

**OPTIMIZACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE CRIOCONSERVACIÓN DE
SEMEN OVINO DE LAS RAZAS AUTÓCTONAS EN PELIGRO DE EXTINCIÓN
XISQUETA Y ARANESA**

WILBER CALIXTO GARCIA VERA

TESIS DOCTORAL

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Veterinària

2014

**OPTIMIZACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE CRIOCONSERVACIÓN DE
SEMEN OVINO DE LAS RAZAS AUTÓCTONAS EN PELIGRO DE EXTINCIÓN
XISQUETA Y ARANESA**

WILBER CALIXTO GARCIAVERA

TESIS DOCTORAL

Directora:

DRA. MARIA JESUS PALOMO PEIRÓ

Departament de Medicina i Cirurgia Animals

2014



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Medicina i Cirurgia Animals

Dra. Maria Jesús Palomo Peiró, Profesora titular del Departamento de medicina i Cirurgia Animals de la Facultat de Veterinaria de la Universidad Autònoma de Barcelona

Informa:

Que la tesis titulada “Optimización de los protocolos de crioconservación de semen ovino de razas autóctonas en peligro de extinción Xisqueta y Aranesa”. Presentada por **Wilber Calixto García Vera** para optar al grado de Doctor en Veterinaria se ha realizado bajo mi dirección y, considerándola acabada, autorizo su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Bellaterra (Cerdanyola del Vallés) Julio de 2014.

Dra. María Jesús Palomo Peiró

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. PRODUCCIÓN ESPERMÁTICA.....	17
2.1.1. Factores sobre la producción y calidad espermática.....	18
2.1.1.1. Uso de implantes de Melatonina.....	21
2.2. PLASMA SEMINAL.....	22
2.3. CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN OVINO.....	23
3.3.1. Refrigeración, congelación y descongelación.....	24
3.3.2. Adición del agente crioprotector (Diluyentes de congelación).....	30
3.3.2.1. Yema de huevo y otros productos derivados.....	30
3.3.2.2. Lecitina.....	33
3.3.2.3. Glicerol.....	34
3.3.2.4. Azúcares.....	35
3.3.2.5. Soluciones Tampones.....	36
3.3.2.6. Antioxidantes.....	37
2.4. ANALISIS SEMINAL.....	38
2.4.1. Evaluación de la Motilidad Espermática.....	39
2.4.2. Evaluación de la Morfología Espermática.....	43
2.4.3. Análisis de la integridad de la membrana citoplasmática.....	47
2.4.4. Análisis de la funcionalidad mitocondrial.....	50
2.4.5. Análisis de la integridad acrosomal.....	51
2.4.6. Análisis espermático mediante Citometría de flujo.....	52
3. OBJETIVOS.....	53
4. CAPITULOS.....	57
4.1. CAPITULO I. Efecto del tipo de yema de huevo utilizada y la presencia de plasma seminal en los diluyentes sobre la crioconservación de semen de morueco de distintas edades.....	59
4.2. CAPITULO II. Estudio de diferentes diluyentes libres de aditivos de origen animal y otras alternativas a la tradicional crioconservación espermática en	

moruecos.....	97
4.3. CAPITULO III. Estudio sobre la necesidad de la eliminación del plasma seminal en la congelación de semen de morueco y elección de la concentración óptima de BHT como antioxidante en los diluyentes de conservación espermática... ..	129
4.4. CAPITULO IV. Efecto del fotoperiodo y edad del donante, de la adición de antioxidantes en el diluyente, de la aplicación de implantes de melatonina en primavera y del individuo sobre la conservación de semen de morueco.....	159
5. DISCUSIÓN GENERAL.....	217
6. CONCLUSIONES.....	237
7. BIBLIOGRAFÍA.....	243
8. ANEXOS.....	305

RESUMEN

RESUMEN

Para optimizar la crioconservación de semen de morueco de las razas Xisqueta y Aranesa, se estudió utilizar otras alternativas a la yema de huevo fresca en la elaboración de los medios para reducir la heterogeneidad, contaminación microbiológica y algunos de sus componentes que interfieren negativamente en su capacidad crioprotectora, analizando diferentes tipos de yema de huevo (fresca, en polvo y clarificada), así como la eliminación del plasma seminal previamente a la conservación y la edad del donante. En segundo lugar, con el afán de elaborar diluyentes libres de crioprotectores de origen animal y de composición definida se analizó la eficacia de la lecitina de soja o el butil hidroxitolueno (BHT), combinados con glicerol o trehalosa, así como dos sistemas tampón, TRIS vs TEST, y la adición de BHT como antioxidante en la criosupervivencia espermática. Asimismo, se pretendió determinar la concentración óptima de BHT, estudiando simultáneamente el efecto de la presencia de plasma seminal en el diluyente. Finalmente, se valoró el efecto de la edad del donante y fotoperiodo, así como de la aplicación de implantes de melatonina en los sementales en primavera, la adición de antioxidantes (BHT vs melatonina) en el medio y el efecto del individuo en la criopreservación espermática.

Para ello se utilizaron 8 moruecos (4 de cada raza), a los que se les colectó semen, desde 1 a 2.5 años de edad aproximadamente, realizando un total de 6 réplicas/experimento. Brevemente, tras recolectar los eyaculados y valorar su motilidad masal y volumen, éstos fueron mezclados y divididos en las alícuotas requeridas en cada experimento, excepto cuando se congeló individualmente. Para la eliminación del plasma seminal, el semen se centrifugó 2 veces (a 600 g por 10') y el sedimento fue resuspendido en el diluyente correspondiente a una concentración final de 400×10^6 de espermatozoides/mL. Las distintas suspensiones fueron refrigeradas a 5°C durante 4h, envasadas en pajuelas 0.25 mL y congeladas en vapores de nitrógeno y sumergidas en él hasta su descongelación (30" a 37°C).

La viabilidad, morfología y resistencia osmótica de las suspensiones espermáticas en fresco y refrigeradas se evaluó mediante eosina-nigrosina y el test de endosmosis (HOST). Los

parámetros cinéticos tras la refrigeración y descongelación se analizaron mediante el sistema ISAS[®], así como la morfometría espermática siguiendo el protocolo comercial Diff-Quik. Para evaluar la integridad de las membranas espermáticas y actividad mitocondrial tras la descongelación, se utilizó una tinción cuádruple con las sondas fluorescentes (SYBR14, yoduro de propidio, lectina *Arachis hypogea* con Ficoeritrina y *Mitotracker deep red*.) y la ayuda de un citómetro de flujo.

Los resultados obtenidos mostraron que la yema de huevo en polvo puede utilizarse de forma satisfactoria en la refrigeración y congelación de espermatozoides ovinos, presentando una mejor capacidad crioprotectora cuando se combina con glicerol y el sistema tampón TRIS. Por otra parte, la eliminación del plasma seminal mediante centrifugación mejoró la criosupervivencia espermática, aunque su presencia en los diluyentes no afectó negativamente la calidad seminal. Generalmente, la adición de BHT (5.0mM) mejoró la calidad de los espermatozoides conservados, independientemente del lavado del semen, edad del donante o fotoperiodo, mientras que el uso de melatonina como antioxidante en el diluyente, no. Tampoco el uso de implantes de melatonina proporcionó ninguna ventaja a la hora de conservar espermatozoides de morueco en primavera. Respecto a la edad del donante, nuestro trabajo parece indicar que el semen de moruecos de 18 meses, junto la adición de BHT en el diluyente, presenta una criosupervivencia similar a la de individuos mayores. Por último, la congelación individualizada del semen de nuestros moruecos parece mostrar la existencia de individuos malos, buenos y también “regulares” congeladores.

ABSTRACT

In order to optimize ram semen preservation of Xisqueta and Aranesa breeds, we studied alternatives to the fresh egg yolk in extender making to reduce heterogeneity, microbiology pollution and some components that interfere negatively in its cryoprotection capability, analyzing different types of egg yolk (fresh, powdered and clarified). Simultaneously, seminal plasma removal previous to cryopreservation and donor age were tested. Secondly, our aim was to obtain an extender free of animal origin cryoprotectants with a clearly-defined composition, therefore the efficiency of the soy lecithin or butylhydroxytoluene (BHT), combined with glycerol or trehalose were assessed. Moreover, the effect of two buffer systems, TRIS vs TEST, and the addition of BHT as antioxidant on sperm cryosurvival was analyzed. Optimal concentration of BHT and the presence of seminal plasma in the extender were also studied. Finally, donor age and photoperiod as the application of melatonin implants on rams in spring, the addition of antioxidants (BHT vs melatonin) in the extender and individual effect on sperm cryopreservation were evaluated.

Therefore, semen from 8 rams (4 of each breed from 1 to 2.5 years old approximately) were collected, doing a total of 6 replicas/experiment. Briefly, after semen collection, mass motility and volume were assessed. Then ejaculates were pooled and split in the required aliquots in each experiment, except when semen was preserved individually. For seminal plasma removal, pooled semen was centrifuged twice (at 600 g for 10 minutes) and the sediment was resuspended in the corresponding media at a final concentration of 400×10^6 of sperm/mL. The different sperm samples were refrigerated at 5°C during 4h, packaged in straws of 0.25 mL, freezed in nitrogen vapors and immersed in it, until the samples were thawed (30" at 37°C).

Viability, morphology and osmotic resistance of fresh and refrigerated sperm samples were tested by eosine-nigrosine stain and hypoosmotic swelling test (HOST). The kinetic parameters after the refrigeration and thawing were analyzed by ISAS[®] system as sperm morphometry, following the trade protocol Diff-Quik. Integrity of sperm membranes and mitochondrial activity after the thawing were evaluate using a quadruple fluorescent stain

(SYBR14, propidium iodide, *Arachis hipogea* lecithin labeled with phycoerithin and *Mitotracker deep red*) with a flow cytometer.

Our results showed that powdered egg yolk can be used satisfactorily on refrigeration and cryopreservation of ram semen, obtaining a better cryoprotectant capability when is combined with glycerol and TRIS buffer system. On the other hand, seminal plasma removal by centrifugation improved sperm cryosurvival, although its presence in the extender does not affect negatively sperm quality. Generally, the supplementation of BHT (5.0mM) improved the quality of preserved sperms, regardless of semen washing, donor age or photoperiod, meanwhile the use of melatonin as antioxidant in the media does not. Neither the use of melatonin implants on males provided any advantage on ram sperm cryopreservation in spring. Related to the age of the donor, our work seems to indicate that semen from 18 months old rams, together to the addition of the BHT in the extender, shows a similar cryosurvival that semen of older males. Finally, the individual semen preservation seems to show the existence of bad, good and regular freezer rams.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La preservación de los recursos genéticos ganaderos ha alcanzado una gran relevancia a nivel internacional. De las 7.600 razas registradas en la base de datos de la FAO (2007) sobre recursos genéticos de animales domésticos, 190 se han extinguido en los últimos 15 años y otras 1.500 se consideran al borde de la extinción (Rodero y col., 2009). Sin embargo, existen múltiples razones por las cuales se justifica la conservación de las distintas razas, es decir, desde la conservación de la variación genética animal permitiendo la adaptación a distintos ambientes, condiciones de producción o nuevas enfermedades hasta el valor ecológico de la conservación de razas autóctonas en su hábitat natural, manteniendo el equilibrio entre el clima, flora y fauna, así como la posibilidad de proporcionar un excelente material de investigación para la realización de estudios genéticos de las distintas razas que podrían aportar genes mejoradores al cruzarlos con otras razas.

Según el catálogo de razas de ovinos, en España existen 10 razas autóctonas de fomento y 33 de protección especial (Esteban, 2003), que se encuentran localizados generalmente en zonas marginales, en las que con dificultad se explota otro tipo de ganado. Son zonas rurales desfavorecidas, con suelos pobres de escasa rentabilidad agraria y alguna de ellas ubicadas en parques naturales.

En el caso de la raza ovina Aranesa, ésta se encuentra en el estatus de raza en peligro debido a un descenso en su población, favorecido, a su vez, por un escaso relevo generacional en la ganadería. Sin embargo, estos ovinos tienen un valor zootécnico muy importante, pues son animales orientados a la producción de carne en base a corderos de tipo “pascual”, muy adaptada a las duras condiciones de pastoreo tradicional de subir los animales en los periodos estivales a alta montaña y pastoreo en los valles en invierno. La distribución geográfica de esta raza se encuentra en el Valle de Arán, al norte de la provincia de Lleida, lindando con la frontera francesa. Según los Servicios de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente del Consejo General del Valle de Arán, en el 2003, había 64 ganaderos de ovino con un total de 2.569 ovejas Aranesas y 92 machos, de los cuales, 1.489

ovejas y 61 machos se consideran de raza pura siguiendo el estándar racial descrito por Parés (2008).

Al igual que la raza anterior, la oveja Xisqueta también conocida como “Pallaresa”, se ubica mayoritariamente en las comarcas leridanas del Pallars Jussà, Pallars Sobirà, Alta Ribagorça y en la Ribargoza oscense. También podemos encontrar núcleos dispersos de la raza en las comarcas oscenses de Monegros, Sobrarbe y Hoya de Huesca y en las comarcas que configuran la Plana de Lleida. Se caracteriza por su alta rusticidad y las madres, por su alta capacidad lechera, cuyo objetivo principal es la producción de carne, orientada a la producción de cordero, tipo "ternasco". Según Avellanet y col., (2005), el número de reproductores se sitúa entre 12.000 y 15.000 individuos que están en peligro de extinción (RD 3322, BOE Núm. 33, 1995).

El interés de estas razas se basa en que se localizan cada una en zonas concretas del país a las que se han adaptado muy bien, y en las que no se podría sobrevivir con otro tipo de ganadería, permitiendo realizar una actividad económica en estas zonas desfavorecidas y facilitando así el asentamiento de familias, evitando su despoblación. No obstante, el futuro de estas razas es complicado debido al escaso relevo generacional en ganadería, por lo que su conservación podría provocar un nuevo interés cultural y un reclamo en el agroturismo y en el consumo de productos característicos de cada zona. Además del factor humano, la conservación de estas razas mantiene los distintos ecosistemas colaborando en la prevención de incendios forestales y en la protección y conservación de numerosos espacios rurales, contribuyendo así al equilibrio ecológico.

De hecho, el trabajo y esfuerzo realizado por el Dr. Jordi Jordana y la asociación de criadores de ovinos de la raza Aranesa (ACORA) como la asociación de criadores de ovinos de la raza Xisqueta (ARACOXI) en la caracterización y conservación de estas razas, junto con el proyecto de *Creación de un banco de semen de razas catalanas autóctonas en peligro de extinción de ovino y caprino: Xisqueta, Aranesa y Blanca de Rasquera, a partir de la selección genética temprana de los reproductores (RZ2009-00-08-000)*, financiado por el Instituto Nacional de Investigaciones Agraria (INIA) han inspirado el presente

trabajo de investigación sobre criopreservación del semen ovino a partir de reproductores de estas dos razas seleccionados por su potencial capacidad de aportar variabilidad genética a las distintas razas. Con ello, y gracias a la inseminación artificial (IA) en los rebaños de origen, se pretende poder colaborar en primer lugar, en frenar las pérdidas de variabilidad genética de estas poblaciones y en segundo lugar, evitar la disminución (y/o extinción) del censo poblacional.

Sin embargo, es conocido que la IA en ovino no está tan desarrollada como en el caso del bovino, presentando tasas de fertilidad variables (de bajas a medias) cuando se realiza IA cervical con semen congelado (O'Meara y col. 2005, Barbas y Mascarenhas, 2009). Estos pobres resultados se deben principalmente al daño que sufren los espermatozoides por el proceso de congelación/descongelación, así como también a la mortalidad embrionaria u otros factores relacionados con la hembra (Anel y col., 2005; Aisen y col., 2005). Así, con el objetivo de mejorar la supervivencia y funcionalidad de los espermatozoides ovinos tras la descongelación, el presente trabajo de investigación se ha centrado principalmente en la optimización de los protocolos de su crioconservación mediante el estudio de la sustitución de varios de los componentes clásicos utilizados en la congelación espermática, la presencia o no de plasma seminal, la adición de otros componentes como diferentes antioxidantes, así como el efecto del fotoperiodo, la edad, el individuo, la raza y la aplicación de implantes de melatonina fuera de la época reproductiva, mediante un complejo análisis *in vitro* del semen crioconservado.

De hecho, un tema que siempre ha preocupado tanto a los investigadores como a los técnicos dedicados a la conservación de semen, es la utilización de componentes de origen animal, como el suero sanguíneo, **la yema de huevo** o la leche. En el caso concreto de los ovinos, la yema de huevo fresco es el crioprotector no penetrante más comúnmente usado durante años por su capacidad de estabilizar la membrana del espermatozoide en los diluyentes para congelar semen (Salamon y Maxwell, 2000; Leboeuf y col., 2000). Sin embargo, el hecho de contener sustancias que pueden interferir en el metabolismo celular reduciendo la motilidad espermática (Moussa y col., 2002), la heterogeneidad de su composición entre lotes de huevos, junto con el potencial riesgo de contaminación

microbiológica, hacen que la posibilidad de utilizar un sustituto a la yema de huevo sea muy deseable.

En los últimos años se han sugerido diferentes propuestas, siendo la yema de huevo en polvo, una de ellas, al ser un producto que sufre un proceso de pasteurización para destruir la contaminación bacteriana, obteniéndose resultados satisfactorios en ovinos (Marco-Jiménez y col., 2004). Asimismo, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) del huevo (Moussa y col., 2002 en toro; Tonieto y col., 2010 en morueco), el hidroxitolueno butilado (BHT) (Khalifa y col., 2008) o la adición de lecitinas de origen vegetal como la lecitina de soja (Gil y col., 2003 ab, Forouzanfar y col., 2010), parecen presentar prometedoras cualidades para ser posibles candidatos a sustitutos de la yema de huevo, lo que podría suponer una mejora sustancial en la optimización de los protocolos de criopreservación espermática.

Por otro lado, el **glicerol** es el crioprotector penetrante más utilizado y eficaz en los diluyentes de congelación para rumiantes (Leibo y Songsasen, 2002), a pesar de ser potencialmente citotóxico (Holt, 2000; Watson, 2000). La adición de azúcares como la **trehalosa** en diluyentes para la congelación de semen sin glicerol parece mejorar la motilidad espermática, pudiendo ser utilizada como crioprotector (Molinia y col., 1994), lo que pudiera representar una alternativa al glicerol muy interesante (Tonieto y col., 2010), aunque su efecto crioprotector podría ser también atribuido a su actividad antioxidante (Aisen y col., 2005).

Asimismo, es de capital importancia valorar y reducir en lo posible el daño producido por el aumento en la generación de especies de reactivas de oxígeno (ROS) durante la criopreservación (Álvarez y Storey, 1992). La gran susceptibilidad de los espermatozoides a la producción excesiva de ROS se debe a que su membrana plasmática tienen un alto contenido de ácidos grasos insaturados, lo cual la hace susceptible a sufrir peroxidación lipídica (Amann y Pickett, 1987). Dicha peroxidación está relacionada con una disminución de la motilidad, viabilidad, integridad de la membrana plasmática y del acrosoma, y de la fertilidad, así como con un aumento de la fragmentación de DNA de los

espermatozoides (Salamon y Maxwell 2000). Una manera de reducir los efectos perjudiciales de las ROS podría ser la adición de componentes con capacidad **antioxidante** al diluyente de congelación para bloquear o prevenir el estrés oxidativo. Entre los diferentes componentes antioxidantes, el butil hidroxitolueno (BHT) ha sido probado en distintas especies como en espermatozoides de toro (Ijaz y col., 2009) y de macho cabrío (Khalifa y col., 2008), así como también componentes tioles no proteicos como el Glutati6n (GSH), o como la cisteamina, trehalosa y la cisteína que mejoran la motilidad post-descongelaci6n y la capacidad antioxidante (Aisen y col., 2005; Bucak y col., 2007; 2008). Igualmente, la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) como antioxidante, ha sido probado en la criopreservaci6n de espermatozoides del toro (Ashraf y col., 2013), en moruecos (Succu y col., 2011) y porcinos (Jang y col., 2010) mejorando la motilidad, viabilidad y la integridad de la membrana, despu6s de la descongelaci6n.

Otro aspecto crucial en la conservaci6n del semen es el mantenimiento del pH del diluyente en el que los espermatozoides son diluidos. Entre las soluciones tampones m6s empleadas se encuentran las de fosfato, citrato y bicarbonato. No obstante, a pesar de los escasos estudios realizados para evaluar otras alternativas, la utilizaci6n de tampones **zwitteri6nicos** parece mejorar la calidad *in vitro* de los espermatozoides ovinos tras la descongelaci6n (Molinia y col., 1994).

Tambi6n la **eliminaci6n o no del plasma seminal** y sus posibles efectos sobre la supervivencia esperm6tica sigue siendo un tema de controversia en la crioconservaci6n esperm6tica. De hecho, podemos encontrar tanto estudios que demuestran un efecto positivo sobre la motilidad y aumento de la resistencia de espermatozoides al choque de frío, como efectos delet6reos de la presencia del plasma seminal durante la congelaci6n (Ashworth y col., 1994; Barrios y col., 2005 Aboagla y Terada 2003 Maxwell y col., 2007).

