan con los espermatozoides y el fluido epididimario lo que contribuye a aumentar el volumen del semen y a facilitar su tránsito por el tracto reproductivo (Moura *et al.*, 2006). Entre sus componentes se encuentran proteínas, enzimas, lípidos, electrolitos y factores decapacitantes, cuya función es mantener la estabilidad de la membrana plasmática hasta que se produce la

capacitación durante el transporte de la gameta por el tracto genital de la hembra. Así, como la capacitación, la reacción acrosomal y la fusión al ovocito son eventos relacionados, una adecuada estructura de la membrana espermática es esencial para el éxito de la fertilización, y por lo tanto es crítico que la capacitación y la reacción acrosomal ocurran en un adecuado marco espacio-temporal (Muiño-Blanco *et al.*, 2008).

El efecto beneficioso del agregado de PS al semen refrigerado o congelado/descongelado está muy estudiado. En los últimos 15 años muchos grupos se han enfocado en estudiar el rol del PS en la estabilización de las membranas espermáticas y en la identificación y separación de sus moléculas decapacitantes (Guraya, 2000). Es así, como se han identificado ciertas fracciones proteicas con capacidad de adherirse a la membrana de los ESPZ capacitados y detener o aún revertir parcialmente este estado (García-López *et al.*, 1996; Ollero *et al.*, 1997; Barrios *et al.*, 2000). Estas fracciones previnieron la ocurrencia de la capacitación cuando fueron incluidas en el diluyente de los ESPZ previo a su exposición al frío (Pérez-Pé *et al.*, 2001). Según Bernardini *et al.* (2011) al tratar ESPZ congelados de carnero con una fracción de proteínas del PS con afinidad por la superficie espermática, la motilidad y ultraestructura mejoraron, del mismo modo que cuando se los incubó con PS completo. En carneros, el efecto del PS sobre los ESPZ fue estudiado antes y después de la disminución brusca de temperatura y de la descongelación (Evans; Maxwell, 1990; Perez-Pé *et al.*, 2002; Barrios *et al.*, 2005; Domínguez *et al.*, 2008; Muiño-Blanco *et al.*, 2008; Leahy *et al.*, 2009; Leahy *et al.*, 2010), demostrando que es capaz, tanto de proteger como de reparar los daños ocasionados por el frío.

Marco-Jiménez *et al.* (2008) reportaron que el 80 % del contenido proteico del PS está representado por 4 tipos de proteínas que tienen un peso molecular de 15, 21, 24 y 50 kDa. En el PS proveniente de la electroeyaculación, la concentración de las proteínas de 15 y 21 kDa es mayor que en el PS colectado con VA. La proteína de 21 kDa podría ser la responsable de que el ESPZ dañado por el frío, recupere la permeabilidad de la membrana plasmática y las características de un ESPZ no dañado (Barrios *et al.*, 2000). Sin embargo, Corteel (1980), Graham (1994) y Kawano *et al.* (2004) reportaron datos contrapuestos de los efectos del PS sobre los parámetros de calidad espermática y fertilidad de los ESPZ congelados/descongelados.

Como consecuencia de los antecedentes y de las mencionadas diferencias entre en el PS correspondiente a eyaculados obtenidos con VA o EE, es posible pensar que los espermatozoides colectados con EE tendrán una menor susceptibilidad al daño por congelación que los obtenidos por medio de VA. Además, no está claro si esta posibilidad se debería a las diferencias en el PS o en los ESPZ inducidas por el método de colecta. El presente trabajo está orientado a determinar si es el PS el causante de esta susceptibilidad diferencial, dejando el aspecto espermático para un trabajo futuro.

### **1.1. HIPÓTESIS**

El plasma seminal obtenido mediante electroeyaculación agregado previo a la congelación mejora las características cualitativas posdescongelación de espermatozoides ovinos obtenidos con electroeyaculador y con vagina artificial.

### **1.2. OBJETIVO GENERAL**

Mejorar la capacidad fecundante del semen ovino congelado/descongelado.

### **1.3. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Describir y comparar cuali-cuantitativamente los eyaculados de carnero obtenidos con vagina artificial y con electroeyaculador.
  
- Determinar el efecto del plasma seminal obtenido con electroeyaculador y con vagina artificial agregado previo a la congelación, sobre la calidad espermática posdescongelación.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Características reproductivas de la especie ovina

La estacionalidad reproductiva es un proceso de adaptación, mediante el cual los animales silvestres y algunos domésticos reducen los efectos de los cambios anuales de temperatura y disponibilidad de alimento, asegurándose la posibilidad de multiplicación de la especie (Karsch *et al.*, 1984). En bovinos y porcinos el proceso de domesticación llevó a la pérdida casi en su totalidad de esta forma de reproducción, sin embargo, la misma se mantiene en la mayoría de las razas ovinas y caprinas originarias de zonas templadas de latitudes  $>35^\circ$  (Malpaux *et al.*, 1996). El patrón reproductivo estacional en estas especies se regula por el fotoperiodo o duración de las horas luz del día (Malpaux *et al.*, 1999), ya que a diferencia de otras señales ambientales, como la temperatura o el régimen de lluvias, se mantiene constante para cada estación a lo largo de los años. Los ovinos son llamados reproductores de días cortos (o fotoperiódicos negativos) debido a que su estación reproductiva se activa en respuesta a la disminución de las horas luz. Dicha estación comienza a fines del verano e inicio del otoño (Chemineau *et al.*, 1992) y se extiende hasta comienzos del invierno (Hafez, 1952). Otros factores ambientales, entre ellos la temperatura y nutrición así como el entorno social modulan el efecto de la estacionalidad reproductiva condicionada por el fotoperiodo, la importancia de cada uno de estos factores dependerá de la raza y la latitud donde habiten los animales.

#### 2.1.1. Melatonina y reproducción

Los ovinos traducen la información fotoperiódica o luminosa a una señal hormonal a través de la melatonina, sustancia natural presente en el organismo de todos los mamíferos. La melatonina es sintetizada durante las horas de oscuridad por la glándula pineal, e indica al animal los cambios en el ciclo luz-oscuridad (Williams; Helliwell, 1993; Arendt, 1998; Malpaux *et al.*, 2002). En las hembras la mayor duración de su secreción indica una mayor duración de las horas de oscuridad, determinando el inicio del período de actividad sexual, además de estimular la actividad gonadal. En el

macho su función es la de aumentar la secreción de andrógenos promoviendo una mayor libido. Debido a que el ritmo de secreción circadiano de esta hormona es muy importante en el establecimiento de la estacionalidad ha sido denominada hormona de la reproducción (Salamon *et al.*, 1990).

### **2.1.2. La oveja**

En la oveja es posible diferenciar dos períodos en el año: uno de reposo sexual, anestro, o contraestación reproductiva y otro de actividad sexual. Dichos períodos están determinados por las variaciones anuales de las horas de luz (Yeates, 1949; Lincoln; Short, 1980; Lehman *et al.*, 2002; Thiéry *et al.*, 2002). El período de anestro se caracteriza por la reducción o cese de la actividad sexual, con disminución de la secreción de melatonina y de la frecuencia de secreción pulsátil de GnRH y LH (Legan; Karsch, 1979; Barrell *et al.*, 1992), por lo cual la oveja no presenta estrógeno ni ovulación, aunque sí se detectan ondas foliculares, ya que los pulsos de FSH se mantienen. De manera contraria, durante la época reproductiva, el aumento en la duración de la secreción de melatonina induce un incremento en la secreción pulsátil de GnRH/LH y restablece los ciclos estrales y la ovulación (Viguié *et al.*, 1997). Durante el período de transición, entre el período de anestro y el de actividad sexual, las hembras exhiben cambios fisiológicos graduales, observándose ciclos estrales cortos debido a que el primer cuerpo lúteo generalmente regresa prematuramente luego de 5-6 días de formado (Rosa; Bryant, 2003).

El ciclo estral en la oveja tiene una duración promedio de 17 días y se compone de una fase folicular y otra luteal. Durante la fase folicular, el estrógeno ejerce un efecto de retroalimentación positiva a nivel hipotalámico, aumentando hacia el final de la misma la frecuencia de secreción de pulsos de GnRH/LH generando el "pico" preovulatorio de ambas hormonas. Durante la fase luteal, la progesterona ejerce un potente efecto inhibitor de la secreción pulsátil de GnRH/LH (Robinson; Kendrick, 1992; Jackson; Kuehl, 2002). La duración del celo varía con la edad, la raza, la situación geográfica, la época del año y el contacto con los machos, oscilando entre 18 y 72 horas. La ovulación es espontánea y tiene lugar hacia el final del celo. En la oveja

la pubertad se presenta entre los 5 y 10 meses de edad, aunque la madurez reproductiva suele manifestarse cuando las hembras tienen entre 8 y 14 meses de vida, al alcanzar el 40-60% de su peso adulto, esto también es modulado por el fotoperiodo. El periodo de gestación varía entre 145 y 152 días.

### **2.1.3. El carnero**

A diferencia de la oveja, en el carnero no se observa un período de anulación de la actividad sexual. Aunque los cambios de horas luz pueden actuar reduciendo la secreción de hormonas gonadotróficas en la época no reproductiva, siempre existe suficiente liberación de gonadotrofinas para mantener un nivel, relativamente bajo, de producción de espermatozoides (ESPZ) y andrógenos. Durante la estación no reproductiva se observa disminución de la circunferencia escrotal, de la tensión testicular, de la producción cuali-cuantitativa de ESPZ y de su fertilidad. La actividad sexual es máxima en verano y otoño, con lo cual se estimula la función testicular y disminuye a fines del invierno e inicios de la primavera, reflejándose en los cambios que ocurren en la calidad del semen (Aguilar, 2009). El grado de estacionalidad varía con la raza (Salamon *et al.*, 1990). Otros factores como la temperatura, el estado nutricional, las enfermedades, el estrés y los factores sociales pueden modificar la función hipofisaria. La introducción de una oveja en celo estimula la secreción de hormonas sexuales en el carnero, debido a estímulos visuales u olfatorios. La pubertad en el carnero, se manifiesta entre los 3 y 6 meses de vida (aparición de primeros ESPZ). Sin embargo, la madurez reproductiva suele alcanzarse a los 8-12 meses.

## **2.2. Semen y eyaculado**

El semen, producto del aparato reproductor masculino, es un líquido blanquecino, opaco, que luego de la centrifugación presenta dos fracciones: una superior, fluida y translúcida llamada plasma seminal (PS) y otra inferior, opaca y densa, compuesta mayoritariamente por ESPZ y en muy pequeña medida por células epiteliales descamadas del tracto genital (Hafez, 1987)

El eyaculado es el volumen de semen que un macho puede depositar en el aparato reproductor de la hembra durante un servicio o en una extracción o colecta. El eyaculado de un carnero tiene un volumen de 0,5-2,0 ml en un animal adulto, y una concentración espermática de  $3500-6000 \times 10^6$  ESPZ/ml. El volumen y la concentración están sujetos a variaciones que dependen del individuo, del método y frecuencia de colecta y de la época del año en que se realice (Cupps *et al.*, 1960; Marco-Jiménez *et al.*, 2005)

### 2.2.1. El espermatozoide

El ESPZ es la gameta masculina, producida en el epitelio de los túbulos seminíferos de los testículos durante un proceso fisiológico denominado espermatogénesis. Es una célula haploide, altamente especializada, cuya función es transportar la información genética del macho hacia la gameta femenina.

Se compone de una cabeza y una cola, ambas unidas por una zona estrecha denominada cuello o porción intermedia, delimitadas en su conjunto por la membrana plasmática (MP) (**Fig.1**). La forma y dimensiones de la cabeza y la longitud de la cola, varían según la especie. El ESPZ ovino tiene forma de espátula, con una cabeza chata de forma oval que mide  $60\mu$  de largo,  $5\mu$  de ancho y menos de media micra de espesor (Vaissaire, 1977).

La cabeza está constituida principalmente por el núcleo, dentro del cual se halla el material genético necesario para la fecundación del ovocito. El ADN se encuentra muy condensado con la finalidad de ocupar el menor espacio posible (Frandsen, 1967), esto se logra gracias a que las proteínas específicas que unen el ADN, llamadas histonas, en los ESPZ fueron reemplazadas por protaminas, lo que permite reducir el volumen de la célula y aumentar sus propiedades dinámicas, favoreciendo el proceso de fertilización (Ramalho-Santos *et al.*, 2007). La cabeza se encuentra rodeada en sus  $2/3$  anteriores por una envoltura especial derivada del aparato de Golgi, llamada saco acrosomal, que contiene en su interior enzimas hidrolíticas como hialuronidasa, cuya función es la de dispersar a las células de la granulosa, que rodean el ovocito, mediante la disolución del ácido hialurónico presente. Este mecanismo se ha supuesto de gran importancia para la fecundación y sería la razón del inmenso número de ESPZ

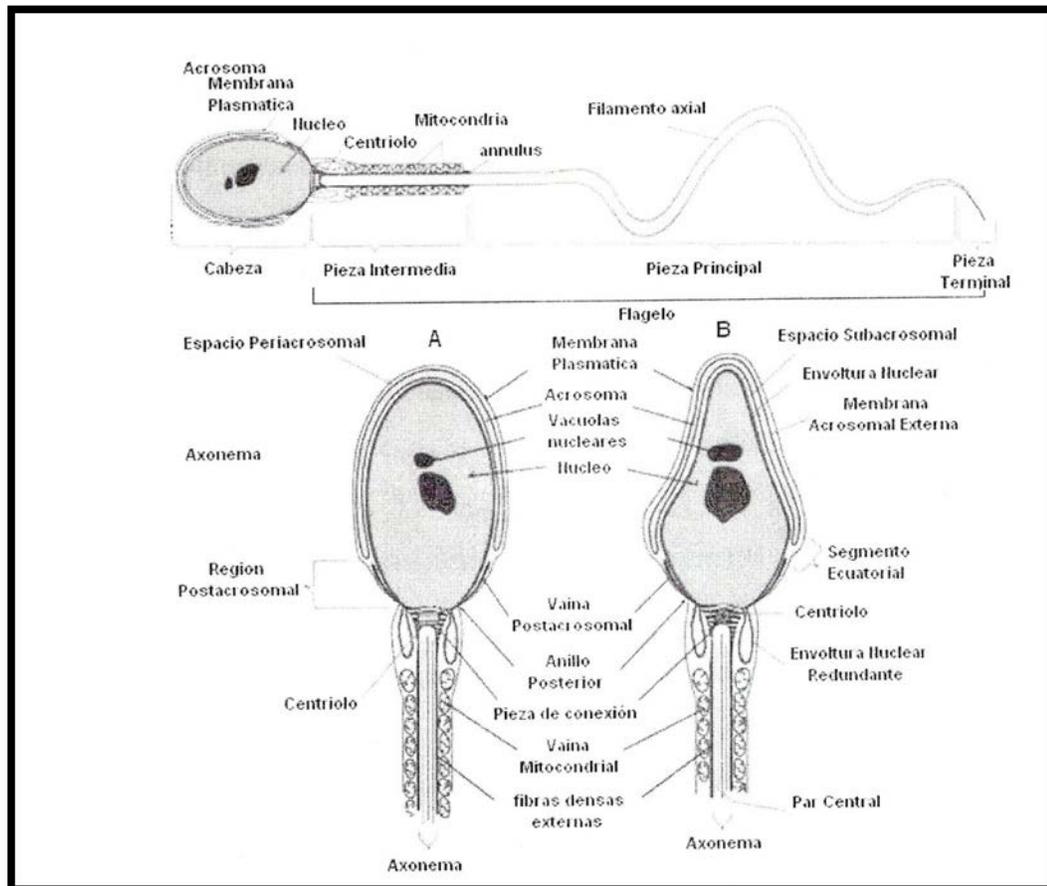
que se observan alrededor del ovocito posterior a una eyaculación o inseminación (Knobil; Neil, 1988).

El cuello (o pieza de unión) es corto ( $0.5 \mu$ ) y contiene el centríolo proximal, esta zona del ESPZ es propensa a sufrir perturbaciones en el proceso de maduración durante el tránsito epididimario.

La cola o flagelo es proporcionalmente larga ( $54\mu$ ) y es la que le permite al ESPZ realizar los movimientos para su traslación. Puede dividirse en tres regiones: pieza intermedia, pieza principal (de mayor longitud) y pieza terminal. Internamente, el flagelo, se encuentra recorrido por un par de microtúbulos centrales rodeados por otros nueve pares de microtúbulos, cercados, a su vez, por nueve fibras externas más gruesas. En la pieza intermedia se encuentra una agrupación de mitocondrias en forma de cinturón (vainas mitocondrial), que se ubica entre las fibras gruesas y la MP. Las mitocondrias, a través de sistemas enzimáticos, son las encargadas de proveer la energía necesaria para el movimiento (Eddy; O'Brien, 1994). Las fibras externas son contráctiles y los microtúbulos sirven para conducir el impulso a lo largo de la cola.

El movimiento del conjunto de ESPZ genera una onda de masa visible macroscópicamente, que también puede ser evaluado microscópicamente de acuerdo a la velocidad de las olas u ondas generadas (movilidad masal microscópica) (Vaissaire, 1977). Los ESPZ ovinos sanos y vitales se desplazan a una velocidad aproximada de  $100\mu/\text{min}$  a  $37^\circ\text{C}$ .

El ESPZ posee un metabolismo de neta degradación ya que toma sustancias del medio líquido que lo rodea o de su propia estructura y con ello genera la energía necesaria para su movimiento. La toma de oxígeno refleja el consumo de estas sustancias y es aproximadamente de  $5-20 \mu\text{l}$  por cada mil millones de células/hora, pero este consumo, y por ende, su actividad, varían con la temperatura, razón por la cual, es necesario mantener constante la temperatura del semen destinado a evaluación, utilización directa o preservación.



**Figura 1. Estructura de un espermatozoide de mamífero**

(Tomado de [//:www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org))

### 2.2.1.1. Composición de las membranas espermáticas

La MP actúa como barrera estructural e interfase de comunicación con el medio extracelular, transmitiendo señales bioquímicas originadas de interacciones entre el ligando y el receptor (Olden *et al.*, 1985). En el ESPZ, la integridad de la MP es de vital importancia para su correcto funcionamiento, debido a su limitada capacidad biosintética y elevada especialización (Parks; Graham, 1992). Tal es así, que su integridad se considera un elemento fundamental para el éxito de la fecundación. Por lo tanto, tiene algunas particularidades con respecto a las MP de las células somáticas.

El modelo básico de membranas biológicas según Singer y Nicholson (1972) es el de una bicapa lipídica conformada por glicoproteínas y glicolípidos unidos por interacciones no covalentes, su fluidez y permeabilidad selectiva son cualidades muy importantes, que se deben a su composición de abundantes fosfolípidos y proteínas asociadas.

Los lípidos componen el 30-50% de la membrana, están íntimamente involucrados en la transducción de señales y pueden modular la función de las proteínas. Estos se encuentran anclados a su posición, aspecto que resulta importante para la fertilización, ya que la fusión de los gametos masculino y femenino requiere la participación particular de un microambiente lipídico. El conjunto de lípidos es muy importante en la regulación de los cambios de la composición de la MP de los ESPZ durante los procesos de maduración y capacitación (Sanocka; Kurpisz, 2004).

La composición lipídica de la MP de los ESPZ es notablemente diferente a las MP de las demás células somáticas (Martínez; Morros, 1996). Se ha determinado que en la superficie del ESPZ existe un alto nivel de fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, difosfatidilglicerol, esterol y lípidos neutros, que representan el 70-80%, así como un alto nivel de ácidos grasos y glucolípidos. Jones y Mann (1977) observaron que en todos los fragmentos de la MP espermática el ácido graso poliinsaturado docosahexaenóico es altamente predominante, con lo cual, se le adjudicó un rol imprescindible en la regulación de la fluidez de la MP (Martínez; Morros, 1996).

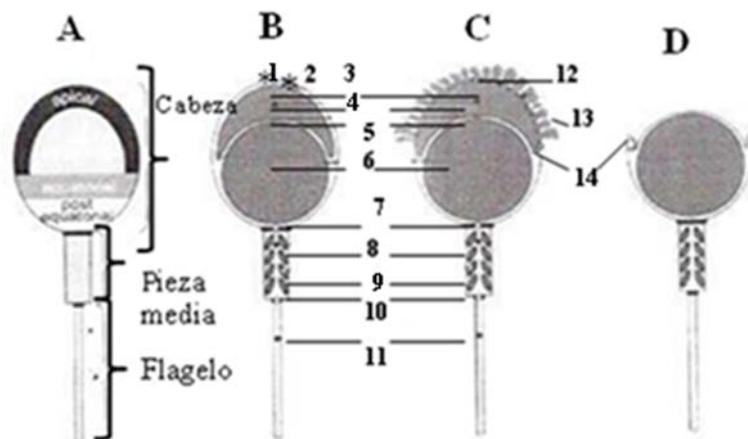
La MP de los ESPZ ovinos difiere de la MP de los ESPZ de otras especies, ya que el ESPZ ovino posee niveles muy elevados de fosfolípidos y ácidos grasos poliinsaturados y niveles muy bajos de colesterol, a diferencia de otros ESPZ, como bovinos y humanos. La relación ácidos grasos poliinsaturados/saturados (fosfolípidos/colesterol) podría influir en la sensibilidad de la MP de los ESPZ al daño debido a las bajas temperaturas. Darin-Bennett y White (1975) establecieron una relación molar alta de fosfolípidos: colesterol en la MP de ESPZ humanos y de conejos en comparación con la relación molar del ovino y bovino (1:0 y 0:4, respectivamente). Esta relación elevada tendría su origen en una membrana más compacta y menos permeable, como es el caso de las dos primeras especies.

Las proteínas realizan diversas funciones, entre ellas, transportar moléculas específicas hacia el interior y exterior de la célula; actuar como enzimas o catalizadores de reacciones y actuar como receptores en la transducción de señales. La distribución

de las proteínas en la MP también cambia marcadamente entre la cola, la pieza media y el acrosoma. Cuando se comparan las proteínas de la MP espermática con las de otros tipos celulares, los ESPZ probablemente exhiben el más alto grado de polaridad, reportándose entre las proteínas específicas de la membrana espermática: -1,4 galactosiltransferasa, fucosiltransferasa, -d-manosidasa, sp56, p95, entre otras.

La MP de los ESPZ mamíferos está compartimentada en 5 regiones o macrodominios principales (**Fig. 2**). En la zona de la cabeza se distinguen 3 de ellos, cubriendo las regiones acrosomal, ecuatorial y postacrosómica y en el flagelo se evidencian 2, que corresponden a la pieza intermedia y a la principal. Estos sitios se diferencian bioquímica y funcionalmente entre sí y cada uno contiene una dotación definida de proteínas y lípidos (Holt, 1984). Dentro de estos compartimentos se encuentran los rafts lipídicos, microdominios de membrana enriquecidos en colesterol y esfingolípidos, que poseen un elevado nivel de compactación y confieren un alto punto de fusión y un fuerte carácter de insolubilidad a detergentes no iónicos a bajas temperaturas. Además de éstos, se encuentran los microdominios de proteínas, formados por moléculas muy dinámicas en respuesta a los estímulos externos (temperatura) e internos (reordenamiento del citoesqueleto) (Edidin, 1997; Retviold; Simmons, 1998). Los macrodominios antes citados son establecidos durante la diferenciación testicular y han sido identificados en ESPZ de diferentes especies (Travis, 2004; Girouard, *et al.*, 2005) y relacionados con la capacitación espermática (Shadan *et al.*, 2004; Van Gestel *et al.*, 2005).

La primera separación entre la MP que recubre la cabeza y la cola está dada por una alineación de proteínas transmembranales que forman el cuello o anillo posterior, mientras que la segunda, entre la pieza intermedia y la principal del flagelo, se debe a la presencia de un anillo. En el ESPZ maduro ambas estructuras parecieran jugar un rol importante durante la maduración y capacitación espermáticas (Cowan *et al.*, 1987; Bartles, 1995; Wolf, 1995).



**Figura 2. Representación esquemática del espermatozoide y sus dominios.** A: Divisiones en la cabeza: apical, pre-ecuatorial, ecuatorial y acrosómica. B, C y D: Representan cortes transversales de la célula. 1: MP. 2: MA externa. 3: contenido del acrosoma. 4: MA interna. 5: envoltura nuclear. 6: núcleo. 7: anillo posterior. 8: pieza intermedia. 9: mitocondrias. 10: porción anular. 11: flagelo. 12: vesícula tras la fusión de la MP con la MA externa. 13: secreción acrosomal. 14: estructura formada de la fusión de la MP y la MA interna (Adaptado de Fleisch y Gadella, 2000).

### 2.2.1.2. Maduración epididimaria

Los ESPZ, una vez formados, son liberados a la luz de los túbulos seminíferos y conducidos hasta la *rete testis* por medio de las secreciones de las células de Sertoli. Luego, deben pasar por los conductos eferentes para desembocar, finalmente, en el epidídimo donde sufren un conjunto de transformaciones que los conducen hacia su maduración.

La interacción entre las células espermáticas y el medio que las rodea es un proceso crucial que afecta su adecuada constitución y características fisiológicas. Amann *et al.* (1993) concluyeron que la maduración de cada ESPZ depende de su exposición a una suficiente concentración de constituyentes luminare epididimarios para maximizar su probabilidad de modificación. La maduración es considerada un proceso a través del cual los ESPZ cambian desde un estado infértil hacia otro fértil, obligatorio para la reproducción no asistida.

Según la porción anatómica del epidídimo por la cual los ESPZ se encuentren atravesando (cabeza, cuerpo o cola), su grado de madurez irá en aumento. El rol

primario de la cola del epidídimo es el mantenimiento y almacenamiento de los ESPZ fértiles y maduros hasta el momento de la eyaculación, aunque la mayor parte se elimina por excreción en la orina.

El tránsito epididimario insume un tiempo variable, que en el carnero oscila entre 10,4 y 16,4 días, aunque puede acortarse a 2-4 días debido a eyaculaciones frecuentes (Amann; Schanbacher, 1983). De acuerdo a los tiempos señalados, un ESPZ de carnero, desde que se forma y madura hasta que aparece en el eyaculado demora alrededor de 60 días, por lo tanto, toda situación adversa que pueda sufrir en ese lapso puede repercutir tanto en su morfología como en su fisiología.

### **Procesos o cambios fisiológicos que sufren los espermatozoides durante la maduración:**

- **Modificación del complejo ADN-proteína del núcleo:** este evento ocurre con el objetivo de minimizar la probabilidad de daño ambiental o degradación prematura, maximizando la posibilidad de recondensación hacia la formación del pronúcleo funcional del macho.
- **Modificaciones en el contenido lipídico de la MP:** ésta es una de las principales características de la maduración espermática. El total de lípidos en esta célula disminuye a lo largo del recorrido por el conducto epididimario. El contenido lipídico total disminuye en ESPZ de cerdos, toros y ratones y el contenido de colesterol, en particular, decrece en ESPZ de carneros y hámsteres. La relación colesterol/fosfolípidos y la concentración de fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, cardiolipina decrece en ESPZ de carnero y aumenta la concentración de ácidos grasos insaturados. Esta podría ser una de las razones por las cuales el semen eyaculado sería más sensible al daño ocasionado por frío que los del interior del testículo.
- **Cambios en la composición de las proteínas:** ocurre adición, modificación, pérdida y cambio de posición de las proteínas. La cabeza y cuerpo del epidídimo secretan una gran variedad de proteínas y algunas de ellas se asocian a la MP espermática. En particular, ocurren cambios en el patrón de distribución de las glicoproteínas intramembranas de la MP.

- Cambios en el patrón y efectividad de la actividad flagelar: ocurren modificaciones en la MP, mitocondrias y componentes fibrosos y microtubulares de las piezas media y principal del ESPZ para proveer eficiente transducción de energía desde sustratos exógenos y/o endógenos para coordinar las contracciones resultantes en movilidad progresiva.

- Adquisición de una cubierta glicoprotéica específica secretada por el epidídimo que aporta los ESPZ la habilidad de unirse a la zona pelúcida (Orgebin-Crist; Fournier-Delpech, 1982).

Todo este conjunto de transformaciones preparan al ESPZ para su supervivencia dentro del tracto genital femenino y para que lleve a cabo su función más importante, la fecundación del ovocito (Amann *et al.*, 1993).

### **2.2.2. Espermatozoide eyaculado vs espermatozoide epididimario**

Los ESPZ de la cola del epidídimo así como los ESPZ eyaculados son considerados maduros y fértiles, aunque estos dos tipos de células, *in vitro*, no se comportan igualmente. Shalgi *et al.* (1980) en ratas y Nagai *et al.* (1984) en cerdos observaron que los ESPZ epididimarios presentaron una capacidad fertilizante mayor que los ESPZ que fueron colectados del eyaculado.

La mayor resistencia de los ESPZ eyaculados sobre los epididimarios a la capacitación *in vitro* podría deberse a que su MP es más estable, además la MP de este último se encuentra estabilizada por adsorción o integración de glicoproteínas epididimarias. Existe una amplia evidencia de que algunos de los componentes del PS (glicoproteínas o polipéptidos y factores decapacitantes) se adhieren muy firmemente a la superficie de los ESPZ eyaculados, de tal manera que no pueden ser removidos con los lavados corrientes que se realizan para preparar el semen para realizar fertilización *in vitro* (Russell *et al.*, 1985), la remoción de estos componentes es esencial para que ocurra el proceso de capacitación espermática. Aparentemente el tracto genital de la hembra en celo es capaz de capacitar ambos ESPZ de igual manera, sugiriendo que existe un mecanismo eficiente para remover los compuestos añadidos en el epidídimo y por parte del plasma seminal (Overstreet *et al.*, 1974).

### 2.2.3. Plasma seminal

La porción líquida del eyaculado denominada plasma seminal (PS), es un complejo biológico compuesto en una mínima proporción por fluido epididimario y casi en su totalidad por fluidos secretados por las vesículas seminales, glándulas accesorias del aparato genital masculino, que acumulan sus productos en el lumen, luego de que el macho alcance la pubertad (Mann; Lutwak-Mann, 1976). Durante la eyaculación, las secreciones glandulares se mezclan con los ESPZ y con el fluido epididimario, lo que contribuye a aumentar el volumen del semen y a facilitar su tránsito por el tracto reproductivo (Moura *et al.*, 2006).