De igual manera, encontramos diferentes opiniones acerca del beneficio de adicionar plasma seminal al semen descongelado. Mientras unos sugieren un aumento de la motilidad esperm6tica y un incremento en el porcentaje de preñez en ovejas inseminadas (Maxwell y col., 1999), o incluso de promover la fecundaci6n *in vitro* de oocitos (Ghaoui y

col., 2007), otros autores reportan efectos perjudiciales (Moore y col., 2005; Maxwell y col., 2007) o sencillamente la ausencia de efecto del plasma seminal (Morrier y col., 2003; de Graaf y col., 2007; Domínguez y col., 2008; Rovegno y col., 2012).

Definitivamente, las técnicas de contrastación del semen, tanto para la utilización en investigación como en la práctica, depende todavía del análisis seminal rutinario clásico. Desafortunadamente, el análisis clásico de la calidad seminal tiene un valor muy limitado para predecir la subsiguiente fertilidad de una muestra (Rodríguez-Martínez, 2003, Gillan y col., 2005; Gadea, 2005), ya que éste implica la valoración de parámetros seminales como la concentración, motilidad y morfología, en que, a menos que el parámetro sea extremadamente anormal, este análisis proporciona poca información pronóstica (Freeman y col., 2001, Gadea 2005).

Los estudios actuales sobre contrastación seminal persiguen como objetivo final identificar algún parámetro cinético, morfológico o bioquímico que indique el estado de la célula espermática en un momento dado y que también pueda ser correlacionado con la fertilidad y calidad del eyaculado (Graham, 2001; Foote, 2003; Gillan y col., 2005; Gadea, 2005; Rodríguez-Martínez, 2006; Silva y Gadella, 2006). En este sentido, los avances tecnológicos realizados en los últimos años han permitido valorar características espermáticas de forma objetiva. Así, se han desarrollado sistemas automáticos de análisis de imágenes (CASA) (González-Recio, y col., 2005; David y col., 2007) y sistemas basados en la citometría de flujo (Kruger y col., 1999; Axner y Linde Forsberg, 2007), los cuales proporcionan una gran cantidad de información para estudiar distintas características del espermatozoide. Así pues, el conocimiento de la calidad seminal tras la descongelación permitirá determinar el rendimiento de los machos para inseminaciones artificiales y por tanto poder planificar el régimen de recuperaciones (Alvarez y col., 2000) en un programa de conservación de recursos genéticos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. PRODUCCIÓN ESPERMÁTICA

Con la madurez sexual, se inicia la producción continuada de espermatozoides en el testículo o **espermatogénesis**, proceso cíclico que comprende una serie de fenómenos de división y diferenciación celular, que en los pequeños rumiantes tiene una duración aproximada de 49 días (Franca y col., 1999; Folch, 2000). El tiempo para que se desarrollen las células es constante y no puede ser acelerado por ningún estímulo hormonal, alimentación o ritmo de eyaculación. De hecho, la producción espermática está en relación al volumen testicular, concretamente el morueco produce diariamente unos 20 millones de espermatozoides por gramo de testículo (Beltrán de Heredia, 2009).

Sin embargo, una vez concluida la espermatogénesis, los espermatozoides mamíferos aún no poseen el movimiento adecuado ni la capacidad de fusionarse al oocito, a pesar de estar altamente diferenciados. Es durante su tránsito y almacenamiento en el epidídimo y posterior transporte a través del tracto reproductor de la hembra, donde los espermatozoides experimentan una secuencia de cambios morfológicos, bioquímicos y cinemáticos a través de los cuales adquieren su capacidad fecundante (Cooper, 1986).

El cambio morfológico que se produce con mayor constancia durante la **maduración espermática** en el epidídimo es, en la mayoría de las especies, la migración de la gota citoplasmática de proximal a distal y su posterior eliminación del flagelo. En estudios recientes, el análisis morfométrico asistido por ordenador ha revelado cambios en el tamaño y la forma de los espermatozoides durante el tránsito epididimario (Soler y col., 2000). La morfología del núcleo no cambia drásticamente, pero sí se incrementa la estabilidad de la cromatina espermática, como resultado del aumento progresivo de puentes disulfuro (-S-S-) entre las protaminas del ADN ricas en cisteínas (Yanagimachi 1988 y 1994). Los cambios de forma y estructura del acrosoma son poco marcados en la mayoría de las especies, a excepción del cobaya o la chinchilla, donde sí son mucho más evidentes (Bellvé y O'Brien, 1983). Algunos componentes de la cola del espermatozoide también se estabilizan mediante puentes

disulfuro, lo que puede condicionar las características del movimiento del espermatozoide maduro (Glover y col., 1990).

Durante su paso por el epidídimo, los espermatozoides también sufren cambios bioquímicos, que aunque afectan a todos sus compartimentos, las mayores modificaciones se centran en la membrana plasmática (Yanagimachi, 1988). El hecho de que la osmolaridad y composición química del fluido secretado por el epidídimo sea diferente en sus distintas partes justifica los cambios producidos en la membrana plasmática del espermatozoide durante su tránsito, ya que su exposición al fluido es directa (Yanagimachi, 1994). La acción de sustancias secretadas por el epitelio epididimario como proteínas, carnitina, ácido sálico o iones inorgánicos, entre otros, modifica la cubierta glicoproteica, de manera que la adsorción de estas sustancias a la superficie de la célula, sobre todo de las glicoproteínas, podría adquirir importancia en la interacción entre los gametos en el momento de la fecundación (Bains y col., 1993). Además la cantidad y composición de los lípidos de la membrana espermática también varía y se da un aumento en la cantidad de colesterol.

La cinética de los espermatozoides también se modifica durante su tránsito epididimario, adquiriendo el máximo potencial en la región de la cola, donde más del 80% de los espermatozoides son ya móviles (Beltrán de Heredia, 2009). Probablemente, son dos los procesos que regulan la motilidad en el epidídimo; uno es la maduración efectiva del aparato flagelar, y el otro es la inhibición de la motilidad para inmovilizar los espermatozoides en el epidídimo y cuidar sus reservas energéticas (Waberski 2007). Esta fase de maduración en el epidídimo de los espermatozoides de morueco suele durar entre 12 a 20 días.

2.1.1. Factores sobre la producción y calidad espermática

La actividad reproductiva de los pequeños rumiantes está influenciada, entre otros, por varios factores estacionales (Pelletier y col., 1988), entre ellos se encuentra el fotoperiodo (Delgadillo y col., 1991; Rodríguez y col., 2003), cuya acción se produce a nivel del eje hipotálamo-hipofisis-gonada, vía glándula pineal. Esta glándula recibe las variaciones en las horas de luz/día y actúa como mediador transformando los impulsos ópticos de la luz en descargas hormonales de melatonina. Durante los días cortos, la

glándula pineal aumenta la síntesis y secreción de melatonina que actuaría a nivel del sistema nervioso central variando la pulsatilidad de la secreción de GnRH en el hipotálamo. Esto supone, en última instancia, un aumento de la secreción de gonadotropina LH, lo que favorecerá el crecimiento testicular y la secreción de testosterona. Por el contrario, cuando el fotoperiodo es ascendente, a través del mecanismo anteriormente citado se deprime la secreción de LH y en consecuencia el tamaño testicular y la secreción de testosterona (Pelletier y col., 1988).

Sin embargo, la influencia del fotoperiodo depende a su vez de la localización geográfica, reduciéndose a medida que nos acercamos a los trópicos (Corteel, 1981; Chemineau, 1986). En este sentido, el tamaño testicular, la producción espermática y la calidad de los eyaculados, así como la capacidad de cubrición varían dependiendo de la latitud en la que se ubican las diferentes razas (Vázquez y col., 1986). Así, por encima de los 40° de latitud, las variaciones estacionales son muy marcadas (Thimonier y Mauleon, 1969), entre 30°- 40° se aprecia mayor producción espermática en verano y otoño, como en el morueco Ile-de-France, donde la producción de espermatozoides diaria por testículo pasa de alrededor de 1.000 millones en primavera a 5.000 millones en otoño (Dacheux y col., 1981). La calidad del semen y su fertilidad en inseminación artificial varían también. En la misma raza se ha observado más de 20 % de espermatozoides anormales y una fertilidad del 47,1 % en primavera, mientras que estos valores son de 10 % y 68,4 % en otoño, respectivamente (Colas, 1980). En zonas situadas a menos de 30° de latitud, sin embargo, las variaciones estacionales en la producción de células espermáticas son muy ligeras (Alonso de Miguel y Cognié, 1980), presentando los machos una calidad seminal aceptable durante todo el año (Lahlou-Kassi y Marie, 1985; Pérez y Mateos, 1996). En zonas de clima tropical o subtropical, donde las variaciones del fotoperiodo a lo largo del año no son tan marcadas, cobran mayor importancia otros componentes climáticos tales como la temperatura y la humedad relativa (Pérez y Mateos, 1996), y quizás también la disponibilidad de alimento (Walkden-Brown y col., 1994; Pérez y Mateos, 1996).

En el ganado ovino también se ha evidenciado que tanto el comportamiento sexual como la calidad seminal varían en función de la edad y raza (Chemineau, 1986; Aisen 2004), aunque la libido puede estar más condicionada por la estación del año que por la propia edad de los animales (Delgadillo, 2004; Aisen y Venturino, 2004),

pudiéndose observar que el número de montas, así como de cópulas disminuyen durante semanas e incluso meses fuera de la estación reproductiva. Según Beltrán de Heredia (2009), los parámetros seminales evolucionan de acuerdo a la edad de los animales, es así en los moruecos de la raza rasa aragonesa, donde la concentración espermática a los 9 meses varia entre el 50 y el 75 % de la de los moruecos adultos de 4 años (Folch, 1984), de tal manera que los moruecos adultos presentan mejores resultados de fertilidad y prolificidad que los animales menores de 1 año (Beltrán de Heredia, 2009).

Para Delgadillo y col., (1991), Aisen y Venturino (2004) y Beltrán de Heredia (2009), existen diferencias estadísticamente significativas en las características espermáticas entre razas, tanto cuantitativas (volumen, concentración y número de espermatozoides por eyaculado) como cualitativas (porcentaje de espermatozoides móviles, movimiento progresivo y porcentaje de anomalías). Varios autores concluyen que además hay variabilidad individual en la producción espermática, existiendo además una interacción entre machos y estación, para los distintos parámetros seminales (Delgadillo y col., 1991; Pérez y Mateos, 1996).

Por otro lado, la calidad seminal de los animales domésticos está influenciada también por la actividad sexual o la frecuencia de recogida de esperma (Foote, 1978). Jennings y Mcweeney (1976), en morueco, observan que el volumen de eyaculado, junto a la concentración y el número total de espermatozoides disminuyen significativamente tras eyaculados consecutivos. Asimismo se presenta una disminución de los movimientos progresivos en eyaculados de machos sometidos a una intensa actividad sexual (Kaya y col., 2002).

Tampoco podemos olvidar que la temperatura del testículo debe ser unos 5 °C inferior a la temperatura corporal. Cuando esto no ocurre como consecuencia del calor, fiebre, estrés,... la espermatogénesis se altera, provocando un aumento de las anomalías espermáticas en el eyaculado, disminuyendo la producción y capacidad fecundante, pudiendo llegar a la esterilidad de los moruecos, dependiendo de la intensidad del calor y de la duración en el tiempo que tenga el efecto (Colas, 1980; Delgadillo, 2004; Aisen y Venturino, 2004).

2.1.1.1. Uso de implantes de Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una hormona secretada por la glándula pineal del cerebro y participa en una serie de funciones fisiológicas incluyendo el control de la reproducción estacional y también afecta el sistema inmune y los ritmos circadianos (Awad y col., 2006). Los niveles plasmáticos de melatonina en la oveja son basales durante el día, de manera que inmediatamente, pasado unos 10 minutos del inicio de la oscuridad, se elevan hasta alcanzar concentraciones entre 100-500 pg/ml. Estas características determinan que el perfil de secreción de melatonina en periodos de 24 horas sea largo en invierno y corto en verano, de manera que la evolución de la duración del mismo a lo largo del año informa a la oveja del fotoperiodo prevalente (Zarazaga y col., 1998).

Al igual que en las ovejas, en los moruecos, la melatonina presenta un ritmo de secreción circadiano, con concentraciones plasmáticas elevadas durante la noche y disminuidas con la aparición de la luz del día (Lincoln y col., 1982). La variación estacional de los parámetros reproductivos es menos marcada en el morueco que en las ovejas, aunque en estación no reproductiva también se observa una disminución del volumen y del diámetro testicular, deterioro en la calidad del semen, así como una alteración del perfil hormonal (Schanbacher y Lunstra, 1976), afectando el desempeño reproductivo de los moruecos.

Ha sido ampliamente demostrada la capacidad de la melatonina para revertir los efectos de la estacionalidad en la reproducción tanto en machos como hembras (Fitzgerald y Stellflug, 1991; Chemineau y col., 1992; Abecia y col., 2008). El uso de implantes de melatonina en el morueco durante la estación no reproductiva se ha asociado con mejoras en parámetros reproductivos como el diámetro escrotal, la producción y calidad espermática (Palacín y col., 2008). Se conoce que esta hormona parece ejercer su acción principalmente en el eje hipotálamo-hipofisario (Webster y col., 1991). Recientes estudios han demostrado su presencia y su variación estacional, junto con la testosterona, en el plasma seminal (Casao y col., 2010a), lo que, además de su acción relevante a nivel testicular y de las glándulas accesorias, sugiere también una acción directa sobre la célula espermática (Casao y col., 2010b)

2.2 PLASMA SEMINAL

El plasma seminal es un fluido complejo, formado principalmente por compuestos inorgánicos y orgánicos, entre los que se encuentran aminoácidos, ácidos grasos, iones inorgánicos, ácido cítrico, carbohidratos, sales orgánicas, prostaglandinas y proteínas de bajo y alto peso molecular, en el cual se encuentran inmersos los espermatozoides tras la eyaculación. Está constituido por una mezcla de secreciones procedentes de los testículos, del epidídimo y de las glándulas sexuales accesorias, que constituyen más del 90% del eyaculado (próstata, vesículas seminales y glándulas bulbouretrales; Mann y Lutwak-Mann, 1981). La formación de los diferentes componentes del plasma seminal se producirá según se desarrolle el proceso de maduración del espermatozoide, así en la red testicular se les van adherir varias proteínas de la familia ADAMs (Blobel, 2000) y la hialorunidasa (pH20/2B1) (Seaton y col., 2000) entre otras. Durante su tránsito por el epidídimo, se producirá la remodelación proteica y fosfolipídica de la membrana plasmática espermática con la integración de nuevas proteínas secretadas por el epidídimo, principalmente en la región de la cabeza y el cuerpo (Gatti y col., 2004).

Tras la eyaculación actuarán las distintas secreciones procedentes de la vesícula seminal, próstata y glándulas bulbouretrales. Entre los compuestos secretados por estas glándulas sexuales se encuentran metabolitos energéticos, como fructosa, inositol, ácido cítrico y ácido ascórbico (Garner y Hafez, 1993); aminoácidos tales como ácido glutámico, carnitina, taurina e hipotaurina; también enzimas protectoras contra sustancias oxígeno reactivas (sustancias ROS), y otras que intervendrán en la digestión de los espermatozoides muertos y dañados, así como en la penetración del ovocito (Strzezek, 2002). Entre los compuestos inorgánicos secretados se hallan principalmente el zinc y el calcio, que actúan como bactericidas y en la capacitación espermática, respectivamente (Strzezek y col., 1987). Sin embargo, y a pesar de la gran cantidad de componentes que posee el plasma seminal, son las proteínas las que contribuyen, de forma más relevante, a la regulación de la mayor parte de las funciones espermáticas.

De hecho, las funciones de las sustancias contenidas en el plasma son complejas y parcialmente conocidas, siendo algunas de ellas, la de medio de suspensión, regulación del transporte de los espermatozoides y eliminación de éstos en el órgano

reproductor de la hembra (Matousek, 1985; Troedsson y col., 2005), prevención de la capacitación prematura y estabilización de la membrana plasmática (Desnoyers y Manjunath, 1992; Villemure y col., 2003), además de mantener el pH y la osmolaridad adecuada en cada especie. Así mismo, también se han descrito funciones como la de proteger a los espermatozoides de la fagocitosis y del proceso inflamatorio en el tracto de la yegua, (Alghamdi y col., 2004), acelerar la ovulación en vacas (Revisado por Juyena y Stelletta, 2012) o incluso inducirla en cerdas y camélidos (O'Leary y col., 2004 ; Ratto y col., 2005), así como la de asistir a las interacciones de espermatozoide-óvulo (Souza y col., 2008), ayudar a preparar el tracto reproductor materno para la implantación y desarrollo del embrión (Robertson, 2005) o incluso influir sobre la fertilidad (Rozeboom y col., 2000).

Por otra parte, el conjunto de sustancias que componen el plasma seminal y la cantidad producida es específico y altamente variable entre especies. Las especies de eyaculación uterina (verraco, caballo, perro o alpaca) cuentan con eyaculados de mayor volumen que en las especies de eyaculación vaginal (toro, morueco o macho cabrío) (Maxwell y col., 2007). Así mismo, es variable entre individuos de la misma especie, así como entre eyaculados de un mismo individuo, pudiendo variar por diferentes procesos patológicos, estación del año, tipo de alimentación o estado fisiológico del animal (Pérez-Pé y col., 2001a) o incluso variaciones en la composición del plasma seminal de diferentes machos ha sido relacionada con diferentes índices de fertilidad (Killian y col., 1993; Moura y col., 2007).

2.3 CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN OVINO

Durante los últimos 50 años, se han desarrollado y perfeccionado numerosas técnicas con objeto de conseguir nacimientos mediante la aplicación de dosis seminales congeladas (Watson, 1979), obteniendo grandes avances en la congelación del semen de toro, mientras que en otras especies, como la ovina, los resultados de fertilidad han sido inconsistentes y extremadamente bajos, como se deduce de la mayoría de estudios publicados (O'Meara y col., 2005; Barbas y Mascarenhas, 2009).

Estos pobres resultados pueden deberse a varios factores. Uno de ellos es el daño que sufren los espermatozoides por el proceso de congelación/descongelación. La disminución de la temperatura produce un daño letal en algunos espermatozoides conocido como shock térmico, provocando alteraciones morfológicas en la membrana plasmática, acrosomal y mitocondrial, (revisado por Aboagla y Terada, 2004), incluso puede llegar a provocar una reacción acrosómica prematura, acortando la vida del espermatozoide y reduciendo su fertilidad (Watson 1995). La congelación también causa daño celular debido al estrés osmótico y tóxico por las concentraciones molares de los agentes crioprotectores, y daño mecánico debido a la formación y disolución de cristales de hielo (revisado por Aboagla y Terada, 2004). Esta respuesta de los espermatozoides de morueco a los procesos de congelación/descongelación puede variar entre individuos dentro de la misma especie y estación del año (Salamon y Maxwell, 2000), lo que parece ser debido a diferencias en la composición de las membranas.

Por otra parte, la tecnología de la criopreservación del espermatozoide incluye distintas etapas importantes como es la eliminación o no del plasma seminal mediante centrifugación, la dilución del material seminal, la refrigeración, las adiciones del crioprotector, la congelación propiamente dicha, el almacenamiento en envase criogénico y por último la descongelación en el momento de su utilización. El diseño de cada una de estas fases debe ir enfocado a producir el menor daño posible sobre las estructuras y el metabolismo del espermatozoide, siendo de especial importancia la función y arquitectura de la membrana plasmática. La inadecuada adaptación a las etapas citadas anteriormente, así como los cambios que va a sufrir la célula durante tan delicado proceso, van a ser responsables de daños o agresiones que pueden suponer una pérdida de capacidad por parte del espermatozoide para llevar a cabo sus funciones con normalidad (Watson, 1995; Gao y col., 1997). No obstante, se considera que las etapas de enfriamiento, congelación y descongelación (Watson, 1990) y la adición del agente crioprotector (Watson, 2001) son las principales fuentes de daño sobre las células en el conjunto del proceso.

2.3.1. Refrigeración, congelación y descongelación

En la fase inicial de la refrigeración, previa a la congelación, la temperatura de la suspensión espermática se reduce desde valores fisiológicos hasta valores ligeramente

por encima de los 0 °C. Este cambio térmico va a poner de manifiesto la extrema sensibilidad de los espermatozoides, sobre todo, a los descensos bruscos de temperatura, más conocidos como “shock por frío” (Parks, 1997) o a los debidos a la temperatura final alcanzada, denominados como “daño por enfriamiento extremo” (“*chilling injury*”) (Watson, 1990, 1995). Así, el espermatozoide manifiesta pérdida de la integridad de membrana y de las funciones celulares al ser enfriado rápidamente en el rango de 20 a 0 °C, aunque por lo general, el daño resulta más severo entre 12 y 2 °C (Watson, 1995). Estas alteraciones pueden minimizarse si se utilizan velocidades de enfriamiento muy lentas (< 10 °C/min) hasta cerca de los 4 °C (Parks, 1997). No obstante, este enfriamiento lento también generara lesiones, aunque mucho menos severas y extensas (Watson, 1990).

La sensibilidad al choque térmico varía entre las especies. Es así que algunos componentes, como son los fosfolípidos y los ácidos grasos de la membrana espermática, son importantes en el grado de susceptibilidad de los espermatozoides de las distintas especies al choque térmico (Poulos y col., 1973; Darin-Bennett y col., 1974). De hecho, espermatozoides de toro, cerdo y morueco, conocidos por su elevada susceptibilidad al choque térmico, presentan una elevada ratio entre ácidos grasos poliinsaturados y saturados de aproximadamente 2,5-3,3, mientras que espermatozoides del hombre presentan una ratio de 1. Dicha ratio tiene un efecto significativo en algunas propiedades de los sistemas de membrana y está correlacionado con la sensibilidad del espermatozoide al choque térmico (Poulos y col., 1973).

Otro factor correlacionado con la susceptibilidad del espermatozoide al choque térmico es la *ratio* colesterol/fosfolípidos, habiéndose observado que una *ratio* superior a 0,5 confiere una mayor resistencia al choque térmico. De hecho, el colesterol existente en el espermatozoide de toro y de morueco es la mitad del existente en el espermatozoide del hombre (Darin-Bennett y White, 1977).

El choque térmico resulta de alteraciones en la organización de los lípidos de la membrana del espermatozoide o fases de transición lipídica (Drobnis y col., 1993). A la temperatura fisiológica, los fosfolípidos de membrana están en un estado fluido y sus cadenas de ácidos grasos son flexibles (De Leeuw y col., 1990), mientras que algunos lípidos no-bicapa, asumen una disposición hexagonal, implicados en la formación de un

anillo alrededor de las proteínas que integran la membrana (Parks y Graham, 1992). Cuando la temperatura de la membrana disminuye por debajo de la temperatura de transición de cada uno de los fosfolípidos individuales que la componen, éstos sufren la fase de transición termotrópica del estado líquido-cristalino al estado gel, comenzando a juntarse (Quinn, 1989). Concretamente, las cadenas de ácidos grasos toman rigidez y se aíslan en dominios de gel, de los cuales son excluidas las proteínas de la membrana que se concentran en áreas fluidas (De Leeuw y col., 1990). Este fenómeno afecta las funciones de las proteínas, por ejemplo, en los canales proteicos iónicos (Watson, 2000).

Además, durante la fase de enfriamiento hasta 5 °C, se han detectado cambios similares a la capacitación o “criocapitación”, siendo uno de los procesos responsables de las alteraciones morfofuncionales que sufren las células espermáticas. Este proceso ha sido descrito en los espermatozoides de un gran número de especies como el cerdo (Watson, 1996; Maxwell y Johnson, 1997), ratón (Fuller y Whittingham, 1996), toro (Cormier y col., 1997), morueco (Gillan y col., 1997) y garañón (Schembre y col., 2002; Thomas y col., 2006).

En el caso de la criocapitación, Green y Watson (2001) propusieron la siguiente secuencia de acontecimientos para explicar su aparición: el enfriamiento del medio en el que se encuentran los espermatozoides produce la desestructuración de la membrana, afectando a los procesos de transporte selectivo de sustancias de la misma, alterando su permeabilidad y provocando un incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} . La acumulación de Ca^{2+} en el medio interno produce la activación de las proteínas-kinasas responsables de desencadenar la cascada de procesos similares a la capacitación. Tanto en la capacitación fisiológica, como en la criocapitación, el resultado final va a ser la desestabilización de la membrana plasmática y la reacción acrosómica (Green y Watson, 2001). Tras la capacitación, el espermatozoide va a sufrir una drástica reducción de su vida útil, y en el caso de los espermatozoides criocapitados una disminución manifiesta de su fertilidad al sufrir dicho cambio fuera del aparato reproductor de la hembra (Green y Watson, 2001; Kaneto y col., 2002). Este fenómeno se agrava en aquellas especies (como el cerdo o el caballo) en los que la hembra presenta celos de larga duración.

En lo que respecta a las fases de congelación y descongelación, las teorías propuestas para explicar el daño celular hacen referencia a las consecuencias de la formación de hielo y a su disolución, las cuales dependen de las velocidades de enfriamiento y calentamiento, respectivamente (Watson, 1995). No obstante, la mayoría de los tipos celulares no sobreviven a la congelación en ausencia de algún agente crioprotector. La incorporación de estas sustancias a la suspensión celular modifica el trazado de la curva, incrementando el porcentaje de supervivencia, en un rango determinado de velocidades de enfriamiento respecto de los valores que se obtienen en su ausencia. Se establece, además, una interacción entre la concentración del crioprotector y la velocidad de enfriamiento, de tal manera que la optimización del proceso, cuando se añaden altas concentraciones de crioprotector, requiere utilizar velocidades de enfriamiento más rápidas, y viceversa (Watson, 1990).

En moruecos para evitar los efectos adversos del choque frío se emplean velocidades de refrigeración moderadas y homogéneas (-0,1C/min. a -0,5C/min.), las cuales descienden la temperatura del semen de 30 °C a 5°C en periodos de tiempo de una a cuatro horas (Graham, 1978; Fiser y Fairfull, 1984; Vázquez y col., 1986). La velocidad óptima de congelación va a depender del tipo celular; y dentro de los espermatozoides, de la especie de procedencia, oscilando la velocidad óptima de enfriamiento entre -10 y -80 °C/min (Watson, 1995), siendo, por ejemplo, de -30 a -50 °C/min para el del verraco, -50 a -60 °C/min para el del morueco, y -26 a -52 °C/min para el del toro (Woelders, 1997).

Durante la fase de descongelación, también se producen efectos letales en la célula, con lo que la efectividad de una congelación bien llevada, a la práctica, puede quedar anulada si no se realiza adecuadamente la descongelación. Se considera, así, que el verdadero desafío al que se enfrenta la célula en el proceso de criopreservación lo constituye una franja de temperaturas de -15 a -60 °C, la cual afecta negativamente a su integridad, y por la que deben pasar en dos ocasiones, una vez durante el enfriamiento y otra durante la descongelación (Mazur, 1985). La supervivencia al proceso requiere, pues, afrontar con éxito una etapa de congelación y otra de descongelación.

Se han propuesto dos mecanismos dañinos para el proceso de descongelación, asociados a dos situaciones particulares. En primer lugar, si las células se han congelado

muy rápidamente, y se produce un calentamiento lento, existirá un fenómeno de “recristalización”, en virtud del cual, los microcristales formados en el interior de la célula tienden a agruparse y a formar cristales de mayor tamaño, con las consiguientes consecuencias letales (Mazur, 1985). Y, en segundo lugar, células congeladas lentamente, en presencia de un crioprotector penetrante, pueden quedar lesionadas mediante estrés osmótico si se descongelan demasiado rápidamente ante la imposibilidad de que el crioprotector abandone la célula lo suficientemente rápido como para mantener el equilibrio osmótico, con el consiguiente hinchamiento por efecto de la entrada de agua (Watson, 1990). La velocidad de descongelación óptima, por tanto, depende de la pauta de enfriamiento seguida, pero debe representar una situación intermedia entre los dos extremos anteriores, con la que se minimicen los daños que se causen por inapropiadas velocidades de transporte de solutos y agua a través de las membranas, y por el agrupamiento de los microcristales intracelulares de hielo (Hammerstedt y col., 1990).

También se han constatado desestabilizaciones moleculares en el plasmalema a causa del cambio de temperatura, contribuyendo a la aparición de lesiones durante esta fase. Holt y col., (1992), por ejemplo, comprobaron la aparición de alteraciones en la membrana plasmática que se manifestaban sólo durante esta etapa de descongelación, y para las que sugirieron un mecanismo causal basado en el fenómeno de transiciones de fase de los lípidos de membrana, resaltando así la importancia de la descongelación en el ciclo de criopreservación. Se ha propuesto, entonces, que las membranas se desestabilizan inicialmente durante la etapa de congelación, tanto por efecto de las bajas temperaturas como por la exposición a altas concentraciones salinas, y ello resulta en una degeneración postdescongelación, al combinarse nuevamente efectos letales de naturaleza térmica y osmótica (Holt y North, 1994 a).

Además, generalmente durante la conservación, los espermatozoides y las bacterias contaminantes producen metabolitos que pueden reducir el pH del diluyente. El pH interno del espermatozoide está directamente relacionado con el pH del diluyente y, a su vez, con la motilidad; así cuando el pH del diluyente baja, también la motilidad y el metabolismo espermático bajan (Gadea, 2003). El principal responsable de este descenso en el pH es el ácido láctico producido por el metabolismo glucolítico del

espermatozoide y que ha sido también usado como indicador de calidad seminal (Rigau y col., 1996).

Como ya ha sido mencionado previamente, cada uno de los pasos del proceso de crioconservación reduce la viabilidad y aumentan los fallos en la funcionalidad de los espermatozoides supervivientes (Parinaud y col., 1997; Chatterjee y Gagnon, 2001; Kankofer, y col., 2005) que disminuyen su potencial fecundante. Estos daños son también debidos, en parte, al estrés oxidativo (Alvarez y Storey, 1992; O'Flaherty y col., 1997; Chatterjee y Gagnon, 2001) como ha sido demostrado en espermatozoides de hombre (Aitken, 1999; Agarwal y col., 2003), de caballo (Baumber y col., 2000; 2003), de morueco (Peris y col., 2007), de toro (Bilodeau y col., 2001; Bilodeau y col., 2002; Nair y col., 2006) y de gato (Thuwanut y col., 2008).

El estrés oxidativo es provocado por la formación de gran cantidad de especies reactivas al oxígeno (ROS) o moléculas que contienen radicales libres, debido a un mecanismo antioxidante deteriorado (Sikka, 2001; Agarwal y col., 2003). Las principales ROS que se conocen y que tienen relación con la funcionalidad espermática son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el peroxil (ROO^\bullet) y la mayoría de los radicales hidroxilos (OH^\bullet), cuya presencia en el ambiente espermático se relaciona con el aumento de espermatozoides muertos (Peris, y col., 2007).

De hecho, el estrés oxidativo es una situación celular generalmente caracterizada por un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad de barrido de los antioxidantes. Cuando la producción de ROS excede el sistema de defensa antioxidante disponible, se produce el daño oxidativo en los orgánulos del espermatozoide a través del daño de lípidos, proteínas y ADN, así como se producen aldehídos citotóxicos como el malondialdehído (MDA) que acaban finalmente con la muerte del espermatozoide (Bucak y col., 2009). Normalmente la liberación espontánea y controlada de moléculas de oxígeno favorece las bajas concentraciones de ROS y está fisiológicamente implicada en el mantenimiento de la capacidad fecundante del espermatozoide (Álvarez y Storey, 1982, 1984). Este sistema está formado por glutatión reducido (GSH), glutatión peroxidasa (GSHPX), catalasa (CAT), superóxido mutasa (SOD) y quelantes de metales (transferrina, lactoferrina y ceruloplasmina), sistema descrito como mecanismo de defensa contra la peroxidación de lípidos en semen, importante para el

mantenimiento de la motilidad y viabilidad espermática (Bilodeau y col., 2001; Gadea y col., 2004). Sin embargo, esta capacidad antioxidante puede ser insuficiente para prevenir la peroxidación de lípidos durante el proceso de congelación/descongelación o verse reducida por efecto de la dilución del semen, ya que el plasma seminal también interviene en el mantenimiento del equilibrio entre la generación de ROS y su neutralización.

En trabajos realizados con eyaculados de morueco, se observa que tras el proceso de congelación y descongelación solamente entre el 40 y 60 % de los espermatozoides preservan su motilidad, aunque apenas un 20-30% se mantienen biológicamente íntegros. Esto es indicativo de que la motilidad y la estructura del espermatozoide se afectan en distinto grado, desconociéndose si las alteraciones se producen simultáneamente o en distintas fases del proceso de congelación y descongelación (Salamon y Maxwell, 1995).

2.3.2. Adición del agente crioprotector (Diluyentes de congelación)

Los diluyentes seminales de congelación deben cumplir unos requisitos de pH, capacidad tampón, osmolaridad y fuerza iónica. Además, han de contener una fuente de energía para el espermatozoide, no deben deteriorarse durante el almacenamiento previo a su uso y sobre todo deben proporcionar a la célula espermática protección frente a los efectos de la bajada de temperatura, refrigeración, congelación y descongelación (Watson, 1979). Sin embargo a pesar de su importancia, apenas han sufrido modificaciones en las últimas décadas. En general, los medios de crioprotección incluyen, como principales componentes los agentes crioprotectores, tanto penetrantes como no penetrantes, azúcares, lipoproteínas, detergentes, aditivos y antibióticos (Johnson y col., 2000; Barbas y Mascarenhas, 2009).

2.3.2.1 Yema de huevo y otros productos derivados

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

conservar espermatozoides bovinos a 5 °C. La yema de huevo desde entonces ha sido utilizada rutinariamente con éxito en los diluyentes de congelación de semen de muchos animales domésticos y salvajes. Su composición es una mezcla compleja compuesta principalmente de 68 % de lipoproteínas de baja densidad (LDL), 16 % lipoproteínas de alta densidad (HDL), 10 % de levetelinas y 4 % fosfivitinas (revisado por Dauphas y col., 2006).

El mecanismo exacto por el cual la yema de huevo ayuda a preservar los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación, es desconocido (Salamon y Maxwell 2000). Sin embargo, se cree que los fosfolípidos, colesterol y lipoproteínas de baja densidad de la yema de huevo pueden ser los factores que proporcionan protección a los espermatozoides contra el shock por frío, actuando a nivel de la membrana celular, manteniendo la motilidad espermática, reduciendo la producción del enzima acrosomal hialuronidasa, y manteniendo la integridad de la membrana mitocondrial (Thérien y col., 1999; Bergeron y col., 2004) Asimismo, la yema de huevo también contiene gránulos y sustancias (lipoproteínas de alta densidad y minerales) que pueden interferir en el metabolismo celular reduciendo la motilidad espermática (Pace y Graham, 1974). La concentración de yema de huevo utilizada habitualmente oscila entre 15 y 30 %, concentraciones superiores o inferiores reducen la proporción de espermatozoides con motilidad tras la descongelación en moruecos (Salomon y Maxwell 2000)

Sin embargo, el uso de yema de huevo en los diluyentes de congelación del semen no está exento de inconvenientes. Las tres principales desventajas de su utilización son: 1) que al ser un componente de origen animal presenta un potencial riesgo de contaminación de endotoxinas en las dosis de inseminación artificial, capaces de dañar la fertilidad de los espermatozoides (Bousseau y col., 1998); 2) que su preparación no es práctica, ya que antes de añadir la yema de huevo en el diluyente el usuario tiene que romper el huevo manualmente y aislar cuidadosamente la yema, y 3) al ser un producto muy complejo, su composición puede ser extremadamente variable entre lotes.

En los últimos años, ha crecido el interés por el uso de las LDL extraídas de la yema de huevo (Moustacas y col., 2011) en los diluyentes de conservación, en lugar de

yema de huevo fresco. Es así que Moussa y col. (2002) obtuvieron resultados satisfactorios en la congelación de semen de toro cuando sustituyeron la yema de huevo por un 8 % (w/v) de LDL, en términos de movilidad y algunas características del movimiento espermático. Lamia y col. (2004) confirmaron que la presencia de LDL en el diluyente de criopreservación de semen de toro mejoraba la capacidad fecundante después de la congelación-descongelación. Igualmente en cerdos, la adición de LDL en el medio mejoró la motilidad, la integridad de la membrana plasmática, del acrosoma y la integridad del ADN después de la congelación-descongelación (Hu y col., 2006; 2008; Jiang y col., 2007). Sin embargo, otros autores, al utilizar concentraciones de 8, 12, 16 y 20 % (w/v) de LDL liofilizado en la congelación de espermatozoides ovinos no obtuvieron resultados satisfactorios (Moustakas y col., 2011)

De hecho, las moléculas de LDL y los mecanismos exactos involucrados que participan durante la crioprotección de los espermatozoides durante este proceso aún no están claros (Hu y col., 2006). Se plantean varias hipótesis para explicar las capacidades de crioprotección de las LDLs. En primer lugar, se propone que las LDL se adhieren a la membrana plasmática de los espermatozoides formando una película protectora en la superficie, proporcionándoles protección mediante la estabilización de su membrana durante la congelación (Watson, 1975; Foulkes, 1977; MacDonald y Foulkes, 1981). En segundo lugar, se propone que LDLs podrían fusionarse con la membrana plasmática y reemplazar los fosfolípidos de la membrana que se pierden o son dañados, aumentando así la tolerancia de los espermatozoides al shock de frío durante la congelación (Foulkes y col., 1980; Graham y Foote, 1987). En tercer lugar, se propone que las LDLs compiten con los péptidos catiónicos perjudiciales del plasma seminal en la unión a la membrana de los espermatozoides (Bergeron y col., 2004.; Bergeron y col., 2005).

Con el objetivo de concentrar las LDLs, algunos autores están utilizando la yema de huevo clarificada, la cual se obtiene a través de un proceso de centrifugación de la yema de huevo fresco con la finalidad de separar sus dos fracciones principales: los granulos y el plasma (yema de huevo clarificada), el cual se compone principalmente de 85 % de LDL y 15 % de livetelinas (Anton y col., 2003). La yema de huevo clarificada ha sido utilizado como crioprotector no penetrante en diluyentes para semen de caballo (Pillet y col., 2011), de toro (Moussa y col., 2002), beneficiando la viabilidad espermática post-descongelación, por su alta concentración de LDL y por la eliminación

de los componentes de la yema de huevo (gránulos y minerales) que se adhieren a la membrana y que tiene un efecto negativo en la motilidad y respiración espermática (Pace y Graham, 1974).

También la utilización de la yema de huevo en polvo, con el objetivo de destruir la contaminación bacteriana y de respetar las leyes establecidas para el consumo humano (Thibier y Guerin, 2000), al ser un producto que sufre un proceso de pasteurización, podría ser un sustituto muy interesante a la yema de huevo fresco, incluso reduciendo parcialmente la heterogeneidad de la composición de los lotes. No obstante, los trabajos de congelación de espermatozoides con yema de huevo en polvo son escasos, salvo el trabajo de Marco-Jimenez y col., (2004), quienes trabajaron con yema de huevo fresco y liofilizada en la congelación de semen de moruecos de la raza Guirra. En este estudio, los porcentajes de espermatozoides con acrosomas intactos fueron similares para ambas yema de huevo, pero se observó un aumento significativo en el porcentaje de total de espermatozoides móviles (+9%) cuando los espermatozoides habían sido congelados en el diluyente que contiene yema de huevo en polvo.

2.3.2.2. Lecitina de soja

La lecitina de soja, es un crioprotector de origen vegetal y su uso está considerado como una alternativa a la yema de huevo para la criopreservación de espermatozoides en diversas especies, ya que contiene alto contenido de LDL. La lecitina de soja ha sido estudiada en diversas especies como la ovina (de Paz y col., 2010; Forouzanfar y col., 2010; Khalifa y col., 2013), bovina (Ricker y col., 2006, Stradioli y col., 2007), equina (Aurich y col., 2007), caprina (Vidal y col., 2013; Salmani y col., 2013) y en peces (Yildiz, y col., 2013). La adición de lecitina en los diluyentes de crioconservación parece no tener ningún efecto citotóxico (Fiume, 2001) ni efecto negativo en la motilidad de los espermatozoides (Hong y col., 1986). Igualmente, Ricker y col., (2006), describieron el mecanismo de estabilización de la membrana espermática de toro, observando la presencia de agregados lipídicos en la membrana y el efecto protector en la movilidad, viabilidad y fertilidad ejercido por los diluyentes con lecitina de soja como estabilizador de membrana. Actualmente existen varios diluyentes comerciales que incluyen en su composición la lecitina de soja y que han sido ensayados en distintas especies con resultados dispares como el diluyente

Biociphos Plus® en espermatozoides de toro (Muiño y col., 2007), el Bioexcell® en semen de morueco (Gil y col., 2003b) o el Botu-Crio® en caballo (Papa y col., 2011).

2.3.2.3 Glicerol

El descubrimiento del glicerol como agente crioprotector se debe a Polge y col. (1949) y ha marcado un avance notable en la preservación del semen por medio de la congelación. Esta sustancia ocupa simultáneamente la membrana y los compartimentos extra e intracelulares (Mazur, 1984). Sin embargo, Amann y Pickett (1987), así como Almlid y Johnson (1988), sugieren que su principal efecto crioprotector se ejerce a nivel extracelular. Su función a este nivel consiste en aumentar el volumen del medio extracelular y la proporción de agua en estado de no-congelación, haciendo disminuir las concentraciones de los electrólitos y por tanto, minimizando los “efectos de solución” (Mazur, 1984). Además, y mediante la estimulación osmótica de la deshidratación celular, el glicerol consigue disminuir el volumen del agua intracelular disponible para congelarse (Medeiros y col., 2002). Los efectos sobre la osmolaridad celular no son los únicos, el glicerol también parece ejercer un efecto directo en la membrana plasmática (Parks y Graham, 1992).