#### 2.2.3.1. Funciones del PS

Entre las diversas funciones del PS se pueden mencionar algunas tales como:

- facilitar el paso de los ESPZ, transportándolos desde el sistema reproductor del macho, durante la eyaculación, hacia el tracto genital femenino
- activar a los ESPZ, previamente no móviles
- proporcionar un medio rico en nutrientes, tamponado, que colabora en mantener la supervivencia de las gametas
- proteger a las membranas celulares de los daños peroxidativos (Schoeneck *et al.*, 1996)
- actuar como un medio natural para completar la maduración espermática a través de procesos hormonales, enzimáticos y modificaciones de superficie (Saling, 1989; Yanagimachi, 1994).
- sus proteínas modulan la interacción del ESPZ con el tracto genital de la hembra y ejercen una acción inmunosupresora (Yeung *et al.*, 2006).
- durante el tránsito epididimario los ESPZ adquieren proteínas del PS que pueden influenciar su fertilidad (Miller *et al.*, 1990).

Sin restarle importancia a lo descrito anteriormente, la función principal del PS es la de prevenir la capacitación prematura de los ESPZ (Yanagimachi, 1994b), manteniéndolos en un estado no capacitado (Cross, 1996)

### 2.2.3.2.Composición

El componente principal del PS es el agua (90-98%), contiene además sustancias orgánicas e inorgánicas (aminoácidos, péptidos y proteínas) que aportan protección y nutrientes a los ESPZ; la fructosa, sustancia orgánica más abundante, es el azúcar más fácilmente metabolizable que proporciona la mayor fuente de energía a los ESPZ (Cuadro 1). El PS normalmente es isotónico y neutro y su pH se mantiene muy próximo a 7 gracias a un complejo sistema amortiguador. Entre sus constituyentes se destacan una amplia variedad de proteínas secretadas, en su mayoría, por las vesículas seminales (Mann; Lutwak-Mann, 1981; Aumüller *et al.*, 1988; Chandonnet *et al.*, 1990). Según Bergeron *et al.* (2005) el 80 % del contenido proteico del PS está representado por 4 tipos de proteínas que tienen un peso molecular de 15, 21, 24 y 50 kDa. En los últimos años estas proteínas han sido objeto de estudio en muchos grupos de investigación, ya que algunas de ellas son adsorbidas en la superficie de los ESPZ y logran mantener la estabilidad de sus membranas hasta el momento de iniciar el proceso de capacitación en el tracto reproductivo femenino (Metz *et al.*, 1990; Desnoyers *et al.*, 1994; Amann, 1999). Estas proteínas deben ser removidas en el momento apropiado para permitir la fertilización (Desnoyers; Manjunath, 1992). Se encontraron correlaciones positivas entre contenido proteico, movilidad y viabilidad espermáticas, lo cual sugiere que las proteínas pueden jugar un papel importante en el mantenimiento de la integridad y funcionalidad del ESPZ (Catt *et al.*, 1997).

El PS también tiene otros componentes que se encuentran en muy bajas concentraciones entre ellos fosfolípidos, ácido ascórbico, aminoácidos, péptidos, lípidos, ácidos grasos y enzimas (White, 1980), además de constituyentes antimicrobianos como plasmina seminal (Shivaji *et al.*, 1984) e inmunoglobulinas (Ablin, 1974). Asimismo, se han encontrado diversas sustancias hormonales como los andrógenos, estrógenos, prostaglandinas, FSH, LH, sustancia tipo gonadotropina coriónica, hormona del crecimiento, insulina, glucagón, prolactina, relaxina, hormona liberadora tiroidea y encefalinas (Mann; Lutwak-Mann, 1981).

La concentración de los componentes del PS presenta variabilidad entre las distintas especies, entre animales de una misma especie, entre eyaculados de un mismo animal y según el método de colecta seminal utilizado.

**Cuadro 1.** Valores promedios de los componentes químicos (mg/100mL) en el PS de carnero obtenido con vagina artificial (Fuente: Garner y Hafez, 2000)

Componentes químicos	Valores
Proteína	5000
Fructosa	250
Sorbitol	26 – 170
Ácido cítrico	110 – 270
Inositol	7 – 14
Glicerilfosforilcolina	1 100 – 2 100
Sodio	178 ± 11
Potasio	84 ± 4
Calcio	6 ± 2
Magnesio	6 ± 0.8
Cloruro	86

### 2.3. Principales cambios sufridos por el espermatozoide durante su tránsito por el tracto reproductivo de la hembra

Los ESPZ recién eyaculados son incapaces de fecundar al ovocito, esta habilidad es adquirida luego de un proceso fisiológico denominado capacitación espermática que comienza en el tracto reproductor de la hembra y finaliza con la reacción acrosómica.

#### 2.3.1. Capacitación espermática

Los ESPZ de los mamíferos, luego de la maduración a lo largo del epidídimo, son almacenados en la cola de este órgano donde se encuentran inmóviles y estables, adquieren la movilidad posteriormente, al ser eliminados con el eyaculado en un

proceso condicionado por los constituyentes del PS. Luego, los ESPZ móviles pero aún incapaces de fecundar al ovocito logran esta aptitud tras un tiempo de permanencia en el tracto genital de la hembra, a través de un fenómeno fisiológico denominado capacitación espermática (CA), que involucra cambios estructurales, bioquímicos y fisiológicos que causan la desestabilización y eliminación de sustancias a nivel de su MP (de Lamirande *et al.*, 1997). En el caso de que los ESPZ sufrieran capacitación prematura, disminuiría su habilidad para adherirse a las células epiteliales del oviducto y cumplir su función, además de acortarse su vida media (Medeiros *et al.*, 2002).

### **Transformaciones que ocurren en el espermatozoide durante la capacitación**

- Alteración de la relación colesterol/fosfolípidos: ocurre salida de colesterol de la MP, lo que conlleva un incremento en la fluidez de la misma y aumento de su permeabilidad y de la capacidad de fusionarse, también ocurre modificación de la concentración de iones e hiperpolarización. La depleción del colesterol parece ser el evento disparador en la cascada de cambios iónicos intracelulares y vías de señalización (Langlais; Roberts, 1985; Yeagle, 1991; De Jonge, 1999).

- Alcalinización citoplasmática (Handrow *et al.*, 1989)

- Activación de los canales de  $\text{Ca}^{++}$  y de  $\text{Na} / \text{K}^+$ , con el subsecuente aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular (Arnoult *et al.*, 1996).

- Activación de la cascada de segundos mensajeros, con la consiguiente generación de radicales libres. Estos radicales libres o especies reactivas de  $\text{O}_2$  (ROS), específicamente anión superóxido, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico juegan un rol importante en la cascada de eventos que llevan a la capacitación, aunque cuando su producción exagerada pueden tener un efecto tóxico y detrimental para la célula debido a su elevada reactividad. La toxicidad se relaciona con la ionización y consecuente inactivación de proteínas, daño del ADN y peroxidación de los lípidos insaturados. Los ESPZ son particularmente susceptibles al daño oxidativo porque poseen en sus membranas una gran cantidad de lípidos insaturados, por su incapacidad de resintetizar componentes de membrana y por la limitada capacidad de sus sistemas

antioxidantes. La peroxidación de los lípidos desestabiliza las membranas lo que conlleva a la muerte celular (De Lamirande *et al.*, 1998).

- Fosforilación del residuo de tirosina de las proteínas (Flesch *et al.*, 1999)

- Aumento del AMPc

- Cambios en el patrón de movimientos

- Remoción de factores decapacitantes de la superficie del ESPZ: estos factores son moléculas que se originan en las secreciones testiculares, epididimarias y seminales, protegen a los ESPZ durante su periodo de almacenamiento en la cola del epidídimo, estabilizando el acrosoma, por lo que su remoción antes de la fecundación, es muy importante. Se ha sugerido que estos factores bloquean a los receptores o grupos electrostáticos localizados en la membrana. La cara externa de la MP es rica en carbohidratos cargados eléctricamente (glicocaliz), en ésta se encuentran unidos carbohidratos absorbidos o polisacáridos por uniones superficiales no covalentes. Así los factores decapacitantes, son susceptibles de enmascarar los sitios de unión de los receptores iónicos o de activación celular.

El estado de CA puede ser determinado *in vitro* mediante pruebas de fertilización, inducción de la reacción acrosómica en respuesta a agentes biológicos (ZP, progesterona) y mediante la prueba de la Clortetraciclina (Prueba de la CTC) (Pérez *et al.*, 1996).

### **2.3.2. Hiperactivación espermática**

La capacitación espermática está relacionada con un cambio en el movimiento del ESPZ, más específicamente del flagelo, desde un tipo de movimiento progresivo hacia movimientos vigorosos similares a los golpes de un látigo, este cambio, conocido como hiperactivación espermática (HE) (Chamberland *et al.*, 2001), sucede previamente a la ocurrencia de la reacción acrosómica (RA). La HE se caracteriza por un movimiento flagelar marcado, movimiento de la cabeza del ESPZ hacia los lados y una trayectoria no lineal (Baldi *et al.*, 1996). Los cambios en la MP del ESPZ durante la capacitación modifican la actividad de la cola, haciendo que tenga una potente

actividad de latigqueo, en lugar del débil movimiento ondulante anterior (Guyton; Hall, 2000). La HE ocurre en el tracto reproductivo de la hembra, aunque puede ser inducida *in vitro* en medios artificiales mediante el agregado de elementos procapacitantes como heparina, suero, albúmina sérica, o la misma co-incubación con ovocitos. La HE es el evento que permite que el ESPZ encuentre al ovocito previo a que ocurra la reacción acrosomal.

Las especies reactivas de oxígeno también están relacionadas con el proceso de hiperactivación, aparentemente, el radical  $O_2^-$  activa la NADPH oxidasa de la membrana espermática permitiendo de esta manera la hiperactivación (De Lamirande; Gagnon, 1993).

### **2.3.3. Reacción acrosomal**

La RA es un fenómeno biológico caracterizado por una serie de eventos que involucran la fusión de la MP con la membrana acrosomal (MA) externa. Este es un proceso vital para la penetración espermática a la zona pelúcida (ZP) y para la posterior fusión del ESPZ con la MP del ovocito (Yanagimachi, 1994).

Se postula que cambios en la permeabilidad de la MP al  $Ca^{+}$  dispararían una señal de inicio para la RA. El aumento intracelular de este ión induciría, entre otras respuestas, un aumento del AMPc con la consiguiente activación de las fosfolipasas ( $A_2$ , C) asociadas a la membrana. Así, durante la RA ocurre una fusión y vesiculación de la MP y MA externa, con la consiguiente exocitosis del contenido acrosomal. Esta fusión resulta en la liberación del contenido acrosomal y la exposición de nuevos dominios de membrana, esenciales para la fertilización. Si los ESPZ han sido previamente capacitados la RA continúa luego de la unión a la ZP. Fisiológicamente, las cubiertas ovocitarias estarían involucradas en este fenómeno, ya que se ha comprobado que proteínas de la ZP serían agonistas espermáticas inductoras de estos procesos. En el ovino, implica la pérdida de proteínas específicas de superficie como también la adsorción de componentes de fluidos exógenos, específicamente de un polipéptido proveniente del fluido uterino, como un elemento clave para dicho proceso.

Para la determinación de la RA *in vitro* se han utilizado exitosamente diversas técnicas como la microscopía de contraste interdifereencial (Saake; Marshall, 1968) y de

campo claro (Way *et al.*, 1995), lectinas unidas a fluoresceína, anticuerpos monoclonales (Parinaud *et al.*, 1993) y tinciones como la prueba de la Clortetraciclina (Pérez, 1996).

## **2.4. Métodos de colecta seminal**

### **2.4.1. Vagina artificial (VA)**

La VA es el método de colecta de semen de uso más difundido en la especie ovina. Consiste en un tubo cilíndrico de goma, recubierto internamente por una camisa de látex unida a un cono, de látex también, al cual se le conecta un tubo colector de vidrio en donde se vuelca la muestra de semen (Foto 1). El espacio comprendido entre el tubo de goma y la camisa se completa con agua caliente (42 °C aprox.), generando presión y temperatura en el pene del animal.

La VA tiene puntos favorables y desfavorables. Entre los primeros, se encuentran su semejanza con el coito natural y la facilidad de su aplicación; dentro de los desfavorables se puede mencionar la necesidad de un período de entrenamiento previo de los animales para acostumbrarlos a su uso, la duración de este periodo depende del carnero (Terrill, 1940). La otra desventaja es que con cierta frecuencia se observa la imposibilidad de realizar la colecta en presencia de dificultades físicas o psíquicas en el animal que le impidan realizar la monta (Rimbaud, 2007).



**Figura 3.** Vagina artificial utilizada para extracción de semen en carneros

### **2.4.2. Electroeyaculador (EE)**

Este sistema consiste en una fuente de energía conectada a un vástago que cuenta con 3 electrodos. El vástago se introduce en el recto del animal con sus electrodos orientados hacia la región ventral, los pulsos de voltaje creciente estimulan los nervios sensitivos y las glándulas vesiculares lo que provoca una eyaculación. Este sistema de colecta seminal desarrollado por Gunn (1936) permite la recolección de semen de un mayor número de animales por unidad de tiempo en comparación con la VA (Foote, 2002), además de admitir la colecta de aquellos animales imposibilitados para realizar un salto. Como desventajas se encuentran la menor eficiencia en la recolección del semen, consecuencia de su contaminación con orina, ya que el estímulo eléctrico puede provocar reflejo de micción (Pineda *et al.*, 1987). Además, el uso inadecuado del EE puede afectar el reflejo de eyaculación como consecuencia de la agresividad de la técnica o por estimulación insuficiente de la mucosa rectal (Dziuk *et al.*, 1954).

## **2.5. Preservación y almacenamiento de semen**

Existen 2 estados en los cuales se puede preservar el semen:

- En estado líquido: enfriado a temperaturas de 10-15 °C o refrigerado a temperaturas de 0-5 °C.
- En estado sólido (congelación): en el cual la temperatura de conservación alcanza o es menor, a la correspondiente al punto de congelación del agua (0°C).

Ambos estados producen una inactivación relativa y reversible de los ESPZ.

### **2.5.1. Congelación de semen**

La congelación de semen ha permitido la expansión de técnicas reproductivas como la inseminación artificial (IA) y la fertilización *in vitro* (FIV). La IA con semen crioconservado ha contribuido notablemente en la producción animal, facilitando los programas de mejora genética y reduciendo los costos al disminuir el número de

animales en el campo, además de permitir la conservación del semen fértil por periodos prolongados.

La congelación es una técnica con la cual se puede conservar una célula a temperaturas extremadamente bajas, permitiendo que su metabolismo se reduzca absolutamente sin que pierda su potencial vital (Watson, 1986). Según Santiani (2003), involucra los siguientes pasos:

- Reducción de la temperatura
- Deshidratación celular
- Congelación
- Descongelación

### **2.5.2. Características generales de la criopreservación de espermatozoides**

El objetivo de la criopreservación de semen es conservar el poder fecundante de los ESPZ a través del mantenimiento latente de las siguientes funciones:

- Metabolismo activo para producir energía y llevar a cabo las funciones espermáticas (Abdelhakeam *et al.*, 1991)
- Proteínas necesarias para la supervivencia dentro del tracto genital femenino y para la adhesión al ovocito en el momento de la fertilización (Amann; Pickett, 1987)
- Capacidad de movimiento progresivo (Pontbriand *et al.*, 1989)
- Enzimas acrosomales para penetrar el ovocito (Amann; Pickett, 1987; Pontbriand *et al.*, 1989).

Hasta el momento no se ha desarrollado ningún protocolo de congelación que garantice la total integridad de las estructuras que deberían ser crioconservadas. El daño celular es el principal impedimento para una criopreservación exitosa, con lo cual, la fertilidad obtenida con semen congelado es mucho menor que con semen fresco (Quinn *et al.*, 1969).

Los ESPZ de los mamíferos son muy sensibles al enfriamiento, pero esta sensibilidad ante la exposición a bajas temperaturas es especie-específica, debido a las características biofísicas y bioquímicas de la MP que difieren entre especies y entre individuos de la misma especie. Los ESPZ ovinos son más sensibles al daño

estructural (físico) que los de otras especies como bovinos, conejos y humanos (Watson, 1981; Fiser; Fairfull, 1989), por lo tanto, los sistemas de congelación no son extrapolables entre las distintas especies.

La fase de descongelamiento es tan importante como la fase de congelamiento, debido a que los ESPZ tienen que atravesar nuevamente el rango crítico de temperatura que va entre -15 a -60 °C (Salamon; Maxwell, 2000).

### **2.5.3. Efecto del descenso térmico sobre las estructuras celulares**

Los procesos de criopreservación ocasionan un nivel de estrés celular que varía según la magnitud del descenso térmico a la que son expuestas las células e incluye dos tipos de estrés debidos al:

#### **a) Choque térmico o “cold shock”**

Se denomina así, al daño que exhiben las células espermáticas ante una rápida disminución de la temperatura, en un rango que oscila entre los 30 y los 0 °C (Watson, 1995). Según este mismo autor (1981) en general, la mayor severidad de los efectos negativos se observa en un rango entre los 12 y 2 °C. Este shock causa una pérdida irreversible de la movilidad espermática, daño y liberación de fosfolípidos de la MP con pérdida de su permeabilidad selectiva y aumento de su fluidez. Ultraestructuralmente se manifiesta por disrupción de las membranas acrosomales y alteración de la función metabólica, causada probablemente por cambios en los constituyentes de membrana (Medeiros *et al.*, 2002). Estudios con microscopía electrónica en ESPZ sometidos a cold shock revelaron disrupción de la MP por sobre el acrosoma, el segmento intermedio y el flagelo. En cuanto a las mitocondrias, si bien mantienen intactas sus membranas su apariencia es de una configuración condensada, lo cual es indicativo de un estado de poca energía (Watson, 2000).

#### **b) Congelamiento:**

La estabilidad celular solo puede ser mantenida a temperaturas por debajo de los -130 C°, temperatura a la cual no se detectan reacciones bioquímicas ni energía térmica dentro de la célula, tampoco existen evidencias de que puedan ocurrir cambios de índole genético. A temperaturas mayores, puede permanecer agua intracelular sin congelar, lo cual permite funciones metabólicas, causando degradación de la célula

(Mazur, 1984). Por lo tanto, el problema en la criopreservación no es la habilidad del ESPZ para mantenerse viable a temperaturas menores a  $-130\text{ C}^{\circ}$ , sino evitar el daño que ocurre durante el congelamiento y descongelamiento. Este daño depende de la velocidad a la que ocurran dichos procesos.

Cuando la temperatura desciende por debajo de los  $-5\text{ C}^{\circ}$ , se comienzan a formar cristales extracelulares de agua pura, aumentando la concentración de sales en la porción de agua sin congelar (Lovelock, 1953; Franks *et al.*, 1983; Pegg, 2007). Mazur (1984) sugirió que con tasas de congelación menores a la óptima ( $5\text{ C}^{\circ}/\text{min}$ ), las células estarían expuestas por un tiempo muy prolongado a concentraciones elevadas de solutos, sufriendo las consecuencias del aumento de pH y osmolaridad. La gran concentración de sales que queda en la porción no congelada causa extracción de proteínas de la MP lo que somete a la célula a estrés de origen osmótico y deshidratación. Inversamente, a tasas de congelación superiores a la óptima ( $10\text{-}20\text{ C}^{\circ}/\text{min}$ ), el tiempo para que el agua salga de la célula es insuficiente, los cambios de volumen ocurren tan rápido que no le permiten a la membrana acomodarse. Por otro lado, se forman cristales intracelulares muy pequeños que dañan mecánicamente a la célula. Estos cristales son termodinámicamente inestables, por lo que al ser descongelados tienden a agruparse (recristalización) y formar cristales más grandes, que resultan letales (Watson, 1986) aunque hasta el momento no se conoce con exactitud de que manera el proceso de recristalización daña a la célula. Fahy (1986) plantea que la célula se vuelve menos tolerante a los cambios bruscos de volumen y concentración cuando se encuentra a temperaturas por debajo de  $-5\text{ C}^{\circ}$ .

En síntesis, es de vital importancia encontrar la tasa óptima de enfriamiento, ya que esta debe ser lo suficientemente lenta como para permitir que ocurra la deshidratación celular ordenada y al mismo tiempo, debe ser lo suficientemente rápida para prevenir el efecto negativo que tiene el aumento de la osmolaridad por la formación de cristales extracelulares (Holt, 2000).

#### **2.5.4. Estructuras espermáticas perjudicadas durante la congelación**

La criopreservación de semen se asocia con alteración de la función espermática en general (Fuller *et al.*, 1994; Watson, 1995), interrupción de la actividad

enzimática (Thundathil, 1999), pérdida de fosfolípidos y proteínas de membrana, lo que afecta su permeabilidad selectiva y fluidez y en consecuencia disminución de la viabilidad espermática. Los daños espermáticos producidos por efecto de la exposición a temperaturas de congelación pueden ser físicos (ultraestructurales) bioquímicos o funcionales. Los daños físicos van siempre acompañados de cambios bioquímicos e incluso con pérdida de contenido esencial (Salamon; Maxwell, 1995).

El daño ultraestructural es más severo en ESPZ ovinos que bovinos y las estructuras más afectadas son las membranas plasmáticas y acrosomales, el acrosoma, la vaina mitocondrial y el axonema (Holt, 1984).

### **Daño físico**

La membrana plasmática y acrosomal externa son las piezas más sensibles de los ESPZ (Krogenaes *et al.*, 1994), por lo que, al hablar de crioinjurias se deben considerar sus propiedades termodinámicas y estructurales, ya que estas contienen un ordenamiento inusual de lípidos (Parks *et al.*, 1987).

Con la congelación/descongelación se produce un reordenamiento de las cadenas de fosfolípidos, formándose regiones cristalinas. En algunas de estas regiones quedan líquidos sin congelar donde las proteínas se reagrupan, de manera tal que construyen puntos de comunicación que alteran la fluidez de la membrana (Parks; Graham, 1992). Estudios realizados antes, durante y después de la congelación han demostrado que entre los 10 y 16 °C ocurre transición en los fosfolípidos de membrana desde una fase líquida-cristalina a una fase de gel (Grossmann; Santaló, 1991), volviéndose las membranas más rígidas, con migración lateral de fosfolípidos, reordenamiento de componentes de membrana y separación de fase en los lípidos (De Leeuw *et al.*, 1990). Estas alteraciones predisponen a las membranas a fusionarse, lo que afecta la actividad de las proteínas y la permeabilidad de las membranas al agua y a los solutos. El efecto dañino de esta separación depende de la combinación de elementos de membrana, de la relación colesterol/fosfolípidos y del grado de saturación de las cadenas hidrocarbonadas. Luego de la descongelación, estas alteraciones son sólo parcialmente revertidas.

Entre los daños físicos a nivel ultraestructural también se pueden mencionar el daño en las membranas debido a la oxidación de los lípidos y a los cambios bruscos de temperatura y volumen (Devireddy *et al.*, 2002), así como también, el daño debido a la formación/disolución de cristales de hielo (Hammerstedt *et al.*, 1990). Muldrew y McGann (1990) postularon que la ruptura de la membrana sería causada por la fricción del agua pasando rápidamente a través de ella, lo cual excedería su capacidad para conducirla. La ruptura de la membrana permitiría la entrada de hielo al interior de la célula por lo que, el hielo intracelular, sería más una consecuencia que una causa del daño.

Las alteraciones observadas en el axonema podrían ocasionar cambios en el transporte y permeabilidad de la MP de la región de la cola ocasionando disminución de la movilidad. Según Courtens *et al.* (1989) el axonema sería una de las porciones más afectadas durante la congelación, pero se reconstruiría durante la descongelación.

Las mitocondrias son organelas muy importantes en la homeostasis espermática, cuya actividad ha sido correlacionada con su movilidad y potencial fertilizante. Su arquitectura se altera con la criopreservación, lo que provoca la disminución de los fenómenos de fosforilación oxidativa y transporte de protones, con la consecuente disminución de la producción de ATP (Watson, 1995). La injuria mitocondrial puede ser un factor que reduce la fertilidad del semen ya que los ESPZ congelados/descongelados tienen mayor inhabilidad para cruzar el cérvix debido a su menor actividad flagelar (Winsor; White, 1995). Otra estructura que se daña durante la criopreservación es el citoesqueleto, muchas de sus proteínas presentan polimerización y despolimerización según la temperatura, lo que podría tener implicancias significativas en la función del ESPZ.

Debido a que la temperatura de transición es propia de cada fosfolípido, el daño estructural es dependiente de la composición de cada membrana y por lo tanto no es igual en todas las especies (Bailey *et al.*, 2003).

### **Daños bioquímicos**

A causa de la congelación/descongelación ocurren alteraciones bioquímicas en el ESPZ, tales como pérdida de lipoproteínas y aminoácidos, disminución de la

actividad proteolítica del acrosoma, liberación de la enzima glutámico oxalacético transaminasa (GOT), disminución de la actividad de las fosfatasa, inactivación de las enzimas hialuronidasa y acrosina, pérdida de prostaglandinas. Al descender la temperatura por debajo de los 0 C° disminuye la formación de ATP, por lo que la bomba de Na-K<sup>+</sup> de la MP (ATP dependiente) también disminuye su actividad. Esto causa que el K<sup>+</sup> que sale de la célula fluya a una tasa mayor de la que entra, con lo cual la concentración de K<sup>+</sup> intracelular disminuye y la relación Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> se altera (Salamon; Maxwell, 1995). Esto causa una despolarización parcial de la membrana abriéndose los canales de Ca<sup>++</sup>, con el consecuente influjo de este ión, el cual activa las fosfolipasas, ocasionando una alteración general de las membranas (Bailey *et al.*, 2003). El incremento de Ca<sup>+</sup> intracelular es un indicio de CA y un evento necesario para que ocurra la RA. La CA, si bien es necesaria para la fertilización, desestabiliza las membranas espermáticas y en consecuencia, cuando ocurre en un momento inadecuado si el ESPZ no tiene un ovocito para fecundar va a morir antes que un ESPZ sin capacitar. Pero si esto se inicia en proximidades del ovocito, los cambios que se producen le van a permitir penetrarlo y por lo tanto continuar su proceso.

En muchas especies han sido descritas otras alteraciones bioquímicas como modificaciones en la estructura de la cromatina como consecuencia de la desnaturalización del ADN (Gillan; Maxwell, 1999).

Estos cambios bioquímicos y físico-ultraestructurales ocasionados por la congelación pueden ser los responsables de la disminución de la integridad funcional, supervivencia *in vivo* y capacidad fertilizante de los ESPZ (Salamon; Maxwell, 2000).

#### **2.5.5. Protocolos actuales de congelación de semen ovino**

Desde mediados del siglo 20 se han realizado muchas investigaciones en torno a la congelación de semen ovino. Inicialmente se utilizaban la metodología y los diluyentes comunes para el semen bovino, obteniéndose resultados muy pobres en cuanto a fertilidad, (alrededor del 5%) (Blackshaw, 1954; Dauzier, 1956). Como consecuencia de esto y posteriormente a estos trabajos, se han desarrollado protocolos de congelación más específicos para esta especie.

### 2.5.6. Diluyentes y sustancias crioprotectoras

La supervivencia de los ESPZ después de eyaculados se limita a unas pocas horas, por lo cual, para prolongar este tiempo es necesaria su dilución. La dilución del semen se realiza tanto por razones técnico-prácticas (1) como biológicas (2):

1- Extender el volumen del semen para que pueda ser usado para múltiples inseminaciones, aprovechando mejor el uso de los sementales.

2- Prolongar la vida media de los ESPZ eyaculados.

Según Salisbury y Van Demark (1978) los medios utilizados para diluir semen para el proceso de criopreservación deben cumplir con las siguientes características:

- Proteger a la célula espermática del choque térmico por frío ("cold shock")
- Mantener una adecuada presión osmótica y balance electrolítico. Los mejores resultados en la criopreservación de semen ovino han sido conseguidos con medios de osmolaridad entre 875 a 950 mOsm/l (Aisen *et al.*, 1995). La MP resiste condiciones hiperosmóticas de hasta 1000 mOsm/l, pero la membrana de los espz descongelados se altera con niveles superiores a 600 mOsm/l (Curry; Watson, 1994).
- Suministrar nutrientes como fuente de energía.
- Conservar un adecuado equilibrio del pH.
- Impedir el crecimiento bacteriano, para lo cual se le agregan antibióticos al diluyente.

Los diluyentes para conservación de semen ovino en estado líquido (fresco) se clasifican en naturales y sintéticos. Los primeros contienen al menos un componente de origen natural (no puede ser caracterizado y nunca es igual), en cambio los sintéticos no tienen ningún ingrediente natural y su composición se conoce siempre exactamente.

Los diluyentes naturales contienen leche de vaca entera, descremada, en polvo o tratada a muy alta temperatura (UHT), o yema de huevo, estos generalmente actúan como protectores de membrana.

Los diluyentes sintéticos contienen un amortiguador de pH, generalmente Tris-[hidroximetil] aminometano y citrato. El Tris es un compuesto alcalino que requiere estar asociado con el citrato para mantener la viabilidad espermática. El uso de Tris en concentraciones mayores a 50 mM protege a los espz de cambios de pH neutralizando el ácido láctico resultante del metabolismo espermático. Estos diluyentes también contienen una fuente energética (glucosa o fructosa) y un crioprotector (glicerol) (Salamon; Maxwell, 2000).

Los diluyentes utilizados para la conservación de semen ovino en estado sólido (congelado) deben contener elementos que contribuyan a minimizar el daño espermático durante el enfriamiento en sus diferentes niveles (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Componentes comunes de los diluyentes

Función bioquímica	Componentes
Fuente de energía	Glucosa, lactosa, fructosa, rafinosa
Crioprotectores	Glicerol, etilenglicol, DMSO
Balance mineral	Citrato de sodio, ácido cítrico
Protectores de membrana	Leche descremada, yema de huevo
Antibióticos	Penicilina, estreptomicina, gentamicina

### **Crioprotectores**

Para mejorar la viabilidad celular, además de una adecuada velocidad de enfriamiento y congelamiento, es necesario alterar el comportamiento fisicoquímico de la solución (Boiso, 2001). Para ello, se añaden a los diluyentes agentes crioprotectores que disminuyen el punto congelación de la solución (García; Vila, 1984). Polge *et al.* (1949) demostraron que los crioprotectores son una necesidad indispensable para la congelación de semen. Estos pueden clasificarse en agentes penetrantes y no penetrantes, de acuerdo a su permeabilidad a través de la membrana celular.