Por otra parte, existe consenso en que a pesar de que el glicerol protege las membranas del espermatozoide durante la criopreservación, también ejerce una cierta toxicidad celular (Fahy y col., 1990), produciendo alteraciones en las características físicas del citoplasma, en su organización y viscosidad, en la permeabilidad y la estabilidad de la membrana plasmática, en la unión no-covalente de las proteínas a la superficie del espermatozoide, y en el metabolismo y equilibrio bioenergético (Hammerstedt y Graham, 1992). Las alteraciones resultantes pueden mermar la fertilidad del espermatozoide, aunque tenga motilidad tras la descongelación (Watson, 1979).

No obstante, el glicerol es el crioprotector más comúnmente utilizado en la congelación de espermatozoides de mamíferos (salvo algunas excepciones) (Watson, 1990, 1995; Holt, 2000), recomendándose su utilización a concentraciones de entre 6 y 9 %. No obstante, la tolerancia al glicerol varía extremadamente entre las especies, mientras que en espermatozoides de toro, morueco y caballo se utilizan concentraciones

comprendidas entre el 4 y el 9% (Watson, 1990), en el verraco (Watson, 1990, 1995; Holt, 2000) o el ratón (Holt, 2000) no es recomendable incluir más de un 3%, o un 1,75%, respectivamente.

De hecho, el estrés osmótico se produce a consecuencia de la penetración del crioprotector en la célula, lo que depende del grado de permeabilidad de la membrana a dicha sustancia (Watson, 1995) y de la temperatura a la que se añade el glicerol. Así, el nivel de glicerol incluido en los diluyentes para la congelación de semen de carnero está limitado por su toxicidad, la cual depende de las tasas de enfriamiento y congelación, la composición del diluyente y el método de adicionar el glicerol (Anel y col., 2003). En la congelación de semen por el método lento convencional y usando principalmente diluyentes hipertónicos, el rango de glicerol más frecuentemente usado es de 6-8%, ya que niveles superiores causan daño a las células disminuyendo su supervivencia (Barbas y Mascarenhas, 2009). Respecto a la temperatura a la que el glicerol debe añadirse, 5°C parece dar mejores resultados de supervivencia espermática que la adición a 30°C, ya que a esta temperatura la membrana espermática es más permeable y por lo tanto tiene un mayor efecto tóxico (Gao y col., 1997). Sin embargo, varios autores han descrito que la dilución del semen en un único paso en el diluyente con glicerol a 30°C es una técnica práctica para congelar semen de carnero (Evans y Maxwell, 1987), aunque la eficacia del método dependerá también de otros factores como el contenido de azúcar del diluyente (Salomon y Maxwell, 1995).

2.3.2.4. Azúcares

En pequeños rumiantes, los efectos beneficiosos de los azúcares en los diluyentes sobre la viabilidad post-descongelación de los espermatozoides han sido descritos en numerosas ocasiones (Aisen y col., 2002; Choe y col., 2006; Bucak y col., 2007; Tonieto y col., 2010), ya que proporcionan un substrato energético para las células durante la incubación, manteniendo la presión osmótica del diluyente y actuando como crioprotector (Leibo y Songsasen, 2002). Diferentes estudios parecen demostrar que la utilización de diluyentes hiperosmóticos con un gran rango de concentraciones de azúcares mejora la integridad de los espermatozoides tras la descongelación. Azúcares no penetrantes como la sacarosa, trehalosa, rafinosa o lactosa proporcionan hipertonidad a los diluyentes, causando la deshidratación de las células antes de la

congelación, sugiriendo una mayor eficacia de los disacáridos frente a los monosacáridos (Aisen y col., 2002, Aboagla y Terada, 2003).

Sin embargo, otros investigadores demostraron que la adición de disacáridos en presencia de glicerol no mejoraba la supervivencia espermática tras la descongelación, aunque la inclusión de trehalosa en diluyentes sin glicerol sí parece mejorar la motilidad espermática, pudiendo ser utilizada como crioprotector (Molinia y col., 1994), promoviendo la deshidratación celular y reduciendo los efectos negativos del reflujo de agua durante la congelación y de la formación de cristales de hielo (Aisen y col., 2002; 2005). Además la trehalosa es capaz de interactuar con los fosfolípidos y proteínas de la membrana proporcionándole una mayor flexibilidad contra el daño celular provocado por la congelación (Aisen y col., 2002; Bucak y col., 2007). También su efecto crioprotector puede ser atribuido a su actividad antioxidante (Aisen y col., 2005). De esta manera, el uso de trehalosa representa una alternativa al glicerol muy interesante (Tonieto y col., 2010), a pesar de que el glicerol sea considerado el crioprotector más eficaz para rumiantes (Leibo and Songsasen, 2002).

2.3.2.5. Soluciones Tampones

La adición de agentes tamponadores a los diluyentes de conservación puede ayudar a controlar el pH. Dicho tampón debería tener una gran capacidad tamponadora independiente de la temperatura, en el rango del pH del espermatozoide funcional, ser atóxico y neutral para las células y no reaccionar con otros componentes del diluyente. Entre estos agentes hay una importante variación de rangos y capacidades, pudiendo tener un impacto en los sistemas biológicos, actividades enzimáticas, sustratos o cofactores (Yániz y col., 2005).

Generalmente, el tampón TRIS (hidroximetil aminometano) y/o citrato son incluidos como componentes básicos de los diluyentes de crioconservación espermática de los ovinos (Salamon y Maxwell, 2000; Yániz y col., 2008). A pesar de los escasos estudios realizados para evaluar otras alternativas a estos tampones en la composición de diluyentes semi-sintéticos, existen evidencias que sugieren que la utilización de tampones zwitterion podrían mejorar la calidad *in vitro* de los espermatozoides ovinos tras la descongelación (Molinia y col., 1994). No obstante, la adición de este tipo de

tampones zwitterion no supuso ningún efecto beneficioso durante el proceso de congelación de espermatozoides caprinos (Tuli y Holtz, 1992), aunque estudios mucho más recientes, también en caprino, parecen confirmar que dichos tampones, pueden ser una buena alternativa para ser incluida en la composición de los diluyentes (Yániz y col., 2005), pero de refrigeración.

De hecho, Graham y col. (1972) ya demostraron que el tampón zwitterionic Tes combinado con Tris (TEST) resultó ser el sistema tampón más satisfactorio para congelar espermatozoides de toro, sistema también utilizado en otras especies como la ovina (Anel y col., 2003) y en la gacela (Garde y col., 2008). De nuevo, hay que tener en cuenta las posibles interacciones entre los distintos componentes, ya que pueden afectar a la eficacia de los diluyentes como sugirió ya Watson (1979), al describir que el efecto protector de la yema de huevo podía variar dependiendo del sistema tampón utilizado.

2.3.2.6. Antioxidantes

Una manera de reducir los efectos perjudiciales de las ROS podría ser la adición de componentes con capacidad antioxidante al diluyente de congelación para bloquear o prevenir el estrés oxidativo. Entre los diferentes componentes antioxidantes, la taurina, aminoácido sulfatado presente tanto en el fluido epididimario y oviductal, (Álvarez y Storey, 1984; Bucak y col., 2007), componentes tioles no proteicos como el glutatión (GSH), otros componentes como la cisteamina, la trehalosa y la cisteína (Aisen y col., 2005; Bucak y col., 2007; 2008), así como la glutamina y el ácido hialurónico (Bucak y col., 2009) han sido probado por varios investigadores.

También el butil hidroxitolueno (BHT), antioxidante sintético fenólico análogo de la vitamina E, ha sido utilizado en la crioconservación de espermatozoides de diferentes especies, describiéndose efectos beneficiosos por muchos investigadores, como Donoghue y Donoghue (1997) en pavos, Anderson y col., (1994) y Shoaie y Zamiri (2008) en el toro, Roca y col., (2004) en cerdo y Khalifa y col., (2008) en espermatozoides caprinos. Estos investigadores reportaron que la inclusión de BHT en diluyente mejoró las características de los espermatozoides evaluados después del proceso de la refrigeración y/o congelación, a excepción de la inclusión de BHT al

diluyente de refrigeración de caballo, donde no pudo influir positivamente en la motilidad (Ball y col., 2001). Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual el BHT protege al espermatozoide durante la crioconservación no está bien estudiado, aunque sí se conoce que su efecto en la prevención de daños a los espermatozoides depende de diferentes parámetros, tales como la especie, la concentración de BHT en el diluyente, la composición de la membrana espermática, el tiempo de incubación y la composición del diluyente básico (Watson y Anderson, 1983; Killian y col., 1989; Ball y col., 2001; Roca y col., 2004).

También la melatonina parece tener propiedades antioxidantes, proporcionando defensas contra el daño oxidativo, especialmente contra la peroxidación lipídica de la membrana del espermatozoide (Gavella y Lipovac, 2000), protegiendo además a las mitocondrias del daño inducido por la producción de ROS (Paradies y col., 2010). La melatonina inactiva a radicales altamente reactivos como es el caso del anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxil (ROO^\bullet) y la mayoría de los radicales hidroxilos (OH^\bullet). La melatonina también estimula las actividades de las enzimas involucradas en la metabolización de ROS y preserva la fluidez de la membrana celular (Reiter, 2000). De hecho, Hyun-Yong y col., (2006) obtuvieron resultados significativamente superiores de motilidad espermática durante la conservación *in vitro* de semen de cerdo con diferentes concentraciones de melatonina. También Succu y col., (2011) en semen de morueco demostraron que la suplementación de 1 mM de melatonina en el diluyente llevó a mayores tasas de viabilidad, de motilidad total y progresiva, así mismo como concentraciones superiores de ATP intracelulares y una mayor integridad del ADN en espermatozoides congelados/descongelados. Sin embargo, hay opiniones divergentes como la de Tanyildizi y col., (2006) que demostraron que la melatonina causó una disminución significativa de la motilidad en espermatozoides de toro incubados *in vitro* o la de Gwayi y col., (2002) que reportaron efectos negativos sobre la motilidad progresiva de espermatozoides de rata.

2.4. ANALISIS SEMINAL

El análisis seminal o espermiograma incluye una serie de pruebas que evalúan diversos factores o funciones de la célula espermática. Como resultado del análisis

seminal podemos calificar a la muestra como apta o no apta para uso en inseminación artificial en fresco, refrigerada o crioconservada.

Como ya ha sido introducido previamente, las técnicas de contrastación del semen, tanto para la utilización en investigación como en la práctica, depende todavía del análisis seminal rutinario clásico, a pesar de su limitado valor para predecir la subsiguiente fertilidad de una muestra (Rodriguez-Martinez, 2003, Gillan y col., 2005; Gadea, 2005).

Sin embargo, el análisis de muchos otros aspectos de los espermatozoides, gracias a diferentes avances metodológicos, puede ayudar a identificar el estado de la célula espermática en un momento dado y correlacionarlo con la fertilidad y calidad del eyaculado (Graham, 2001; Foote, 2003; Gillan y col., 2005; Gadea, 2005; Rodriguez-Martinez, 2006; Silva y Gadella, 2006). Así, se han desarrollado sistemas automáticos de análisis de imágenes (CASA) (González-Recio, y col., 2005; David y col., 2007) y sistemas basados en la citometría de flujo (Kruger y col., 1999; Axner y Linde Forsberg, 2007), los cuales proporcionan una gran cantidad de información para estudiar distintas características del espermatozoide. Así pues, el conocimiento de la calidad seminal tras la descongelación permitirá determinar el rendimiento de los machos para inseminaciones artificiales y por tanto poder planificar el régimen de recuperaciones (Alvarez y col., 2000)

2.4.1. Evaluación de la Motilidad Espermática

La evaluación de la motilidad es muy sencilla y por eso es uno de los parámetros más utilizados. La motilidad es necesaria para el transporte de los espermatozoides en el tracto reproductivo femenino y para atravesar todas las cubiertas del ovocito. Se puede evaluar subjetivamente (motilidad masal y la motilidad individual) u objetivamente mediante sistemas computarizados de análisis (CASA), pero la más utilizada y a su vez la más simple es la valoración visual de la motilidad masal que refleja el movimiento de las células espermáticas en su conjunto. Ésta es una valoración que requiere de una elevada concentración espermática para que las ondas y remolinos se hagan visibles, siendo empleada a nivel práctico en el análisis de semen de rumiantes menores (Aisen y Veturino, 2004). La motilidad individual se obtiene utilizando mediante observación en

microscopio óptico a 100-400 aumentos de una gota seminal (generalmente diluida) dispuesta entre portaobjeto y cubreobjeto. Valoramos de forma subjetiva tanto el porcentaje de espermatozoides motiles, el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo y la calidad del movimiento (González Urdiales y col., 2006).

Para desarrollar el análisis objetivo de la motilidad, numerosos investigadores (Glover, 1968; Katz y Dott, 1975; Amann y Hammerstedt, 1980; Katz y Overstreet, 1981; O'Connor y col., 1981) han dedicado mucho trabajo y recursos para intentar eliminar la subjetividad inherente a la evaluación microscópica de la calidad del semen. Fruto de estas investigaciones fue el desarrollo de los sistemas informatizados para el análisis de la motilidad espermática. Desde que se introdujeron en el mercado a principios de los años 80, originalmente para la evaluación de semen humano, los sistemas CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) se han ido perfeccionando y modernizando, a la vez que su precio se ha ido haciendo también más asequible. En consecuencia, comenzaron a utilizarse cada vez con más frecuencia en veterinaria, especialmente en las especies bovina y equina, tanto en el ámbito de la investigación como en el de la industria, en los centros de IA.

Aunque los principios básicos utilizados para el análisis de las imágenes digitalizadas son similares en los diferentes sistemas CASA que existen en el mercado, hay diferencias apreciables en sus sistemas ópticos, técnicas de captura de imagen y reconocimiento espermático, algoritmos utilizados para la reconstrucción de trayectorias y determinación de las medidas cinéticas, así como también en el manejo y análisis de los datos, y consecuentemente, en los resultados finales. (Davis y Katz, 1993; Davis y Siemers, 1995; Irving, 1995; Krause, 1995; Mortimer, 2000; Verstegen y col., 2002).

El uso de sistemas CASA para la contrastación rutinaria de las dosis seminales ofrece notables ventajas, pero también posee algunos inconvenientes. Uno de los principales es que no existe una estandarización y optimización de los equipos y de los procedimientos empleados en los análisis (Verstegen y col., 2002). Los diferentes laboratorios trabajan con distintos equipos, y las características técnicas difieren de unos a otros, lo cual provoca que los resultados facilitados por los distintos centros para los mismos parámetros sean muy dispares. No obstante, los programas diseñados para estos equipos incluyen una serie de parámetros descriptores del movimiento espermático que

son comunes a todos los sistemas CASA (Boyers y col., 1989; Farell y col., 1995) y que se describen brevemente en la siguiente tabla.

Tabla 1. Parámetros cinéticos medidos por los sistemas CASA (Tomado de Tejerina, 2007).

PARAMETRO	Unidad	DEFINICIÓN
Velocidad curvilínea (VCL)	$\mu\text{m/s}$	Velocidad media de la cabeza espermática a lo largo de su trayectoria real.
Velocidad rectilínea (VSL)	$\mu\text{m/s}$	Velocidad media de la cabeza espermática a lo largo de la línea recta que une la primera y última posición de la trayectoria curvilínea.
Velocidad media (VAP)	$\mu\text{m/s}$	Velocidad promedio de la cabeza del espermatozoide en su trayectoria media.
Índice de linealidad (LIN)	%	Linealidad de la trayectoria curvilínea $(\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100$
Índice de rectitud (STR)	%	Rectitud de la trayectoria media $(\text{VSL}/\text{VAP}) \times 100$
Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH)	μm	Desplazamiento efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media
Frecuencia de batido (BCF):	Hz	Nº de veces que la cabeza del espermatozoide cruza la dirección de movimiento

Entre los principales factores que afectan a los resultados obtenidos con el CASA, existen una serie de consideraciones prácticas y biológicas de las que depende el resultado final de estos parámetros. Según Versteegen y col. (2002), la temperatura es, desde hace tiempo conocida por su transcendencia para el análisis subjetivo de la movilidad, habiéndose demostrado, igualmente, que los resultados de los parámetros cinéticos están fuertemente condicionados por ella. Así la temperatura recomendada por el grupo ESHRE (1998), es la temperatura corporal de la especie de origen del semen analizado.

También la concentración de la muestra es considerada como uno de los parámetros que más condiciona los resultados de las características cinéticas

espermáticas. Para Pedigo y col., (1989), el uso de concentraciones elevadas esta inversamente correlacionado con la variabilidad de los resultados. Este efecto, en principio beneficioso para la precisión de los datos obtenidos, se ve contrarrestado por la significativa influencia que ejercen las altas concentraciones en los resultados cinéticos. Existe una correlación positiva entre la concentración de la muestra y el porcentaje de motilidad individual de la misma, fruto de la cual se produce una sobreestimación artificial de dicho parámetro (Welzels y col., 1993). Esto es debido a las colisiones de las células espermáticas entre sí, provocando la adquisición de movimiento por parte de las células inmóviles que han sufrido una colisión.

Igualmente los parámetros cinéticos se ven condicionados por las características y composición de los medios en los se diluyen los espermatozoides (Farrell y col., 1996; Rijsselaere y col., 2003). Por lo tanto, sólo se pueden comparar los resultados de dos muestras si ambas están diluidas en el mismo medio. Además, la cámara de recuento utilizada puede producir errores sistemáticos en los análisis mediante los sistemas CASA, influyendo sobre los patrones cinéticos de las células espermáticas (Sherins, 1991; David y Katz, 1993). La elección de la cámara a utilizar es básica para la realización de una correcta medición. En la mayoría de los laboratorios se ha venido utilizando una cámara de solo 10 μm de profundidad, la Makler (Blanco, 1998), que limita la distribución de los espermatozoides a un única capa. Las recomendaciones, tanto del ESHRE (1998) como de otros autores (Verstegen y col., 2002), apuntan a la necesidad de utilizar cámaras de recuento entre 10 y 20 μm de profundidad.

Por otra parte, el número de células espermáticas necesarias para caracterizar el total de la población ha sido siempre uno de los planteamientos más discutidos en la práctica andrológica. La mayoría de laboratorios realizan el análisis cinético sobre 100 o 200 espermatozoides elegidos al azar en varios campos, obteniendo coeficientes de variación entorno al 10%, usando concentraciones de 50 millones de espermatozoides por mililitro (Tejerina, 2007)

No obstante, a pesar de que los sistemas CASA nacieron con el fin de evitar la subjetividad en el análisis provocada por la valoración visual directa, los resultados obtenidos siguen sufriendo variaciones en función del técnico que realice el análisis. Así, en un estudio de Holt y col., (1994b), en el que una misma muestra era analizada

por varios técnicos (con diverso grado de experiencia) en 5 modelos diferentes de sistemas CASA, se pudo constatar, que para todos los parámetros evaluados la variabilidad interna del modelo fue mayor que entre modelos, indicando que las diferencias en manejo de la muestra y la experiencia del técnico fueron fuentes de variación más significativas que los sistemas CASA por sí mismos. Esta apreciación se repitió en el estudio llevado a cabo por Farrell y col., (1995), al evaluar dos sistemas CASA idénticos. A consecuencia de estos resultados, la especialización y el entrenamiento del personal dedicado al manejo de estos equipos son unos de los aspectos que más importancia acaparan en los trabajos que describen la correcta utilización de la nueva tecnología (ESHRE, 1998; Krause y Viethen, 1999; Versteegen y col., 2002).

2.4.2 Evaluación de la Morfología Espermática

El estudio de la morfología espermática es otra prueba determinante de la calidad de un eyaculado, permitiendo además detectar alteraciones en la espermatogénesis y en la maduración epididimaria, lo cual, puede resultar muy útil a la hora de eliminar reproductores con baja calidad seminal, cuando estas anomalías indiquen patologías genitales mayores. Al igual que en la valoración subjetiva de la motilidad, la correlación de los resultados obtenidos en la valoración morfológica del semen con la fertilidad varía ampliamente en función del estudio que tomemos en cuenta, describiéndose valores entre $r = 0,06$ a $r = 0,86$ (Rodríguez-Martínez, 2003). Para realizar este análisis disponemos de un amplio abanico de tinciones de las extensiones espermáticas para su posterior observación en un microscopio óptico como son las tinciones simples tipo eosina-nigrosina, azul de metileno, rosa de bengala o la hematoxilina que proporcionan una distribución homogénea del colorante en el interior de la célula, permitiéndonos así diferenciar el contorno de la misma, al tener un buen contraste con el fondo del campo de visión. También disponemos de las tinciones dobles (Giemsa, William, Papanicolau) que buscan visualizar partes específicas del espermatozoide (García-Artiga y col., 1994).