El glicerol es un agente penetrante, ya que su bajo peso molecular le permite atravesar las membranas. Es el crioprotector más utilizado en la congelación de semen ovino ya que ha demostrado ser el más eficiente (Molinia *et al.*, 1994; Santiani, 2003), su adición al diluyente frecuentemente se realiza en un solo paso a 30 °C. Al entrar en el ESPZ, el glicerol reemplaza al agua y mantiene el volumen celular, lo que evita el colapso debido a una deshidratación excesiva, además de impedir la formación de cristales de hielo (Farrant *et al.*, 1977). Al igual que otros crioprotectores penetrantes, protege al ESPZ de las lesiones producidas por la congelación lenta (Boiso, 2001). Su concentración óptima se encuentra entre 6 y 8 % (Maxwell; Watson, 1996). Sin embargo, Graham *et al.* (1978) reportaron que niveles de glicerol por encima de 6% son perjudiciales para la supervivencia de los espz posdescongelación. Mientras que el glicerol protege a los ESPZ durante la congelación, éste puede causar daño estructural, osmótico y tóxico durante el proceso de precongelado y esta sería la limitante de su concentración (Fahy, 1986). De todas maneras, esta concentración dependerá de las tasas de enfriamiento y congelación, de la presión osmótica del diluyente (Salamon, 1968), del método de agregado al semen, de la concentración espermática final (Colas, 1975) y de la composición del diluyente (Lightfoot; Salamon, 1969). Esto último es referido a su contenido de yema de huevo, ya que un aumento en la concentración de ésta reduce la concentración requerida de glicerol (Watson; Martin, 1975). La acción del glicerol en los ESPZ es, en cierta medida, especie- específica: los espz ovinos (Nauk *et al.*, 1970) son más sensibles al efecto tóxico del glicerol que los ESPZ bovinos.

Entre otros agentes crioprotectores se encuentran el dimetilsulfóxido (DMSO), el etilenglicol, la albúmina, los polioles de bajo peso molecular y los compuestos poliméricos, surfactantes (Salamon; Maxwell, 2000). La trehalosa es un agente crioprotector no penetrante debido a su alto peso molecular, que suele usarse asociada a los agentes penetrantes (Sandoval, 2005). Es efectiva cuando se utilizan altas velocidades de congelación interactuando con la MP formando puentes de hidrógeno entre sus grupos hidroxilo y los grupos fosfato de los fosfolípidos de membrana. Al reemplazar el agua alrededor de los fosfolípidos, previene el daño a la membrana durante la deshidratación celular (Aisen, 2000).

### 2.5.7. Protectores de membrana

Los lípidos de diferentes fuentes (yema de huevo, soja) se añaden a los ESPZ para protegerlos del choque térmico (Milovanov; Selivanova, 1932). Entre estos componentes, la yema de huevo es la más utilizada ya que su fracción lipoproteica está conformada por fosfolípidos que al unirse a la superficie de la membrana espermática la protegen de las bajas temperaturas y previenen el daño peroxidativo (Watson, 1975; Jones; 1977). Posiblemente su acción esté dada por la reducción de poros de la membrana y funciones ATP-dependientes, así como la agregación proteínica y formación de bloques lipídicos, la concentración requerida depende de la composición del diluyente (Salamon; Lightfoot, 1969). Watson y Martin (1976) encontraron evidencias que sugieren que puede retrasar el envejecimiento de los ESPZ ovinos.

Además de las sustancias anteriormente mencionadas, también se han adicionado otros compuestos a los medios de dilución para el congelamiento de semen ovino. Un ejemplo de estos es el ácido etildiaminoacético (EDTA) que mejora la acción crioprotectora de los disacáridos, como lactosa y trehalosa. Es un agente quelante que previene la peroxidación de los fosfolípidos de la MP (Salamon; Maxwell, 2000).

### 2.5.8. Tasa de dilución

El éxito de la congelación depende en gran medida de la tasa de dilución del semen. La excesiva dilución conduce a la pérdida permanente de movilidad, actividad metabólica y reducción de la capacidad fecundante *in vivo* de los ESPZ, fenómeno conocido como “efecto de dilución” (Mann, 1964). En el semen refrigerado la elevada dilución puede tener un efecto negativo en la supervivencia espermática, este efecto adverso está relacionado a la tensión de O<sub>2</sub> presente en el medio. Shannon (1965) evaluó la supervivencia espermática a 37 °C de eyaculados con diferente tasa de dilución (200 x 10<sup>6</sup>/ml y 12,5 x 10<sup>6</sup>/ml), observando que la viabilidad se reducía de 2 días a 5 horas en el caso de los eyaculados mas diluidos.

Macmillan *et al.* (1978) realizaron estudios comparativos de fertilidad *in vivo* con semen diluido a 25 x10<sup>6</sup> y a 12,5 x10<sup>6</sup> y obtuvieron una reducción del 6% en la tasa de preñez en bovinos. Una reducción de la cantidad total de ESPZ en semen congelado en pajuelas de 20 x10<sup>6</sup> a 10 x10<sup>6</sup> redujo la tasa de concepción de 4-6 % en bovinos de leche.

Evans y Maxwell (1987) expusieron que para la congelación de semen ovino la tasa de dilución óptima equivale de 2 a 5 veces (v/v) dependiendo de la concentración espermática/ml deseada. Sin embargo, esta tasa de dilución dependería del diluyente a utilizar. Otros autores (Salamon, Maxwell; 2006) encontraron mejores resultados con tasas de dilución de 11 a 26 veces, argumentando que tasas menores implicarían una menor oferta de sustancias crioprotectoras disponibles para los ESPZ.

## **2.6. Enfriamiento, equilibramiento y cristalización**

Luego de la dilución, el semen debe ser enfriado lentamente hasta alcanzar temperaturas cercanas a los 0 °C, este periodo de enfriamiento es el lapso de adaptación en el cual el ESPZ debe reducir su metabolismo. El enfriamiento desde 37 hasta 5 °C provoca una alteración específica relacionada con cambio de fase de los lípidos de la MP y es muy diferente de aquella causada por la congelación/descongelación, la cual provoca cambios mecánicos y osmóticos (Ollero *et al.*, 1998).

El enfriamiento produce la muerte de buena parte de la población espermática, pero en menor medida que durante el proceso de congelación/descongelación. Por ello, el uso de semen refrigerado permite obtener tasas de fertilidad aceptables al utilizar el semen en IA por la vía cervical y cuando no se superan las 24 horas del enfriado luego de la eyaculación. Transcurrido este período, la fertilidad se reduce a menos que el semen sea depositado por la vía intrauterina (Salamon; Maxwell, 1993). El enfriamiento muy rápido del semen, entre los 32 y 0 °C, provoca un gran estrés en la célula que puede conducirla a la muerte, de hecho, como se mencionó con anterioridad, buena parte mueren. El grado de estrés es directamente proporcional a la tasa de enfriamiento y al rango de temperatura (Watson, 1981). Este fenómeno, conocido como choque térmico por frío ("cold shock") y que afecta en forma variable a las diferentes especies, establece la necesidad de un cuidadoso manejo del enfriamiento previo a la congelación.

La tasa o velocidad de enfriamiento en la cual ocurren la formación y disolución del hielo y la deshidratación celular van a depender del tipo de célula expuesto. Para los ESPZ, la tasa o velocidad de descenso de la temperatura no debe exceder los 0,5 °C/min en la etapa que va desde los 32°C hasta los 15°C. Entre los 15 y 5°C es aconsejable una pérdida promedio de alrededor de 0,2 °C/min. Esto permite concluir con todo el proceso en 1,5-2 horas. El enfriamiento rápido del semen diluido desde

30°C a 15°C podría no tener efecto sobre la supervivencia espermática, sin embargo el enfriamiento rápido desde 30 °C a 10°C, 5°C ó 0°C disminuye la movilidad de los ESPZ tras su descongelación (Fiser; Fairfull, 1986).

El equilibramiento, tradicionalmente, ha sido definido como el tiempo en el que cual los ESPZ deben permanecer en contacto con el glicerol antes de ser congelados. En este tiempo, el glicerol penetra al interior de la célula y se establece un balance entre la concentración intra y extracelular, posibilitando que ejerza su función de manera apropiada. Evans y Maxwell (1987) estimaron que para que se cumpla este fenómeno, el semen diluido y enfriado 5°C debe ser mantenido a esta temperatura por un período de 2 horas, luego de la adición del glicerol.

Luego del período de equilibramiento el semen se debe envasar en pajuelas y congelar en vapores de nitrógeno líquido. Si esta congelación se realiza entre los -75°C y -125°C, no se observan efectos deletéreos marcados sobre los ESPZ, pero si se realiza a -55°C se reduce la supervivencia de los mismos (Colas, 1975). En esta etapa también es importante la forma de la curva de descenso térmico. Lo ideal es que tenga forma de parábola, la cual puede lograrse suspendiendo las pajuelas de 0.25 ml, en vapores de nitrógeno a una distancia de 4 cm del nitrógeno y las pajuelas de 0.5 ml a una distancia de 6 cm (Maxwell *et al.*, 1995).

Muchos de los procedimientos asociados a los protocolos de congelación de semen ovino son potencialmente peligrosos. La dilución es un paso fundamental para el uso del semen en IA, pero puede reducir la movilidad, la actividad metabólica, la fertilidad y causar disrupción del acrosoma.

La supervivencia del semen congelado-descongelado además de ser afectada por: el diluyente, el crioprotector, el envase en pajuelas, la congelación y la descongelación también se puede ver afectada por el factor macho (factor individual) como por la calidad del semen utilizado (Salamon; Maxwell, 1995).

## **2.7. Descongelación**

La fase de descongelación es tan importante para la supervivencia de los ESPZ como la fase de congelación, ya que deben volver a atravesar la zona de temperatura crítica (-15 °C a -60 °C). Ambas tasas, de congelación y descongelación, tienen un efecto sobre la supervivencia de los ESPZ (Mazur, 1985). El efecto depende de que la tasa de congelación haya sido suficientemente alta como para inducir el congelamiento

intracelular o lo suficientemente lenta como para provocar la deshidratación celular (Parks; Graham, 1992c). En el primero de los casos, es requerida una descongelación rápida para prevenir la recristalización del hielo intracelular presente en el ESPZ (Mazur, 1976). La exposición abrupta y por un corto periodo a la elevada concentración de solutos y al glicerol, provoca una restauración del equilibrio intra y extracelular más rápida que en la, descongelación lenta, sin embargo, Morozov (1959) propuso que el concepto de que cuanto más elevada la tasa de congelación más elevada debe ser la tasa de descongelación sólo se aplica al procesar volúmenes muy pequeños de semen (menores al mililitro).

En semen ovino congelado en pajuelas se han obteniendo los mejores resultados en cuanto a viabilidad y movilidad espermática con la descongelación a 37-42 °C durante 1 minuto (Salamon; Maxwell, 2000).

## **2.8. Semen congelado/descongelado y fertilidad**

La problemática que surge en torno a la criopreservación de semen ovino es que aún con los protocolos de congelación más refinados y controlados no se ha logrado conseguir más allá del 50% de movilidad espermática tras la descongelación, ya que la criopreservación de semen ocurre a expensas de su viabilidad y función norma. En otras especies, como bovinos, también se obtienen estas tasas de viabilidad espermática tras la descongelación, pero como se mencionó anteriormente la IA en ovinos es más dificultosa debido a la complejidad de cérvix de la oveja.

Los ESPZ son muy sensibles a las bajas temperaturas (Maxwell; Watson, 1996), luego de la descongelación sólo el 20-30% de los ESPZ se mantiene biológicamente sano y su capacidad fecundante se reduce alrededor de siete veces (Vishwanath, 2003). Ésto se debe a la disminución de la vida media, la longevidad de los ESPZ congelados/descongelados corresponde a la mitad de los ESPZ frescos, a las disfunciones subletales que sufre la población de sobrevivientes y a la disminución de la capacidad de éstos para interactuar con el tracto femenino mostrando por ejemplo una pobre habilidad para penetrar el cérvix (Salamon; Maxwell 1995)

Watson (1995) sugirió que la baja fertilidad del semen criopreservado podría deberse a que el proceso de congelación y descongelación selecciona los mejores

ESPZ, destruyendo a los más débiles, o bien a que dicho proceso modifica las membranas de las células.

Como se mencionó anteriormente, el proceso de congelamiento daña las membranas espermáticas y reduce la habilidad de los ESPZ para atravesar el cérvix. De acuerdo con esto, la IA cervical con semen descongelado en ovejas resulta en tasas de concepción muy bajas (Maxwell; Johnson, 1999) en comparación con la inseminación con semen fresco depositado en fondo de vagina, lo cual impone dificultades a la expansión de la IA en ovinos. Todas estas dificultades pueden ser parcialmente compensadas utilizando mayores dosis de semen pero se resuelven totalmente cambiando el lugar de inseminación por el cuerno uterino. El desarrollo de la inseminación intrauterina por laparoscopia ha intentado solucionar este problema (Salamon; Maxwell, 1995) pero existen limitaciones al uso de esta técnica, ya que es un procedimiento invasivo.

Según Watson (1995) algunos aspectos de la congelación/descongelación pueden acelerar la maduración de las membranas espermáticas y aumentar la proporción de ESPZ capacitados y reaccionados. Los cambios en las membranas de los ESPZ pueden no afectar su movilidad pero a corto plazo puede provocar disminución de la capacidad fertilizante ya que como se dijo antes, los espz capacitados tienen una vida media limitada. En un proceso de reproducción *in vivo*, luego de la IA por ejemplo, si los ESPZ capacitados no se encuentran rápidamente con un ovocito, la fertilización no ocurrirá porque las células morirán prematuramente en el tracto reproductivo de la hembra.

## **2.9. Criopreservación y capacitación espermática**

Cormier *et al.* (1997) observaron que un proceso similar al inducido por la CA podía ocurrir en los ESPZ cuando el semen diluido se conservaba refrigerado durante 4 horas o más. Por ello se sugirió que estas alteraciones se debían a la criopreservación (Cormier; Bailey, 2003).

Pérez-Pé *et al.* (2001) observaron que la exposición de las gametas a temperaturas de refrigeración y/o congelación ocasionaba una CA prematura, basándose en la gran semejanza en el patrón de fosforilación de las proteínas de la

MP de ESPZ capacitados y de ESPZ congelados/descongelados y en la similitud en los patrones espermáticos luego de realizar la prueba de la Clortetraciclina.

Watson (1995) y Maxwell y Watson (1996) identificaron, también con la tinción de CTC, que los últimos pasos en el patrón de transducción de señales que permite la capacitación natural y la capacitación causada por frío serían semejantes. Debido a todo esto algunos autores la denominaron criocapacitación (Vadnais *et al.*, 2005).

El estado de criocapacitación o precapacitación acorta el tiempo de vida media de los ESPZ congelados/descongelados en el tracto reproductor femenino (Cormier *et al.* 1997; Maxwell *et al.*, 1997; Gillan; Maxwell 1999) ya que las membranas espermáticas se vuelven permeables al Ca<sup>+</sup>, dándole paso a la RA y posteriormente a la muerte de la célula. Durante la capacitación, el ESPZ se vuelve muy polarizado, disminuyendo su capacidad para fertilizar el ovocito. Cuando la capacitación es inducida prematuramente, debido a la congelación, se reducen las tasas de concepción, si el semen es utilizado en IA cervical (Bailey; Buhr, 1994). Esto ocurre ya que aún con el mejor método de criopreservación, cerca de la mitad de la población móvil inicial no sobrevive a la descongelación y dentro de esta población superviviente los ESPZ sufren daños subletales que disminuyen su actividad y su capacidad de fertilizar. Un ESPZ puede ser mótil pero estar dañado, con lo cual sería dudoso si esa célula puede o no fertilizar un ovocito (Salamon; Maxwell, 2000).

## **2.10. Eyaculados obtenidos con VA vs eyaculados obtenidos con EE**

Estudios comparativos realizados en eyaculados obtenidos con ambos métodos, en los cuales se evaluaron la movilidad y la viabilidad espermática indicaron que el semen fresco colectado con EE tendría menor calidad que el colectado con VA (Brady; Gildow, 1939; Terrill, 1940; Mattner; Voglmayr, 1962). Sin embargo, más recientemente Marco-Jiménez *et al.* (2005) hallaron que la calidad espermática fue mayor en muestras colectadas con EE y que esas características se mantenían aún luego de someter los eyaculados a la criopreservación. En concordancia con esto, Marco-Jiménez *et al.* (2005) encontraron un mayor porcentaje de ESPZ viables no capacitados y con acrosomas intactos en eyaculados colectados con EE, incluso luego de la descongelación. Quinn *et al.* (1968) sugirieron que los ESPZ colectados con VA tendrían mayor resistencia al cold-shock (choque térmico) que aquellos colectados con

EE.) Por su lado, Austin *et al.* (1959) observaron que existen pocas, o ninguna diferencia en la calidad del semen colectado con EE o con VA. Varios investigadores (Dziuk *et al.*, 1954; Mattner; Voglmayr, 1962; Pineda *et al.*, 1991) observaron que la electroestimulación produce mayores volúmenes de semen y menor concentración de ESPZ, el mayor volumen se debe a que el uso de EE estimula una mayor producción de PS por parte de las glándulas sexuales accesorias. Quinn *et al.* (1966; 1968) hipotizaron acerca de una diferente composición en el PS secretado por las glándulas sexuales como una manera de explicar como el método de colecta afecta la función de los ESPZ. Según Marco-Jiménez *et al.* (2008) el método de colecta de semen no tendría efecto significativo sobre el contenido total de proteínas del PS.

### **2.11. Influencia del plasma seminal en la supervivencia espermática**

Ashworth *et al.* (1994) y Maxwell *et al.* (1997), entre otros, demostraron que el PS constituye un ambiente benéfico para los ESPZ. Cumpliendo un papel muy importante en el mantenimiento de la viabilidad y de la movilidad de ESPZ ovinos (Graham, 1994) y bovinos (Baas *et al.*, 1983). El efecto favorable del PS quedó demostrado cuando se comprobó que la viabilidad espermática disminuía si se reducía el volumen de PS por dilución o lavado (Emmens; Swyer, 1948; Blackshaw, 1953; White, 1953). También fue observado que cambios en la composición del PS luego de remover las glándulas accesorias del aparato reproductor del macho resultaron perjudiciales para la fertilidad en ratas (Pursel, 1975), ratones (Pang, 1979) y hámsters (Chow, 1986).

Sobre esta línea de investigación, surgieron muchos experimentos en los cuales el PS era agregado a los ESPZ previo a su congelación, o posteriormente en el medio de descongelación. Ashworth *et al.* (1994) notaron que la movilidad espermática mejoraba cuando el medio de descongelación era suplementado con 10% de PS homólogo. Por su parte, Ollero *et al.* (1997) demostraron que los efectos benéficos del PS sobre los ESPZ se mantenían aún luego de que el PS fuera removido. Maxwell y Johnson (1999) observaron mayores porcentajes de ESPZ móviles, membranas acrosomales íntegras, mayor penetración a través del moco cervical y superiores porcentajes de preñez en ovejas tras una inseminación cervical, luego de resuspender

ESPZ de carnero congelados/descongelados en 20-30% de PS. Resultados afines en cuanto a movilidad y estado de las membranas acrosomales fueron informados por Mortimer y Maxwell (2004) al incubar ESPZ congelados/descongelados en un medio de composición similar al PS.

Aún no se conoce con exactitud cuáles son aquellos componentes del PS que tienen un efecto benéfico sobre el mantenimiento de la capacidad fecundante de los ESPZ. Sin embargo, trabajos recientes en criopreservación seminal se han enfocado en el rol del PS sobre la estabilización de las membranas espermáticas, así como en la identificación y aislamiento de los factores decapacitantes (Guraya, 2000). En los últimos años muchos estudios se han orientado en la caracterización de fracciones proteicas, que poseen la capacidad de adherirse a las membranas de los ESPZ capacitados y modificar sus características funcionales, frenando o incluso revirtiendo este estado. Por lo cual, los ESPZ retornarían a una condición de pre-capacitación (García-López *et al.*, 1996; Ollero *et al.*, 1997; Barrios *et al.*, 2000). Estas fracciones fueron capaces de restituir la estabilidad de las membranas espermáticas cuando fueron incluidas en el medio previo a la exposición de los ESPZ al frío (Pérez-Pé *et al.*, 2001), también provocaron este efecto cuando fueron añadidas a los ESPZ luego de que hayan sido sometidos a un daño térmico (Ollero *et al.*, 1997). Por lo cual, la dilución de los ESPZ ovinos en PS aumentaría su resistencia al daño ocasionado por el choque térmico (Berger; Clegg, 1985). El 20% de PS previene o revierte los cambios tipo capacitación en espz de cerdos, efecto detectado a través de la prueba de la Clortetraciclina (Vadnais *et al.*, 2005).

El efecto protector de las proteínas seminales descrito anteriormente por Pérez-Pé *et al.* (2001) se puso nuevamente de manifiesto cuando el mismo grupo de investigación expuso a los ESPZ a condiciones que provocan cold-shock. Posteriormente se añadió 2,1 mg de proteínas de > 3 kDa provenientes de PS al medio de incubación de los ESPZ, observándose un mayor porcentaje de ESPZ viables y disminución del porcentaje de ESPZ capacitados y de la señal de fosfotirosinas inducidas por el cold-shock. Este efecto protector de las proteínas del plasma seminal (PPS) de bajo peso molecular contra los daños ocasionados por frío fue demostrado por Ashworth (1994).

En ovinos, se identificaron algunas proteínas de 5-10 kDa que resultarían benéficas al reducir el efecto adverso de las temperaturas de congelación sobre los

ESPZ de carneros (Ashworth *et al.* 1994). Ollero *et al.*, (1997) demostraron que cuando la fracción proteica de >10 kDa era añadida al diluyente, previo a la congelación, ocasionaban aumentos significativos de la movilidad y aumentaba la proporción de ESPZ con integridad de las membranas acrosomal y plasmática luego de la descongelación. Recientes estudios en la especie ovina, lograron el máximo porcentaje de restauración (65%) de la MP de los ESPZ expuestos a choque térmico por frío luego de la de  $1 \times 10^6$  ESPZ con 1,4 mg de proteínas del plasma seminal (PPS) (Barrios *et al.*, 2000). Contrariamente, también se han reportado efectos detrimentales del PS sobre la movilidad (De Lamirande; Cagnon, 1984; Morrier *et al.*, 2003), la viabilidad (Dott *et al.*, 1979) y la supervivencia espermática luego del congelado-descongelado (O'Meara, 2007). Muchos estudios, en especial en ESPZ de toro, demostraron que el PS tiene un efecto tóxico directo. Reportes actuales en semen de cerdo congelado recomiendan remover el PS previamente a la congelación ya que podría afectar negativamente la supervivencia de los espz luego de la descongelación (Pursel; Johnson, 1975). La variabilidad entre especies en la composición del PS hace que su efecto sobre ESPZ refrigerados o congelados sea diferente. En equinos la remoción del PS y la resuspensión en un medio artificial han sido utilizados para mejorar la supervivencia e integridad del ADN en espz congelados/descongelados de los sementales (Love *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2005). En estudios recientes realizados en ovinos la adición de PS al semen congelado/descongelado no mejoró las tasas de preñez en ovejas tras una inseminación cervical (O'Meara *et al.*, 2007b). En el caso particular del caprino, se observó un efecto negativo del PS cuando el semen fue congelado/descongelado en medios compuestos por yema de huevo y leche. Para explicar lo anterior, surgió la hipótesis de que las fosfolipasas presentes en el PS interactúan con la lecitina de la yema de huevo y producirían sustancias tóxicas para los ESPZ. Pero esta es una situación muy particular del semen de macho cabrío que no parece tener equivalente en otras especies.

Surgen distintas hipótesis para explicar el tipo de efecto (perjudicial o benéfico) del PS sobre los espermatozoides. Por un lado, el efecto podría depender de la relación ESPZ capacitados/decapitados presentes, la concentración de proteínas del PS, su variación entre especies e individuos y en cada individuo a través del tiempo (Pérez-Pé *et al.*, 2001). Por el otro lado, los efectos benéficos del PS podrían restringirse a proteínas específicas y éstas a su vez, podrían estar bloqueadas por los

efectos de otras sustancias presentes en el PS. La influencia del PS también puede depender de los demás componentes del diluyente. Manjunath *et al.* (2002) sostuvieron que en espz bovinos la yema de huevo sería detrimental ya que sus LDL (Lipoproteínas de baja densidad) no permitirían el efecto decapacitante de las proteínas de bajo peso molecular (14, 15 y 16 kDa). Otra explicación sugiere que la adsorción de proteínas benéficas también depende del origen del espz (epididimario, eyaculado, oviductal) y de las manipulaciones a las que haya sido expuesto (dilución o criopreservación). García-López *et al.* (1996) demostraron que PS de carnero libre de proteínas contenía un factor de bajo peso molecular que potenciaba los efectos benéficos de las proteínas del PS, posiblemente promoviendo su adsorción a la superficie espermática.

Pérez-Pé *et al.* (2001) observaron disminución de algunas PPS y pérdida de su capacidad reparadora del daño de membrana por efecto del choque térmico por frío cuando estas proteínas fueron obtenidas durante la época no reproductiva de los carneros.

Los cambios que se producen en la superficie de los ESPZ durante la capacitación, por ejemplo la salida de colesterol, la alteración en la composición de proteínas de superficie o los cambios en la distribución de las partículas intramembranas (Yanagimachi, 1988), podrían estar influenciados por los cambios en las proteínas aportadas por el PS a los ESPZ. Se cree que los factores decapacitantes presentes en el PS se van eliminando o modificando durante el tránsito de los ESPZ a través del tracto genital de la hembra por lo cual, si se añaden a los ESPZ congelados/descongelados antes de su introducción en el tracto genital se extendería su longevidad mediante la unión o nuevo enlace a la MP y la inhibición de otros cambios estructurales y fisiológicos (Wolfe *et al.*, 2001).

De acuerdo con esto, sería posible utilizar las proteínas específicas para mejorar la función de los ESPZ a través de su agregado en el procesamiento y almacenamiento previo a la I.A. REFERENCIA

## **2.12. Caracterización de proteínas presentes en el PS**

Esch *et al.* (1983) encontraron una proteína que se encontraba en una mayor concentración en el PS del bovino y la denominaron PDC-109, pocos años después Scheit *et al.* (1988) comprobaron que dicha proteína se unía a los ESPZ. Distintos autores establecieron que luego de la eyaculación, las proteínas BSP (bovine seminal plasma proteins), caracterizadas como BSP-A1/A2, BSP-A3 y BSP-30kDa, cuyas masas moleculares son de 15, 16,5 y 28-30 kDa, respectivamente, se unían a la MP de los ESPZ, a través de interacciones con distintas moléculas como fosfolípidos unidos a colina (Moreau; Manjunath, 2000), lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Manjunath *et al.*, 1988, 1989), heparina y glicosaminoglicanos (GAG) (Chandonnet *et al.*, 1990). Entre estas moléculas, las HDL, la heparina y los GAG presentes en el tracto reproductor femenino de los bovinos fueron implicadas en la capacitación espermática (Thérien *et al.*, 1997).

Swamy *et al.* (2002) establecieron que las BSP-A1 y A2 poseen entre sí, una estructura primaria idéntica de 109 aminoácidos, difiriendo solo en su glicosilación. Por este motivo, los mencionados autores establecieron que la PDC-109 es una mezcla de ambas formas, glicosilada y no glicosilada de las proteínas BSP-A1 y BSP-A2, respectivamente, y además comprobaron que dicha proteína también interactúa con diferentes fosfolípidos de la MP y que el colesterol favorece su asociación.

Según Desnoyers *et al.* (1994), las BSP jugarían un rol muy importante en la capacitación espermática. Unos años más tarde, Manjunath y Thérien (2002) propusieron un mecanismo de capacitación inducido por las proteínas BSP, la interacción de éstas con los fosfolípidos del tipo colina de la MP del ESPZ prevendría el movimiento libre de los mismos, estabilizando su MP (estado no capacitado). Sin embargo, durante el tránsito del complejo ESPZ-proteína BSP por el tracto genital de la hembra, los mismos autores propusieron la ocurrencia de una modificación de los lípidos y, por ende, una reorganización de las membranas y aparición de nuevos receptores para las HDL (o heparina, en el caso del bovino) promoviendo el comienzo de la capacitación (Thérien *et al.*, 1998; 1999). De esta manera, decrece la relación colesterol/fosfolípidos lo que sería un evento esencial para que los ESPZ comiencen la RA y eventualmente fertilicen el ovocito.

La liberación de colesterol, altera la relación colesterol/fosfolípidos, esta liberación desestabiliza las membranas espermáticas e inicia las vías de transducción que regulan la expresión de receptores para proteínas de zona pelúcida en la

superficie espermática, habilitando el inicio a la RA (Benoff *et al.*, 1993). Los procesos mediados por las BSPs que llevan a la capacitación espermática sugieren que diferencias detectadas en sus concentraciones en el PS pueden influenciar la fertilidad (Nauc; Manjunath, 2000).

Según Bergeron *et al.* (2005) el PS de los mamíferos contiene dos familias principales de proteínas, las espermadhesinas y otras proteínas que contienen dominios de fibronectina-tipo II. Las primeras, son las principales PPS de cerdos y caballos, mientras que proteínas homólogas también han sido identificadas en toros. En cambio, el segundo tipo de proteínas, son las predominantes en el bovino. A pesar que las espermadhesinas del bovino presentan una alta similitud de secuencia con las correspondientes al porcino, no se unen a la superficie espermática ni presentan actividad de unión a los carbohidratos, la heparina o la ZP (Dostalova *et al.*, 1994).

Bergeron *et al.* (2005) demostraron, a través de la técnica de SDS-PAGE, que la principal PPS del ovino (PPSo) es una espermadhesina de 15 kDa, mientras que otras proteínas importantes pertenecen a la familia de las BSP (RSP-15 kDa, RSP-16 kDa, RSP-22 kDa y RSP-24 kDa), éstas representan aproximadamente el 45% y 20% del total de las PPSo, respectivamente. Sin embargo, Jobim *et al.* (2004) reportaron que las PPSo son pobremente conocidas y verificaron una similitud proteica con las proteínas BSP-A1/A2 identificadas por Manjunath y Thèrien en el bovino (2002) determinando su peso molecular y punto isoeléctrico (16,5 kDa, pI 4,7-5,0 y 16 kDa, pI 4.9-5.2, respectivamente).

Según Barrios *et al.* (2002) en el ovino existen fracciones proteicas que se adsorben a la MP dañada. Dentro de estas fracciones identificaron una banda proteica (F6) de aproximadamente 20 kDa como la principal responsable de revertir el efecto del estrés térmico por frío en los ESPZ. Estos autores, además, expresaron que las lipoproteínas presentes en el PS de ovino no fueron las responsables del efecto de reversión comentado anteriormente, sugirieron un rol proteico decapacitante de la p20 debido a su pérdida durante el transcurso de la capacitación. Además, estos autores caracterizaron e identificaron a la p20 como una nueva proteína denominada proteína de la vesícula seminal del carnero (RSVP-20), mientras hallaron una homología importante entre la p14 y la PDC-109 del bovino. Posteriormente Barrios *et al.* (2003) purificaron dos bandas proteicas a partir de la banda F6, de 14 y 20 kDa y comprobaron su capacidad de proteger a los ESPZ frente al choque térmico por frío. La

proteína de 14 kDa (p14) mostró mayor capacidad protectora cuando se adicionó a la misma concentración que la de 20 kDa (p20).