De hecho, podemos realizar un análisis morfométrico a partir de tinciones clásicas o mediante el uso de sistemas informatizados conocidos por su acrónimo en inglés como ASMA, aunque por el costo del equipamiento y su lentitud, su uso queda

restringido principalmente a trabajos de investigación (García-Herreros y col., 2006). Inicialmente, y hasta la actualidad, en numerosos laboratorios la evaluación morfológica de los espermatozoides se realiza “manualmente”. Sin embargo, este método ha demostrado ser problemático y constitutivo de limitaciones. Es conocida la existencia de variaciones importantes entre técnicos y laboratorios que hacen difícil la exacta interpretación y comparación de resultados (Verstegen y col., 2002). Actualmente se han desarrollado sofisticados sistemas informatizados que permiten el análisis objetivo de la morfología/morfometría principalmente de la cabeza del espermatozoide, revelando sutiles diferencias que no son detectables visualmente (Ramos y col., 2002). Estos sistemas comprenden un complejo proceso con diferentes etapas: preparación de la muestra, adquisición de las imágenes y por último, procesado y análisis de datos (Verstegen y col., 2002).

La totalidad de los programas morfométricos realizan la medición de los siguientes parámetros de la cabeza espermática:

Longitud (L): Medida, en μm , del eje mayor de la cabeza del espermatozoide.

Anchura (W): Medida, en μm , del eje menor de la cabeza del espermatozoide.

Perímetro (P): Longitud, en μm , de la frontera externa entre la zona identificada como cabeza y el fondo.

Área (A): Suma, en μm^2 , de las áreas del grupo de píxeles que el software ha identificado como cabeza.

En algunos sistemas ASMA, como en el Sperm Class Analyzer[®] o el Integrated Semen Analysis System[®], realizan el cálculo de 4 parámetros adicionales, indicativos de la forma del espermatozoide como es la Elipticidad (L/W), la Rugosidad ($4PIA/P^2$), la Elongación: $(L-W)/(L+W)$ y la Regularidad: $(IILW/4A)$. Con el sistema ISAS[®], es posible realizar el estudio morfométrico de la pieza intermedia (Hidalgo y col., 2005), midiendo los siguientes parámetros: Anchura de la pieza intermedia (μm), Área de la pieza intermedia (μm^2), Distancia, en μm , entre el eje mayor de la cabeza y la inserción de la pieza intermedia y Ángulo de divergencia de la pieza intermedia con respecto al eje mayor de la cabeza. También estos sistemas de análisis morfométrico han mostrado su validez en el análisis del núcleo del espermatozoide definiéndose nuevos parámetros para caracterizar dicha estructura (Ramos y col., 2002) en la especie bovina.

Sin embargo, los sistemas ASMA tampoco están exentos de importantes fuentes de variación en las medidas morfométricas realizadas. Algunas de estas fuentes de variación son originadas por los mismos equipos de captura y análisis, variaciones que se derivan del tipo de software de análisis, empleando algoritmos diferentes entre los distintos sistemas CASA comerciales para la segmentación de la cabeza espermática y su posterior medida. Incluso dentro del mismo equipo se observan diferencias en los resultados dependiendo del modo de funcionamiento (automático, semiautomático o manual) (Goulart y col., 2003). También hay fuentes de variación derivadas del sistema de captura como puede ser la intensidad de la fuente de iluminación, parámetro determinante en el contraste entre el espermatozoide y el fondo de la imagen, por tanto influye de forma decidida en la segmentación de la cabeza y en el consecuente cálculo de los parámetros morfométricos (Sancho y col., 1998; Verstegen y col, 2002). Es obvio que la magnificación empleada juega un papel condicionante de los resultados finales, consiguiéndose el mejor grado de detalle y exactitud con el mayor aumento disponible. El problema de tal planteamiento es que cuanto mayor sea la magnificación con la que estemos trabajando, menor será el número de células por campo, por tanto, será necesario analizar un mayor número de campos y se prolongará el tiempo de la captura (Gravance y col., 1997).

La elección de las condiciones en que se realiza el análisis puede determinar cambios significativos en la morfología observada: así, cuando son teñidos, utilizando preparaciones en seco o fijándolos, la osmolaridad de la solución y si el espermatozoide es refrigerado o congelado (Gravance y col., 1998). También, en función del agente fijador que añadamos a la muestra seminal previamente a la extensión en el portaobjetos, se puede modificar las dimensiones de la cabeza espermática, lo que conlleva la obtención de resultados diferentes, y por tanto la imposibilidad de compararlos cuando utilizamos agentes distintos. Incluso la tinción es un factor determinante a la hora de conseguir un adecuado contraste entre la cabeza espermática y el fondo de la imagen, por tanto está directamente implicada. El primer condicionante a la hora de elegir la sustancia colorante es que las tinciones son especie-dependientes (Gravance y col., 1995; 1997); y en segundo lugar, de todas aquellas sustancias aptas para una especie en concreto, deberemos elegir aquellas que mejor se adapten a los algoritmos de segmentación del programa ASMA utilizado.

En andrología humana se han utilizado infinidad de tinciones, la WHO (1999) recomienda la técnica de Papanicolau (al igual que para la valoración subjetiva), aunque su utilización no es muy común en los trabajos de investigación. Han sido utilizadas de forma esporádica la hematoxilina (Davis y col., 1992) y la tinción de Shorr (Wang y col., 1991), aunque los más utilizados son los kits comerciales como el Hemacolor® (Pérez-Sánchez y col., 1994; Goulart y col., 2003) o el Diff-Quick® (Coetzee y col., 1999), siendo precisamente esta última combinación de tinciones, la descrita en distintos estudios comparativos como el más idóneo tanto para el análisis convencional (Harrison y col., 1989), como para el morfométrico informatizado (Coetzee y col., 2001b).

En las especies de interés ganadero, los colorantes empleados han sido muy diversos. Por ejemplo, en el semen de toro se han empleado agentes colorantes tan exóticos como el azul de toluidina (Beletti y col., 2005), o asociaciones tan convencionales como la Hematoxilina con Rosa de Bengala, mostrándose superior a la Hematoxilina en solitario cuando las extensiones eran analizadas con el sistema CellMorf® (Gravance y col., 1996). A la misma conclusión se llegó, en este caso, analizando espermatozoides de morueco (Gravance y col., 1998). Sin embargo, Sancho y col., (1998), prefieren emplear el kit comercial Hemacolor® en la valoración morfométrica en la especie ovina. En el caso del caprino, la tinción óptima para trabajar con el sistema Cell-Form® es la Hematoxilina (Gravance y col., 1995), mientras que para el SCA® es el Diff-Quick® (Hidalgo y col., 2006), situación que se repitió al analizar espermatozoides de ciervo empleando el mismo equipo (Soler y col., 2005).

Como en el caso de la motilidad, la elección del número idóneo de células a analizar para caracterizar morfológica o morfométricamente una población espermática, no tiene una respuesta sencilla (Kuster y col., 2004), más aún en este caso, ya que un número excesivo de espermatozoides a capturar por muestra puede suponer un prolongado tiempo de análisis (Gravance y col., 1995). La WHO (1999) recomienda, al menos, capturar 200 células espermáticas. Sin embargo en estudios llevados a cabo con diversas especies/equipos [ovino/CellMorf (Gravance y col., 1995); caprino/CellMorf (Gravance y col., 1995); porcino/SCA (Tejerina y col., 2005); equino/SCA(Hidalgo y col., 2005)], se ha demostrado que no hay diferencias en los resultados de los parámetros morfométricos entre tamaños muestrales de 100 y 200 espermatozoides

capturados. Incluso utilizando el sistema ISAS y la tinción hematoxilina en semen de verraco, se podría reducir el número de células capturadas a solo 50, sin existir diferencias significativas con los resultados de tamaños muestrales mayores (García-Herreros y col., 2006).

2.4.3. Análisis de la integridad de la membrana citoplasmática

La membrana citoplasmática es una de las estructuras más seriamente afectadas por el proceso de congelación-descongelación, siendo su análisis indispensable ya sea con una finalidad investigadora o comercial (Nagy y col., 2003, 2004; Peláez y col., 2006), desarrollándose una amplia gama de pruebas para estudiar su estado. Podemos realizar una evaluación morfológica utilizando óptica de contraste diferencial de interferencia o Nomarski, así como microscopía electrónica (de barrido o de transmisión), si bien estas técnicas aportan información parcial y/o son tediosas y de alto costo (Rodríguez-Martínez, 2005). Las técnicas tintoriales son las más ampliamente utilizadas en la valoración de la membrana citoplasmática, tanto las convencionales, como las fluorescentes. Las tinciones convencionales se basan en el principio de que los espermatozoides con la membrana plasmática intacta (vivos) presentan mecanismos de permeabilidad selectiva que impiden la entrada del colorante, mientras que en aquellos donde existe ruptura de la membrana, y no existan estos mecanismos, el colorante penetrará y la célula se teñirá (Watson, 1990). Ejemplos de estas tinciones, son la eosina/nigrosina, azul tripán, verde rápido/eosina, eosina/azul de anilina o el amarillo de naftol/eritrosina (García-Artiga y col., 1994; Rodríguez-Martínez, 2005).

No obstante, el uso de esta metodología acarrea una serie de complicaciones como la aparición de espermatozoides parcialmente teñidos que dificulta la interpretación de su *status* (Watson, 1990); o como en el caso de analizar semen criopreservado el glicerol puede aumentar la permeabilidad de la membrana de los espermatozoides no dañados, incrementándose la población de espermatozoides con la membrana dañada artificialmente (Mixner y Saroff, 1954, citados por Peláez, 2003). También la eosina, una de las tinciones más empleadas, al usarse a concentraciones citotóxicas puede igualmente subestimar la proporción de espermatozoides vivos artificialmente (Woelders, 1990).

Con la aparición de fluorocromos capaces de determinar con mayor objetividad el estado de integridad de la membrana, las tinciones clásicas se han desechado como técnica de elección para valorar este parámetro; así se han desarrollado una gran variedad de protocolos basados en la utilización de tinciones fluorescentes. Estas sustancias se clasifican en dos grupos principales en función de su mecanismo de acción. Así, las tinciones de membrana impermeable sólo son capaces de atravesar las membranas plasmáticas dañadas o degeneradas, y por tanto permite identificar a las células muertas o en proceso de degeneración. Por otra parte, las tinciones de membrana permeable son capaces de atravesar membranas celulares intactas y por tanto permiten identificar la población de células viables (Garner y col., 1986).

Uno de los fluorocromos más utilizados para identificar células muertas es el Ioduro de propidio (PI). Este compuesto entra en espermatozoides con la membrana plasmática dañada, se une al núcleo y, al ser excitado por la longitud de onda apropiada (510-560 nm), emite fluorescencia roja. Además del PI, existen otros marcadores fluorescentes específicos para células muertas cuyo mecanismo de acción es similar, como por ejemplo, el Hoechst 33258 (Keeler y col., 1983; Pintado y col., 2000), el bromuro de etidio (Evenson y col., 1982) o la hidroetidina (HED) (Ericsson y col., 1989), entre otros.

Otro fluorocromo ampliamente utilizado, en este caso para identificar espermatozoides vivos, es el SYBR-14, que es capaz de atravesar membranas intactas y unirse al ADN de los espermatozoides (Garner y col., 1986; Silva y Gadella, 2006). Presenta algunas ventajas con respecto a los fluorocromos basados en la actividad esterasa intracelular, siendo una molécula más estable, al no tener que sufrir una transformación enzimática para poder actuar, y unirse específicamente al ADN del espermatozoide, lo que supone que toda partícula que no contenga dicho material genético no se va a marcar, y por tanto quedará descartada del análisis. El SYBR-14 suele utilizarse en combinación con PI (Gillan y col., 2005), y de esta forma se pueden distinguir tres poblaciones espermáticas: una de ellas constituida por células muertas o en estado de degeneración, cuyas membranas plasmáticas son permeables al PI, y por tanto emiten fluorescencia roja, la otra constituida por espermatozoides viables, cuyas membranas intactas son impermeables al PI pero dejan entrar el SYBR-14, y por tanto emiten fluorescencia verde y una tercera subpoblación celular que será aquella

compuesta por espermatozoides con daños menores de membrana en los que el IP comienza a sustituir al SYBR-14, por lo tanto presentan tanto fluorescencia verde como roja, se clasifican como espermatozoides dañados o moribundos.

Un fluorocromo, con un mecanismo de acción similar al del SYBR-14, capaz de identificar espermatozoides vivos, es el Hoechst 33342. Este compuesto también entra en células vivas y se une al ADN espermático, sin embargo, su uso está limitado por la longitud de onda de su espectro de excitación que está en el rango UV. La mayoría de los citómetros disponen de un laser con una longitud de onda de 488 nm, y para evaluar las muestras marcadas con Hoechst 33342, es preciso disponer de un láser de menor longitud de onda.

Con respecto a la correlación entre la viabilidad espermática y la capacidad fecundante de las dosis seminales hay discrepancia entre los autores. Decuadro y col., (2002) y Christensen y col., (2004) hablan de una correlación elevada entre la viabilidad espermática y la capacidad fecundante de las dosis, siempre que se respete una concentración espermática mínima por pajueta. Sin embargo, Graham (2001) observó que la viabilidad espermática apenas se correlacionaba con la fertilidad.

Un último aspecto a evaluar de la membrana plasmática es la funcionalidad de la misma. El Test de endósmosis (*hypoosmotic swelling test*, HOST) evalúa el hinchamiento y enrollamiento que se produce en el flagelo de las células con una membrana íntegra, a consecuencia de la entrada y acumulación de agua a ese nivel; mientras que los espermatozoides con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentarán cambios en la forma de su flagelo (Pérez-Llano y col., 1999). Esta prueba ha sido utilizada en el análisis de espermatozoides de diversas especies como el hombre, perro, caballo, cerdo y rumiantes, tratándose de un método sencillo en el que se incuba la muestra seminal generalmente durante 30 a 60 minutos en un medio con una presión osmótica, comprendida, entre 50 y 150 mOsm/kg a 37°C. Los valores obtenidos en esta prueba se correlacionan con otros parámetros de calidad seminal como la motilidad, la viabilidad o la morfología (Jeyendran y col., 1984; Rodríguez-Gil y col., 1994; Vázquez y col., 1997; Pratap y col., 2000). Por otra parte, presenta una elevada correlación con el test de penetración en ovocitos de hámster en semen humano (Jeyendran y col., 1984). En humanos se ha encontrado una correlación elevada entre

los resultados de HOST y los obtenidos en fecundación “*in vitro*” (Zaneveld y Jeyendran, 1990).

2.4.4. Análisis de la funcionalidad mitocondrial

Para evaluar la actividad mitocondrial, el fluorocromo Rodamina 123 fue el primero que se utilizó en espermatozoides humanos, y posteriormente en los de otras especies domésticas (Evenson y col., 1982; Anger y col., 1989; Graham y col., 1990). Este fluorocromo penetra y se acumula en el interior la matriz mitocondrial produciendo una fluorescencia verde si la mitocondria desarrolla el proceso de respiración de forma activa pero no nos indica la intensidad del mismo (Graham, 2001; Gillan y col., 2005). En cambio, el 5,5,6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-ioduro tetraetilbezimidazolilcarbocianina conocido también como JC-1, es una sustancia que atraviesa de forma selectiva las membranas mitocondriales en su forma monomérica para indicarnos si las mitocondrias son metabólicamente activas, además nos permite diferenciar mitocondrias que muestran un potencial de membrana alto de las que tienen un potencial bajo o medio y, en consecuencia, nos da una estimación más rigurosa de la función metabólica de las mitocondrias que otros colorantes. Cuando las mitocondrias tienen un potencial de membrana alto, el JC-1 forma agregados y tiene un pico de emisión a una longitud de onda del rojo-naranja (590nm). Este fenómeno depende de la concentración del colorante, del pH, de la fuerza iónica y de la temperatura. En cambio, cuando el potencial de membrana es bajo, el JC-1 se encuentra en forma de monómero y emite fluorescencia verde (510-520nm) (Peña y Rodríguez, 2006)

También existen las tinciones comerciales específicas para mitocondrias Mito Traker®, una de ellas el Mito Traker® deep red, cuyas moléculas se difunden a través de la membrana plasmática y se unen específicamente a los lípidos de membrana de las mitocondrias funcionales (Keij y col., 2000; Fraser y col., 2001), pero no son retenidas por las mitocondrias que presentan un potencial de membrana alterado. Las principales ventajas que ofrece Mito Traker® deep red frente a otros fluorocromos específicos para mitocondrias son su gran especificidad (Sutovsky y col., 1999) y fotoestabilidad (Poot y col., 1996), y su elevada sensibilidad al ser incorporado en distintos protocolos de doble y triple marcaje (Sutovsky y col., 1999).

2.4.5. Análisis de la integridad acrosomal

La integridad estructural del acrosoma es un requisito indispensable para que el espermatozoide sea capaz de unirse de forma efectiva al ovocito y se lleve a cabo la fecundación (Yanagimachi, 1994). La pérdida de dicha integridad previamente al paso por el aparato reproductor femenino o en una fase temprana de tránsito por él, supondrá una irremediable pérdida de la capacidad fecundante del espermatozoide (Woelders, 1990; Silva y Gadella, 2006).

La integridad acrosomal puede ser valorada por numerosos procedimientos (Topfer-Petersen y col., 1984), pero cuando se utiliza citometría de flujo como método de análisis, el más común es el uso de una lectina conjugada con un fluorocromo (Graham y col., 1990; Cheryl y col., 1997; Maxwell y col., 1997). Entre todas las lectinas disponibles comercialmente, las más frecuentemente utilizadas son la PNA (*peanut agglutinin*), que se une específicamente a la membrana acrosomal interna de los espermatozoides (Farlin y col., 1992; Flesch y col., 1998; Guillan y col., 2005), y la PSA (*pisum sativum agglutinin*), que se une a la matriz acrosomal y a la membrana acrosomal externa (Mortimer y col., 1987; Flesch y col., 1998; Szasz y col., 2000). El uso de lectinas conjugadas con un fluorocromo, como por ejemplo fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE), permite detectar aquellos espermatozoides que tienen la membrana acrosomal dañada, lo cual posibilita el paso de la lectina, y por tanto del fluorógeno, al interior del compartimento acrosomal (Graham y col., 1990; Nolan y col., 1995).

Otras técnicas para identificar la presencia de alteraciones acrosomales, son las técnicas de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos mono o policlonales, conjugados con colorantes fluorescentes; siendo específicos de proteínas de la membrana acrosomal (como la CD46) o de la matriz acrosómica (Gonzalez Urdiales y col., 2006).

Para valorar simultáneamente el estado del acrosoma y la viabilidad espermática se pueden combinar tres fluorocromos. Por ejemplo, Nagy y col., (2003) desarrollaron una triple tinción para espermatozoides bovinos, en la que combinaban el uso de SYBR-14 y PI, para evaluar la viabilidad espermática, con la lectina PNA marcada con ficoeritrina (PE-PNA), que tiñe en naranja los acrosomas dañados. Esta triple tinción

genera la aparición de cuatro poblaciones espermáticas: 1) espermatozoides vivos con el acrosoma intacto (positivos a SYBR-14 y negativos a PE-PNA), 2) espermatozoides vivos con el acrosoma dañado (positivos a SYBR-14 y positivos a PE-PNA), 3) espermatozoides muertos con el acrosoma intacto (positivos a PI y negativos a PE-PNA) y 4) espermatozoides muertos con el acrosoma dañado (positivos a PI y a PE-PNA).

2.4.6. Análisis espermático mediante Citometría de flujo

Por último especial atención merece el uso de los citómetros de flujos para el análisis seminal. La citometría de flujo es una técnica que consiste en el análisis rápido de células individualizadas y orgánulos subcelulares, suspendidos en un flujo laminar, sobre los que incide un rayo láser. El análisis de la desviación del haz de luz, de su intensidad y de la fluorescencia que emiten los distintos fluorocromos con los que podemos marcar las células nos da información sobre el estado funcional, presencia o ausencia de determinados antígenos, pH, estado Redox, etc. Otra gran ventaja de esta técnica es que permite evaluar un gran número de espermatozoides en muy poco tiempo, entre 5.000 y 10.000 espermatozoides pueden ser evaluados en solamente 1 segundo, lo que permite, detectar ligeras diferencias entre eyaculados o estudiar la distribución de subpoblaciones espermáticas en los mismos (Peña y Rodríguez, 2006).

Así pues, la citometría de flujo se presenta como uno de los métodos de gran valor en la predicción de la fertilidad (Silva y Gadella, 2006), ya que nos permite poder evaluar desde la integridad y funcionalidad de las membranas espermáticas plasmática y acrosomal, del ADN espermático, de la actividad de las mitocondrias hasta la fluidez de la membrana y la producción de ROS entre otras características, lo que determinará la existencia de distintas subpoblaciones en función de los parámetros evaluados, favoreciendo el estudio de la importancia de cada una de estas subpoblaciones en el éxito de la fecundación.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

El principal objetivo de la presente tesis doctoral es la optimización de la crioconservación espermática ovina para la creación de un banco de semen de las razas autóctonas catalanas Xisqueta y Aranesa en peligro de extinción.