La mayor parte de las proteínas adquiridas por la membrana del ESPZ a lo largo del epidídimo son de bajo peso molecular (14-36 kDa) y se caracterizan por un alto nivel de glicosilación (Voglmayr *et al.*, 1980). Se ha demostrado que glicoproteínas secretadas en el epidídimo como respuesta a la acción de los andrógenos se asocian con la superficie espermática durante la maduración (Jones, 1989; Vreeburg *et al.*, 1992). Aunque algunas de estas proteínas desaparecen posteriormente, otras están relacionadas con el desarrollo de epítomos específicos como la unión a la zona pelúcida (Boue *et al.*, 1996). También se adquieren proteínas inmunosupresoras para asegurar la supervivencia en el tracto genital femenino (Brooks, 1990).

Aunque se ha descrito una importante cantidad de proteínas del PS la función de la mayoría de ellas respecto a la fisiología del ESPZ es desconocida. Dos proteínas del PS cuyo peso molecular se encuentra en 26 kDa y 55 kDa se han correlacionado con alta fertilidad en toros (Killian *et al.*, 1993) y se ha descrito que las proteínas del PS ovino cambian drásticamente las características de superficie de los ESPZ, pudiendo restituir la impermeabilidad de membrana después de haber sido sometidos a daño térmico ocasionado (Ollero *et al.*, 1997).

Con respecto a la composición proteica del PS ovino obtenido con los distintos métodos de colecta seminal, la bibliografía disponible es escasa. Marco-Jiménez *et al.* (2008c) al estudiar la composición del PS obtenido con VA o EE reportaron que el contenido total de proteínas y perfil proteico en ambos PS fue similar.

Hoy en día, no se dispone de información científica acerca del efecto en la calidad posdescongelación del agregado de PS obtenido con VA y EE a ESPZ obtenidos con ambos métodos.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Materiales**

### **3.1.1. Lugar y período experimental**

El presente estudio se realizó en las instalaciones del Grupo de Biotecnología de la Reproducción de la EEA INTA Balcarce ubicadas en el kilómetro 73,5 de la Ruta Nacional 226, partido de Balcarce en la Provincia de Buenos Aires, Argentina (37° 45' latitud sur, 58° 18' longitud Oeste, a 130 metros sobre el nivel del mar).

El período experimental abarcó desde febrero a junio de 2010.

### **3.1.2. Drogas y/o reactivos**

Las drogas y/o reactivos utilizados en la formulación de los distintos medios durante el experimento fueron adquiridos en Sigma Aldrich Co<sup>®</sup> (USA) y Mallinckrodt<sup>®</sup> (New York, EE.UU)

### **3.1.3. Obtención y procesamiento de los eyaculados**

Los ESPZ y el PS utilizados fueron obtenidos de los eyaculados de cinco carneros adultos (> 5 años) en buena condición corporal de la raza *Corriedale*. Las colectas seminales se realizaron una vez a la semana con VA y otra vez con EE de manera alternada, desde el mes de febrero hasta junio de 2010 (12 semanas). El período de abstinencia entre colectas se obtuvo en relación a los resultados positivos sobre la viabilidad de los ESPZ del carnero encontrados por Ollero *et al.* (1996).

Debido a que en el ovino el potencial fecundante del semen no permanece constante a lo largo del año, se eligió trabajar con semen obtenido en otoño, estación en la cual se minimizan las diferencias en cuanto a la morfología y la capacidad fecundante de los ESPZ entre los distintos animales (Colas, 1983).

#### **3.1.3.1. Vagina artificial**

Uno de los métodos utilizados para la colecta de semen fue la VA, atemperada en estufa a 42°C. Para la estimulación de los carneros se utilizaron ovejas ovariectomizadas, sin tratamiento hormonal. Las muestras fueron obtenidas luego de realizar una falsa monta, y siempre se utilizó el primer eyaculado de cada carnero.

### **3.1.3.2. Electroeyaculador**

Para la obtención de semen con EE se utilizó un equipo ElectroJac 5, con una sonda rectal de 22 cm de largo x 2,5 cm de diámetro y 3 electrodos longitudinales. Previo a la electroeyaculación (15 minutos antes), los animales recibieron una inyección intramuscular de clorhidrato de xilacina (0,2 mg/Kg, Xylacina 2%, Alfasan, Argentina) y se procedió a higienizar el área prepucial. Para realizar esta maniobra, los animales fueron colocados en decúbito lateral izquierdo y se les introdujo la sonda, lubricada con gel, en el recto posicionando los electrodos ventralmente. El EE fue utilizado en modo manual, permitiendo un incremento gradual del voltaje hasta provocar la eyaculación. El glande del pene fue exteriorizado y fijado en esa posición de manera manual con una gasa estéril. El semen fue colectado en un tubo graduado, similar al utilizado para la colecta con VA. Posteriormente, el tubo con el semen recién extraído fue inmediatamente transferido al laboratorio y colocado en Baño de María (BM) a 35°C hasta la evaluación cuali-cuantitativa de los parámetros espermáticos.

### **3.1.4. Conformación del pool de eyaculados para los diferentes usos**

Con los eyaculados que tuvieron una movilidad masal microscópica (MMm)  $\geq 4$  y una concentración espermática  $\geq 600 \times 10^6/\text{ml}$  se formó un pool para cada método y sesión de colecta, con el objetivo de eliminar el efecto individual de cada carnero (Ollero *et al.*, 1996). La concentración final del pool fue de  $600 \times 10^6/\text{ml}$  y para llegar a esa concentración se calculó el volumen de semen que cada carnero debería aportar.

### 3.1.5. Obtención, procesamiento y conservación de plasma seminal y espermatozoides

Los pools obtenidos en las primeras 6 semanas de colecta fueron destinados a la obtención de PS, para lo cual se siguió el protocolo descrito por Evans *et al.* (1987). Cada eyaculado fue centrifugado a 2000g durante 15 minutos a 4 °C luego se recuperó el sobrenadante que fue nuevamente centrifugado bajo las mismas condiciones. Los PS correspondientes a cada pool, obtenidos en cada una de las 6 semanas con VA y EE fueron filtrados, por separado, a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,22  $\mu\text{m}$  (Microclar<sup>®</sup>, India). En cada pool se evaluó volumen, pH y osmolaridad y luego fue almacenado en tubos eppendorf a -20 °C, donde se conservó hasta el momento de ser agregado a los correspondientes grupos experimentales.

Como información complementaria y para conocer la relación PS/ESPZ presente en un eyaculado obtenido con VA se realizó una técnica a la que denominamos espermocrito. Para realizar el espermocrito se utilizaron capilares para microhematocrito que fueron llenados con una muestra de semen obtenido con VA y luego se centrifugaron durante 15 minutos a 2000 g (Abdel-Rahman *et al.*, 2000). La relación PS/espz se estableció midiendo ambas fases con un calibre ( $\pm 0.05$  mm). La proporción de PS que contiene un eyaculado de carnero colectado con VA representó el 57% del total del eyaculado. Este valor se calculó a partir de un promedio de 12 muestras. Esta determinación se utilizó luego para reconstituir los eyaculados con PS obtenido por ambos métodos.

Los pools obtenidos las segundas 6 semanas de colecta, fueron destinados a la obtención de ESPZ, para lo cual se eliminó el PS según el protocolo de Cabrera *et al.* (2005). El semen fue diluido en una proporción 1:9 (v: v) en una solución de TRIS a 37° C. El semen así diluido, fue centrifugado durante 15 minutos a 700g. Posteriormente se procedió al retiro del sobrenadante y el pellet fue diluido con la misma solución para ser sometido a nueva centrifugación. Luego se retiró el sobrenadante, recuperando el pellet de ESPZ libres de PS.

### 3.1.6. Constitución de los grupos experimentales (Tratamientos)

Los pools de ESPZ de cada sesión conformados por 600 millones (VA o EE) fueron divididos en tres partes iguales de 200 millones cada uno. Los tratamientos consistieron en agregar a cada una de las 3 fracciones del pool, PS obtenido con VA o EE o solución de lavado. Considerando que hubo pools de semen obtenido con VA y otros con EE, se constituyeron los siguientes tratamientos:

- Tratamiento 1: 200 millones de ESPZ obtenidos con VA + x  $\mu$ l de PS de VA
- Tratamiento 2: 200 millones de ESPZ obtenidos con VA + x  $\mu$ l de PS de EE
- Tratamiento 3 (Control): 200 millones de ESPZ obtenidos con VA + x  $\mu$ l de Solución de lavado

- Tratamiento 4: 200 millones de ESPZ obtenidos con EE + x  $\mu$ l de PS de EE
- Tratamiento 5: 200 millones de ESPZ obtenidos con EE + x  $\mu$ l de PS de VA
- Tratamiento 6 (Control): 200 millones de ESPZ obtenidos con EE + x  $\mu$ l de Solución de lavado

x = correspondió al 57% del volumen total del eyaculado, cifra que tuvo su origen en la proporción de PS/ESPZ obtenida previamente en el espermatozoido de eyaculados obtenidos por medio de VA. La Solución de lavado de los grupos 3 y 6, fue agregada en la misma proporción

El PS utilizado en cada caso fue descongelado dentro del recipiente en el cual se encontraba acondicionado. Esto se realizó en un BM a 37 °C en donde el PS fue mantenido minutos más tarde hasta su uso.

### 3.1.7. Congelamiento y descongelamiento de semen

Los ESPZ lavados, libres de su PS de origen, más la fracción adicionada (PS de VA o EE o solución de lavado) se diluyó en diluyente de congelación a 37°C. Una vez diluida, la muestra se mantuvo a temperatura ambiente hasta alcanzar 20°C, para finalmente ser enfriada hasta 5 °C (en heladera) a una tasa de enfriamiento de 0,5°C/min. El equilibramiento se realizó a 5°C durante 2 horas. Las muestras fueron

envasadas en pajuelas de 0,25 ml, con 50 millones de ESPZ y se identificaron por tratamiento con diferentes colores.

Para su congelación, las pajuelas fueron expuestas a vapores de nitrógeno líquido (-100°C) durante 10 minutos y luego fueron volcadas en nitrógeno líquido, a -196°C para su conservación.

La descongelación se realizó por inmersión de las pajuelas en BM a 37°C, durante 1'. Luego, fueron secadas y su contenido vertido en un tubo de vidrio precalentado en el mismo baño.

### **3.1.8. Lavado y acondicionamiento de los espermatozoides congelados/descongelados**

Con el propósito de obtener una población de células espermáticas vivas, el contenido de las pajuelas correspondiente a cada tratamiento, luego de realizar las evaluaciones citadas, fue acondicionado por centrifugación a través de un gradiente de Percoll<sup>®</sup> de la siguiente manera:

- Se colocaron en tubos eppendorf por sotoposición dos soluciones de Percoll de 45 y 90%, 300 µl de cada una de ellas.
- Sobre la capa superior de la columna de Percoll se depositaron 200 µl del contenido de la pajuela y se procedió a su centrifugado (600g durante 10 minutos a temperatura ambiente).
- Se recuperaron 80 µl del sedimento de cada centrifugado en donde se realizaron las correspondientes determinaciones.

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1. Valoración cuali-cuantitativa de las muestras individuales de semen fresco**

#### **3.2.1.1. Volumen del eyaculado**

La determinación del volumen se efectuó mediante la observación directa de la graduación marcada en el tubo de colecta con una precisión de 0,1 ml.

#### **3.2.1.2. Movilidad masal microscópica**

La evaluación de la onda de movimiento espermático, comúnmente denominada MMm se llevó a cabo utilizando una escala subjetiva de 0 a 5, donde cada valor corresponde a la siguiente descripción:

0. Ausencia de ESPZ móviles
1. Algunos ESPZ se mueven en su sitio
2. Presencia de ESPZ móviles, pero insuficiente cantidad como para formar ondas
3. Presencia de ondas o remolinos muy lentos (50-70% ESPZ móviles)
4. Las ondas o remolinos se forman rápidamente (70-90% ESPZ móviles)
5. Velocidad de formación de ondas extremadamente alta (>90% ESPZ móviles)

Para esta determinación, se descargó una alícuota de 6  $\mu$ l del eyaculado sobre un portaobjetos colocado sobre una platina térmica a 37 °C. Se utilizó un microscopio óptico utilizando un aumento de 40x y se evaluó la zona ubicada en el borde de la gota. Sólo fueron utilizados los eyaculados con  $MMm \geq 4$ .

#### **3.2.1.3. Concentración espermática**

La concentración espermática se determinó utilizando un espectrofotómetro Accured (IMV Technologies, Francia). La tasa de dilución utilizada

fue la indicada para las especies Ovino/Caprino (1/400). Fueron elegidos los eyaculados que tuvieron una concentración mínima de  $600 \times 10^6$  ESPZ/ml.

### **3.2.2. Valoración cuali-cuantitativa del pool de semen fresco antes y después de formar los tratamientos**

Los pools generados en las últimas 6 semanas de colecta fueron evaluados para determinar las características cuali-cuantitativas de los eyaculados obtenidos con VA y EE.

#### **3.2.2.1. Movilidad espermática total (MET)**

Este método consiste en visualizar y estimar subjetivamente la proporción (%) de ESPZ móviles, mediante la observación de al menos 2 campos microscópicos, utilizando un microscopio óptico (400x). Para ello, se colocó una alícuota de 6  $\mu$ l de cada pool de semen entre porta y cubreobjetos sobre una platina térmica a 37°C.

#### **3.2.2.2. Movilidad individual rectilínea progresiva (MIP)**

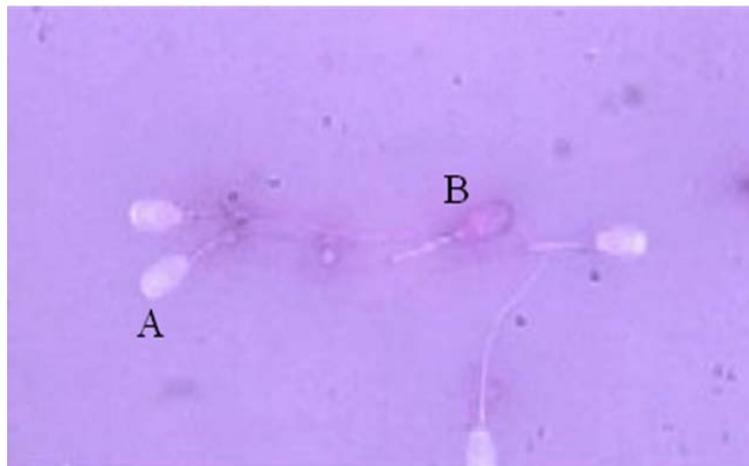
Esta técnica consiste en visualizar y estimar subjetivamente la proporción (%) de ESPZ móviles con desplazamiento de avance.

Para realizar esta determinación se descargó una alícuota de 6  $\mu$ l de cada pool entre porta y cubreobjetos y se observó en un microscopio óptico (400x).

#### **3.2.2.3. Integridad de la membrana plasmática (MP)**

Las muestras de semen fueron coloreadas con eosina y nigrosina, según una modificación del método descrito por Mortimer (1994). El protocolo de coloración fue el siguiente:

- Se colocó una alícuota de 6  $\mu\text{l}$  de la muestra sobre un portaobjetos y al lado de ésta, una alícuota (10  $\mu\text{l}$ ) de la solución de eosina-nigrosina (ver Anexo).
- Ambas gotas fueron mezcladas y debidamente homogeneizadas durante 10 segundos para posteriormente efectuar un frotis que fue secado sobre platina térmica a 37°C. Los ESPZ total o parcialmente coloreados (rosado-violeta) fueron considerados como células con alteraciones de membrana, mientras que aquellos que no se tiñeron (blanco) fueron considerados como células con la MP intacta.
- Se contaron 200 células en un microscopio óptico (400x) y se calculó el porcentaje de los ESPZ sin alteraciones de la MP (Figura 4).



**Figura 4. Espermatozoides teñidos con eosina-nigrosina. A: MP intacta y B: MP alterada**

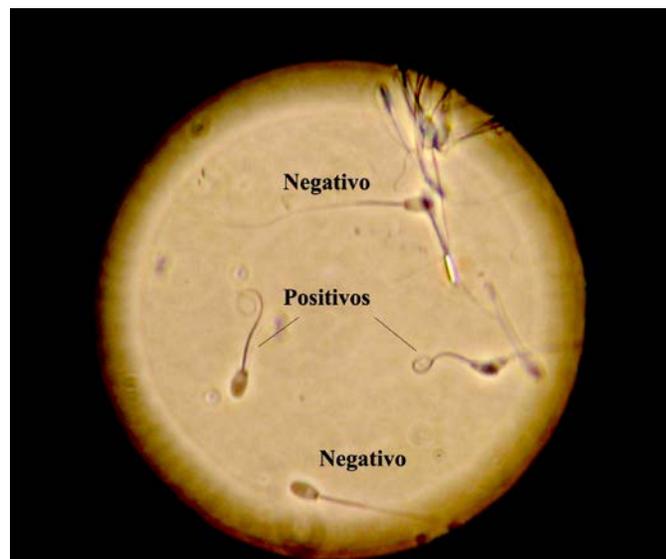
#### **3.2.2.4. Funcionalidad de la membrana plasmática del compartimiento flagelar (HOS Test)**

Esta metodología se denomina prueba Hipoosmótica (Prueba HOS; Hypoosmotic Sweeling Test). El fundamento de la misma se basa en el aumento de volumen que experimentan las células espermáticas con MP del compartimiento flagelar intacta cuando son sometidas a un choque osmótico al diluir la muestra en un medio hipotónico. Dicho aumento de volumen se debe a la entrada de agua a la célula, la cual provoca la expansión de las membranas en un intento de las mismas por resistir la diferencia de presión osmótica entre el medio intra y extracelular. De este modo, la

disminución de la relación entre superficie y volumen provoca el enrollamiento del flagelo del ESPZ.

Para el estudio de la funcionalidad de la MP del compartimiento flagelar se utilizó un método basado en el descrito por Jeyedran *et al.* (1984) para la especie humana, adaptado al estudio de semen de ovino por García Artiga (1994). La prueba HOS se llevó a cabo como se describe a continuación:

- Se incubó en BM a 37°C, durante 30 min., una alícuota de 20 µl de semen en 500 µl de un medio hipoosmótico ajustado a 100 mOsm/l (ver Anexo).
- Transcurrido ese tiempo, se agregaron 50 µl de una solución HOS stop (ver Anexo) para detener la reacción.
- Para su determinación se colocó una gota (6 µl) entre porta y cubreobjetos, y se determinó microscópicamente (400x) el porcentaje de células positivas (ESPZ con flagelo enrollado = HOS +) contando un máximo de 200 células.
- Se consideraron negativos los casos en que el flagelo se mostró recto o en forma de látigo (Figura 5).



**Figura 5. Espermatozoides sometidos a la prueba HOS.** ESPZ negativos (membrana no funcional) y ESPZ positivos (membrana funcional, HOS+).

### 3.2.2.5. Funcionalidad mitocondrial

Para determinar la actividad mitocondrial de los ESPZ se realizó un test que emplea la coloración de Rhodamina 123 (Rh 123) en combinación con Ioduro de Propidio (IP), adaptado de Grasa *et al.* (2004). El fundamento de esta prueba consiste en que la Rh 123 (fluorocromo lipofílico y de naturaleza catiónica) se acumula selectivamente en el interior de las mitocondrias activas, atraída por el potencial de membrana mitocondrial, generando fluorescencia verde a nivel de la porción intermedia de los ESPZ. (Rh+, mitocondria funcional). Los ESPZ que no emiten fluorescencia a este nivel, se consideran como no reactivos (Rh-). Por otro lado, el IP entra en las células con membranas dañadas, uniéndose al ADN del núcleo y emitiendo una fluorescencia roja (IP + = células no viables).

Los ESPZ viables no se tiñen con el IP y sus cabezas emiten una fluorescencia verde de menor intensidad que la porción intermedia. Del resultado de la acción de ambos colorantes se realizó una adaptación de la interpretación descrita por Grasa *et al.* (2004), identificándose los patrones definidos en el siguiente cuadro:

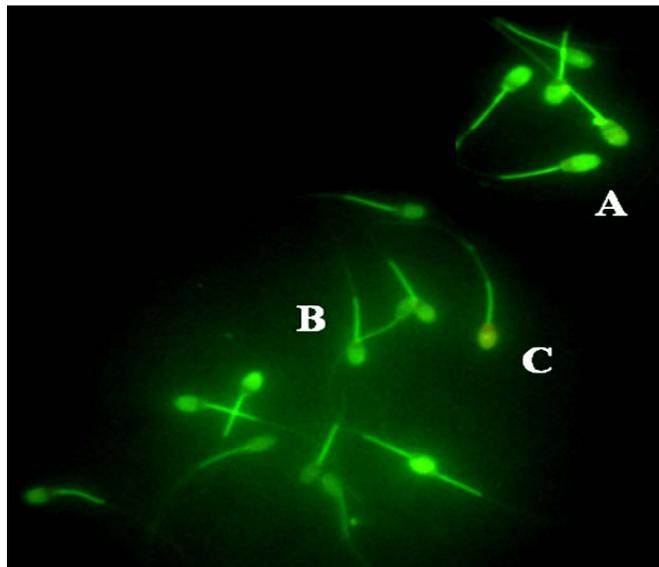
**Cuadro 3.** Patrones de viabilidad celular y funcionalidad de mitocondrias.

Interpretación	Rh 123	IP
ESPZ viables con mitocondrias funcionales	+	-
ESPZ viables con mitocondrias no funcionales	-	-
ESPZ no viables con mitocondrias no funcionales	-	+

Esta prueba se realizó en un tubo de vidrio en el cual se colocó 1 ml de solución isotónica, en BM a 37 °C. Luego se agregaron 250 µl de la muestra del semen diluido en TRIS (1:300), 3 µl de la solución de trabajo Rh 123, esta mezcla se incubó durante 15 minutos. Posteriormente, se agregaron 25 µl de la solución de trabajo IP dejando incubar otros 15 minutos y finalmente se detuvo la reacción mediante el

agregado de 10  $\mu\text{l}$  de una solución isotónica formolada (ver Anexo) dejando incubar otros 5 minutos. Luego, las muestras se retiraron del BM para ser almacenadas al abrigo de la luz y a temperatura ambiente. La observación se realizó en microscopio de epifluorescencia a 400x. Se colocó una muestra de 5  $\mu\text{l}$  entre porta y cubreobjetos, donde se contaron un mínimo de 200 células, estableciéndose los porcentajes de células Rh+, Rh- y también de los IP+ e IP-.

Todo este proceso se realizó al resguardo de la luz directa y el tiempo transcurrido desde el final de la incubación hasta la observación al microscopio no fue superior a las 3 horas.



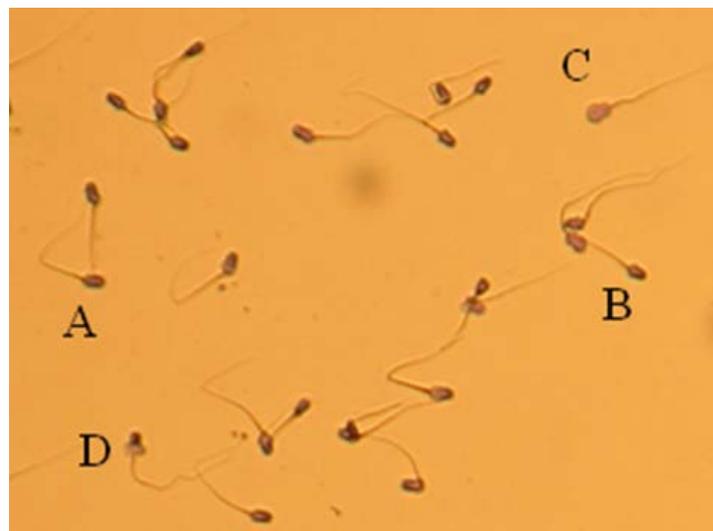
**Figura 6. Espermatozoides sometidos a la reacción de Rh 123. A:** ESPZ viable con mitocondrias funcionales **B:** ESPZ viable con mitocondria no funcional **C:** ESPZ no viable con mitocondrias no funcionales.

### 3.2.2.6. Prueba de “Decondensación de la cromatina nuclear”

La prueba de “Decondensación de la Cromatina Nuclear” determina, *in vitro*, el grado de maduración de la cromatina espermática. Está basada en la reducción de puentes disulfuro mediante la exposición a un agente reductor y evidencia que la decondensación de núcleos inmaduros es más rápida y completa que la de los

maduros. Por lo tanto, el porcentaje de ESPZ que sufre decondensación de la cromatina nuclear *in vitro*, se correlaciona con el porcentaje de núcleos inmaduros presentes en una muestra de semen (Rodríguez *et al.*, 1985).

El grado de decondensación de la cromatina nuclear fue evaluado según el protocolo de Vieytes *et al.* (2008) adaptado para ovinos. Semen y dihidrotreitol (DTT) al 1% fueron incubados en partes iguales (30  $\mu$ l) durante 30 minutos a 22°C. Transcurrido este tiempo, se realizaron extendidos con 6  $\mu$ l de la muestra y se secaron rápidamente en platina térmica. Luego los extendidos fueron coloreados con azul de toluidina durante 20 minutos, se lavaron con agua destilada, se dejaron secar al aire y fueron observados con microscopio óptico (1000x). Los ESPZ se clasificaron en 4 grupos según el grado de reacción del núcleo al DTT. Grupo A: tamaño normal con coloración tenue y homogénea; B: forma y tamaño normal con coloración intensa y generalmente homogénea; C: con vacuolas y moderada pérdida de la forma y D: decondensados, muy vacuolados y con importante pérdida de la forma. Los Grupos C y D fueron considerados como inmaduros.



**Figura 7. Espermatozoides sometidos a la Prueba de Decondensación de la cromatina.** **A:** tamaño normal con coloración tenue y homogénea; **B:** forma y tamaño normal con coloración intensa y generalmente homogénea; **C:** con vacuolas y moderada pérdida de la forma y **D:** decondensados, muy vacuolados y con importante pérdida de la forma.

### **3.2.3. Valoración del semen Congelado/Descongelado**

**Movilidad espermática total (similar a lo descrito antes)**

**Movilidad rectilínea progresiva (similar a lo descrito antes)**

**Integridad de la membrana plasmática (Eosina/Nigrosina) (similar a lo descrito antes)**

### **3.2.4. Valoración del semen Congelado/Descongelado después del lavado**

**Actividad mitocondrial (similar a lo descrito antes)**

**Funcionalidad de la membrana plasmática (HOS test) (similar a lo descrito anteriormente)**

#### **3.2.4.1. Estado del acrosoma según los diferentes patrones de la Prueba de la Clortetraciclina**

La prueba de la Clortetraciclina (Prueba CTC) se basa en la propiedad de unión de este antibiótico (Clortetraciclina) al calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) de membrana. La distribución del  $\text{Ca}^{++}$  en la membrana plasmática sufre cambios durante el proceso de capacitación espermática, los cuales pueden ser evidenciados mediante esta prueba. De este modo, cuando una muestra de ESPZ es sometida a la Prueba de la CTC es posible diferenciar el estado de la capacitación espermática del comienzo de la reacción acrosómica.

El procedimiento empleado para realizar la técnica fue basado en Pérez *et al.* (1996) como se describe a continuación:

- Se descongeló un buffer-CTC (ver Anexo)
- Luego, una solución de CTC (750  $\mu\text{M}$ ) se diluyó en 2 ml de la solución CTC-buffer.
- La solución CTC- buffer fue filtrada a través de una membrana de acetato de celulosa (Microclar<sup>®</sup>) de 0,22  $\mu\text{m}$  con el propósito de que no quedaran partículas groseras en la suspensión y mantenida a 4 °C, hasta el momento de ser utilizada.

- En un tubo Eppendorf se colocó una alícuota de 10  $\mu$ l de la muestra de ESPZ y se le añadieron 20  $\mu$ l de la solución CTC-buffer. Ambos se homogeneizaron durante 20 segundos, al resguardo de la luz.

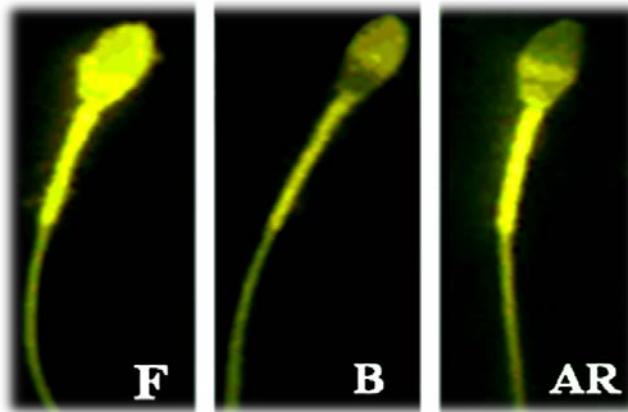
- La reacción colorimétrica anterior fue detenida mediante la adición de 10  $\mu$ l de la mezcla de dos soluciones fijadoras: A (Tris-HCL 1 M + 1% (v/v) glutaraldehído EM (25%) + 5 ml de agua bidestilada estéril) y B (Tris 1 M + 1% (v/v) glutaraldehído EM (25%) + 10 ml de agua bidestilada estéril), pH 7,8.

- Se colocaron 5  $\mu$ l de la muestra fijada entre porta y cubreobjetos y se evaluó el estado de capacitación utilizando un microscopio de epifluorescencia (Nikon® Eclipse TE-300 Japón) a 400x. El colorante fue excitado con luz ultravioleta y se utilizó un filtro barrera de amplio rango (LP) (380 nm de excitación y 420 nm de emisión). Se contaron no menos de 200 ESPZ y fueron clasificados de acuerdo a los patrones-CTC descritos por Fraser *et al.* (1995):

- Patrón F-CTC: ESPZ no capacitados, fluorescencia uniformemente distribuida en toda la cabeza con una banda brillante en la región ecuatorial.

- Patrón B-CTC: ESPZ que han iniciado el proceso de capacitación; fluorescencia uniforme aunque menos intensa que la anterior y pérdida de la banda ecuatorial o fluorescencia en la parte anterior de la cabeza sin fluorescencia en la región posacrosomal.

- Patrón AR-CTC: ESPZ con reacción acrosómica, no se observa ninguna fluorescencia sobre la cabeza o sólo una delgada banda fluorescente en el segmento ecuatorial (Figura 8)



**Figura 8. Espermatozoides de carnero congelados/descongelados expuestos a la Prueba de la CTC. Clasificación de los patrones-CTC según el estado del acrosoma. F: no capacitado; B: capacitado y AR: reaccionado.**

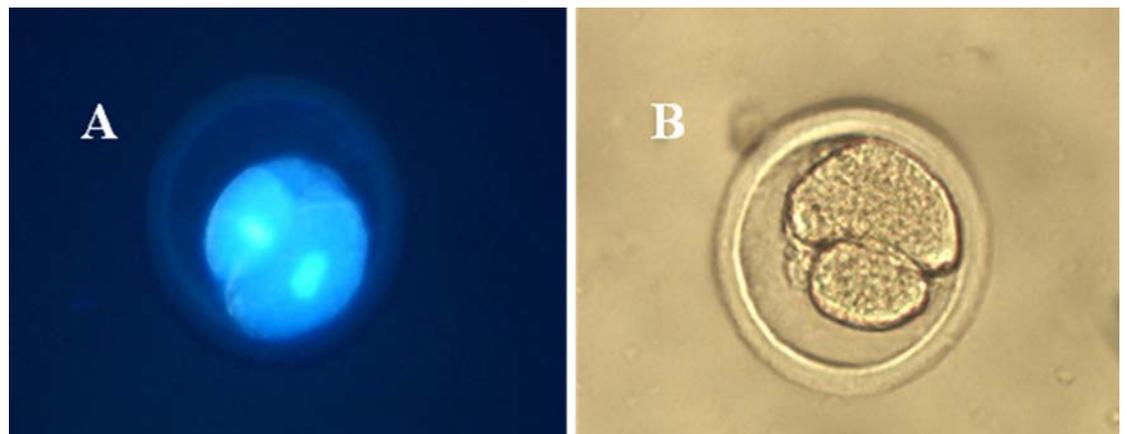
#### **3.2.4.2. Fecundación *in-vitro* heteróloga**

Esta técnica se utilizó como un método de evaluación de la calidad espermática ya que permite obtener un valor aproximado de la fertilidad *in vivo* del semen. Se realizó según García-Álvarez *et al.* (2008) y se llevó a cabo de la siguiente manera:

Los ovocitos bovinos fueron obtenidos de ovarios de matadero y se transportaron hasta el laboratorio en solución estéril 0.9% de NaCl a 20°C, en un período menor a 3 horas. Se realizó la aspiración de los folículos de 2-10 mm haciendo vacío con agujas de 21 mm. Los complejos cúmulus-ovocito (COCs) fueron seleccionados bajo lupa estereoscópica Nikon SM 800 (x30), conservando aquellos que presentaron varias capas compactas de células de cúmulus y estructura homogénea. Posteriormente fueron colocados en grupos de 20 en placas de maduración conteniendo 300 µl de medio TCM-199 suplementado con 50 µg/ml de gentamicina, 5,5 mM de lactato de Ca, 2,3 mM de piruvato de Na, 36 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM de Hepes, 0.01UI/ml rhFSH (Gonal F-75, Serono, UK) y 10% de suero fetal bovino. La maduración se realizó por un período de 24 h en una estufa a 38,5°C; 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación.

Al completar la maduración, los COCs se lavaron en medio H-SOF y se eliminaron las células del cúmulus mediante un pipeteo suave. Los ovocitos se

colocaron en placas de cultivo con medio IVF-SOF suplementado con 10% de suero de oveja en celo y 40 µg/ml de gentamicina. Para la fecundación *in vitro* heteróloga se eligieron al azar 3 pajuelas de cada tratamiento correspondientes a 3 sesiones de congelación distintas. Los ESPZ fueron seleccionados y liberados de los componentes del medio de congelación a través del pasaje por una columna de Percoll®, según un gradiente discontinuo de densidad (45/90). Luego los ESPZ fueron capacitados en el medio de fertilización durante 10 minutos, después de lo cual fueron co-incubados con los ovocitos bovinos en una concentración final de 10<sup>6</sup> ESPZ/ml a 38.5 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación. La fecundación heteróloga se evaluó, luego de 40 horas de cultivo, mediante la presencia de dos o más núcleos en ovocitos fijados y/o núcleos teñidos con Hoechst 33342, en un microscopio de epifluorescencia invertido.



**Figura 9. Ovocitos fecundados. A:** ovocito con dos núcleos y **B:** ovocito dividido.

### 3.2.5. Determinaciones realizadas en el plasma seminal

#### 3.2.5.1. Concentración de proteína total en PS obtenido con VA y con EE

Se evaluaron 3 muestras de PS obtenidas con VA y 3 muestras de PS obtenidas con EE, elegidas al azar. La determinación de la concentración de proteína total se realizó mediante el método de Bradford (1976), como se describe a continuación:

- Inicialmente se obtuvo una curva de calibración de análisis de soluciones estándar con concentraciones conocidas de proteína: 1, 2, 4 y 8 mg de albúmina sérica bovina (BSA) añadido a 999, 998, 996 y 992  $\mu$ l de reactivo de Bradford respectivamente, para llegar a un volumen final de 1 ml.
- Para la cuantificación de proteínas en cada muestra de PS, se diluyeron por duplicado, en una proporción de 1:50 y 1:100 en agua, agregando 999  $\mu$ l del reactivo Bradford.
- Luego de 10 minutos de incubación, se realizaron las lecturas de absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Genequant1300 (Alemania). La obtención del valor de cada muestra se expresó como el promedio de duplicados.
- La curva de calibración fue establecida a continuación, por espectrofotometría por duplicado, lo que generó una concentración de absorbancia lineal, por el que fue posible determinar el contenido de proteína en cada una de las muestras experimentales.

### **3.2.5.2. Caracterización de las proteínas del PS por electroforesis en geles de poliacrilamida**

La purificación, análisis y caracterización de proteínas presentes en el PS obtenido con EE y con VA se realizó mediante electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), según el método descrito por Schagger y Von Jagow (1987). Esta técnica permitió separar proteínas en base a su peso molecular al someterlas a la acción de un campo eléctrico.

La electroforesis se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Un volumen de PS obtenido con EE y con VA conteniendo 100 mg de proteínas fue diluido en agua destilada hasta alcanzar 10  $\mu$ l de volumen final, luego se le añadió una solución de un detergente aniónico (SDS) al 10% y DTT 1N.

La acción del detergente SDS es solubilizar las proteínas, al unirse a ellas en una proporción de 1,4:1 (Reynolds y Tanford, 1970) y oculta las cargas intrínsecas del polipéptido, por lo que la carga neta por unidad de masa se convierte en positiva.

- Luego se prepararon los geles de poliacrilamida al 12% (ver Anexo) cuyas dimensiones fueron de 10 x 10,5 cm.
- La mezcla fue sembrada en las calles formadas en el gel de apilamiento (5%).
- Se utilizó un marcador de peso molecular del rango de 12 a 225 kDa (RPN 800, Amersham Biosciences, EE.UU.).
- Posteriormente se realizó la corrida mediante electroforesis conectada a una fuente eléctrica a 20 mA durante un período de aproximadamente 1 hora.
- Para la visualización de las proteínas los geles fueron teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-350 (Amersham Biosciences, EE.UU.) y posteriormente se lavó con una solución conteniendo ácido acético y metanol para quitar el colorante y se fotografiaron para luego analizar las proporciones relativas de cada proteína.
- El análisis de las proporciones relativas de cada banda proteica presente en el PS obtenido con ambos métodos de colecta seminal se realizó por medio del software Gel pro analyzer versión 3.1 (MediaCybernetics®)

### **3.2.5.3. Determinación de la concentración de fructosa y minerales**

Fueron analizadas dos muestras de PS correspondientes a EE y VA. Se determinó la concentración de fructosa, calcio, magnesio, sodio y potasio y se utilizó la técnica de espectrofotometría de absorción atómica.

### **3.3. Diseño experimental y análisis estadísticos**

Evaluación de las variables cuali-cuantitativas de los eyaculados enteros obtenidos con electroeyaculador y con vagina artificial, de los eyaculados reconstituidos (tratamientos) frescos y de las variables determinadas en el plasma seminal (osmolaridad, pH y volumen).

El estudio se realizó usando un diseño en completamente aleatorizado con un arreglo factorial 2 x 3 de los tratamientos y 6 repeticiones (Cuadro 4)

**Cuadro 4.** Factores principales y sus niveles utilizados en el experimento

FACTORES PRINCIPALES	NIVELES
Método de obtención de Plasma Seminal	Control (sol. tris)
	Vagina Artificial
	Electroeyaculador
Método de obtención de espermatozoides	Vagina Artificial
	Electroeyaculador

### 3.3.1. Evaluación del semen fresco

El modelo matemático lineal fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \rho_j + (\tau\rho)_{ij} + e_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  = Variable respuesta

$\mu$  = Media general

$\tau_i$  = Efecto fijo del i-ésimo método de obtención de los espermatozoides

$\rho_j$  = Efecto fijo del j-ésimo método de obtención del plasma seminal

$\zeta_k$  = Efecto del bloque

$(\tau^* \rho)_{ij}$  = Efecto fijo de la interacción del i-ésimo método de obtención de los espermatozoides con el j-ésimo método de obtención del plasma seminal

$e_{ijk}$  = Error experimental aleatorio

**Las variables dependientes en el modelo matemático fueron:**

- Movilidad Espermática Total
- Movilidad Espermática Rectilínea Progresiva
- Espermatozoides con membrana plasmática íntegra (Eosina/Nigrosina)
- Espermatozoides con membrana plasmática funcional (HOS Test +)
- Espermatozoides con mitocondrias funcionales (Rhodamina 123)
- Espermatozoides inmaduros (DDT + Azul Toluidina)

### 3.3.2. Evaluación del semen descongelado

El estudio se efectuó usando un diseño en bloque completamente aleatorizado

**El modelo matemático lineal fue:**

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \rho_j + (\tau\rho)_{ij} + \zeta_k + X_{ijk} + e_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  = Variable respuesta

$\mu$  = Media general

$\tau_i$  = Efecto fijo del i-ésimo método de obtención de los espermatozoides

$\rho_j$  = Efecto fijo del j-ésimo método de obtención del plasma seminal

$(\tau^* \rho)_{ij}$  = Efecto fijo de la interacción del i-ésimo método de obtención de los espermatozoides con el j-ésimo método de obtención del plasma seminal

$\zeta_k$  = Efecto del bloque

$e_{ijk}$  = Error experimental aleatorio

**Las variables dependientes en el modelo matemático fueron:**

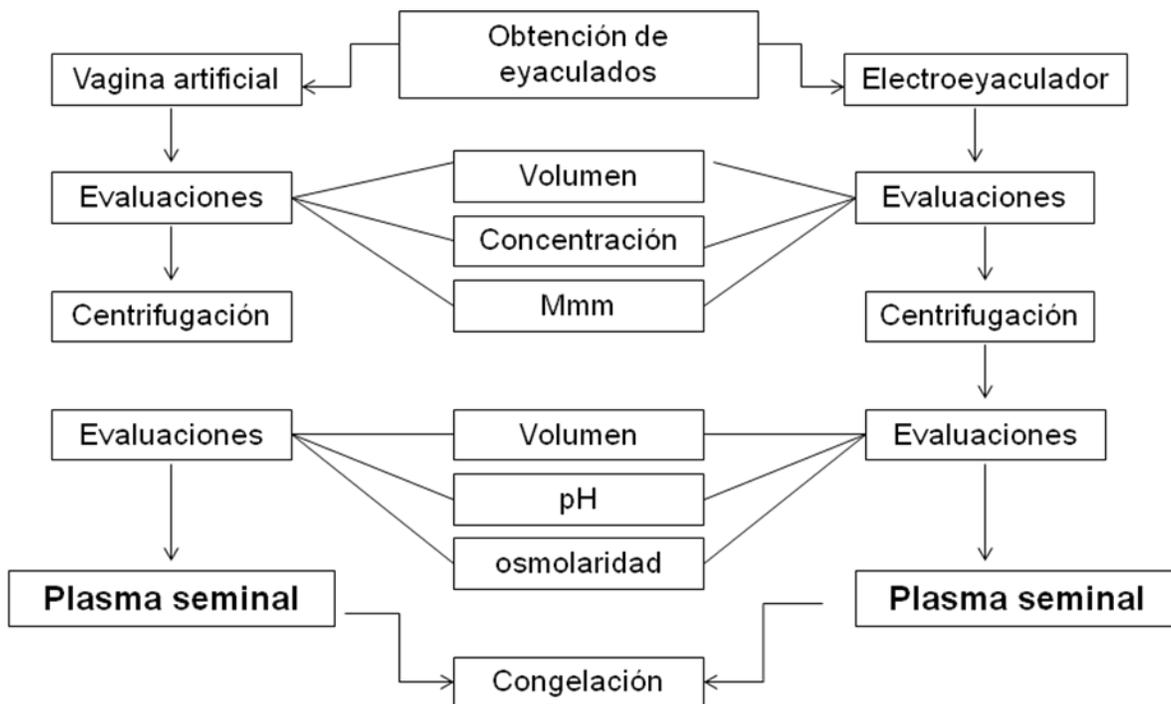
- Movilidad Espermática Total
- Movilidad Espermática Rectilínea Progresiva
- Espermatozoides con membrana plasmática integra (Eosina/Nigrosina)
- Espermatozoides con membrana plasmática funcional (HOS Test +)
- Espermatozoides con mitocondrias funcionales
- Patrón F-CTC
- Patrón B-CTC
- Patrón AR-CTC

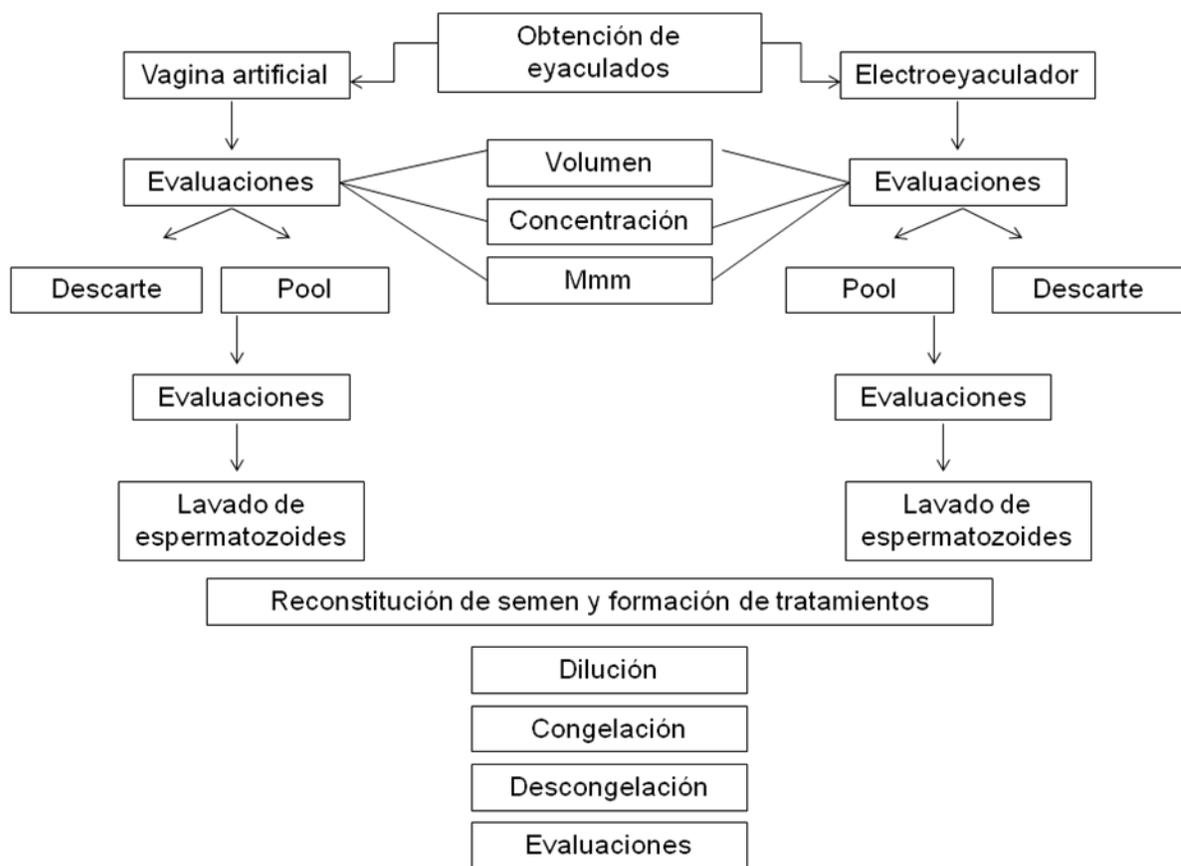
Ovocitos fecundados Los datos referidos al porcentaje de espermatozoides observado

para cada variable y de ovocitos fecundados fueron analizados mediante el procedimiento PROC GLM del paquete estadístico SAS (SAS, 2000) y la comparación de medias mediante la prueba de Tukey del mismo paquete y el nivel de significancia establecido fue del 5%.

### Esquema de obtención de plasma seminal

**Figura 10.** Esquema utilizado para la obtención de plasma seminal





### Esquema de obtención de espermatozoides y tratamientos

**Figura 11.** Esquema utilizado para la obtención de espermatozoides

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Material procesado

A continuación se describe el material procesado en este estudio (Tabla 1). Del total de los eyaculados obtenidos con VA se descartó un 10% por no cumplir con uno o varios de los valores mínimos de los parámetros de calidad prefijados. De las muestras obtenidas mediante EE se eliminó el 11% por contaminación con orina, todas ellas perteneciente al mismo animal.

**Tabla1.** Eyaculados utilizados/ obtenidos en el experimento

<b>Eyaculados</b>	<b>Vagina Artificial</b>	<b>Electroeyaculador</b>	<b>Totales</b>
<b>Obtenidos</b>	60	54	114
<b>Utilizados (%)</b>	54 (90,0)	48 (89,0)	102 (89,5)

### 4.2. Evaluaciones realizadas en los eyaculados individuales

Con VA se obtuvieron eyaculados de todos los animales y en todas las sesiones, mientras que con EE un 10% de las veces la muestra no pudo ser obtenida.

Se observó un efecto del método de colecta ( $p < 0,05$ ) sobre las variables evaluadas. Los eyaculados obtenidos con EE presentaron mayor volumen, menor concentración y cantidad total de ESPZ que los eyaculados obtenidos con VA (Tabla 2)

**Tabla 2.** Efecto del método de obtención de semen (vagina artificial o electroeyaculador) en ovinos, sobre los parámetros de calidad espermática en los eyaculados individuales (LSM  $\pm$  EEM)

Variable	Método de colecta de semen		<i>p</i>
	Vagina artificial (n=6)	Electroeyaculador (n=6)	
Volumen ( $\mu$ l)	997 $\pm$ 64b	1.534 $\pm$ 64a	0,0001
Concentración (millones de ESPZ/ml)	2.565 $\pm$ 75a	741 $\pm$ 75 7b	0,0001
Total de ESPZ	2.564 $\pm$ 130a	1.117 $\pm$ 130b	0,0001
Movilidad masal	4 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	0,07

<sup>ab</sup> indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3. Evaluaciones realizadas sobre los pools de semen fresco

No se detectó efecto del método de colecta ( $p < 0,05$ ) sobre las variables MET, MIP, ESPZ Hos+ y ESPZ con cromatina decondensada. Por el contrario, se observaron valores significativamente más elevados en las variables integridad de MP y funcionalidad mitocondrial en las muestras obtenidas con EE ( $p = 0,001$ ) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Efecto del método de obtención de semen (electroeyaculador o vagina artificial), en ovinos, sobre los parámetros de calidad espermática en los pools de semen fresco (LSM  $\pm$  EEM)

Variable (%)	Método de colecta de semen		<i>p</i>
	Vagina artificial (n=6)	Electroeyaculador (n=6)	
Movilidad espermática			
Total	71,7 $\pm$ 5,8	81,7 $\pm$ 5,8	0,27
Individual progresiva	78,3 $\pm$ 6,9	73,3 $\pm$ 6,9	0,63
ESPZ con MP íntegra	58,0 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>	76,0 $\pm$ 2,5 <sup>a</sup>	0,001
ESPZ con MP funcional	44,7 $\pm$ 4,4	35,0 $\pm$ 4,4	0,18
ESPZ con mitocondrias funcionales	16,7 $\pm$ 3,5 <sup>b</sup>	47,8 $\pm$ 3,5 <sup>a</sup>	0,001
ESPZ con cromatina decondensada	26,8 $\pm$ 6,2	20,7 $\pm$ 6,2	0,51

<sup>ab</sup> indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4. Evaluaciones realizadas en los pools de Plasma Seminal

Se detectaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las variables volumen, pH y osmolaridad medidos en 6 pools de PS obtenidos con VA y 6 pools obtenidos con EE (Tabla 4).

**Tabla 4.** Efecto del método de obtención (electroeyaculador o vagina artificial) de plasma seminal ovino sobre las variables volumen, pH y osmolaridad (LSM  $\pm$  EEM)

Variable (%)	Método de colecta de semen		<i>p</i>
	Vagina artificial (n=6)	Electroeyaculador (n=6)	
Volumen ( $\mu$ l)	2.100 $\pm$ 265b	4.500 $\pm$ 265a	0,0004
pH	6.3 $\pm$ 0,12b	6.8 $\pm$ 0,12a	0,02
Osmolaridad (mosm/l)	322,6 $\pm$ 4b	302,8 $\pm$ 4a	0,01

<sup>ab</sup> indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ )

Valores promedios de calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ), magnesio ( $\text{Mg}^{+}$ ), sodio ( $\text{Na}^{+}$ ), potasio ( $\text{K}^{+}$ ) y fructosa medidos en 2 pools de PS obtenidos con VA y 2 pools de PS obtenidos con EE se observan en la tabla 5.

**Tabla 5.** Concentración (mg/ml) de componentes en plasma seminal ovino colectado con vagina artificial y electroeyaculador (promedio  $\pm$  DE)

Componentes (mg/ml)	Método de colecta de semen	
	Vagina artificial (n=2)	Electroeyaculador (n=2)
Ca	0,079 $\pm$ 0,021	0,066 $\pm$ 0,019
Mg	0,035 $\pm$ 0,027	0,028 $\pm$ 0,019

Na	0,12±0,002	2,52±0,11
K	0,49±0,027	0,57±0,027
Fructosa	0,28±0,085	0,51±0,12

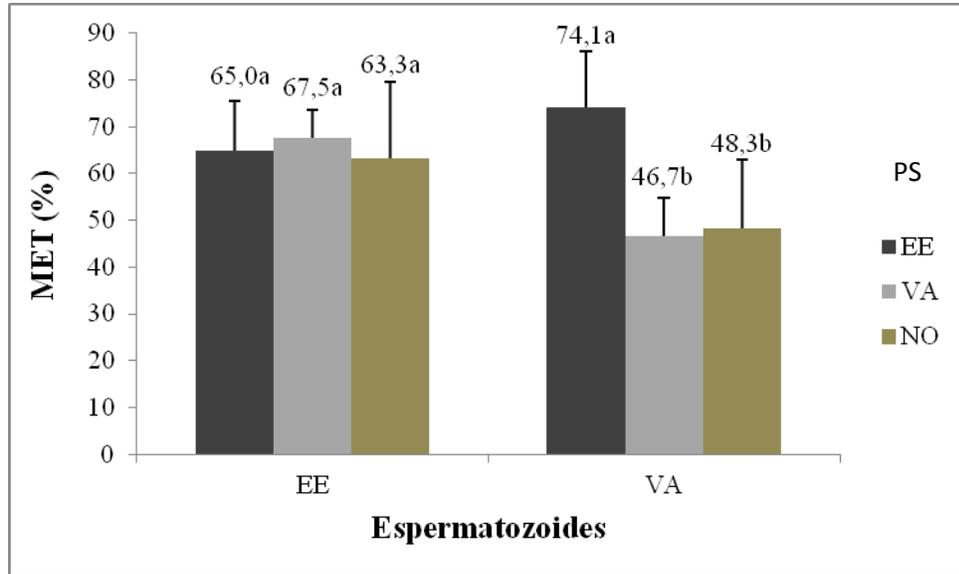
#### **4.5. Evaluaciones realizadas sobre los tratamientos pre-congelación (eyaculados reconstituidos)**

Estas evaluaciones se llevaron a cabo aproximadamente luego de 10 minutos de haber reconstituido los eyaculados.

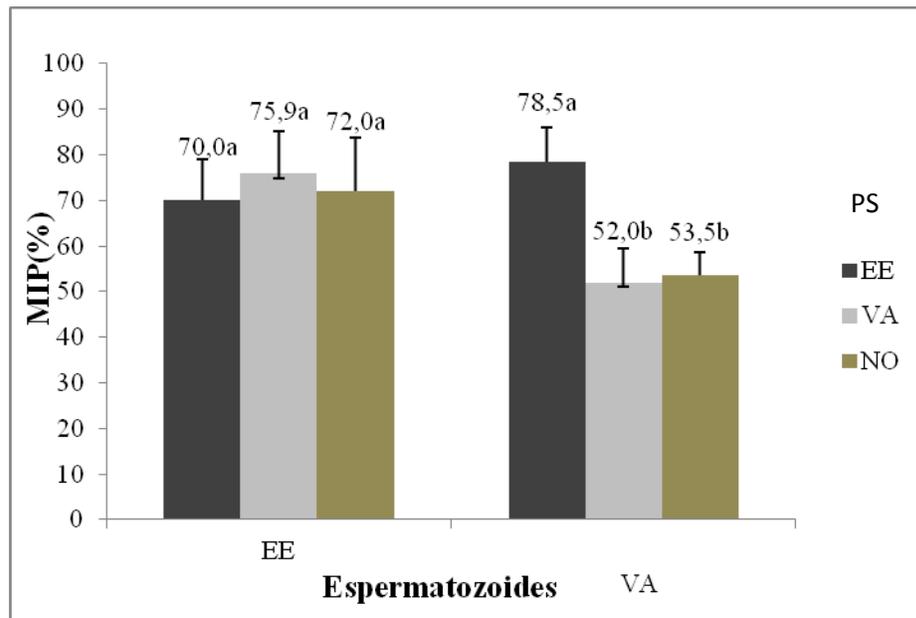
La interacción entre el método de colecta de los ESPZ y el método de colecta del PS fue significativa ( $p < 0,05$ ) para las variables Movilidad Espermática Total (MET) y Movilidad Individual Progresiva (MIP) (Gráficos 1 y 2).

#### **MET y MIP**

Los mayores porcentajes de MET y MIP fueron observados en los eyaculados reconstituidos con ESPZ colectados con EE, independientemente del sustrato agregado (PS VA, PS EE o sin PS). Por el contrario, los ESPZ obtenidos con VA tuvieron una MET y una MIP similares a las obtenidas con EE sólo cuando fue agregado PS obtenido por EE (Gráficos 1 y 2).



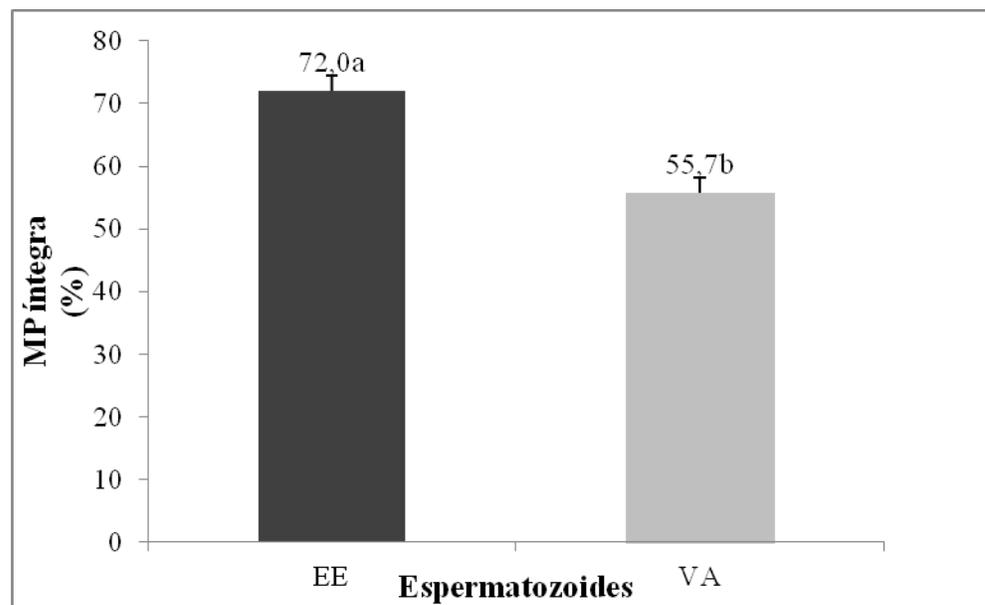
**Gráfico 1.** Movilidad espermática total (MET) de espermatozoides ovinos colectados con electroeyaculador (EE) o con vagina artificial (VA) tratados con plasma seminal (PS) obtenido con EE, VA o sin PS (NO), previo a su congelación. <sup>ab</sup> indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).