Con este fin se plantearon los siguientes objetivos parciales:

1. Estudiar diferentes alternativas a la yema de huevo fresca en la elaboración de los medios para reducir la heterogeneidad y contaminación microbiológica, así como algunos de sus componentes que interfieren negativamente en su capacidad crioprotectora, analizando el efecto de diferentes tipos de yema de huevo (fresca, en polvo y clarificada) en la viabilidad, motilidad, integridad acrosomal, funcionalidad mitocondrial y morfometría de los espermatozoides durante todo el proceso de refrigeración y crioconservación. Paralelamente también se estudió el efecto de la eliminación del plasma seminal y la edad del donante.
2. Valorar la posibilidad de elaborar diluyentes libres de crioprotectores de origen animal y de composición definida mediante el uso de la lecitina de soja o el butil hidroxitolueno (BHT).
3. Analizar la eficacia de dos sistemas tampón como son el TRIS y TEST en los medios de conservación a base de yema de huevo en polvo o de lecitina de soja, junto con la suplementación o no de BHT como antioxidante en la refrigeración y criopreservación de espermatozoides ovinos.
4. Determinar la concentración óptima del antioxidante BHT en el medio de conservación, valorando la adición de diferentes concentraciones (0.6mM, 2.0mM y 5.0mM).

5. Analizar el efecto de la presencia de plasma seminal en el diluyente y estudiar la necesidad o no de su eliminación, valorando el posible efecto ejercido por el método de lavado o centrifugación en los diferentes parámetros de calidad seminal de los espermatozoides durante todo el proceso de refrigeración y criopreservación.
6. Analizar la inclusión de antioxidantes en los medios de conservación (BHT vs melatonina) y la aplicación de implantes de melatonina en los sementales fuera de la época reproductiva.
7. Analizar el efecto del individuo o donante sobre la criopreservación de semen de morueco.
8. Valorar el posible efecto de la edad del donante y fotoperiodo durante la recolecta del semen e inclusión de BHT como antioxidante mediante la recopilación de los resultados obtenidos a lo largo de toda la fase experimental.

4. CAPITULOS

4.1. CAPITULO I

Efecto del tipo de yema de huevo utilizada y la presencia de plasma seminal en los diluyentes sobre la crioconservación de semen de morueco de distintas edades.

ABSTRACT

The main objective of this first chapter was to reduce the heterogeneity and the potential risk of microbiological contamination on ram semen cryopreservation by replacement of fresh egg yolk by pasteurized powered egg yolk. Simultaneously, we studied also the effect of fresh clarified egg yolk obtained by centrifugation of fresh egg yolk twice at 10.000xg for 45' at 4°C in order to increase the proportion of LDL's in the extenders. In addition, we assessed the effect of seminal plasma and age of the donors (1 year vs 2 years old) on sperm freezability. Briefly, fresh ejaculates from 8 rams (4 of *Xisqueta* and 4 of *Aranesa* breed) were collected by artificial vagina in autumn during two consecutive years. Immediately after collection, the ejaculates were mixed in equal quantities and the pooled semen was split into two samples. One sperm sample was washed by centrifugation and then the pellet was split into three equal aliquots and re-suspended in an extender containing 15% (v/v) of different type of egg yolk (powered, fresh or fresh clarified) supplemented with 5% glycerol in a Tris-based medium. The other semen sample was directly split into three equal aliquots and re-suspended in the same extenders, containing 15% (v/v) of different type of egg yolk (powered, fresh or fresh clarified). Afterwards, sperm samples were refrigerated at 5° C for 4 hours before being frozen in nitrogen liquid vapors. Sperm motility was analyzed by computer assisted sperm analysis (ISAS®) and viability, acrosomal integrity and viability after hyposmotic test (HOST) were determined by eosine/nigrosine stain after refrigeration. Moreover, after thawing, plasmatic and acrosomal membrane integrity and mitochondrial activity were determined by flow cytometry, as well sperm motility and morphometry by ISAS ® (mean±SE, n=6). Our results suggest that semen from 2 years old donors is more resistant to preservation, showing better sperm quality parameters after thawing than youngest donor semen. Also, we recommend in order to increase sperm cryosurvival to remove seminal plasma by centrifugation before preservation. Finally, the powered egg yolk can be used satisfactory on ram sperm cryopreservation, as a replacement of the traditional fresh egg yolk, contributing to a lower heterogeneity and potential risk of microbiological contamination on the preservation extenders, meanwhile the use of fresh clarified egg yolk does not improve the sperm cryosurvival.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 60 años, la yema de huevo se ha incluido de forma rutinaria en la mayoría de los protocolos de criopreservación del semen de especies domésticas y salvajes (Wall y Foote, 1999; Salamon y Maxwell, 2000; Manjunath y col., 2002; Bergeron y col., 2004; Lamia y col., 2004). Su composición es una mezcla compleja basada principalmente en un 68 % de lipoproteínas de baja densidad (LDL), 16 % de lipoproteínas de alta densidad (HDL), 10 % de levetelinas y 4 % de fosfivitinas (revisado por Dauphas y col., 2006). El mecanismo exacto por el cual la yema de huevo ayuda a preservar los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación sigue siendo desconocido (Salamon y Maxwell 2000), aunque su acción crioprotectora es atribuida en gran parte a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Watson y Martin , 1975; Quinn y Chow, 1980; Graham y Foote, 1987; Babiak y col., 1999; Moussa y col., 2002; Bergeron y Manjunath, 2006)

Varios son los trabajos publicados donde se ha intentado utilizar de forma más eficaz las lipoproteínas de baja densidad (LDL) de la yema de huevo como crioprotector no penetrante en los diluyentes de semen mediante complejos métodos de extracción y purificación de las LDL, como el descrito por Pace y Graham, (1974) o más recientemente por Moussa y col. (2002) entre otros. No obstante, en la literatura también ha sido descrito una manera sencilla y rápida de separar las dos fracciones principales de la yema de huevo (el plasma y los gránulos), incrementando el contenido de LDL a través de un simple proceso de centrifugación. La yema de huevo clarificada o plasma se compone principalmente de un 85 % de LDL y un 15 % de livetelinas (Anton y col., 2003).

Sin embargo, el uso de yema de huevo, esté o no clarificada, en los diluyentes de congelación del semen, representa un potencial riesgo de contaminación de endotoxinas en las dosis de inseminación artificial, capaces de dañar la fertilidad de los espermatozoides (Bousseau y col., 1998). Además es un producto muy complejo, cuya composición puede ser extremadamente variable y puede diferir entre lotes (Kampschmidt y col., 1953; Watson

y Martin, 1975), por lo que la búsqueda de un sustituto de la yema de huevo es altamente deseable.

La yema de huevo en polvo podría ser un alternativa para la yema de huevo fresco, ya que este producto se somete a un proceso de pasteurización para destruir las bacterias, de acuerdo con las leyes establecidas para el consumo humano (Thibier y Guerin, 2000) y los lotes tienen una mayor composición homogénea. No obstante, los trabajos de congelación de espermatozoides con yema de huevo en polvo son escasos.

Por otra parte, el plasma seminal es el medio natural en el cual se encuentran inmersos los espermatozoides tras la eyaculación, y que les sirve como medio de transporte y soporte metabólico (Maxwell y col., 2007), proporcionándoles protección y regulando procesos como la motilidad y capacitación espermática o incluso el reconocimiento y unión entre gametos (Johnson y col., 2000). Durante la criopreservación espermática, el plasma seminal parece aumentar la resistencia de los espermatozoides al shock de frío en muchas especies (Ashworth y col., 1994; Barrios y col., 2000; 2005; Fernández-Juan y col., 2006), reduciendo la criocapacitación, proceso por el cual la vida de los espermatozoides se ve seriamente limitada y consecuentemente su capacidad fecundante, reducida. No obstante, también han sido reportados efectos negativos de la presencia de plasma seminal en el proceso de crioconservación (Moore y col., 2005; Maxwell y col., 2007) como también ha sido descrito en numerosas ocasiones en el semen caprino (Aboagla y Terada 2003). Sin embargo, la necesidad o no de eliminar el plasma en el caso de crioconservar semen ovino sigue todavía siendo tema de estudio.

Es preciso recordar que la producción seminal, y por consiguiente, su potencial reproductivo evolucionan de acuerdo a la edad. De tal manera, los moruecos adultos presentan mejor calidad seminal y fertilidad que los jóvenes (Folch, 1984; Beltrán de Heredia, 2009), hecho que se le atribuye al desarrollo de la madurez sexual. Con la madurez sexual se incrementa el crecimiento del volumen testicular, las glándulas sexuales accesorias y la concentración de proteínas en el plasma seminal entre los 7 a los 14 meses de edad, (Dott y col., 1979; Corteel, 1980), lo que repercuten en una mayor calidad seminal

y fertilidad de los espermatozoides refrigerados y criopresevados de animales adultos (Colas y Zinsner, 1975; Rodríguez-Almeida y col., 2008). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio pretende valorar el efecto de diferentes tipos de yema de huevo (fresca, en polvo y clarificada) en la viabilidad, motilidad, integridad del acrosoma, funcionalidad mitocondrial y morfometría de los espermatozoides durante todo el proceso de refrigeración y crioconservación, así como la eliminación del plasma seminal y la edad del donante.

MATERIALES Y METODOS

Todos los reactivos utilizados procedían de la casa comercial Sigma-Aldrich, excepto la yema de huevo en polvo que procedía de NIVE (Nunspeet Holland Eiproducten).

Preparación de los diluyentes de conservación

Para el proceso de crioconservación se utilizó un diluyente base o solución TCG compuesta por 0,3 M Tris [hidroximetil] aminometano, 27,75 mM D(+)-Glucosa, 94,7 mM Ácido Cítrico Anhidro (Salamon y Maxwell, 2000), ajustada a un pH $7,25 \pm 0,05$ y una osmolaridad de $333 \pm 2,80$ mOsm. A esta solución TGC se le añadió glicerol a una concentración final del 5 % (v/v), penicilina benzatinica (1000 UI/mL) y sulfato de estreptomicina (1,0 mg/ml de) con pH de 7,0 a 7,17 y una osmolaridad de 1327 mOsm. Asimismo, a cada uno de los medios, se le añadió uno de los 3 tipos de yema de huevo: yema de huevo fresco (YHF), yema de huevo en polvo (YHP) o yema de huevo clarificada (YHC), a una concentración final de 15 % (v/v).

Para la obtención de 2 de los tipos de yema de huevo (YHF y YHC), se utilizaron huevos de gallina frescos (24-48h desde la puesta), los cuales eran rotos manualmente, descartando la mayor cantidad de clara y obteniendo las yemas. A continuación, se procedió a rodar la yema de huevo sobre un papel de filtro para eliminar las chalazas y restos de albúmina adheridos a la membrana vitelina, a la cual se le practicó un corte para

extraer una fracción de la yema con ayuda de una jeringa. En el caso de la yema de huevo clarificada (YHC), una vez obtenida la fracción de la yema, ésta era sometida a la metodología descrita por Holt y col., (1996) para la obtención del plasma de la yema separada de los gránulos. Para ello, se colocaron 0,5 ml de la yema de huevo en un tubo Eppendorf, se diluyó (1:2) en agua Milli Q y se centrifugó a 10,000 g, en una centrifuga (Microfuge®) durante 45 minutos a 5 °C. Tras la centrifugación, el sobrenadante (plasma) fue recuperado cuidadosamente evitando cualquier contaminación del sedimento (gránulos). A continuación, el sobrenadante se centrifugó de nuevo a 10,000 g, durante otros 45 minutos a 5 °C. Después de la segunda centrifugación, el sobrenadante recuperado constituyó la “yema de huevo clarificada”. Para la preparación de yema de huevo en polvo se utilizó la metodología descrita por Marco-Jiménez y col., (2004). Brevemente, se diluyó (1:1.25) la yema de huevo en polvo (NIVE, ver anexo 1) en agua Milli Q, se homogenizó con la ayuda de un agitador magnético y se añadió a los diferentes diluyentes.

Colección de semen y protocolo de congelación

El experimento se llevó a cabo entre las instalaciones del IRTA en Caldes de Montbui y la Universidad Autónoma de Barcelona. Para ello, se utilizaron 8 moruecos (4 de raza Xisqueta y 4 de Aranesa), a los que se les colectó semen con vagina artificial 2 días/semana y 2 eyaculados/día en otoño durante dos años consecutivos, a la de edad de uno y dos años, realizando un total de 6 réplicas por año. Tras la recogida de los eyaculados, y manteniéndolos en un Baño María a 37°C, se procedió a valorar su motilidad masal y volumen siguiendo la clasificación de Evans y Maxwell (1990). A continuación, los eyaculados eran mezclados en un solo tubo (*pool*), a partir del cual se dividía en dos alícuotas. Una de ellas se diluyó (1:6) con una solución TCG y se centrifugó a 600 g durante 10 minutos. Seguidamente se eliminó el sobrenadante, y el sedimento era resuspendido en 9 mL de la solución TGC para realizar una segunda centrifugación (600xg por 10'). Finalmente, se descartó el sobrenadante y el sedimento fue recuperado para su posterior procesamiento.

Para el proceso de crioconservación de la mezcla de eyaculados, tanto la alícuota de semen que había sido centrifugada (lavado) como la que permaneció sin lavar, se diluyeron (1:4) en el diluyente A, descrito anteriormente, al que se le había agregado previamente uno de los 3 tipos de yema de huevo: fresca (YHF), en polvo (YHP) o clarificada (YHC), a una concentración final del 15 % (v/v), dando lugar a 6 tratamientos distintos de conservación: espermatozoides lavados y conservados en un medio a base de yema de huevo fresco (L-YHF), de yema de huevo en polvo (L-YHP) o de yema de huevo clarificad (L-YHC) y espermatozoides no lavados y conservados en cada uno de los tres tipos de medios (YHF, YHP o YHC). Una vez homogenizada las suspensiones, los tubos se introdujeron en un recipiente con 10 ml de agua a 20 °C, se colocaron en una nevera portátil (Dometic-Waeco) a 5°C y fueron trasladados desde del IRTA a una cámara de frio de la Facultad de Veterinaria de la UAB. Tras aproximadamente 3h30' de permanecer las suspensiones espermáticas en refrigeración se les agrego el diluyente B con la finalidad de llegar a una concentración final de 400×10^6 de espermatozoides/mL. Seguidamente, las distintas alícuotas refrigeradas fueron envasadas manualmente en pajuelas de 0.25 mL (IMV, L'Aigle Cedex, France) y selladas con alcohol polivinílico. Una vez transcurridas las 4 horas de refrigeración, las pajuelas fueron congeladas en vapores de nitrógeno líquido (LN₂), a 5 cm por encima del nivel de LN₂ durante 10 minutos, para finalmente ser sumergidas en él para su almacenamiento hasta su descongelación.

Análisis de los parámetros de calidad seminal

Tras la recolección del semen se evaluó el volumen de cada eyaculado en un tubo graduado y la motilidad masal de los espermatozoides mediante un microscopio óptico (Y5100 Nikon) a 100X, con platina calentable a 37 °C, valorando la velocidad de los movimientos de las ondas o remolinos que se forman en la superficie de la gota de semen, en una escala de 0 a 5, procedimiento descrito por (Evans y Maxwell, 1990).

La viabilidad y morfología espermática de la mezcla de eyaculados en fresco y tras 4 h de refrigeración de los distintos tratamientos se evaluaron por medio de la tinción de eosina-nigrosina (Hancock, 1957) en portaobjetos atemperados a 37 °C con la ayuda de un

microscopio óptico (Y5100, Nikon) a 1000X. Asimismo, se llevó a cabo el test de endosmosis (*Hypoosmotic-Swelling test*, HOST) empleado por Jeyendram y col., (1984), con la finalidad de evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática de las distintas suspensiones espermáticas mediante la incubación durante 30' de cada una de las alícuotas diluidas (1:10) en una solución hipotónica (124 mOsm). A continuación, se realizaron las distintas extensiones mediante la tinción de eosina-nigrosina, tal como se ha descrito anteriormente. Un total de 200 espermatozoides fueron contados en campos diferentes del microscopio, los espermatozoides vivos con colas dobladas e hinchadas fueron registrados como células positivas a HOST (Aisen y Venturino, 2004).

La evaluación de la cantidad y calidad de movimiento de los espermatozoides en las distintas suspensiones espermáticas tras la refrigeración y post-descongelación se realizó mediante el sistema ISAS[®] (Proiser R+D S.D., Valencia) de análisis de semen asistido por computadora (CASA). Con este fin, las distintas muestras seminales se diluyeron en la solución TGC a una concentración final de 50×10^6 espermatozoides/mL. A continuación, se depositó una gota de 10 μ L de la suspensión espermática en un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos (22x22 mm) y se capturaron de 4 a 6 campos para cada muestra mediante un microscopio de contraste de fases (BH-2 Olympus), analizándose un mínimo de 200 células/muestra. Los parámetros analizados fueron: motilidad total (MT,%), motilidad progresiva (MP,%), velocidad curvilínea (VCL, μ m/s), velocidad rectilínea (VSL, μ m/s), velocidad media (VAP, μ m/s), linealidad (%LIN=[VSL/VCL]x100), rectitud (%STR= [VSL/VAP]x100), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μ m) y frecuencia de batido (BCF, Hz).

Para determinar la morfometría espermática se realizaron frotis de los diferentes tratamientos después del proceso congelación-descongelación. Una vez secados al aire, los frotis fueron teñidos siguiendo el protocolo comercial Diff-Quik[®], procedimiento descrito por Hidalgo y col., (2006). La captura de las imágenes se realizó con un microscopio de contraste de fases BH-2 Olympus con un objetivo de 60x y un ocular de 3.3x, sobre el que se encuentra montada una cámara de video A312-F Basler con un CCD de 782x582 píxeles. Las imágenes fueron capturadas de forma manual con el módulo de morfometría

del sistema ISAS[®] (Proiser R+D S.D., Valencia), en su versión 1.0.16, empleándose la opción de análisis global de la cabeza. Un mínimo de 150 espermatozoides por extensión fueron capturados al azar en diferentes campos. Respecto al tamaño de la cabeza se midió la longitud (L, μm), anchura (W, μm), perímetro (P, μm) y área (A, μm^2) y respecto a la forma, se analizó la elipticidad: (L/W), rugosidad: ($4\pi A/P^2$), elongación: (L-W/L+W) y regularidad ($\pi LW/4A$).

Para evaluar conjuntamente la integridad física y funcional de la membrana plasmática, la integridad del acrosoma y la actividad mitocondrial de los espermatozoides tras la descongelación, en nuestro laboratorio se desarrolló una tinción cuádruple consistente en las siguientes sondas fluorescentes, se utilizó el kit de viabilidad espermática vivos/muertos[®] compuesto por SYBR14 e ioduro de propidio (IP; L-7011, Invitrogen S.A), para la integridad de la membrana acrosomal, se utilizó Ficoeritrina (PE) unida a la lectina *Arachis hipogea* (PNA; GTX01509, Antibody, Bcn S.L.) y para detectar la actividad de las mitocondrias se utilizó *Mitotracker deep red* (M22426, Invitrogen S.A). El equipo utilizado fue el citómetro de flujo BD FACSCanto (BD Biosciences, CA) y las muestras se analizaron con el programa BD FACSDiva (BD Biosciences, CA).

Las muestras seminales crioconservadas en cada tratamiento fueron descongeladas en baño María a 37°C durante 30 segundos. Se utilizaron dos tipos de suspensión de espermatozoides: la primera se incubó durante 10 minutos en PBS con las sondas fluorescentes y la segunda fue sometida al test hipoosmótico durante 20 minutos y posteriormente incubada con las sondas fluorescentes durante 10 minutos. En ambos casos, las suspensiones espermáticas fueron diluidas en PBS hasta alcanzar una concentración final de 1×10^6 espermatozoides/mL.