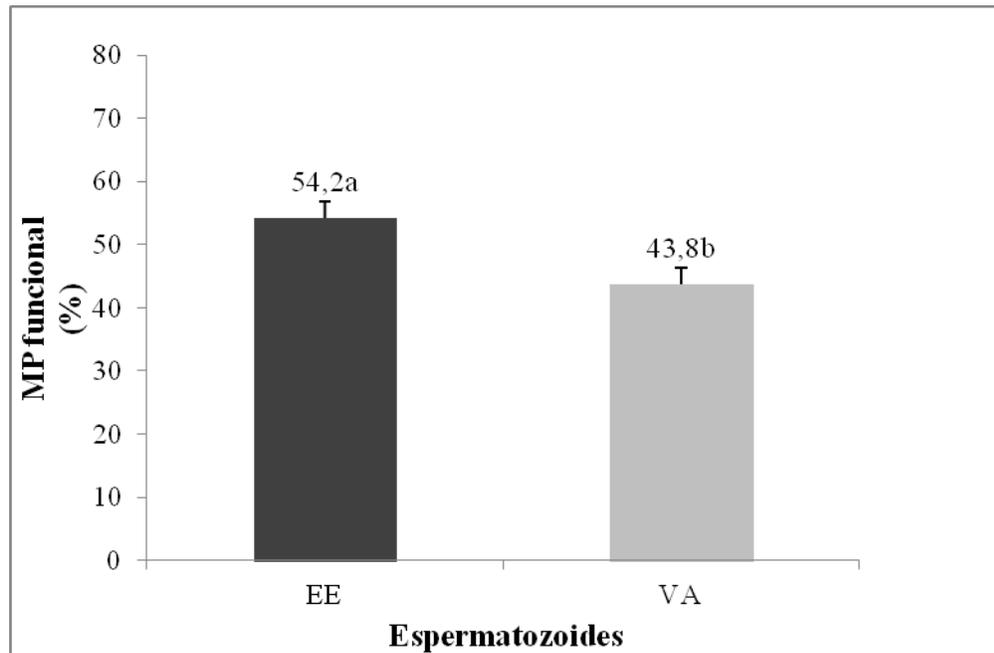
**Gráfico 2.** Movilidad individual progresiva (MIP) de espermatozoides ovinos colectados con electroeyaculador (EE) o con vagina artificial (VA) tratados con plasma seminal (PS) obtenido con EE, VA y sin PS (NO), previo a su congelación. <sup>ab</sup> indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

### Integridad y funcionalidad de la membrana plasmática (Hos+)

Tanto el porcentaje de ESPZ con MP íntegra como el porcentaje de ESPZ con MP funcional fueron significativamente mayores ( $p=0,0001$  y  $p=0,009$  respectivamente) en los tratamientos compuestos por ESPZ colectados con EE, independientemente del origen del PS adicionado (Gráficos 3 y 4)



**Gráfico 3.** Espermatozoides ovinos colectados con electroeyaculador (EE) y con vagina artificial (VA) con MP íntegra (tinción con eosina/nigrosina). <sup>ab</sup> indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p=0,0001$ ).



**Gráfico 4.** Espermatozoides ovinos colectados con electroeyaculador (EE) y con vagina artificial (VA) con MP funcional (Hos+). <sup>ab</sup> indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p=0,009$ ).

#### Actividad mitocondrial

No se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p=0,13$ ). El valor promedio ( $\pm$ EEM) de ESPZ con mitocondrias funcionales en todos los tratamientos fue de  $29,2\pm 5,0\%$ .

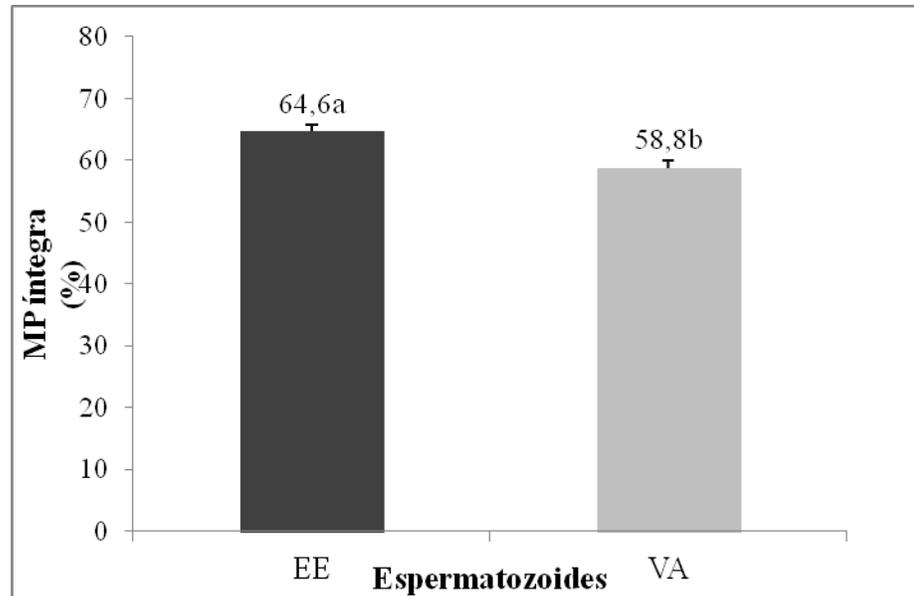
#### 4.6. Evaluaciones realizadas en las muestras congeladas/descongeladas

##### MET y MIP

No se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos en la MET ( $p=0,28$ ) y la MIP ( $p=0,35$ ). Los valores promedio ( $\pm$ EEM) fueron de  $36,4\pm 3,0\%$  y  $35,6\pm 4,0\%$  para la MET y la MIP, respectivamente.

### Integridad de la membrana plasmática

El porcentaje de ESPZ con MP íntegra fue significativamente mayor ( $p=0,0001$ ) en los tratamientos compuestos por ESPZ colectados con EE, independientemente del PS adicionado (Gráfico 5).



**Gráfico 5.** Espermatozoides ovinos congelados/descongelados colectados con electroeyaculador (EE) y con vagina artificial (VA) con MP íntegra (tinción con eosina/nigrosina). <sup>ab</sup> indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p=0,0001$ ).

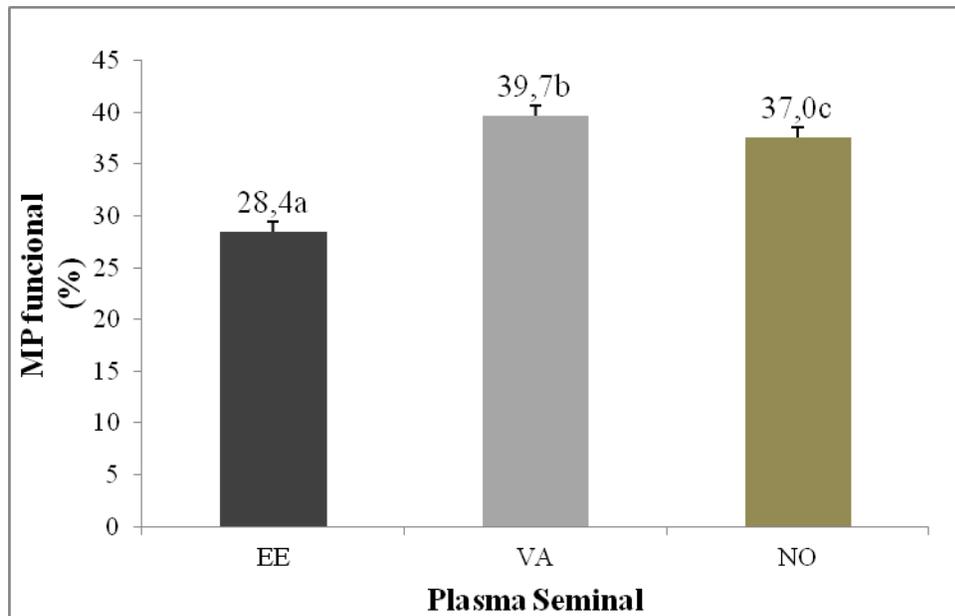
### 4.7. Evaluaciones realizadas después de pasar el semen por gradientes de Percoll

#### Funcionalidad mitocondrial

No se detectaron diferencias significativas ( $p=0,8$ ) entre los tratamientos. El valor promedio ( $\pm$ EEM) de ESPZ con mitocondrias funcionales en todos los tratamientos fue de  $29,6\pm 6\%$ .

### Espermatozoides con membrana plasmática funcional (HOS+)

Se detectó un efecto significativo ( $p= 0,003$ ) del método de colecta de PS sobre la variable ESPZ Hos+ independientemente del método de colecta de los ESPZ (Gráfico 6).

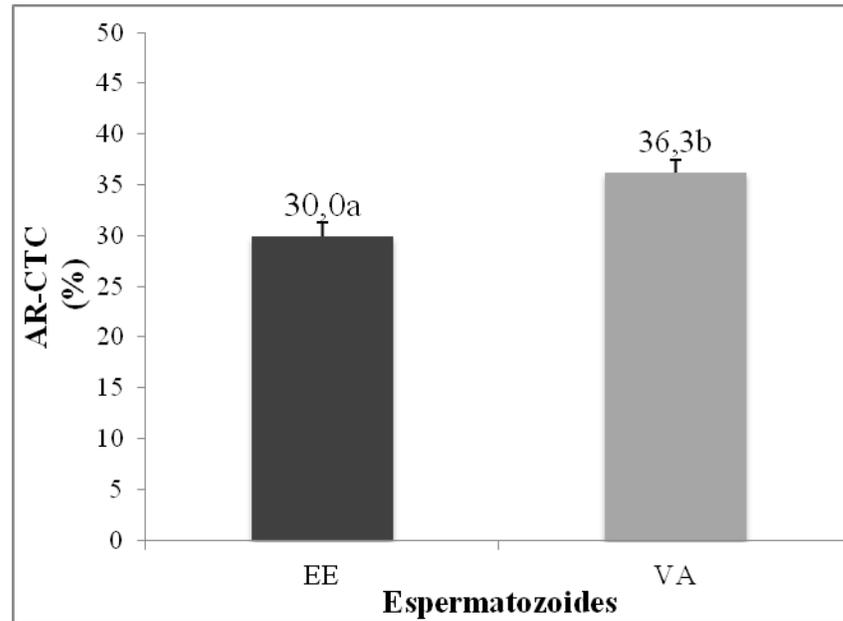


**Gráfico 6.** Espermatozoides ovinos congelados/descongelados con MP funcional (Hos+) luego de realizar un gradiente de Percoll. <sup>ab</sup> indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p= 0,003$ ).

### Patrones- CTC

No se detectó efecto del tratamiento en los patrones F-CTC y B-CTC ( $p=0,9$  y  $p=0,7$ , respectivamente). Los valores promedios ( $\pm$  EEM) de ESPZ con patrón F-CTC y B-CTC fueron de  $25,8\pm 3,2\%$  y  $41,4\pm 2,9\%$ , respectivamente, en todos los tratamientos.

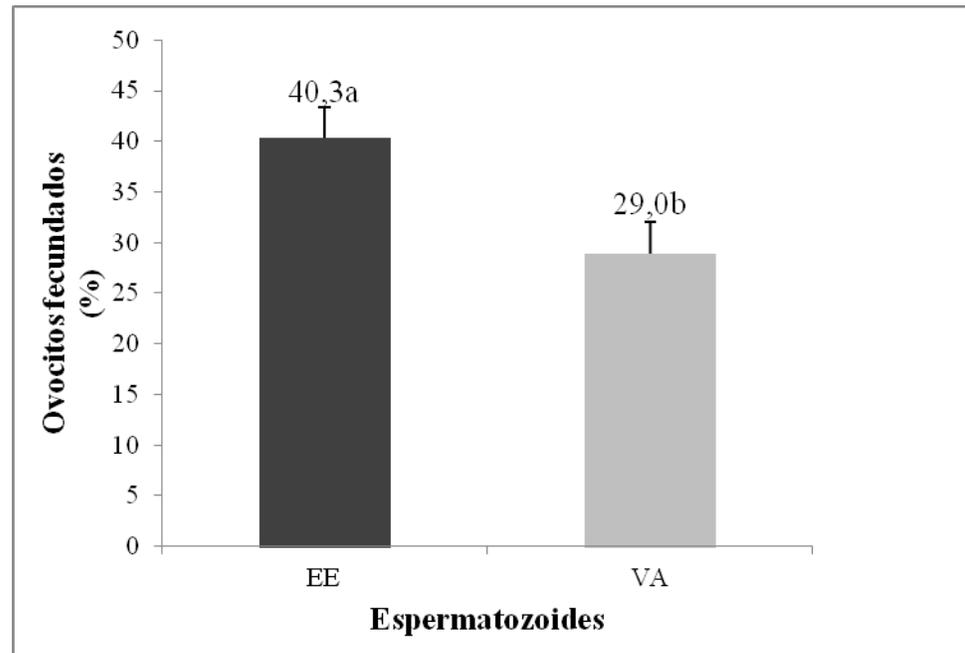
Se encontró efecto del método de colecta de ESPZ sobre el patrón AR-CTC ( $p=0,002$ ), siendo mayor el porcentaje de ESPZ reaccionados en los tratamientos conformados por ESPZ colectados con VA (Gráfico 7).



**Gráfico 7.** Espermatozoides ovinos congelados/descongelados obtenidos con electroeyaculador (EE) y con vagina artificial (VA) con reacción acrosómica (AR-CTC). <sup>ab</sup> indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p=0,002$ ).

### Capacidad fecundante

Los ESPZ ovinos colectados con EE fecundaron un mayor porcentaje de ovocitos bovinos ( $p < 0,001$ ) (Gráfico 8).



**Gráfico 8.** Porcentaje de ovocitos bovinos fecundados por espermatozoides ovinos congelados/descongelados colectados con electroeyaculador (EE) o con vagina artificial (VA). <sup>ab</sup> indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,001$ ).

#### 4.8. Concentración de proteínas en plasma seminal

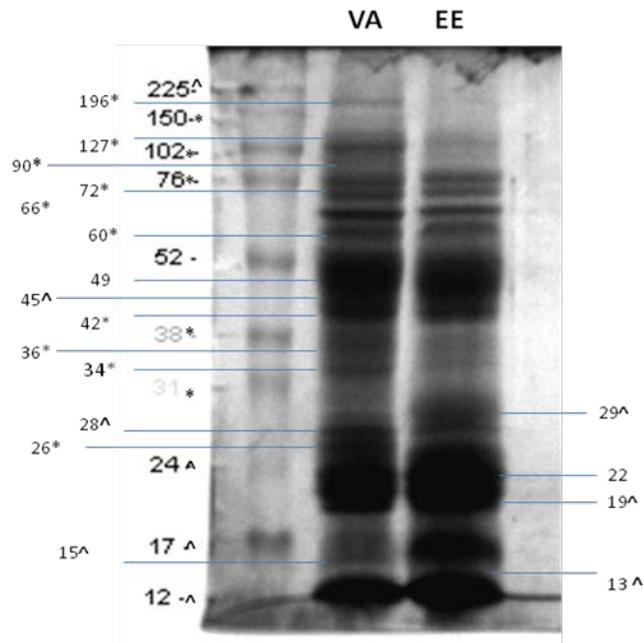
No se detectó efecto del método de colecta de PS ( $p = 0,08$ ) sobre la concentración de proteínas totales.

La concentración promedio ( $\pm$ EEM) de proteínas totales fue de  $63,6 \pm 5,2$  mg/ml en el PS colectado con VA y  $39,4 \pm 5,2$  mg/ml en el PS colectado con EE. Por cada método fueron analizados 4 pooles.

#### Concentración relativa de las proteínas del plasma seminal obtenido por vagina artificial y electroeyaculador

Fueron observadas 28 bandas en un rango entre 12 y 225 kDa. Todas las bandas estuvieron presentes en el PS correspondiente a cada método de colecta. La figura 1 muestra las diferencias en la concentración de las diferentes bandas proteicas presentes

en el PS obtenido con VA y EE. En el PS obtenido con VA se observó mayor concentración de las bandas de mayor peso molecular. Por el contrario, en el PS obtenido con EE se observó mayor concentración de las bandas proteicas de bajo peso molecular.



**Figura 12.** Bandas de proteínas presentes en plasma seminal (PS) obtenido con vagina artificial (VA) y con electroeyaculador (EE) en ovinos, separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), teñidas con Coomassie blue. En la línea 1 el marcador de peso molecular (12-225 kDa); en la línea 2 PS obtenido con VA; en la línea 3 PS obtenido con EE.

### **Absorbancia relativa de las proteínas presentes en el plasma seminal obtenido con vagina artificial y con electroeyaculador**

La determinación de la absorbancia relativa de cada banda proteica identificada en PS obtenido con EE y con VA permitió conocer la concentración de cada banda proteica. En el PS obtenido con VA se observó mayor concentración de las bandas de mayor peso molecular, opuestamente, en el PS obtenido con EE se observó mayor concentración de las bandas proteicas de bajo peso molecular (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Absorbancia relativa de las proteínas presentes en el plasma seminal obtenido con vagina artificial y con electroeyaculador

<b>Peso molecular (kDa)</b>	<b>Absorbancias relativas</b>
225	^
196	*
150	*
127	*
102	*
90	*
76	*
72	*
66	*
60	*
52	^
49	=
45	^
42	*
38	*
36	*
34	*
31	*
29	^
28	^

26	*
24	^
22	=
19	^
17	^
15	^
12	^

\*: Mayor absorbancia en PS obtenido con VA. ^: Mayor absorbancia en PS obtenido con EE. =: Igual absorbancia en PS obtenido con VA y EE

## 5. DISCUSIÓN

Con el método de electroestimulación se obtuvieron colectas en el 90% de las sesiones, mientras que con la VA todas las colectas fueron exitosas. Esta diferencia, aunque mínima, podría deberse a dos factores: por un lado, sólo animales que estaban entrenados a saltar con VA fueron utilizados en este estudio. Por otro lado, existe una diferente sensibilidad de los individuos a la electroestimulación. A través del adecuado ajuste de la técnica al individuo sería posible lograr eyaculados en todos los animales. Marco-Jiménez *et al.* (2005) obtuvieron resultados similares y adjudicaron esta diferencia al estrés ocasionado por el uso del EE, que es diferencial entre individuos, aunque también, posiblemente, fue debido a una inadecuada estimulación nerviosa a través de la mucosa rectal.

En cuanto a la eficiencia de la colecta, que estaría dada por el cumplimiento de los estándares mínimos de volumen, concentración y movilidad del eyaculado previamente fijados, en nuestro trabajo fue muy alta, ya que el 90% de los eyaculados obtenidos con ambos métodos pudo ser utilizado.

### 5.1. Valoración cuali-cuantitativa de los eyaculados individuales obtenidos con electroeyaculador y con vagina artificial

Considerando únicamente los eyaculados que cumplieron con los estándares mínimos prefijados, el material obtenido con ambos métodos de colecta difirió en el volumen, la concentración y el número total de ESPZ presentes. El mayor volumen del eyaculado obtenido con EE se debió, fundamentalmente, a la contribución que tuvieron en el mismo las glándulas sexuales accesorias, lo que se manifestó en una disminución simultánea de la concentración espermática, debida al aumento del PS del eyaculado. Numerosos estudios realizados en semen ovino (Terril, 1940; Hulet *et al.*, 1964; Quinn; White, 1966; Lighfoot, 1968; Pineda, *et al.*, 1987) y bovino (Dziuk, 1954) coinciden con estos hallazgos. Sin embargo, Marco-Jiménez *et al.* (2005), bajo similares condiciones de extracción, no observaron esta diferencia en el volumen de semen obtenido con ambos métodos. Por otra parte, observaciones realizadas en el presente trabajo, mostraron que tanto el volumen, como la concentración de los eyaculados obtenidos con EE pueden ser parcialmente controlados mediante ajustes en la duración, la intensidad del estímulo y la colecta selectiva de las porciones del eyaculado (PS y/o ESPZ). Es decir, que un buen

ajuste del método (tiempo de estimulación-relajación y momento de obtención), según el individuo, podrían corregir estas características, siendo posible así, obtener eyaculados cuantitativamente muy similares a los obtenidos con VA.

## **5.2. Valoración cuali-cuantitativa de los pooles de semen fresco obtenidos con electroeyaculador y con vagina artificial**

En este trabajo se pudo observar que la estimulación eléctrica no afectó la MET ni la MIP de los ESPZ. Si bien estos resultados coinciden con los obtenidos recientemente por Marco-Jiménez *et al.* (2005), quienes evaluaron estos parámetros con un sistema totalmente objetivo (CASA), los mismos son opuestos a los obtenidos en estudios realizados en el siglo pasado por varios autores (Brady; Gildow, 1939; Mattner; Voglmayr, 1962). La diferencia con lo observado en el presente estudio podría estar explicada particularmente por las diferencias en los equipos utilizados, que han sido mejorados en los últimos 50 años. Los equipos que se utilizan en la actualidad generan estímulos menos traumáticos, lo cual posibilita mejores colectas. A su vez, como se dijo más arriba, un mejor ajuste de la técnica de colecta en si misma posibilitaría también mejorar otros parámetros.

En este estudio se observó un mayor número de ESPZ con MP íntegra y ESPZ con mitocondrias funcionales en los pooles colectados con EE, lo que podría deberse a que los eyaculados obtenidos con EE presentaron una mayor proporción de PS. Varios investigadores observaron que el PS contiene elevadas concentraciones de compuestos antioxidantes como  $\alpha$  tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico, glutatión, piruvato, enzimas catalasa, superóxido dismutasa y sistema glutatión peroxidasa/reductasa, cuya función es proteger a los ESPZ de los daños que ocasionan las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Nissen; Kreysel, 1983; Álvarez; Storey, 1989; Jeulin *et al.*, 1989; de Lamirande; Cagnon, 1993). Las ROS se originan en el metabolismo normal de las células en condiciones aeróbicas y provocan disminución de la viabilidad espermática, de la integridad acrosomal, del potencial de membrana y deterioro de las mitocondrias, debido a la oxidación de los lípidos de membrana (Baumber *et al.*, 2000; Agarwal; Prabakaran, 2005). Estas ROS se hallan presentes en mayores proporciones en individuos con fertilidad reducida (Lewis *et al.*, 1995). Por lo tanto, las mayores cantidades de PS en eyaculados obtenidos por EE pondrían a disposición de los ESPZ una mayor proporción de antioxidantes y como consecuencia de ello, una mayor protección. Sin embargo,

Matthews *et al.* (2003) observaron mayores porcentajes de ESPZ con MP íntegra en los eyaculados colectados con VA. En ambos trabajos, el nuestro y el antes mencionado, la técnica utilizada (tinción con eosina/nigrosina) puede no ser totalmente confiable debido a artefactos de la técnica (Björndahl *et al.*, 2005), esto, así como la interpretación de los resultados de la coloración podrían explicar esta divergencia.

En relación con lo antes mencionado, y a pesar de que los pooles colectados con VA presentaron un mayor porcentaje de ESPZ con MP dañada, el porcentaje de ESPZ con MP funcional no difirió entre ambos métodos de colecta. Sin embargo, varios autores (Jeyendran *et al.*, 1984; Mantovani *et al.*, 2002; Fonseca *et al.*, 2005) encontraron una correlación positiva entre viabilidad y funcionalidad espermática que no fue observada en este estudio.

La población de ESPZ colectados con ambos métodos no difirió en el grado de maduración de su cromatina nuclear, por lo que ambos sistemas de colecta ejercerían similares efectos sobre este parámetro. El valor obtenido fue similar al observado por Rodríguez *et al.* (2005).

### **5.3. Valoración cuali-cuantitativa de los tratamientos previo a la congelación**

En las condiciones en las que se realizó este estudio, los resultados ponen en evidencia que el EE permite obtener ESPZ de mejor calidad que aquellos obtenidos con VA. El PS colectado con EE parece tener un efecto positivo sobre los ESPZ obtenidos con VA, ya que en éstos, la MET y la MIP mejoraron en relación a las observadas con los otros dos sustratos adicionados (PS de VA o solución de lavado). Esto podría deberse a la menor osmolaridad y a la mayor concentración de fructosa que hallamos en el PS obtenido con EE, la cual es utilizada por los ESPZ como fuente energética necesaria para su movilidad.

Existen opiniones contradictorias sobre la capacidad del PS como mejorador de los parámetros cualitativos del semen. Ashworth *et al.* (1994) y Maxwell *et al.* (1996) indicaron que el agregado de PS a los eyaculados mejora la calidad de los mismos, mientras que Dott *et al.* (1979), De Lamirande y Cagnon. (1984) e Iwamoto *et al.* (1993) observaron que su efecto sobre la calidad seminal fue detrimental. Por otra parte, actualmente no se ha encontrado en la bibliografía trabajos que permitan diferenciar el efecto que el método de colecta puede tener sobre los ESPZ y/o sobre el PS.

Los tratamientos conformados por ESPZ colectados con EE resultaron en un mayor porcentaje de células con MP íntegra y MP funcional, que los conformados por ESPZ obtenidos con VA, independientemente del sustrato en el que se encontraron suspendidos los ESPZ. Esto podría estar indicando:

- que la exposición de los ESPZ a su PS de origen durante la eyaculación permitiría la adsorción de proteínas y demás componentes tales como minerales, que producirían un efecto beneficioso sobre ellos y/o
- que los ESPZ obtenidos con EE tienen por sí mismos una mayor vitalidad y calidad que los obtenidos con VA.

Durante la eyaculación, las vesículas seminales aportan al PS proteínas, fructosa, fosfatos y cationes, como potasio ( $K^+$ ), sodio ( $Na^+$ ) y magnesio ( $Mg^{++}$ ). El uso del EE provoca una estimulación exagerada de estas vesículas, por lo que, los niveles absolutos de los componentes en el PS obtenido con EE son mayores que en el PS obtenido con VA. Incluso, algunos de los cationes ( $K^+$  y  $Na^+$ ) se encuentran en mayores cantidades por unidad de medida en el PS obtenido por EE (Quinn; White, 1966; Marco-Jiménez *et al.*, 2008). La mayor concentración de  $K^+$  en los eyaculados permite un mejor aprovechamiento de la fructosa, mejorando las tasas de viabilidad espermática (White, 1953). Por otra parte, la presencia de este catión aumenta el metabolismo y la movilidad espermática, como fue visto por Blackshaw (1964) y O'Shea y Wales (1964) en ESPZ ovinos. Los fosfatos cumplen la misma función que el  $K^+$ , tal como fue observado por Murdoch y White (1968) en ESPZ humanos. Finalmente, la fructosa es una importante fuente de energía para la célula y también estaría aumentada en valores absolutos en el PS obtenido por EE. En nuestro trabajo, si bien no se pudo hacer un análisis estadístico de los valores de algunos de estos parámetros bioquímicos, se observaron valores de  $K^+$ ,  $Na^+$  y fructosa mayores en el PS obtenido por EE, en relación a los observados en PS obtenido por VA. Esto sería coincidente con lo obtenido por otros autores y explicaría algunas de las mejoras morfológicas y funcionales de los ESPZ.

En cuanto a las proteínas, la mayoría de las presentes en el PS están representadas por dos tipos: las pertenecientes a la familia de las espermadhesinas, que representan el 40% del total, y a las homólogas a las BSP (Bovine Seminal Plasma) que representan el 20%. Ambas tipos de proteínas tienen un bajo peso molecular y desempeñan un rol importante como estabilizadoras de la MP luego de la eyaculación (Manjunath; Sairam, 1987; Maxwell; Watson, 1996; Romão *et al.*, 1997; Barrios *et al.*,

2002; Swamy, 2004). En el presente estudio, las proteínas de bajo peso molecular (12-30kDa) que comprenden a ambos grupos mencionados más arriba, resultaron más abundantes en el PS obtenido con EE, con respecto al PS obtenido con VA, lo cual podría explicar el mayor porcentaje de ESPZ con MP íntegra y funcional en los tratamientos conformados por ESPZ colectados con EE.

El agregado de PS a los ESPZ obtenidos con ambos métodos no afectó la integridad y funcionalidad de la MP. Esto se contradice a lo observado por Ashworth *et al.* (1994) y Maxwell *et al.* (1997) en carneros, Castellini *et al.* (2000) en conejos y Garner *et al.* (2001) en toros, en dichos estudios el agregado de PS a un eyaculado completo mejoró estos parámetros. La falta de efecto mejorador del PS sobre los ESPZ observada en nuestro estudio podría ser debida a que el primer contacto de los mismos con su PS de origen, durante la eyaculación, permitiría la adsorción de una gran variedad de proteínas, que inhibiría, posteriormente, la adhesión de nuevas proteínas o componentes benéficos del PS (Dott *et al.*, 1979), durante la reconstitución de los eyaculados.

El porcentaje de ESPZ con mitocondrias funcionales no difirió entre tratamientos. Para el caso de los tratamientos constituidos por ESPZ obtenidos con EE este valor disminuyó, lo cual podría ser atribuido al aumento significativo de las ROS que se produce durante la centrifugación (Aitken; Clarkson, 1988; Iwasaki; Cagnon, 1992), sumado al efecto físico de la centrifugación propiamente dicha.

A su vez, el agregado de PS a los ESPZ de ambos orígenes no tuvo efecto benéfico sobre los mismos y esto podría deberse a que los antioxidantes presentes serían incapaces de revertir los daños antes mencionados.

#### **5.4. Evaluaciones efectuadas en los tratamientos luego de su descongelación**

En el presente estudio no se observaron mejoras en la movilidad espermática luego del agregado de PS previo a la congelación en ninguno de los tratamientos, tal como ocurrió en el trabajo de Wales y White (1997). Sin embargo, los porcentajes de ESPZ con MET y MIP observados luego de la descongelación coincidieron con los hallados por Marco-Jiménez *et al.* (2005) en ESPZ ovinos. Por otro lado, en las evaluaciones previas a la congelación, se observaron mayores valores de MET y MIP en los tratamientos constituidos por ESPZ obtenidos con EE. Estas diferencias podrían atribuirse a factores presentes en el PS que actuarían antes de la congelación. Sin embargo, luego de la descongelación y por los efectos del proceso de criopreservación

sobre las membranas espermáticas, la acción mejoradora de estos factores sería removida o simplemente sería superada por efecto de las bajas temperaturas. Por lo tanto, los ESPZ obtenidos con ambos métodos de colecta, luego de la exposición a las bajas temperaturas quedarían en la misma condición de movilidad.

El mayor porcentaje de ESPZ con MP íntegra observado en los tratamientos compuestos por ESPZ colectados con EE, independientemente del PS adicionado. Quinn *et al.* (1968) congelaron semen utilizando un método de congelación rápida y observaron que los ESPZ colectados con VA presentaron mayor viabilidad y movilidad después de la disminución repentina de temperatura que los ESPZ obtenidos con EE. Estos autores hipotetizaron que el PS de EE volvería a los ESPZ más sensibles a las bajas temperaturas que el colectado con VA. Contrariamente, es posible pensar que estas diferencias no estarían únicamente vinculadas a la presencia del PS sino también a las características propias de los ESPZ colectados con EE que los hacen más resistentes al daño ocasionado por las temperaturas de congelación. Sin embargo, Pérez-Pé *et al.* (2001) y Cardozo *et al.* (2009) al adicionar proteínas del PS de muy bajo peso molecular (>3 kDa) a los ESPZ lavados previo a su congelación obtuvieron una mejora significativa en el porcentaje de ESPZ con MP íntegra. Esta mejora podría estar relacionada con la concentración de proteínas que fue adicionada. Estas diferencias pudieron deberse a que Pérez-Pé *et al.* (2001) adicionaron sólo 2,1 mg de proteínas, mientras que en nuestro estudio se agregó el PS entero, con una concentración de 39,4 mg/ml, lo que podría haber impedido que las proteínas protectoras específicas se adhirieran a la MP, por interferencias o por excesos de proteínas. De igual manera, Ollero *et al.* (1997) y Maxwell *et al.* (1997) obtuvieron mejoras en el porcentaje de ESPZ con MP íntegra luego de adicionar la fracción de PS que contiene proteínas de 10 kDa y 10% de PS a los ESPZ, respectivamente. Nuevamente surge el concepto de factores presentes en el PS que interferirían en la adsorción de proteínas protectoras sobre la membrana espermática, las que ayudarían a prevenir los daños ocasionados por la congelación.

El resto de las evaluaciones de calidad espermática (funcionalidad mitocondrial, funcionalidad de la membrana plasmática, estado de capacitación y fecundación *in vitro* heteróloga) se realizaron luego de pasar el semen por gradientes de Percoll con el fin de lograr una mayor población de células vivas y así evidenciar mejor, en el caso de existir, un efecto del método de colecta de ESPZ o del PS sobre las variables. Para el caso de la

evaluación del estado de capacitación Gillan *et al.* (1997) indicaron que la dilución, el congelamiento y el descongelamiento del semen inducen cambios estructurales que conducen a una capacitación prematura en los ESPZ. Sin embargo, es posible que las células muertas pierdan su contenido acrosomal, debido a la rotura de membranas, presentando una similitud con los cambios acrosomales producidos durante la capacitación (Marti *et al.*, 2000). Por lo tanto, es necesario evaluar el estado de capacitación sólo en aquellos ESPZ que sobreviven a la congelación.

Con respecto al porcentaje de ESPZ con MP funcional, se pudo observar una mejora en el porcentaje de ESPZ con MP funcional luego del agregado de PS de VA. Probablemente la diferencia hallada se deba a la selección de la población espermática que ocurre como consecuencia de la técnica antes mencionada. Estos resultados se oponen a lo esperado según el perfil proteico del PS obtenido con VA y con EE, donde las proteínas específicas reportadas en la bibliografía como protectoras de los daños ocasionados por la congelación se encuentran en mayor medida en el PS colectado con EE. Esto podría deberse a que en este estudio se reconstituyeron los tratamientos con la proporción de PS que corresponde a un eyaculado obtenido con VA (56%), en lugar del porcentaje de PS que compone un eyaculado obtenido con EE (83%), disminuyendo la cantidad de proteínas protectoras disponibles.

El agregado de PS previo a la congelación no afectó el porcentaje de ESPZ con mitocondrias funcionales. Sin embargo, los valores observados concuerdan con lo reportado por otros autores (O'Connell *et al.*, 2002). Estos datos concuerdan con lo esperado ya que el efecto mejorador de las proteínas del PS se concentra a nivel de las membranas acrosomal y plasmática (Dukelow *et al.*, 1967; Pérez-Pe *et al.*, 2001), indicando que su presencia no debería mejorar la funcionalidad de estas organelas.

El menor porcentaje de ESPZ reaccionados hallado en los tratamientos conformados por ESPZ colectados con EE, coincide con lo observado por Marco-Jiménez *et al.* (2005) en ovinos. La menor proporción de ESPZ no reaccionados en las muestras obtenidas con EE podría ser consecuencia del primer contacto, durante la eyaculación, del PS de origen con la membrana espermática. Esta exposición a un PS de diferente composición y concentración de dichos componentes, podría permitir una mayor adsorción de proteínas específicas a la MP espermática previniendo la capacitación y

reacción acrosómica prematuras debida a la congelación (Maxwell *et al.*, 1999). Según Pérez-Pé *et al.* (2001) la exposición de los ESPZ ovinos a las proteínas del PS de peso molecular de 14 y 20 antes de ser sometidos a las temperaturas de congelación, tendría un efecto inmediato sobre la supervivencia de los ESPZ. Barrios (2005) reportó que estas proteínas estarían involucradas en el proceso de fertilización, y en relación a lo que fue observado en nuestro estudio a través de la separación electroforética de las proteínas del PS colectado con EE y con VA, el PS colectado con EE contiene mayor proporción de estas proteínas protectoras, lo que podría explicar los mayores porcentajes de ovocitos fecundados y menores porcentajes de ESPZ reaccionados en los tratamientos. A diferencia de lo observado por Marco-Jiménez *et al.* (2005) el porcentaje de ESPZ no capacitados no fue afectado por el método de obtención de los mismos. Estas diferencias podrían deberse a las distintas metodologías de dilución y congelación utilizadas.

Por otra parte, en nuestro estudio todos los ESPZ estuvieron originalmente expuestos a su propio PS. En el caso de aquellos obtenidos con EE el volumen de PS fue superior al obtenido con VA y por ello, tal vez, también la cantidad absoluta de proteínas fue superior. Esta situación podría haber permitido que el tiempo de exposición de los ESPZ al PS antes de ser lavados para su reemplazo, fuese suficiente como para lograr mejorar la calidad de los ESPZ y volverlos más resistentes a los daños que ocasionan la congelación y su posterior descongelación.

La técnica de fecundación *in vitro* heteróloga permite evaluar, *in vitro*, el potencial fecundante de los ESPZ, esta se encuentra altamente correlacionada con el potencial de fecundación *in vivo* de los mismos (García-Álvarez *et al.*, 2008). En el presente estudio los mayores porcentajes de ovocitos bovinos fecundados fueron obtenidos con los ESPZ colectados con EE, independientemente del tipo de sustrato en el cual fueron suspendidos. De acuerdo con estos resultados, se puede estimar que el PS no tuvo efecto sobre la habilidad fecundante de los ESPZ y que serían las características propias de los mismos, las que vuelven diferentes, a los ESPZ colectados con EE, al momento de fecundar. Otra alternativa es pensar que es el primer contacto entre ESPZ y PS, mencionado anteriormente, el responsable de estos efectos. En tal sentido, García-Álvarez *et al.* (2009) al comparar la capacidad fecundante de ESPZ ovinos descongelados, colectados con EE y ESPZ obtenidos directamente del epidídimo, por lo tanto sin contacto previo con PS, observaron que los ESPZ colectados con EE lograron mayores tasas de fecundación *in vitro* (33% vs 22%, respectivamente). Ellington *et al.*

(1993) en ESPZ de toros, Martínez *et al.* (2008) en ESPZ de ciervo y Blash *et al.* (2000) en ESPZ de chivos obtuvieron resultados similares. Estos datos apoyarían la hipótesis de que ese contacto inicial con el PS de origen sería el responsable de que los ESPZ colectados con EE logran las mayores tasas de fecundación. De acuerdo con el trabajo de Dott *et al.* (1979) esto sería posible, ya que el contacto inmediato del PS con el ESPZ, fija un determinado comportamiento que no se modifica con el lavado posterior del eyaculado.

Watson (1995) sugirió que una de las causas de la menor fertilidad del semen congelado sería la capacitación prematura que sufren los ESPZ a consecuencia del frío, lo que coincide con lo observado en el presente trabajo, ya que las mayores tasas de fecundación *in vitro* se lograron con los tratamientos conformados por ESPZ colectados con EE (>40%), valor considerado como de elevada fertilidad (García-Álvarez *et al.*, 2008), estos tratamientos obtuvieron, también, la mayor proporción de ESPZ no reaccionados luego de la congelación/descongelación.

En el presente trabajo no se detectaron diferencias en la concentración de proteínas totales del PS obtenido con ambos métodos de colecta seminal, sin embargo, existió una tendencia hacia un mayor contenido de las mismas en el PS colectado con VA. Esta diferencia podría haber tenido valor estadístico si el número de muestras analizadas hubiese sido mayor. Por otro lado, Marco-Jiménez *et al.* (2008), tampoco obtuvieron diferencias en el contenido de proteínas de PS de ambos orígenes, a pesar de haber evaluado el doble de muestras que en este estudio, aunque lo hicieron utilizando otra metodología de determinación. El valor obtenido en el trabajo antes mencionado fue muy similar al del PS obtenido con VA (35 mg/ml).

## 6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo es posible concluir que:

Bajo las condiciones experimentales del presente estudio la movilidad total y la movilidad individual progresiva de los espermatozoides obtenidos con vagina artificial fue mejorada luego de la reconstitución de los eyaculados con plasma seminal obtenido por electroestimulación.

El uso del electroeyaculador permite obtener eyaculados con un porcentaje de espermatozoides viables y con mitocondrias funcionales superior a los eyaculados obtenidos con vagina artificial. Los ESPZ colectados con EE presentan, luego de la descongelación, mejor calidad y mayor potencial de fecundación *in vitro*.

### Implicancias y perspectivas

El presente estudio nos permitió comparar algunos parámetros de calidad seminal en eyaculados obtenidos con vagina artificial y electroeyaculador que hasta el momento no habían sido estudiados, tales como la proporción de espermatozoides con mitocondrias funcionales y de espermatozoides con cromatina inmadura presentes en cada eyaculado. Además, generamos nueva información acerca del uso del electroeyaculador, ajustes adecuados (en el tiempo de estimulación-relajación y en el voltaje) según la sensibilidad propia de cada individuo permitirían la obtención de mejores colectas.

Los resultados del presente trabajo aportan información acerca del comportamiento de los espermatozoides obtenidos con ambos métodos frente a los daños que provoca la congelación/descongelación. Sin embargo, a través de los datos obtenidos no es posible especificar si estas diferencias se deben a la presencia de plasma seminal o a las características propias de los espermatozoides. Para esto último serían necesarios estudios futuros:

- Determinación de las proteínas específicas que se adhieren a los espermatozoides. Para lo cual se utilizarían espermatozoides obtenidos directamente de epidídimo

- Adición precongelación y luego de la descongelación de plasma seminal en la misma proporción que contiene un eyaculado obtenido con electroeyaculador
- Adición posdescongelación de una menor concentración de proteínas (sólo las de bajo peso molecular, consideradas protectoras)
- Estudios de fertilización *in vivo*

## 7. ANEXO

### DILUYENTE PARA CONGELACIÓN

(Según protocolo de Maxwell, 1986)

Tris [hydroxymethyl] amino-methane 99,9 % Trizma base® SIGMA T1410	4,356 g
Glucosa D-(+)-Glucose® SIGMA G6152	0,598 g
Acido Cítrico Citric acid monohydrate® SIGMA C7129	2,386 g
Estreptomicina Streptomycin sulfate salt®	0,100 g
Penicilina G Benzilpenicillin Sodium salt® SIGMA P3032	0,060 g
Agua pura c.s.p. Bamstead/ultraline®, modelo D 11931 (USA)	76 ml
Glicerol 99 % Glycerol® SIGMA G2025	7 ml
Yema de huevo	10 ml

**Nota:** Alicuotar en tubos a razón de 10 ml c/u. Conservar congelado a -20 °C hasta 1 hora antes de su uso. Descartar el remanente diario.

**SOLUCIÓN DE CITRATO DE SODIO 2,92 %**

Citrato de Sodio	2,92g
Sodium citrate® MALLINCKRODT 0754	
Agua pura c.s.p.	100 ml
Bamstead/Ultraline®, modelo D 11931 (USA)	

**Nota:** Conservar en heladera hasta su uso.

**TINCION EOSINA NIGROSINA**

Citrato de sodio dihidratado	2,45 g
Nigrosina	2 g
Eosina	1 g
Agua bidestilada estéril	100 ml

## SOLUCIÓN HOS

(Según Paulenz, 1992)

Citrato de Sodio	0,49 g
Sodium citrate® MALLINCKRODT 0754	
Fructosa	0,90 g
D-(+)-Fructose® SIGMA F3510	
Agua pura c.s.p	100 ml
Bamstead/Ultraline®, modelo D 11931 (USA)	

**Nota:** Ajustar la osmolaridad a 100 mOsm/l pH a 7,5-7,8 (ajustar adicionando hidróxido de sodio (Sodium hydroxide® SIGMA S5881). Alicuotar en botellas con tapa a razón de 50 ml c/u y conservar en heladera a 5 °C hasta su uso.

## SOLUCIÓN HOS FORMOL (STOP)

Solución HOS	1 ml
Solución formol al 38 %	3 µl
Formaldehyde solution® SIGMA F8775	

**Nota:** Conservar a 5 °C hasta su uso.

### SOLUCIÓN ISOTÓNICA (Según protocolo de Harrison y Vickers, 1990)

Cloruro de sodio (140 mM) Sodium chloride® SIGMA S5806	0, 810 g
Glucosa (10 mM) D-(+)-Glucose® SIGMA G6152	0,180 g
Cloruro de Potasio (2,5 mM) Potassium chloride® SIGMA P8136	0, 018 g
Alcohol Polivinilico (0,5 g/ml) Polyvinyl alcohol® SIGMA P8136	0, 050 g
Polivinilpirrolidona (0,5 g/ml) Polyvinylpyrrolidone® SIGMA P0930	0, 050 g
Hepes (20 mM) HEPES Sodium salt® SIGMA H9136 o H7006	0, 560 g
Agua pura c.s.p. Bamstead/ultraline®, modelo D 11931 (USA)	100 ml

**Nota:** Ajustar el pH a 7,5 con el agregado de Hidróxido de Sodio (Sodium hydroxide® SIGMA S6881) y la osmolaridad a 300 mOsm/l. Conservar en heladera a 5 °C hasta su uso.

### SOLUCIÓN ISOTÓNICA FORMOLADA

Solución de formol al 38 % Formaldehyde solution® SIGMA F8775	10 µl
Solución isotónica	1470 µl

**Nota:** Conservar a 5 °C hasta su uso.

**SOLUCIÓN DE IODURO DE PROPIDIO (PI)**  
**(Según protocolo de Harrison y Vickers, 1990)**

**a) Solución Stock (1mg/ml)**

Ioduro de propidio	0,010 g
Propidium iodide® SIGMA P4170	
Agua pura c.s.p.	10 ml
Bamstead/Ultraline®, modelo D 11931 (USA)	

**Nota:** Conservar a 5 °C y al abrigo de la luz

**b) Solución de trabajo (0,5 mg/ml)**

Solución stock de Ioduro de Propidio	500 µl
Agua pura	500 µl

**Nota:** Conservar a -20 °C y al abrigo de la luz hasta 1 hora antes del uso

**SOLUCIÓN DE RHODAMINA 123 (Rh 123)****(Según protocolo de Grasa, 1997)****a) Solución Stock (0,4 mg/ml)**

Rodamina 123	0,004 g
Rhodamine 123® SIGMA C5879	

Dimetil sulfóxido (DMSO)	1 ml
Dimethyl sulfoxide® SIGMA C5879	

**Nota:** Conservar a -20 °C y al abrigo de la luz**b) Solución de trabajo (0,2 mg/ml)**

Solución stock de Rodamina	500µl
----------------------------	-------

DMSO	500µl
------	-------

**Nota:** Alicuotar en 20 tubos eppendorf con 100 µl c/u, conservar a -20 °C y al abrigo de la luz hasta 1 hora antes de su uso.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- ABDEL-RAHMAN, H.A.; EL- BELELY, M.S.; AL-QARAWI A.A.; EL-MOUGY S.A. 2000. The relationship between semen quality and mineral composition of semen in various ram breeds. *Small Ruminant Res.* 38:45-49.
- ABDELHAKEM, A.A.; GRAHAM, E.F.; VAZQUEZ, I.A. 1991. Studies on the presence and absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Fertility trials and the effect of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. *Cryobiology.* 28:36-42.
- ABLIN, R.1974. Immunologic properties of sex accessory tissue components. In: D. Brandes eds. *Male Accessory Sex Organs.* Academic Press. New York, United States.
- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. 2005. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl.* 26(6):654-660.
- AGUILAR, D. T. 2009. Variaciones estacionales de características seminales, circunferencia escrotal y comportamiento sexual en carneros Pampinta y Corriedale. Tesis *Magister Scientiae.* Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. 133 p.
- AISEN, E.; ALVAREZ, H.; VENTURINO, A.; LARREGUY, D.; GARDE, J.; VAZQUEZ, I. 1995. Efecto comparativo de diluyos conservadores de diferente composición y tonicidad sobre la criopreservación del semen ovino. *Investigación Agraria: Producción y Sanidad Animales.* 3(10):224-231.
- AISEN, E.; ALVAREZ, H.L.; VENTURINO, A.; GARDE, J. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology.* 53(5): 1053-1061.
- AITKEN, R.J.; CLARKSON, S. 1988. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl.* 9 (6):367-376.
- ÁLVAREZ, J.C.; STOREY, B.T. 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res.* 23:77-90.
- AMANN, R.P. Cryopreservation of sperm. 1999. In: Knobil, E.; Neill, J.D. eds. *Encyclopedia of Reproduction.* Academic Press. New York, United States. pp. 773-783.
- AMANN, R. P.; SCHANBACHER, B.D. 1983. Physiology of male reproduction. *J Anim Sci.* 2(57):380-403.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci.* 3:145-173.
- AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H.; VEERAMACHANENI, D.N.R. 1993. The epididymis and sperm maturation: a perspective. *Reprod Fert Dev.* 5:361-381.

- ARENDR, J. 1998. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reproduction*. 3:13-22.
- ARNOULT, C.; CARDULLO, R.A.; LEMOS, J.R.; FLORMAN, H.M. 1996. Activation of mouse sperm T-type  $Ca^{++}$  channels by adhesion to the egg zona pellucida. *P Natl Acad Sci USA*. 93: 13004-13009.
- ASHWORTH, P.J.C.; HARRISON, R.A.P.; MILLER, N.G.; PLUMMER, J.M.; WATSON, P.J. 1994. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reprod Fert Dev*. 6:173-180.
- AUMÜLLER, G.; VESPER, M.; SEITZ, J.; KEMME, M.; SCHEIT, K. 1988. Binding of a major secretory protein from bull seminal vesicles to bovine spermatozoa. *Cell Tissue Res*. 252:377-384.
- AUSTIN, J. W.; HUPP, E. W.; MURPHREE, R.L. 1961. Comparison of Quality of bull semen collected in the artificial vagina and by electroejaculation. *J Dairy Sci*. 44:292-2297.
- BAILEY, J.L.; BUHR, M.M. 1994. The impact of cryopreservation on  $Ca^{21}$  regulation by bovine spermatozoa. *Can J Anim Sci*. 74:45-52.
- BAILEY, J.; MORRIER, A.; CORMIER, N. 2003; Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Can J Anim Sci*. 3(83):393-401.
- BALDI, E.; LUCONI, M.; BONACCORSI, L.; KRAUSZ, C.; FORTI, G. 1996. Human sperm activation during capacitation and acrosoma reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodeling pathways. *Front Biosci*. 1:189-205.
- BARRELL, G.K; MOENTER, S.M.; CARATY, A.; KARSCH, F.J. 1992. Seasonal changes of gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe. *Biol Reprod*. 46:1130-1135.
- BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGO, M.; TATOO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod*. 63:1531-1537.
- BARRIOS, B.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; CEBRIAN-PEREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. 2002. Identificación de una nueva proteína del plasma seminal que protege a los espermatozoides frente al daño del frío. *Actas 10 Jornadas sobre Prod Anim. ITEA 1*. 2002.
- BARRIOS, B.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J.A. 2005. Immunocytochemical Localization and Biochemical Characterization of Two Seminal Plasma Proteins That Protect Ram Spermatozoa Against Cold Shock. *J Androl*. 4(26):539-549.
- BARTLES, J.R. 1995. The spermatid plasma membrane comes of age. *Trends Cell Biol*. 5:400-404.
- BASS, J.; MOLAN, P.C.; SHANNON, P. 1983. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *Reproduction*. 68:275-280.

- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *J Androl.* 21(6):895-902.
- BENOFF, S.; HURLEY, I.; COOPER, G.W.; MANDEL, F.S.; HERSHLAG, A.; SCHOLL, G.M. ROSENFELD, D, L. 1993. Fertilization potential in vitro is correlated with head-specific mannose-ligand receptor expression, acrosome status and membrane cholesterol content. *Hum Reprod.* 8(12):2155-2166.
- BERGER, T.; Clegg, E.D. 1985. Effect of male accessory gland secretions on sensitivity of porcine sperm acrosomes to cold shock, initiation of motility and loss of cytoplasmic droplets. *J Anim Sci* 60(5):1295-1302.
- BERGERON, A.; VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. 2005. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol Reprod Dev.* 71:461-470.
- BERNARDINI, A.; HOZBOR, F.; SANCHEZ, E.; FORNES, M.; ALBERIO, R.; CESARI, A. 2011. Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. *Theriogenology* 76(3):436-447.
- BJÖRNDAHL, L.; MOHAMMADIEH, M.; POURIAN, M.; SODERLUND, I.; KVIST, U. 2005. Contamination by seminal plasma factors during sperm selection. *J Androl.* 26(2):170-173.
- BLACKSHAW, A.W. 1953. The motility of ram and bull spermatozoa in dilute suspension. *J Cell Biol.* 36(4):449-462.
- BLACKSHAW, A.W. 1954. The prevention of temperature shock of bull and ram semen. *Aust J Biol Sci.* 7:573.
- BLACKSHAW, A.W. 1964. The enzymatic activity of bull testis and epididymal spermatozoa. *Aust J Bio Sci.* 17(2):489-498.
- BLASH, S.; MELICAN, D.; GAVIN, W. 2000. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology* 54:899-905.
- BOISO, I. 2001. Principios básicos de criobiología. *Rev Iberoam Fert.* 18(4).
- BOUE, F.; BLAIS, J.; SULLIVAN, R. 1996. Surface localization of P34H, epididymal protein during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 54:1009-1017.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1(72):248-254.
- BRADY, D.E.; GILDOW, E.M. 1939. Characteristics of ram semen as influenced by method of collection. *Proc. 32nd Annual Mtg Am Soc Anim Prod.* Chicago, IL. pp. A2500-A254.

- BROOKS, D.E. 1990. Biochemistry of the male accessory glands. In: G.E. Lamming eds. *Marshall's Physiology of Reproduction*. Churchill Livingstone, London. pp. 569-690.
- BYRNE, G.P.; LONERGAN, P.; WADE, M.; DUFFY, P.; DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.P.; BOLAND, M.P. 2000. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Anim Reprod Sci.* 62:265-275.
- CABRERA, F.; GONZÁLEZ, F.; BATISTA, M.; CALERO, P.; MEDRANO, A.; GRACIA, A. 2005. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (*Capra hircus*). *Reprod Domest Anim.* 40(3):191-195.
- CARDOZO, J.A.; GRASA, P.; MUIÑO, M.T.; CEBRIÁN, 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.* 10:51-59.
- CASTELLINI, C.; LATTAIOLI, P.; MORONI, M.; MINELLI, A. 2000. Effect of seminal plasma on the characteristics and fertility of rabbit spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 63(3-4):275-282.
- CATT, S.L.; O'BRIEN, J.K.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. 1997. Assessment of ram and boar spermatozoa during cell-sorting by flow cytometry. *Reprod Domest Anim.* 32:251-258.
- CHAMBERLAND, A.; FOURNIER, V.; TARDIF, S.; SIRARD, M.A.; SULLIVAN, R.; BAILEY, J.L. 2001. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology.* 55:823-835.
- CHANDONNET, L.; ROBERTS, K.D.; CHAPDELAIN, A.; MANJUNATH, P. 1990. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev.* 26:313-318.
- CHEMINEAU, P.; MALPAUX, B.; DELGADILLO, J.A.; GUERIN, Y.; RAVAUULT, J.P.; THIMONIER, J.; PELLETIER, J. 1992. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Anim Reprod Sci.* 30:157-184.
- CHOW, P.H.; PANG, S.F.; NG, K.W.; WONG, T.M. 1986. Fertility, fecundity, sex ratio and the accessory sex glands in male golden hamsters. *J Androl.* 9:312-32.
- 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 Fertil.* 2(42):277-285.
- COLAS, G. 1983. Factors affecting the quality of ram semen. In: HERESIGN, W. eds. *Sheep production*. Stoneham, Massachusetts: Butterworths. Pp 285-291.
- CORMIER, N.; BAILEY, J.L. 2003. A differential mechanism is involved during heparin and cryopreservation induced capacitation of bovine spermatozoa. *Biol Reprod.* 69:177-185.
- CORMIER, N.; SIRARD, M. A.; BAILEY, J.L. 1997. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl.* 18(4):461-468.

- CORTEEL, J.M. 1980. Effects du plasma seminal sur la survie et la fertilité des spermatozoïdes conservés in vitro. *Reprod Nutr Dev.* 20(4):1111-1123.
- COURTENS, J.L.; EK WALL, H.; PAQUIGNON, M.; PLOËN, L. 1989. Preliminary study of water and some element contents in boar spermatozoa, before, during and after freezing. *J Reprod Fert* 87 613-626.
- COWAN, A.E; MYLES, D.G.; KOOPEL, D.E. 1987. Lateral diffusion of the PH-20 protein on guinea pig sperm: evidence that barriers to diffusion maintain plasma membrane domains in mammalian sperm: *J Cell Biol.* 104:917-923.
- CROSS, N.L. 1996. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the mayor inhibitor. *Biol Reprod.* 54:138-145.
- CUPPS, P.T.; MCGOWAN, B.; RAHLMANN, D.F.; REDDON, A.R.; WEIR, W.C. 1960. Seasonal changes in the semen of rams. *J Anim Sci.* 19:208-213.
- CURRY, M.R.; WATSON, P.F. 1994. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology.* 31:39-4.
- DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. 1975. Cholesterol and phospholipid content of mammalian spermatozoa and its relation to membrane structure and cold-shock. *J. Reprod Fertil.* 2(43):383-384.
- DAUZIER, L. 1956. Quelques resultats sur l'insemination artificielle des brebis et des chevres on France. (Some results obtained from the artificial insemination of ewes and goats in France). *Pap. 3rd Int Congr. An. Reprod. Sec.* 3:12.
- DE JONGE, C. 1999. Attributes of fertile spermatozoa: *Andrology Lab Corner An Update.* *J Androl.* 20:463-473.
- DE LAMIRANDE, E.; CAGNON, C. 1984. Origin of a motility inhibitor within the male reproductive tract. *J Androl.* 5(4):269-276.
- DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. 1993. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radical Bio Med.* 14:157-166.
- DE LAMIRANDE, E.; LECLERC, P.; CAGNON, C. 1997. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod.* 3:175-194.
- DE LAMIRANDE, E.; HARAKAT, A.; CAGNON, C. 1998. Human sperm capacitation induced by biological fluids and progesterone, but not by NADH or NADPH, is associated with the production of superoxide anion. *J Androl.* 19:215-225.
- DE LEEUW, F.; CHEN, H.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. 1990. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology.* 27:171-183

- DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. 1992. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem.* 267:10149-10155.
- DESNOYERS, L.; THÈARIEN, I.; MANJUNATH, P. 1994. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Cell Biology and Biochem.* 37(4):425-435.
- DEVIREDDY, R.; SWANLUNDS, D.; ALGHAMDI, A.; DUOOS, L.; TROEDSSON, M.; BISCHOFF, J.; ROBERTS, K. 2002. Measured effect of collection and cooling conditions on the motility and the water transport parameters at subzero temperatures of equine spermatozoa. *Reproduction.* 124:643-648.
- DOMINGUEZ, M.P.; FALCINELLI, A.; HOZBOR, F.; SANCHEZ, E.; CESARI, A.; ALBERIO, R. 2008. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology.* 69(5):564-573.
- DOSTALOVA, Z.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; HETTEL, C.; RIEDEL, D.; SCHONECK, C.; EINSPIANIER, R.; TOPFER-PETERSEN, E. 1994. Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein (aSFP). *Biol Chem Hoppe Seyler.* 7(357):457-461.
- DOTT, H.M.; HARRISON, R.A.P.; FOSTER, C.G.A. 1979. The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa of bull rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. *J Reprod Fertil.* 55:113-124.
- DUKELOW, W.; CHERNOFF, H.; WILLIAMS, W. 1967. Properties of decapacitation factor and presence on various species. *J Reprod Fertil.* 14:393-399.
- DZIUK, S.P.; GRAHAM, F.E.; DONKER, D.J.; MARION, B.G.; PETERSON, E.W. 1954. Some observations in collection of semen from bulls, goats, boards and rams by electrical stimulation. *Vet Med.* 69:455-458.
- EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. 1994. In: Knobil E, Neil JD eds. *The physiology of reproduction.* Raven Press. New York, United States. pp 29-77.
- EDIDIN, M. 1997. Lipid microdomains in cell surface membranes. *Curr Opin Struct. Biol.* 7:528-532.
- ELLINGTON, J.E.; WILKER, C.W.; HILLMAN, R.B.; BALL, B.A. 1993. Ability of epididymal or ejaculated bull spermatozoa to bind to cow zonae before and after oviduct epithelial cell co-culture. *Theriogenology.* 39:213
- EMMENS, C.W.; SWYER, G.I. 1948. Observations on the motility of rabbit spermatozoa in dilute suspension. *J Cell Biol.* 32(1):121-138.
- ESCH, F.S.; LING, N.C.; BÖHLEN, P.; YING, S.Y.; GUILLEMIN, R. 1983. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochem Bioph Res Co.* 113:861-867.
- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths. Sydney, Australia. 194 p.

- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Acribia. Zaragoza, España. 192 p.
- FAHY, G. 1986. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*. 23(1):1-13.
- FARRANT, J.; WALTER, C.A.; LEE, H.; MORRIS, G.J.; CLARKE, K.J. 1977. Structural and functional aspects of biological freezing techniques. *J Microscopy*. 111(1):17-34.
- FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W. 1986. The effects of rapid cooling, cold shock of ram semen, photoperiod, and egg yolk undiluent on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology* 23:518-524.
- FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W. 1989. The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*. 26:64-69
- FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A.; MAFFILI, V.V.; BORGES, A.M.; SANTOS, A.D.F.; RODRIGUES, M.T.; OLIVEIRA, R.F.M. 2005. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. *Anim Reprod*. 2(2):139-144.
- FOOTE, R.H. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J Anim Sci*. 80:1-10.
- FRANDSON, 1967. Anatomía y fisiología de los animales domésticos R.D. Interamericana, Magistrini. 428 p.
- FRANKS, F.; MATHIAS, S.; GALFRE, P.; WEBSTER, S.; BROWN, D. 1983. Ice nucleation and freezing in undercooled cells. *Cryobiology*. 20(3):298-309.
- FULLER, S.J.; WOOD, M.J.; WHITTINGHAM, D.J.; WATSON, P.F. 1994. Cooling mouse sperm to 4°C does not affect fertilization or embryonic development. *J Reprod Fertil*. 14:8.
- GARCÍA, J.; VILA, L. 1984. Criopreservadores: concepto y manejo. *Biol Clin Hematol*. 6:219-225
- GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; MARTÍNEZ-PASTOR; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; ESTESO, M.C.; PÉREZ-GUZMÁN, M.D.; SOLER, A.J. 2008. Heterologous in vitro fertilization is good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology* 71:643-650.
- GARCÍA ARTIGA, C. 1994. Test de endósmosis en ovino. Actas 7<sup>o</sup> Jornadas Internacionales de Reproducción Animal. Murcia, España septiembre 1994.
- GARCÍA-LÓPEZ, N.; OLLERO, M.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. 1996. A dextran swim-up procedure for the separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma. *Theriogenology* 46:141-151.
- GARNER, D.; HÁFEZ, E. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. In: HÁFEZ, E.S.E. and HÁFEZ, B. eds. *Reproduction in farm animals*, 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins Company. Philadelphia, USA. pp A96-A109.