Las concentraciones finales utilizadas fueron de 1 nM de SYBR-14 (diluido en DMSO), 1.5 μM de IP, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de solución PE-PNA (1 mg/ml de solución stock en una solución compuesta de 3.0 M de sulfato de amonio, 50 mM de fosfato de sodio y 0.05% de ácido de sodio, pH 7.0, y conteniendo 1 mM de iones $[\text{Ca}^{2+}]$ y $[\text{Mn}^{2+}]$) y 1.5 nM de *Mitotracker deep red* (diluido en DMSO). Todas las sondas fluorescentes fueron añadidas a

1 ml de semen diluido. Las muestras fueron mezcladas e incubadas a 37°C durante 10 minutos y remezcladas justo antes del análisis. Seguidamente, la suspensión de espermatozoides teñidos fue pasada a través del citómetro de flujo. Las sondas fluorescentes SYBR-14, PE e IP fueron excitadas en el citómetro de flujo con el láser azul de estado sólido a 488 nm, para la excitación del Mitotracker deep red se utilizó el láser rojo de He/Ne a 633 nm. Las células no viables, positivas a IP y señal fluorescente roja se detectaron usando el detector con filtro 679LP (detecta fotones emitidos a más de 670 nm de longitud de onda). Las células vivas, positivas a SYBR-14 y con señal fluorescente verde fueron detectadas usando el detector con filtro 530/30BP (detecta fotones emitidos en el rango 515-545 nm de longitud de onda). Las células con daño acrosomal fueron teñidas positivamente por PE-PNA y esta señal fluorescente naranja fue detectada usando el detector con filtro 585/42BP (detecta fotones emitidos en el rango 564-650 nm). El estatus funcional de la mitocondria fue detectado con Mitotracker deep red usando un detector con filtro 660/20BP. Después de la evaluación se identificaron ocho poblaciones espermáticas: vivos con actividad mitocondrial y acrosoma intacto (VAI), vivos con actividad mitocondrial y acrosoma dañado (VAD), vivos sin actividad mitocondrial y acrosoma intacto (VSI), vivos sin actividad mitocondrial y acrosoma dañado (VSD), muertos con actividad mitocondrial y acrosoma intacto (MAI), muertos con actividad mitocondrial y acrosoma dañado (MAD), muertos sin actividad mitocondrial y acrosoma intacto (MSI) y muertos sin actividad mitocondrial y acrosoma dañado (MSD).

Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el procedimiento GLM (ANOVA) de SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.), en un diseño factorial, teniendo como factor la edad (1 año vs 2 años), tipo de yema de huevo (3 categorías), lavado/no lavado (2 categorías). Se realizó 6 repeticiones por unidad experimental. Cuando las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$), se realizó el test de Bonferroni de comparación de medias a posteriori. La normalidad y homogeneidad de varianza de los parámetros espermáticos se comprobaron con el tests de Kolmogorv-Smirnov y Levene. Las variables dependientes que

no cumplieron con los supuestos de igualdad de varianza y distribución normal fueron sometidas a una transformación arcoseno, antes del análisis estadístico.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos tras el análisis seminal de la mezcla de eyaculados frescos parecen indicar que la edad de los sementales es un factor determinante en todos los parámetros de calidad seminal evaluados, siendo superiores en aquellas muestras procedentes de moruecos de 2 años con relación a las obtenidas de machos de 1 año con valores significativamente diferentes en la concentración seminal ($3.520 \pm 248.6 \times 10^6$ vs $2.996 \pm 105.2 \times 10^6$ espermatozoides/mL, $p < 0.001$), en el porcentaje de viabilidad estimada por E/N (87.4 ± 1.0 vs 74.9 ± 3.2 ; $p < 0.004$) y de integridad funcional de sus membranas tras la prueba de HOST (62.3 ± 1.6 vs 30.4 ± 4.8 ; $p < 0.0001$) y sin diferencias significativas en la motilidad masal (2.8 ± 0.2 vs 2.3 ± 0.1 ; $p < 0.062$) y anomalías espermáticas (26.5 ± 3.2 vs 28.5 ± 3.7). De la misma manera, tras la refrigeración, tanto en los parámetros de viabilidad como los de integridad funcional de la membrana plasmática (HOST), se aprecia el mismo efecto de la edad ($p < 0.0001$), independientemente del tratamiento, con valores siempre superiores significativamente en las muestras procedentes de moruecos de 2 años, tal y como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Efecto de la edad del morueco, del tipo de yema de huevo como crioprotector y de la eliminación o no del plasma seminal mediante centrifugación (lavado) en la viabilidad espermática e integridad funcional de la membrana plasmática analizada mediante HOST tras la refrigeración (media \pm es).

Tratamiento/Edad	Viabilidad		Integridad funcional membrana (HOST)	
	1 año	2 años	1 año	2 años
L-YHF	74.8 \pm 2.6 ^{a1}	92.6 \pm 1.2 ^{a2}	38.2 \pm 3.5 ^{ab1}	54.2 \pm 2.8 ^{a2}
L-YHP	63.9 \pm 4.3 ^{bc1}	85.1 \pm 1.9 ^{ab2}	41.9 \pm 3.1 ^{c1}	60.1 \pm 2.8 ^{b2}
L-YHC	66.1 \pm 1.4 ^{b1}	83.9 \pm 2.1 ^{b2}	38.2 \pm 5.4 ^{ab1}	59.5 \pm 2.5 ^{b2}
YHF	56.0 \pm 4.8 ^{d1}	81.6 \pm 2.3 ^{b2}	32.8 \pm 3.5 ^{a1}	52.6 \pm 3.8 ^{ac2}
YHP	58.4 \pm 3.9 ^{cd1}	81.9 \pm 3.0 ^{b2}	28.4 \pm 2.6 ^{a1}	56.1 \pm 2.3 ^{ab2}
YHC	58.4 \pm 3.7 ^{cd1}	73.7 \pm 2.9 ^{c2}	32.1 \pm 3.2 ^{a1}	48.5 \pm 3.9 ^{c2}

^{a,d}Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre tratamientos dentro de la misma edad y parámetro de calidad seminal. ^{1,2}diferentes números representan diferencias significativas entre edades (1 vs 2 años) dentro del mismo tratamiento y parámetro de calidad seminal. **L-YHF**: espermatozoides lavados y conservados en yema de huevo fresco, **L-YHP**: lavados y en yema de huevo en polvo, **L-YHC**: lavados y en yema de huevo clarificada, **YHF**: espermatozoides sin lavar y conservados en yema de huevo fresco, **YHP**: sin lavar y en yema de huevo en polvo y **YHC**: sin lavar y en yema de huevo clarificada.

Al comparar los valores de viabilidad de los diferentes tratamientos, se observó un significativo efecto del lavado o eliminación del plasma seminal ($p < 0.0001$), presentando valores superiores en la viabilidad de los espermatozoides lavados y refrigerados durante 4 horas, tanto cuando los individuos donantes contaban con 1 como con 2 años de edad, aunque no siempre existieran diferencias significativas entre los distintos tratamientos, especialmente en los resultados obtenidos en el 2º año. Cabe destacar que, una vez lavados los espermatozoides y refrigerados, la yema de huevo fresca proporcionó valores significativamente superiores de viabilidad tanto en el primer año (74.8 \pm 2.6 %) como en el segundo (92.6 \pm 1.2 %) respecto al resto de tratamientos, aunque en el segundo año no se diferenciara significativamente de la yema de huevo en polvo (85.1 \pm 1.9 %). Tampoco se observó un importante efecto del tipo de yema de huevo en los espermatozoides refrigerados en presencia de plasma seminal (no lavados), a excepción de los resultados

obtenidos con la yema de huevo clarificada en donantes de 2 años donde la viabilidad fue significativamente inferior al resto de tratamiento de refrigeración.

Respecto a la capacidad de resistencia al shock hipoosmótico, solamente una vez lavados los espermatozoides y refrigerados, la yema de huevo en polvo proporcionó valores significativamente superiores de viabilidad tras el HOST, tanto el primer año (41.9 ± 3.1 %) como en el segundo (60.1 ± 2.8 %), respecto al resto de tratamientos, aunque en el segundo año no se diferenciara significativamente de la obtenida con la yema de huevo clarificada (59.5 ± 2.5 %) y de la obtenida con yema de huevo en polvo en espermatozoides no lavados (56.1 ± 2.3 %). Únicamente los espermatozoides refrigerados en presencia de plasma seminal y yema de huevo clarificada en el segundo año presentaron a su vez diferencias significativas con el resto de tratamientos, a excepción de lo observado con la YH fresco, también en presencia de plasma seminal.

El análisis de los distintos parámetros cinéticos obtenidos mediante el sistema ISAS® de las distintas suspensiones espermáticas sometidas a estudio (Tabla 2.) parece indicar un escaso efecto de la edad del donante en el porcentaje de espermatozoides que se mueven de forma progresiva tras la refrigeración, ya que no se observó ninguna diferencia significativa en este parámetro en las muestras de un año respecto al siguiente en ninguno de los tratamientos. Por lo que hace referencia al porcentaje total de motilidad espermática, la edad influyó de manera desigual según el protocolo de conservación utilizado, siendo significativamente superior en el segundo año sólo en el caso de espermatozoides (lavados y no lavados) refrigerados en yema de huevo en polvo y en espermatozoides lavados conservados en yema de huevo clarificada.

Sin embargo, en todos los tratamientos utilizados se observó un incremento significativo en el resto de parámetros cinéticos estudiados, a excepción de la amplitud lateral del desplazamiento de la cabeza (ALH), cuando los donantes de semen eran un año mayor. No obstante, hubieron algunas excepciones como la velocidad curvilínea (VCL) de los espermatozoides refrigerados en presencia de plasma seminal en los tres tipos de yema usados y la frecuencia de batido (BCF) de los espermatozoides lavados y refrigerados en

yema de huevo en polvo o clarificada, donde no se apreció ningún efecto de la edad. Asimismo se observaron diferencias significativas en la amplitud lateral del desplazamiento de la cabeza (ALH), disminuyendo en el segundo año en todos los tratamientos, excepto en los espermatozoides lavados y refrigerados en YHP y en los no lavados y conservados en YHC, aunque la tendencia parecía mantenerse.

Respecto a los distintos protocolos de refrigeración utilizados durante el primer año no se aprecia un marcado efecto del tipo de yema usado en la motilidad espermática total, salvo una disminución en este parámetro cuando los espermatozoides fueron refrigerados en YHP sin haber eliminado previamente el plasma seminal. Tampoco se observaron diferencias significativas entre tratamientos en el segundo año, sólo un descenso en la motilidad total de los espermatozoides no lavados y refrigerados en YHF y en YHC. No obstante, el análisis estadístico de los datos muestra una interacción ($p < 0.05$) entre la edad y tipo de yema de huevo en este parámetro de motilidad total.

Por otra parte, sí se observa como el tipo de yema usada afecta significativamente al porcentaje de motilidad progresiva cuando los espermatozoides son lavados, siendo superior en muestras refrigeradas en YHF, un poco inferior en YHC y obteniendo los valores más bajos en YHP, tanto en el primero como en el segundo año de edad de los donantes. En cambio, en espermatozoides sin lavar, el tipo de yema no parece afectar este tipo de movimiento ya que no se observaron diferencias entre tratamientos en ninguna de las edades testadas, a excepción del resultado obtenido el primer año con espermatozoides refrigerados en YHP que fue significativamente inferior.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de espermatozoides refrigerados de morueco según el tipo de yema de huevo usado como crioprotector, la edad del donante y la eliminación o no del plasma seminal mediante lavado (media \pm es).

P. cinéticos	Edad (años)	L-YHF	L-YHP	L-YHC	YHF	YHP	YHC
MT ¹ (%)	1	80.2 \pm 1.9 ^a	75.7 \pm 2.0 ^{a1}	78.9 \pm 4.3 ^{a1}	77.9 \pm 3.1 ^a	66.1 \pm 3.5 ^{b1}	74.8 \pm 4.5 ^a
	2	84.5 \pm 2.9 ^{ab}	86.7 \pm 2.3 ^{a2}	84.8 \pm 2.0 ^{ab2}	76.6 \pm 1.6 ^c	79.6 \pm 4.3 ^{bc2}	77.6 \pm 3.3 ^c
MP (%)	1	55.1 \pm 2.6 ^a	38.2 \pm 2.7 ^b	43.9 \pm 4.5 ^c	47.9 \pm 3.2 ^c	37.7 \pm 1.5 ^b	40.9 \pm 6.5 ^{bc}
	2	55.8 \pm 3.3 ^a	36.0 \pm 3.0 ^b	46.4 \pm 3.2 ^c	46.7 \pm 2.5 ^c	41.2 \pm 5.7 ^c	39.4 \pm 3.3 ^{bc}
VCL(μ m/s)	1	101.2 \pm 2.0 ^{a1}	92.1 \pm 2.9 ^{b1}	101.3 \pm 4.5 ^{a1}	111.5 \pm 4.3 ^c	111.9 \pm 5.2 ^c	103.6 \pm 10.2 ^{abc}
	2	113.2 \pm 5.4 ^{a2}	98.4 \pm 4.0 ^{b2}	113.6 \pm 4.2 ^{a2}	119.7 \pm 5.9 ^a	106.3 \pm 6.9 ^{ab}	115.1 \pm 4.2 ^a
VSL(μ m/s)	1	40.3 \pm 3.8 ^{ab1}	36.2 \pm 2.6 ^{a1}	38.9 \pm 1.9 ^{ab1}	42.0 \pm 2.8 ^{b1}	39.0 \pm 2.5 ^{ab1}	40.2 \pm 5.3 ^{ab1}
	2	71.5 \pm 4.3 ^{ab2}	53.8 \pm 4.0 ^{c2}	67.8 \pm 2.2 ^{bd2}	74.9 \pm 4.9 ^{a2}	61.1 \pm 6.8 ^{d2}	65.9 \pm 3.1 ^{d2}
VAP(μ m/s)	1	59.8 \pm 4.0 ^{ab1}	52.8 \pm 3.3 ^{a1}	56.4 \pm 3.1 ^{a1}	65.3 \pm 2.6 ^{b1}	61.9 \pm 3.0 ^{b1}	60.0 \pm 6.2 ^{b1}
	2	90.1 \pm 5.0 ^{a2}	76.0 \pm 4.5 ^{b2}	90.1 \pm 3.0 ^{a2}	94.4 \pm 4.5 ^{a2}	81.1 \pm 6.5 ^{bc2}	88.8 \pm 3.5 ^{ac2}
LIN (%)	1	42.9 \pm 2.2 ^{a1}	44.9 \pm 2.8 ^{a1}	41.2 \pm 1.5 ^{ab1}	39.9 \pm 1.9 ^{ab1}	37.3 \pm 1.9 ^{b1}	40.4 \pm 2.1 ^{ab1}
	2	62.2 \pm 1.3 ^{a2}	53.3 \pm 2.4 ^{b2}	59.2 \pm 1.2 ^{ac2}	60.9 \pm 1.8 ^{a2}	55.3 \pm 3.5 ^{bc2}	55.9 \pm 0.9 ^{b2}
STR (%)	1	66.6 \pm 1.8 ^{a1}	67.3 \pm 1.6 ^{a1}	68.1 \pm 1.4 ^{a1}	64.0 \pm 2.1 ^{a1}	63.1 \pm 2.5 ^{a1}	65.4 \pm 2.6 ^{a1}
	2	77.4 \pm 1.4 ^{a2}	69.6 \pm 2.0 ^{b2}	73.3 \pm 1.1 ^{c2}	76.4 \pm 1.7 ^{a2}	71.9 \pm 3.2 ^{bc2}	71.9 \pm 1.1 ^{c2}
ALH(μ m/s)	1	4.2 \pm 0.2 ^{a1}	3.8 \pm 0.3 ^a	4.2 \pm 0.3 ^{a1}	4.8 \pm 0.2 ^{b1}	4.9 \pm 0.2 ^{b1}	4.3 \pm 0.4 ^a
	2	3.4 \pm 0.1 ²	3.4 \pm 0.1	3.5 \pm 0.2 ²	3.7 \pm 0.3 ²	3.5 \pm 0.2 ²	3.8 \pm 0.2
BCF (Hz)	1	7.6 \pm 0.4 ¹	7.9 \pm 0.3	7.9 \pm 0.4	7.4 \pm 0.4 ¹	7.2 \pm 0.5 ¹	7.9 \pm 0.9 ¹
	2	10.0 \pm 0.8 ^{a2}	7.5 \pm 0.4 ^b	8.6 \pm 0.5 ^c	9.3 \pm 0.9 ^{ac2}	9.1 \pm 0.9 ^{ac2}	8.9 \pm 0.6 ^{c2}

^{a,d} Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre tratamientos (**L-YHF**: espermatozoides lavados y conservados en yema de huevo fresco, **L-YHP**: lavados y en yema de huevo en polvo, **L-YHC**: lavados y en yema de huevo clarificada, **YHF**: espermatozoides sin lavar y conservados en yema de huevo fresco, **YHP**: sin lavar y en yema de huevo en polvo y **YHC**: sin lavar y en yema de huevo clarificada) y ^{1,2} diferentes números representan diferencias significativas entre edades (1 vs 2 años) dentro de los parámetros cinéticos (**MT**: motilidad total, **MP**: motilidad progresiva, **VCL**: velocidad curvilínea, **VSL**: velocidad rectilínea, **VAP**: velocidad media, **LIN**: índice de linealidad, **STR**: índice de rectitud, **ALH**: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, **BCF**: frecuencia de batida). Numero de espermatozoides = 15.233¹

En cuanto a los diferentes descriptores del movimiento espermático existen numerosas diferencias significativas dependiendo del tipo de yema usado, de la presencia o

no del plasma seminal y de la edad del donante. Concretamente, en los espermatozoides lavados se observa un descenso de la VCL cuando son refrigerados con YHP en las dos edades testadas, mientras que en los espermatozoides no lavados de donantes de 1 año, a pesar de presentar valores de VCL superiores a la de los espermatozoides lavados, no se aprecia ningún efecto del tipo de yema. De hecho, los valores de VCL obtenidos en los seis protocolos estudiados en el segundo año no se diferencian significativamente entre ellos, a excepción de la menor VCL de los espermatozoides lavados y refrigerados en YHP, aunque ésta tampoco se diferencia de la VCL presentada en espermatozoides no lavados y refrigerados en este mismo medio a base de YHP. Respecto a la velocidad rectilínea (VSL), los valores más altos en los 2 edades testadas se observaron en aquellos espermatozoides lavados y no lavados que fueron refrigerados en YHF, mientras que los valores más bajos se obtuvieron en aquellos espermatozoides conservados en YHP, siendo significativamente inferiores en los espermatozoides lavados y procedentes de machos de 2 años, lo que a su vez se reflejó en un índice de linealidad (%LIN) también inferior (53.3 ± 2.4).

Donde no se apreció ningún efecto del protocolo de conservación utilizado fue en el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) de los espermatozoides de individuos de 2 años, aunque en el primer año sí se encontraron diferencias entre los valores obtenidos en los tratamientos sin lavado previo donde se había utilizado YHF y YHP. Tampoco se apreciaron diferencias entre tratamientos en la frecuencia del batido (BCF) de los espermatozoides obtenidos durante el primer año. Sin embargo, en el segundo año este parámetro fue significativamente menor en aquellos espermatozoides lavados y conservados en YHP respecto al resto de tratamientos.

Al analizar estos mismos parámetros cinéticos en los espermatozoides tras la descongelación (Tabla 3.), se observa como la edad afectó sobre la motilidad total de manera similar a lo observado en los espermatozoides refrigerados, es decir, siendo significativamente superior en el segundo año sólo en el caso de espermatozoides (lavados y no lavados) congelados en yema de huevo en polvo y en espermatozoides lavados conservados en yema de huevo clarificada. En cambio, a diferencia de lo observado en los espermatozoides refrigerados, la edad tuvo un significativo efecto sobre la motilidad

progresiva de los espermatozoides tras la descongelación, presentando valores superiores en el segundo año en todos los protocolos estudiados. También, y tal como se observó tras la refrigeración, en los espermatozoides descongelados, independientemente del tratamiento de conservación utilizado, hubo un incremento significativo en el resto de parámetros cinéticos estudiados cuando los donantes de semen eran un año mayor, a excepción de la amplitud lateral del desplazamiento de la cabeza (ALH). Solamente en el caso del índice de rectitud (%STR) en espermatozoides lavados y no lavados congelados en YHC y en espermatozoides no lavados y criopreservados en YHP este efecto no fue significativo, aunque la tendencia parecía mantenerse. Cabe destacar que la edad no influyó en los valores de ALH de los espermatozoides descongelados en ninguno de los protocolos analizados. Por otra parte, ni el tipo de yema usado ni el proceso de lavado del semen produjo ningún efecto significativo sobre la motilidad espermática total, aunque los valores de este parámetro fueron ligeramente superiores en aquellos tratamientos donde se eliminó el plasma seminal previamente a su conservación, tanto con espermatozoides procedentes de individuos de 1 año como de 2 años de edad.

En cuanto a los diferentes descriptores del movimiento espermático existen numerosas diferencias significativas dependiendo del tipo de yema usado, de la presencia o no del plasma seminal y de la edad del donante. De nuevo, en los espermatozoides lavados se observa un descenso de la VCL cuando son congelados con YHP en las dos edades testadas, mientras que en los espermatozoides no lavados, a pesar de presentar valores de VCL generalmente inferiores a la de los espermatozoides lavados, no se aprecia ningún efecto del tipo de yema. Respecto a la velocidad rectilínea (VSL), ésta no varió significativamente entre los distintos tratamientos de los espermatozoides descongelados procedentes de machos de 1 año, a excepción de cuando se usó YHP y en presencia de plasma seminal que fue superior al resto, aunque sin diferenciarse de las VSL presentadas por los espermatozoides que había sido conservados en YHF. Sin embargo, en el segundo año, este parámetro fue significativamente superior en aquellos espermatozoides que habían sido preservados en ausencia del plasma seminal y con YHF en el medio, sin diferenciarse de la VSL observada en espermatozoides lavados y congelados en un medio a base de

YHC, mientras que la presentada por espermatozoides lavados y conservados en YHP difirió de ambas.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de espermatozoides congelados-descongelados de morueco según el tipo de yema de huevo usado como crioprotector, la edad del donante y la eliminación o no del plasma seminal mediante lavado (media \pm es).