- GARNER, D. ; THOMAS, C.A.; GRAVANCE, C.G.; MARSHALL, C.E.; DeJarnette, J.M.; ALLEN, C.H. 2001. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology*. 58(1):31-40.
- GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology* 59:1241-1255.
- GILLAN, L.; MAXWELL, W. 1999. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *J Reprod Fertil* 54(1):271-283.
- GIROUARD, J.; FRENETTE, G.; SULLIVAN, R. 2005. Cholesterol depletion alters lipid rafts structure and the membrane localization of the spermatozoa- associated protein p25b. *Proc Annual Mtng Soc. Study of Reprod. Universite laval, Quebec, Canadá. 2005.*
- GRAHAM, J.K. 1994. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology*. 41:1151-1162.
- GRAHAM, E.; CRABO, B.; PACE, M. 1978. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. *J Anim Sci*. 47(2):80-119.
- GRASA, P.; PÉREZ-PÉ, R; BÁGUENA, O.; FORCADA, F.; A. ABECIA, J. A. CEBRIÁN-PÉREZ ANDT. MUIÑO-BLANCO 2004. Ram Sperm Selection by a Dextran/Swim-Up Procedure Increases Fertilization Rates Following Intrauterine Insemination in Superovulated Ewes. *J Androl*. 25(6):982-990.
- GROSSMANN, M.; SANTALÓ, J. 1991. Aspectes teòrics de la congelació de gàmetes i d'embrions. *Treb Soc Cat Biol*. 42:87-108.
- GUNN, R.C.M. 1936. Artificial production of seminal ejaculation and the characters of the spermatozoa. *Therein. Council Sci Ind Res Bull* 94:1-116.
- GURAYA, S. 2000. Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in spermatozoa. *Int Rev Cytol*. 199(2000):1-64.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.C. 2000. *Textbook of Medical Physiology* 10<sup>th</sup> Edn. W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania. pp. 916-920.
- HAFEZ, E.S. 1952. Studies on the breeding season and reproduction of ewes. *J Agr Sci*. 42:189-265.
- HAFEZ, E.S. 1987. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 5<sup>o</sup> edition. Kiawah Island, South Carolina, USA. Ed. Interamericana, Mc Graw, Hill.
- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive?. *J Androl*. 11:73-88.
- HANDROW, R.R.; FIRST, N.L.; PARRISH, J.J. 1989. Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *J Exp Zool*. 252:174-182.

- HOLT, W.V.; North, R.D. 1984. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *J Exp Zool.* 230:473-483.
- HOLT, W. V. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53:47-58.
- HULET, C. V.; FOOTE, W. C.; BLACKWELL, R. L. 1964. Effects of natural and electrical ejaculation on predicting fertility in the ram. *J Anim Sci.* 23:418-424.
- IWAMOTO, T.; TANAKA, H.; OSADA, T.; SHINAGAWA, T.; OSAMURA, Y; CAGNON, C. 1993. Origin of a sperm motility inhibitor from boar seminal plasma. *Mol Reprd Dev.* 36(4):475-481.
- IWASAKI, A.; CAGNON, C. 1992. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril.* 57(2):409-416.
- JACKSON, G.L.; KUEHL, D. 2002. Gamma-aminobutyric acid (GABA) regulation of GnRH secretion in sheep. *Reprod Suppl.* 59:15-24.
- JEULIN, C.; SOUFIR, J.C.; WEBER, P.; LAVAL-MARTIN, D.; CALVAYRAC, R. 1989. Catalasa activity in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 24(2):185-196.
- JEYENDRAN, R.S.; VANDERVEN, H.H.; PÉREZ-PELÁEZ, M.; CRABO, B.G; ZANEVELD, L.J.D. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil.* 70:219-228.
- JOBIM, M.I.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G.; WALD, V.B.; HORN, A.P. AND MATTOS, R.C. 2004. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. *Theriogenology.* 63:2053-2062.
- JONES, R. 1989. Membrane remodeling during sperm maturation in the epididymis. *Oxf Rev Reprod Biol.* 11:285-337.
- JONES, R.; MANN, T. 1977. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *J Reprod Fertil.* 50: 261-268.
- KARSCH, F.J.; BITTMAN, E.L.; FOSTER, D.L.; GOODMAN, R.L.; LEGAN, S.J.; ROBINSON, J.E. 1984. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Progr Horm Res.* 40:185-232.
- KAWANO, N.; SHIMADA, M.; TERADA, T. 2004. Motility and penetration competence of frozen-thawed miniature pig spermatozoa are substantially altered by exposure to seminal plasma before freezing. *Theriogenology.* 61(2-3):351-364.
- KILLIAN, G.J; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. 1993. Fertility-Associated Proteins in Holstein Bull Seminal Plasma. *Biol Reprod.* 49:1202-1207.
- KNOBIL, E.; NEILL, J.D. 1988. *The Physiology of Reproduction.* Raven Press, New York, USA. Pp 387-445.

- KROGENAES, A.; ANDERSEN BERG, K.; HAFNE, A.; ENGELAND, E. 1994. Membrane alterations in bull spermatozoa after freezing and thawing and after in vitro fertilization. *Acta Vet Scand.* 35(1):17-26.
- LANGLAIS, J.; ROBERTS, K. 1985. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosoma reaction of mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 12:183-224.
- LEAHY, T.; MARTI, J.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. 2009. Seminal plasma proteins protect flow-sorted ram spermatozoa from freeze-thaw damage. *Reprod fert Dev.* 21(4):571-578.
- LEAHY, T.; MARTI, J.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. 2010. Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen-thawed ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 119(1-2):147-153.
- LEGAN, S.J.; KARSCH, F.J. 1979. Neuroendocrine regulation of the estrous cycle and seasonal breeding in the ewe. *Biol Reprod.* 20:74-85.
- LEHMAN, M.N.; COOLEN, L.M.; GOODMAN, R.L.; VIGUIÉ, C.; BILLINGS, H.J.; KARSCH, F.J. 2002. Seasonal plasticity in the brain: the use of large animal models for neuroanatomical research. *Rep Supp.* 59:149-165.
- LEWIS, S.E.; BOYLE, P.M.; MCKINNEY, K.A.; YOUNG, I.S.; THOMPSON, W. 1995. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil Steril.* 64:868-70.
- LIGHTFOOT, R.J. 1968. The effect of mating on semen characteristics. *Aust J Agric Res.* 19:1043-57.
- LIGHTFOOT, R.J.; SALAMON, S. 1969. Freezing of ram semen by the pellet method II. The effect of method of dilution, dilution rate, glycerol concentration and duration of storage at 5 °C prior to freezing on survival of spermatozoa. *Aust J Biol Sci.* 22:1547-1560.
- LINCOLN, G.A.; SHORT, R.V. 1980. Seasonal breeding: nature's contraceptive. *Rec Prog Horm Res.* 36:1-52.
- LOVE, C.C.; Brinsko, S.P.; Rigby, S.L.; Thompson, J.A.; Blanchard, T.L.; Varner, D.D. 2005. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology.* 63(6):1584-1591.
- LOVELOCK, J.E. 1953. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta.* 10:414-426.
- MACMILLAN, K.L.; SHANNON, P.; HART, N.L. 1978. The redilution of deep frozen bull semen. *Brit Soc Anim Sci.* 26:67-73.
- MALPAUX, B.; VIGUIE, C.; THIERY, J.C. 1996. Photoperiodic control of reproduction. *Producción Animal.* 9: 9-23.
- MALPAUX, B.; THIERY, J.C.; CHEMINEAU, P. 1999. Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reprod Nutr Dev.* 39:355-366.

- MALPAUX, B.; TRICOIRE, H.; MAILLIET, F.; DAVEAU, A.; MIGAUD, M.; SKINNER, D.C.; PELLETIER, J.; CHEMINEAU, P. 2002. Melatonin and seasonal reproduction: understanding the neuroendocrine mechanisms using the sheep as a model. *Reprod Suppl.* 59:167-179.
- MANN, T. 1964. *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract.* Methuen and Co., London. p. 493
- MANN T.; LUTWAK- MANN, C. 1976. Evaluation of the functional state of male accessory glands by the analysis of seminal plasma. *Andrologia.* 8:237-242.
- MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. 1981. *Male reproductive function and semen. Themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology.* Berlín: Springer-Verlag. 495 pp.
- MANJUNATH P.; THERIEN, I. 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J. Reprod Immunol.* 53:109-119.
- MANJUNATH P.; SAIRAM, M.R.; UMA, J. 1987. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biom Life Sci.* 7(3):231-238.
- MANJUNATH, P.; BAILLARGEON, L.; MARCEL, Y.; SEIDAH, N.; CHRETIEN, M.; CHAPDELAINE, A. 1988. Diversity of novel proteins in gonadal fluids. Chrétien, M.; McKerns, K. eds. *Molecular Biology of Brain and Endocrine Peptidergic Systems.* Plenum Press, New York. pp 259-273.
- MANJUNATH, P.; MARCEL, Y.; UMA, J.; SEIDAH, N.; CHRÉTIEN, M.; CHAPDELAINE, A. 1989. Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J Biol Chem.* 264:16853-16857.
- MARCO-JIMÉNEZ, F.; PUCHADES S.; GADEA, J.; VICENTE J.S.; VIUDES DE CASTRO, M.P. 2005. Effect of semen collection method on pre-and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology.* 64:1756-1765.
- MARCO-JIMENEZ, F.; VICENTE, J.S.; VIUDES DE CASTRO, M.P. 2008. Seminal Plasma Composition from Ejaculates Collected by Artificial Vagina and Electroejaculation in Guirra Ram. *Reprod Dom Anim.* 43:403-408.
- MARTI, J.I.; CEBRIAN-PEREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. 2000. Assessment of the acrosomal status of ram spermatozoa by RCA lecting binding and partition in an aqueous two.phase system. *J Androl.* 21(4):541-548.
- MARTINEZ, P.; MORROS, A. 1996. Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Front Biosci.* 1:103-117.

- MARTINEZ, F.; MARTINEZ-PASTOR, F.; ALVAREZ, M.; FERNANDEZ-SANTOS, M.R.; ESTESO, M.C.; DE PAZ, P. 2008. Sperm parameters on Iberian red deer: electroejaculation and postmortem collection. *Theriogenology*. 70:216-26.
- MATTHEWS, N.; BESTER, N.; SCHWALBACH, L.M. J.; 2003. A comparison of ram semen collected by artificial vagina and electroejaculation. *S Afr J Anim Sci*. 4:28-30.
- MATTNER, P.E.; VOGLMAYR, J.K. 1962. A comparison of ram semen collection by the artificial vagina and by electro ejaculation. *Aust J Exp Agric Anim Husband*. 2:78-81.
- MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. 1996. Recent Progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci*. 42:55-65.
- MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. 1999. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*. 52:1353-1362.
- MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. 2000. Recent developments in artificial insemination in sheeps and goats with semen stored in chilled liquid or frozen state. 14 International Congress on Animal Reproduction. Stockholm, Sweden.
- MAXWELL, W.M.C.; LANDERDS, A.J.; EVANS, G. 1995. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. *Theriogenology*. 43(7):1201-1210
- MAXWELL, W.M.C.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. 1997. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Rep Fert Dev*. 8:1165-1178.
- MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G.; MORTIMER, S.T.; GILLAN, L.; GELLALTLY, E.S.; MCPHIE, C.A. 1999. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented whit seminal plasma. *Reprod Fertil Dev*. 11:123-126.
- MAZUR, P. 1984. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *Am J Physiol*. 247: A125-A142.
- MAZUR, P.; MILLER, R.H. 1976. Survival of frozen-thawed human red cells as a function of the permeation of glycerol and sucrose. *Cryobiology*. 13:523-536.
- MCMILLEN, I.C.; HOUGHTON, D.C.; YOUNG, I.R. 1995. Melatonin and the development of circadian and seasonal rhythmicity. *J Reprod Fertil Suppl*. 49:137-146.
- MEDEIROS, C. M.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T.; RODRIGUES, J.L. 2002. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better?. *Theriogenology*. 57:327-344.
- METZ, K.W.; BERGER, T.; CLEGG, E.D. 1990. Adsorption of seminal plasma spermatozoa. *Theriogenoly*. 34:691-700.
- MILLER, D.J.; WINER, M.A.; AX, R.L. 1990. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod*. 42:899-915.

- MILOVANOV, V.; SELIVANOVA, O. 1932. Probl. Zhivotnov. 2:75. (Anim. Breed. Abstr. 1:153 (1933).
- MOLINIA, F.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. 1994. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology*. 42(5):849-858.
- MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. 2005. Effect of seminal plasma on the cryopreservation equine spermatozoa. *Theriogenology*. 63(9):2372-2381.
- MOREAU, R.; MANJUNATH, P. 2000. Characteristics of the cholesterol efflux induced by novel seminal phospholipids-binding protein. *Biochem Biophys Acta*. 1(1487):24-32.
- MOROZOV, V.A. 1959. Elaboration of the problems of preservation of semen of farm animals in a frozen state. *Zhivotnovodstvo* 21:66-72.
- MORRIER, A.; CASTONGUAY, F.; BAILEY, J.L. 2003. Conservation of fresh ram spermatozoa at 5 °C in the presence of seminal plasma. *Can J Anim Sci*. 83: 221-227.
- MORTIMER, D. 1994. *Practical Laboratory Andrology* (Hardcover). New York, Oxford. Oxford University. Press pp 159-174.
- MORTIMER, S.; MAXWELL, W.M.C. 2004. Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction*. 127:285-291.
- MOURA, A.A.; CHAPMAN, D.A.; KOC, H.; KILLIAN, G.J.; 2006. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. *J Androl*. 27: 534-41.
- MUÑO-BLANCO, T.; PEREZ-PE, R.; CEBRIAN-PEREZ, J.A. 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Rep Dom An*. 43(54):18-31.
- MULDREW, K.; MCGANN, L. 1990. Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophys J*. 57 (3):525-532.
- MURDOCH, R.N.; WHITE, I.G. 1968. Studies of the metabolism of human spermatozoa. *Reproduction*. 16:351-361.
- NAGAI, T.; NIWA, K.; IRITANI, A. 1984. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes. *Reproduction*. 70:271-275.
- NAUC, V.; MANJUNATH, P. 2000. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/A2, BSP-A3 and BSP-A30 kDa) and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biol Reprod*. 63:1058-1066.
- NAUK, V.A.; LANSBERG, E.S.; SHERIKIN, V.N. 1970. Cryogenic changes in ram spermatozoa. *Ovtsevodstvo*. 10:25-27.
- NICHOLS, G.D.; EDGAR, D.G.; 1964. A transistorised rectal probe for ejaculating rams. *NZ Vet J*. 12: 145-146.

- NISSEN, H.P.; KREYSEL, H.W. 1983. Superoxide dismutase in human semen. *Klinische Wochenschrift*.61: 63-65.
- O´CONNELL, M.; MC CLURE, N.; LEWIS, S.E.M. 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod*. 17(3):704-709.
- OLDEN, K.; BAERNARD, B.; HUMPHIRES, M.; YEO, T.; YEO, K.; WHITE, S.; NEWTON, S.; BAUER, H.; PARENT, B. 1985. Function of glycoprotein glycans. *Trends Biochem Sci*. 2(10):78-82.
- OLLERO, M.; MUIÑO-BLANCO, T.; LOPEZ-PEREZ, M.J.; CEBRIAN PEREZ, J. 1996. Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *Int J Androl*. 19:287-292.
- OLLERO, M.; GARCÍA-LÓPEZ, N.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T.1997. Surface changes of ram spermatozoa by adsorption of homologous seminal plasma proteins revealed by partition in an aqueous two-phase system. *Reprod Fertil Dev*. 9:381-390.
- OLLERO, M.; PEREZ-PE, R.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIAN PEREZ, J. 1998. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology*. 37(1):1-12.
- O´MEARA, C.M; DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.P.; DUFFY, P.; FAIR, S.; EVANS, A.; LONERGAN, P. 2007. Resuspending ram spermatozoa in seminal plasma after cryopreservation does not improve pregnancy rate in cervically inseminated ewes. *Theriogenology*. 67:1262-8.
- ORGBIN-CRIST, M.; FOURNIER-DELPECH, S. 1982. Evidence for maturational changes during epididymal transit. *J Androl*. 3:429-433.
- O´SHEA, T.; WALES, R.G. 1964. Effects of potassium on ram spermatozoa during chilling to and storage at 5°C. *Reproduction*. 8:121-132.
- OVERSTREET, J.W.; BEDFORD, J.M. Transport, capacitation and fertilizing ability of epididymal spermatozoa. 1974. *J Exp Zool*. 189:203-214.
- PANG, S.F.; CHOW, P.H.; WONG, T.M. 1979. The role of the seminal vesicle, coagulating glands and prostate glands on the fertility and fecundity of mice. *J Reprod Fertil* 56:129.
- PARINAUD, J.; LABAL, B.; VIEITEZ, G.; RICHUILLEY, G.; GRANDJEAN, H. 1993. Comparison between fluorescent peanut agglutinin lectin and GB24 antibody techniques for the assessment of acrosomal status. *Hum Reprod*. 8:1685-1688.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38:209-222.
- PARKS, J.E.; ARION, J.; FOOTE, R. 1987. Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biol Reprod*. 37(5):1249-1258.

- PEGG, D.E. 2007. Principles of Cryopreservation. In: Day JG, Stacey GN, eds. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols: Second Edition. Totowa, NJ USA: Humana. pp. 39–58.
- PÉREZ, L.J.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; 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.
- PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. 2001. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*. 56:425-434.
- PÉREZ-PÉ, R.; GRASA, P.; FERNANDEZ-JUAN, M.; PELEATO, M.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. 2002. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. *Mol Reprod Dev*. 61(2):226-233.
- PINEDA, M.H.; DOOLEY, M.P. 1991. Effect of method of seminal collection on the retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of rams. *Am J Vet Res*.52:307-313.
- PINEDA, M.H.; DOOLEY, M.P.; HEMBROUGH, F.B.1987. Retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of rams. *Am J Vet Res*. 48: 562-568.
- POLGE, C.; SMITH, A.; PARKES, A. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 164:666-680.
- PONS-REJRAJI, H.; BAILEY, J.; LECLERC, P. 2009. Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. *Reprod Fert Dev* 21(4):525-537.
- PONTBRIAND, D.; HOWARD, J.; SCHIEWE, M.; STUART, L.; WILDT, D. 1989. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*. 24(4):341-354.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. 1975. Freezing of boars spermatozoo alter fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci*. 40:99-102.
- QUINN, P.J. 1968. The effect of cold shock and deep freezing on ram spermatozoa collected by electrical ejaculation and by artificial vagina. *Aust J Agr Res*. 19:119-128.
- QUINN, P.J.; WHITE, I.G. 1966. Variation in semen cations in relation to semen quality and methods of collection. *Fertil Steril*. 17:815–25.
- QUINN, P.J.; WHITE, I.G.; CLELAND, K.W. 1969. Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *J Reprod Fertil*. 18:209-220.
- RAMALHO-SANTOS, J.; AMARAL, A.; SOUSA, A.P.; RODRIGUES, A.S.; MARTINS, L.; BAPTISTA, M.; MOTA, P.; TAVARES, R.; AMARAL, S.; GAMBOA, S. 2007. Probing the structure and Function of Mammalian Sperm using Optical and Fluorescence

Microscopy. Méndez-Vilas, A.; Díaz, J. eds. Modern Research and educational topics in microscopy. Pp 394-402.

RETVIELD, A.; SIMMONS, K. 1998. The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochem Biophys Acta*. 1376: 467-479.

REYNOLDS, J.; TANFORD, C. 1970. The Gross Conformation of Protein-Sodium Duodecyl Sulfate Complexes. *J Biol Chem*. 245:5161-5165.

RIMBAUD, E. 2007. Fisiopatología de la reproducción [en línea] < <http://www.bionica.info/Biblioteca/Rimbaud2005.pdf> [consulta: septiembre 2009]

ROBINSON, J.E.; KENDRICK, K. 1992. Inhibition of luteinizing hormone secretion in the ewe by progesterone: associated changes in the release of gamma-aminobutyric acid and noradrenaline in the preoptic area as measured by intracranial microdialysis. *J Neuroendocrinol*.4: 231-236.

RODRÍGUEZ, H.; OHANIAN, C.; BUSTOS-OBREGON, E. 1985. Nuclear chromatin decondensation of spermatozoa in vitro: a method for evaluating the fertilizing ability of ovine semen. *Int J Androl* 8:147-158.

ROMÃO, M.J.; KOLL, I.; DIAS, J.; CARVALHO, A.; ROMERO, A.; VARELA, P.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J. 1997. Crystal structure of acidic seminal fluid protein (aSFP) at 1.9Å resolution: a bovine polypeptide of the spermadhesin family. *J Mol Biol*. 274(4):650-660.

ROSA, H.J.D.; BRYANT, M.J. 2003. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Res*. 48:155-171.

RUSSELL, L.; MONTAG, B.; HUNT, W.; PETERSON, R. 1985. Properties of boar sperm plasma membranes (PM): Proteins released by washing and differential solubility in salts, detergents, and sensitivity to surface radiolabelling. *Mol Reprod Dev*. 11(3):237-252.

SAAKE, R.G., MARSHALL, C.E. 1968. Observations on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 16:511-514.

SALAMON, S. 1968. Deep freezing of ram semen: recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods of freezing. *J Biol Sci*. 21:351

SALAMON, S.; LIGHTFOOT, R. 1969. Freezing Ram Spermatozoa by the Pellet Method. I. the Effect of Diluent Composition on Survival of Spermatozoa. *Aust J Biol Sci*. 22(6):1527-1546.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. 1993. Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod Fert Dev*. 5(6):613-638.

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

- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci.* 62:77-111.
- SALAMON, S.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M.C. 1990. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworth. Sidney, Australia. 200p.
- SALLING, P.M. 1989. Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. In: Milligan SR eds. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. New York: Oxford University Press. 339-388.
- SANDOVAL, R. 2005. Criopreservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. Tesis Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 72p.
- SANOCKA, D.; KURPISZ, M. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrin.* 2:12.
- SANTIANI, A.V. 2003. Criopreservación de semen ovino: Efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis Magíster en Ciencias mención Biología de la Reproducción. Universidad de La Frontera. Temuco, Chile. 200p.
- SCHOENECK, C.; BRAUN, J.; EINSPANIER, R. 1996. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: Effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriogenology* 45:633-642.
- SHADAN, S.; JAMES, P. S.; HOWES, E.A.; JONES, R. 2004. Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. *Biol Reprod.* 71:263-265.
- SHALGI, R.; PHILLIPS, D. 1980. Mechanics of sperm entry in cycling hamsters. *J Ultra Mol Struc R.* 71(2):154-161.
- SHANNON, P. 1965. Contribution of Seminal Plasma, sperm numbers, and gas phase to dilution effects of bovine spermatozoa. *J Dairy Sci.* 48(10):1357-1361.
- SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 166:368-379.
- SCHEIT, K.; KEMME, M.; AUMÜLLER, G.; SEITZ, J.; HAGENDORFF, G.; ZIMMER, M. 1988. The major protein of bull seminal plasma: biosynthesis and biological function. *Biosci Reprod.* 8:589-608.
- SHIVAJI, S.; BHARAGAVA, P.; SCHEIT, K. 1984. Immunological identification of seminalplasmin in tissue extracts of sex glands of bull. *Biol Reprod.* 30:1237-1241.

- SINGER, S.J.; NICOLSON, G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175(4023):720-731.
- SWAMY, M.J. 2004. Interaction of bovine seminal plasma proteins with model membranes and sperm plasma membranes. *Curr Sci.* 87(2):203-212.
- SWAMY, M.J.; MARSH, D.; ANBAZHAGAN, V.; RAMAKRISHNAN, M. 2002. Effect of cholesterol on the interaction of seminal plasma protein, PDC-109 with phosphatidylcholine membranes. *FEBS Letters.* 528: 230-234.
- TERRILL, C. 1940. Comparison of Ram Semen Collection Obtained by Three Different Methods for Artificial Insemination. *Proc. Eerd Annu Mtg Am Soc Anim Prod. Chicago, IL.* Pp 201-207.
- THERIEN, I.; SOUBEYR, S.; MANJUNATH, P. 1997. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol. Reprod.* 57:1080-1088.
- THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. 1998. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma and High-Density Lipoprotein Induce Cholesterol Efflux from Epididymal Sperm. *Biol Reprod.* 59(4):768-776.
- THERIEN, I. MOREAU R. MANJUNATH, P. 1999. Bovine Seminal Plasma Phospholipid-Binding Proteins Stimulate Phospholipids Efflux from Epididymal Sperm. 1999. *Biol Reprod.* 61(3):590-598.
- THIERY, J.C.; CHEMINEAU, P.; HERNANDEZ, X.; MIGAUD, M.; MALPAUX, B. 2002. Neuroendocrine interactions and seasonality. *Domest Anim Endocrin.* 23:87-100.
- THUNDATHIL, J. GIL, J.; JANUSKAUSKAS, A.; LARSSON, B. 1999. Premature capacitation post-thaw and the fertility of AI bull semen. *Theriogenology.* 18:90-98.
- TRAVIS, A. 2004. Organization and functions of lipid rafts in spermatozoa. College of Veterinary Medicine, Cornell University.
- VADNAIS, M.; KIRKWOOD, R.; SPECHER, D.; CHOU, K. 2005. Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. *Anim Repro Sci.* 90(3-4):347-354.
- VAISSAIRE, J.P.; 1977. *Sexualité et Reproduction des mammifères domestiques et de laboratoire.* Maloine S.A. eds. Paris. 457 p.
- VAN GESTEL, R.A.; BREWIS, I.A.; ASHTON, P.R.; HELMS, J.B.; BROWERS, J.F.; GADELLA, B.M. 2005. Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Mol Hum Reprod.* 11(8):583-590.
- VIEYTES, A.L., CISALE H.O., FERRARI, M.R. 2008. Relationship between the nuclear morphology of the sperm of 10 bulls and their fertility. *Veterinary Record.* 163:625-629.

- VIGUIÉ, C.; THIBAUT, J.; THIÉRY J.C.; TILLET, I.; MALPAUX, B. 1997. Characterization of the short day-induced decrease in median eminence tyrosine hydroxylase activity in the ewe: temporal relationship to the changes in the luteinizing hormone and prolactin secretion and short day-like effect of melatonin. *Neuroendocrinology*. 138(1):499.
- VISCONTI, P.E.; GALANATINO-HOMER, H.; MOORE, G.D.; BAILEY, J.L.; NING, X.; FORNES M.; KOPF, G.S. 1998. The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl*. 19(2):242-248.
- VISHWANATH, R. 2003. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*. 59(2):571-584.
- VOGLMAYR, J. ; FAIRBANKS, G. ; JACKOWITZ, M. ; COLLELA, J. 1980. Post-Testicular Developmental Changes in the Ram Sperm Cell Surface and Their Relationship to Luminal Fluid Proteins of the Reproductive Tract. *Biol Reprod*. 22(3):655-667.
- VREEBURG, J.; HOLLAND, M.; ORGEBIN-CRIST, M. 1992. Binding of epididymal proteins to rat spermatozoa in vivo. *Biol Reprod*. 47(4):588-597.
- WATSON, P.F. 1975. Use of a Giemsa stain to detect changes in the acrosome of frozen ram spermatozoa. *Vet. Rec.* 97:1-12.
- WATSON, P.F. 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes. London. Academic Press. Pp. 189-218.
- WATSON, P.F. 1986. Problems in the cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Cryobiology*. 23:547
- WATSON, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*. 7:871-891.
- WATSON, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*. 60-61 481-492.
- WATSON, P.F.; MARTÍN, I.C. 1975. Effects of Egg Yolk, Glycerol and the Freezing Rate on the Viability and Acrosomal Structures of Frozen Ram Spermatozoa. *Aust J Biol Sci*. 28(2):153-160.
- WATSON P.F.; MARTIN, I.C. 1976. Artificial insemination of sheep: The effect of semen diluents containing egg yolk on the fertility of ram semen. *Theriogenology*. 6(5):559-564.
- WAY, A.L.; HENAULT, M.A.; KILLIAN, G.J. 1995. Comparison of four staining Methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Theriogenology*. 8(43):1301-1316.
- WILLIAMS, L.; HELLIWELL, R. 1993. Melatonin and seasonality in the sheep. *Anim Reprod Sci*. 33:159-182.

- WHITE, I.G. 1953. The effect of washing on motility and metabolism of ram, bull and rabbit spermatozoa. *J Biol.* 30:200-213.
- WHITE, L. 1980. Secretion of the male reproductive tract and seminal plasma. In: *Reproduction in Farm Animals*. 4th ed. E.S.E. Hafez eds. Philadelphia, Lea & Febiger. p 509.
- WINSOR, D.; WHITE, I. 1995. Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial insemination or frozen storage. *Anim Reprod Sci.* 40 (1-2):43-58.
- WOLF, D.E. 1995. Lipid domains in sperm plasma membranes. *Mol Membr Biol.* 12:101-104.
- WOLFE, C.A.; JAMES, P.S.; GUNNING, P.; LADHA, S.; CHRISTOVA, Y.; JONES, R. 2001. Lipid dynamics in the plasma membrane of ram and bull spermatozoa after washing and exposure to macromolecules BSA and PVP. *Mol Reprod Dev.* 59:306-313.
- YANAGIMACHI, R. 1988. Mammalian fertilization. In: Knobil, E.; Neil, J.D. eds. *The Physiology of Reproduction*. 2 ed. Raven Press Ltd. New York. Pp. 135-185.
- YANAGIMACHI, R. 1994 a. Mammalian fertilization. In: Knobil, E.; Neil, J.D. eds. *The Physiology of Reproduction*. 2<sup>o</sup> ed. Raven Press Ltd. New York. Pp.189-317.
- YANAGIMACHI, R. 1994 b. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote.* 3:371-372.
- YEAGLE, P.L. 1991. Modulation of membrane functions by cholesterol. *Biochim.* 73:1303-1310.
- YEATES, N.T. 1949. The breeding season of the sheep with particular reference to its modification by artificial means using light. *J Agric Sci.* 39:1-43.
- YEUNG, W.; LEE, K.; KOISTINEN, H.; SEPPALA, M.; HO, P. 2006. Roles of glycodefin in modulating sperm function. *Mol Cell Endocrinol.* 250:149-56.