P. cinéticos	Edad (años)	L-YHF	L-YHP	L-YHC	YHF	YHP	YHC
MT (%)	1	46.7 \pm 8.8	42.5 \pm 3.6 ¹	41.6 \pm 1.4 ¹	38.9 \pm 6.9	39.1 \pm 6.8 ¹	36.2 \pm 7.2
	2	51.4 \pm 4.8	52.4 \pm 3.9 ²	49.2 \pm 4.9 ²	39.9 \pm 7.1	51.5 \pm 2.5 ²	39.8 \pm 4.4
MP (%)	1	20.1 \pm 3.2 ^{a1}	16.7 \pm 1.7 ^{b1}	15.0 \pm 1.6 ^{b1}	17.9 \pm 1.2 ^{ab1}	16.3 \pm 2.8 ^{b1}	13.9 \pm 2.5 ^{b1}
	2	29.8 \pm 2.4 ^{a2}	21.9 \pm 2.8 ^{b2}	22.2 \pm 3.6 ^{b2}	22.5 \pm 3.9 ^{b2}	27.9 \pm 4.5 ^{a2}	15.1 \pm 2.3 ^{c2}
VCL(μ m/s)	1	69.4 \pm 5.6 ^{a1}	58.4 \pm 4.8 ^{b1}	63.0 \pm 2.3 ^{b1}	61.7 \pm 3.3 ^{b1}	68.8 \pm 6.1 ^{ab1}	59.1 \pm 6.7 ^{b1}
	2	97.8 \pm 5.8 ^{a2}	86.9 \pm 2.6 ^{b2}	96.3 \pm 3.7 ^{a2}	83.6 \pm 5.2 ^{b2}	83.4 \pm 5.9 ^{b2}	82.9 \pm 5.5 ^{b2}
VSL(μ m/s)	1	24.2 \pm 2.8 ^{ab1}	21.4 \pm 2.2 ^{a1}	23.4 \pm 1.3 ^{a1}	25.9 \pm 1.0 ^{ab1}	27.2 \pm 3.9 ^{b1}	21.3 \pm 3.4 ^{a1}
	2	58.8 \pm 7.2 ^{a2}	41.3 \pm 2.2 ^{bc2}	49.3 \pm 4.2 ^{ad2}	47.6 \pm 4.9 ^{bd2}	44.7 \pm 7.9 ^{bd2}	37.9 \pm 5.1 ^{c2}
VAP(μ m/s)	1	37.8 \pm 3.5 ^{a1}	33.2 \pm 2.9 ^{b1}	33.9 \pm 1.7 ^{b1}	35.4 \pm 1.3 ^{ab1}	39.0 \pm 4.0 ^{a1}	32.7 \pm 3.9 ^{b1}
	2	73.2 \pm 6.8 ^{a2}	59.2 \pm 2.1 ^{bc2}	65.6 \pm 4.4 ^{ab2}	58.7 \pm 4.6 ^{bc2}	59.8 \pm 7.4 ^{bc2}	52.8 \pm 5.1 ^{c2}
LIN (%)	1	36.4 \pm 1.0 ^{a1}	39.1 \pm 1.0 ^{b1}	39.6 \pm 2.5 ^{b1}	44.2 \pm 2.2 ^{c1}	40.3 \pm 1.9 ^{bc1}	38.9 \pm 1.7 ^{ab1}
	2	58.1 \pm 3.7 ^{a2}	47.8 \pm 2.1 ^{b2}	49.9 \pm 2.4 ^{bc2}	53.9 \pm 2.9 ^{c2}	51.5 \pm 4.8 ^{bc2}	43.8 \pm 2.5 ^{d2}
STR (%)	1	61.9 \pm 2.3 ^{a1}	63.5 \pm 1.3 ^{ab1}	66.3 \pm 2.3 ^b	70.3 \pm 1.2 ^{c1}	65.9 \pm 2.6 ^b	63.1 \pm 2.8 ^{ab}
	2	77.1 \pm 2.6 ^{a2}	68.2 \pm 1.4 ^{b2}	69.6 \pm 1.6 ^b	76.3 \pm 2.6 ^{ac2}	71.4 \pm 3.8 ^{bc}	64.9 \pm 1.8 ^d
ALH(μ m/s)	1	3.2 \pm 0.2	2.8 \pm 0.2	2.9 \pm 0.1	2.8 \pm 0.1	3.1 \pm 0.2	2.9 \pm 0.3
	2	3.1 \pm 0.6 ^{ab}	3.3 \pm 0.2 ^{ab}	3.6 \pm 0.1 ^b	3.0 \pm 0.1 ^a	3.1 \pm 0.1 ^a	3.3 \pm 0.1 ^{ab}
BCF (Hz)	1	6.4 \pm 0.9 ^{ab1}	6.2 \pm 0.6 ^{ac1}	6.9 \pm 0.5 ^{ab1}	7.5 \pm 0.7 ^{b1}	6.7 \pm 0.6 ^{ab1}	5.5 \pm 0.8 ^{c1}
	2	10.8 \pm 0.6 ^{a2}	9.0 \pm 0.2 ^{b2}	8.7 \pm 0.5 ^{bc2}	9.9 \pm 0.5 ^{a2}	8.9 \pm 0.7 ^{bc2}	8.1 \pm 0.8 ^{c2}

^{a,d} Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre tratamientos (**L-YHF**: espermatozoides lavados y conservados en yema de huevo fresco, **L-YHP**: lavados y en yema de huevo en polvo, **L-YHC**: lavados y en yema de huevo clarificada, **YHF**: espermatozoides sin lavar y conservados en yema de huevo fresco, **YHP**: sin lavar y en yema de huevo en polvo y **YHC**: sin lavar y en yema de huevo clarificada) y ^{1,2} diferentes números representan diferencias significativas entre edades (1 vs 2 años) dentro de los parámetros cinéticos (**MT**: motilidad total, **MP**: motilidad progresiva, **VCL**: velocidad curvilínea, **VSL**: velocidad rectilínea, **VAP**: velocidad media, **LIN**: índice de linealidad,

STR: índice de rectitud, **ALH:** amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, **BCF:** frecuencia de batida). Numero de espermatozoides =7.592

También los índices de linealidad (%LIN) presentaron valores significativamente diferentes dependiendo del tipo de yema y de la eliminación o no del plasma seminal, pero sin seguir una tendencia clara, ya que el tratamiento (YHF y lavado) que proporcionó el primer año los valores más bajos de linealidad ($36.4 \pm 1.0\%$), fue el mismo que al siguiente año proporcionó los valores más altos ($58.1 \pm 3.7\%$), diferenciándose significativamente del resto. Donde no se apreció ningún efecto del protocolo de conservación utilizado fue en el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) de los espermatozoides descongelados, a excepción del presentado en los espermatozoides lavados y conservados en YHC que fue significativamente superior al obtenido en espermatozoides conservados en YHF y en YHP en presencia de plasma seminal. En cuanto a la frecuencia de batido, las diferencias significativas encontradas tampoco muestran un efecto concreto del tipo de yema usado o del proceso de eliminación del plasma, especialmente en el primer año. No obstante, cuando los espermatozoides procedieron de machos de 2 años, este parámetro aumentó significativamente cuando eran conservados en YHF, tanto lavados como sin lavar.

De los estudios morfométricos de la cabeza de 9.850 espermatozoides congelados-descongelados mediante el sistema ISAS, los valores de dimensión y forma de la cabeza obtenidos dependiendo del tipo de yema de huevo utilizado en su conservación, de la edad del donante y de la eliminación o no del plasma seminal mediante lavado no mostraron ningún efecto significativo, obteniéndose los siguientes valores medios de longitud de la cabeza ($8.4 \pm 0.0 \mu\text{m}$), ancho ($4.9 \pm 0.0 \mu\text{m}$), área ($34.2 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$), perímetro ($23.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$), elipticidad (1.7 ± 0.0), elongación (0.2 ± 0.0), rugosidad (0.8 ± 0.0) y regularidad (0.9 ± 0.0).

El análisis de los parámetros obtenidos mediante citometría de flujo (Tabla 4.) indica que la edad afectó significativamente ($p < 0.0001$) sobre la viabilidad, integridad acrosomal y actividad mitocondrial de los espermatozoides tras la descongelación, presentando valores superiores en el segundo año en todo los tratamientos estudiados, aunque sin influir en el porcentaje de células vivas con acrosoma reaccionado.

También la eliminación del plasma seminal produjo un significativo efecto en la supervivencia espermática tras la descongelación, observándose valores superiores de espermatozoides viables en aquellas muestras que habían sido centrifugadas previamente a su congelación, independientemente del tipo de YH utilizado y de la edad de los donantes. Sin embargo, también se observa una tendencia, en ambas edades estudiadas, a presentar menores índices de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado en aquellos espermatozoides conservados en presencia de plasma seminal o bien lavados pero conservados con YH en polvo. Cabe destacar la alta incidencia de espermatozoides con baja actividad mitocondrial y con acrosoma reaccionado cuando los espermatozoides fueron congelados en YH clarificada, especialmente si habían sido lavados previamente.

Tabla 4. Parámetros de calidad espermática de espermatozoides descongelados según el tipo de yema de huevo, la edad del morueco y la eliminación o no del plasma seminal (media \pm es).

Parámetros	Edad (años)	L-YHF	L-YHP	L-YHC	YHF	YHP	YHC
Viabilidad	1	34.5 \pm 4.8 ^{a1}	36.5 \pm 2.5 ^{a1}	33.8 \pm 2.6 ^{a1}	21.4 \pm 1.7 ^{b1}	23.1 \pm 3.7 ^{b1}	24.3 \pm 2.7 ^{b1}
	2	47.8 \pm 1.5 ^{a2}	48.9 \pm 3.2 ^{a2}	45.3 \pm 3.5 ^{a2}	33.9 \pm 3.9 ^{b2}	37.1 \pm 1.6 ^{b2}	29.8 \pm 5.1 ^{b2}
VAI	1	28.3 \pm 3.5 ^{ab1}	31.9 \pm 2.4 ^{b1}	27.3 \pm 1.3 ^{a1}	18.2 \pm 2.1 ^{c1}	20.4 \pm 2.8 ^{c1}	20.8 \pm 2.3 ^{c1}
	2	39.4 \pm 1.8 ^{a2}	41.7 \pm 3.0 ^{a2}	36.5 \pm 2.6 ^{a2}	29.6 \pm 3.9 ^{bc2}	32.3 \pm 1.9 ^{b2}	24.0 \pm 4.5 ^{c2}
VAD	1	3.7 \pm 0.2 ^{a1}	1.3 \pm 0.2 ^{b1}	3.2 \pm 0.8 ^{a1}	2.3 \pm 0.4 ^{ab1}	1.0 \pm 0.2 ^{b1}	1.7 \pm 0.5 ^{b1}
	2	4.3 \pm 0.6 ^{a1}	2.2 \pm 0.2 ^{ab1}	3.5 \pm 0.5 ^{a1}	2.4 \pm 0.1 ^{ab1}	2.2 \pm 0.3 ^{ab1}	1.3 \pm 0.2 ^{b1}
VSI	1	2.0 \pm 0.6 ^{a1}	3.2 \pm 0.3 ^{b1}	2.0 \pm 0.4 ^{a1}	0.7 \pm 0.2 ^{c1}	1.6 \pm 0.6 ^{a1}	2.1 \pm 0.3 ^{a1}
	2	3.5 \pm 0.5 ^{ab2}	4.7 \pm 0.8 ^{a2}	3.9 \pm 0.6 ^{a2}	1.7 \pm 0.4 ^{c2}	2.5 \pm 0.9 ^{bc2}	4.1 \pm 2.4 ^{ab2}
VSD	1	0.5 \pm 0.3 ^{b1}	0.1 \pm 0.0 ^{b1}	1.3 \pm 1.0 ^{a1}	0.2 \pm 0.1 ^{b1}	0.1 \pm 0.0 ^{b1}	0.1 \pm 0.2 ^{b1}
	2	0.6 \pm 0.1 ^{a1}	0.2 \pm 0.1 ^{b1}	1.4 \pm 0.6 ^{c1}	0.2 \pm 0.1 ^{b1}	0.1 \pm 0.0 ^{b1}	0.4 \pm 0.3 ^{ab1}
Integridad Acrosomal	1	54.3 \pm 2.7 ^{a1}	58.0 \pm 2.9 ^{a1}	56.5 \pm 3.0 ^{a1}	43.8 \pm 3.7 ^{b1}	44.0 \pm 3.1 ^{b1}	40.2 \pm 2.6 ^{b1}
	2	66.6 \pm 2.3 ^{a2}	65.0 \pm 3.6 ^{a2}	65.2 \pm 3.9 ^{a2}	50.2 \pm 3.9 ^{b2}	51.9 \pm 2.3 ^{b2}	49.8 \pm 2.0 ^{b2}

^{a,d}Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre tratamientos (**L-YHF**: espermatozoides lavados y conservados en yema de huevo fresco, **L-YHP**: lavados y en yema de huevo en polvo, **L-YHC**: lavados y en yema de huevo clarificada, **YHF**: espermatozoides sin lavar y conservados en yema de huevo fresco, **YHP**: sin lavar y en yema de

huevo en polvo y **YHC**: sin lavar y en yema de huevo clarificada) y ^{1,2}diferentes número representan diferencias significativas entre edades (1 vs 2 años) dentro de los parámetros (**viabilidad**, **VAI**: vivos con actividad mitocondrial y acrosoma intacto, **VAD**: vivos con actividad mitocondrial y con acrosoma dañado, **VSI**: vivos sin actividad mitocondrial y acrosoma intacto, **VSD**: vivos sin actividad mitocondrial y con acrosoma dañado, **Integridad Arosomal**: vivos y muertos con acrosoma intacto).

Respecto a la capacidad de resistencia osmótica de los espermatozoides descongelados (Tabla 5.), se aprecia un comportamiento similar a lo observado tras la descongelación pero sin haber sido sometidos a una incubación en un medio hipoosmótico. Destacar aquí también la alta incidencia de espermatozoides viables con acrosoma íntegro pero con baja actividad mitocondrial en el caso de congelarlos una vez lavados en un medio a base de YHP y habiéndolos sometido ($VSI = 4,8 \pm 0,6\%$) o no a un shock hiposomótico ($VSI = 4.7 \pm 0.8 \%$), a pesar de no diferenciarse en este último caso de algunos de los tratamientos.

Tabla 5. Parámetros de calidad espermática de los espermatozoides descongelados e incubados en medio hipoosmótico, según el tipo de yema de huevo, la edad del morueco y la eliminación o no del plasma seminal (media \pm es).

Parámetros	Edad (años)	L-YHF	L-YHP	L-YHC	YHF	YHP	YHC
Viabilidad	1	33.2 \pm 2.4 ^{a1}	34.7 \pm 1.9 ^{a1}	32.3 \pm 4.1 ^{a1}	23.0 \pm 1.4 ^{b1}	22.7 \pm 1.3 ^{b1}	24.9 \pm 0.8 ^{b1}
	2	43.5 \pm 1.1 ^{a2}	49.7 \pm 1.7 ^{b2}	44.1 \pm 3.8 ^{ab2}	31.6 \pm 1.9 ^{c2}	33.8 \pm 3.2 ^{c2}	30.2 \pm 3.3 ^{c2}
VAI	1	27.0 \pm 2.2 ^{a1}	30.7 \pm 2.4 ^{a1}	26.1 \pm 3.1 ^{a1}	19.7 \pm 1.3 ^{b1}	18.1 \pm 1.2 ^{b1}	21.7 \pm 1.1 ^{b1}
	2	36.3 \pm 2.0 ^{a2}	41.4 \pm 1.1 ^{b2}	36.0 \pm 2.7 ^{a2}	26.7 \pm 1.9 ^{c2}	28.6 \pm 4.2 ^{ac2}	25.1 \pm 2.7 ^{c1}
VAD	1	2.8 \pm 0.9 ^{a1}	1.2 \pm 0.4 ^{b1}	3.2 \pm 0.8 ^{a1}	1.5 \pm 0.4 ^{b1}	1.7 \pm 0.7 ^{b1}	1.2 \pm 0.4 ^{b1}
	2	3.9 \pm 0.6 ^{a1}	3.1 \pm 0.6 ^{a2}	4.1 \pm 0.5 ^{a1}	2.4 \pm 0.3 ^{b2}	1.4 \pm 0.6 ^{c1}	2.0 \pm 0.4 ^{bc1}
VSI	1	2.5 \pm 0.5 ^{a1}	2.7 \pm 0.4 ^{a1}	2.0 \pm 0.5 ^{ab1}	1.7 \pm 0.4 ^{b1}	2.6 \pm 0.7 ^{a1}	2.2 \pm 0.7 ^{ab1}
	2	2.7 \pm 0.4 ^{a1}	4.8 \pm 0.6 ^{b2}	2.8 \pm 0.9 ^{a1}	2.3 \pm 0.9 ^{a1}	3.6 \pm 0.9 ^{ab1}	2.9 \pm 0.6 ^{a1}
VSD	1	0.9 \pm 0.2 ^{a1}	0.2 \pm 0.1 ^{b1}	1.0 \pm 0.5 ^{a1}	0.1 \pm 0.2 ^{b1}	0.2 \pm 0.1 ^{b1}	0.2 \pm 0.1 ^{b1}
	2	0.6 \pm 0.3 ^{a1}	0.3 \pm 0.1 ^{a1}	1.2 \pm 0.4 ^{b1}	0.2 \pm 0.1 ^{a1}	0.2 \pm 0.1 ^{a1}	0.2 \pm 0.1 ^{a1}
Integridad Acrosomal	1	48.5 \pm 2.0 ^{a1}	49.1 \pm 3.0 ^{a1}	44.7 \pm 3.3 ^{a1}	32.2 \pm 1.3 ^{b1}	30.2 \pm 0.9 ^{b1}	31.9 \pm 3.7 ^{b1}
	2	57.8 \pm 3.4 ^{a2}	59.3 \pm 1.6 ^{a2}	55.3 \pm 5.3 ^{a2}	41.9 \pm 4.4 ^{b2}	39.6 \pm 7.6 ^{b2}	40.4 \pm 2.0 ^{b2}

^{a,d}Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre tratamientos (**L-YHF**: espermatozoides lavados y conservados en yema de huevo fresco, **L-YHP**: lavados y en yema de huevo en polvo, **L-YHC**: lavados y en yema de huevo clarificada, **YHF**: espermatozoides sin lavar y conservados en yema de huevo fresco, **YHP**: sin lavar y en yema de huevo en polvo y **YHC**: sin lavar y en yema de huevo clarificada) y ^{1,2}diferentes número representan diferencias significativas entre edades (1 vs 2 años) dentro de los parámetros (**viabilidad**, **VAI**: vivos con actividad mitocondrial y acrosoma intacto, **VAD**: vivos con actividad mitocondrial y con acrosoma dañado, **VSI**: vivos sin actividad mitocondrial y acrosoma intacto, **VSD**: vivos sin actividad mitocondrial y con acrosoma dañado, **Integridad Acrosomal**: vivos y muertos con acrosoma intacto).

DISCUSIÓN

Numerosos investigadores han demostrado que la yema de huevo en los diluyentes de criopreservación protegen a los espermatozoides de los mamíferos del shock por frío, y preservan la integridad de las membranas plasmática, acrosomal y mitocondrial, manteniendo la motilidad y fertilidad en espermatozoides de conejo (Hildebrandt y col., 2006), ciervo (Garde y col., 2008), toro (Wall y Foote, 1999), morueco (Salamon y Maxwell 1995; Ali y col., 2013) o macho cabrío (Cabrera y col., 2005). Sin embargo, la yema de huevo, a pesar de ser el crioprotector no penetrante más comúnmente usado por su capacidad de estabilizar la membrana del espermatozoide (Salamon y Maxwell, 2000), contiene sustancias que pueden interferir en el metabolismo celular reduciendo la motilidad espermática (Moussa y col., 2002), que junto con la heterogeneidad de su composición entre lotes de huevos y el potencial riesgo de contaminación microbiológica, hacen que la posibilidad de utilizar otras alternativas a la yema de huevo fresca sea muy deseable.

En el presente estudio, uno de los objetivos perseguidos ha sido comparar la capacidad crioprotectora de la yema de huevo fresca con la yema de huevo clarificada, la cual nos permite eliminar algunos de los componentes de la yema de huevo (por ej. gránulos) y concentrar la cantidad de LDL (Pace y Graham, 1974) y la yema de huevo en polvo, en donde la contaminación bacteriana es destruida por la pasteurización y nos permite respetar las leyes establecidas para el consumo humano. Así, tras estudiar los resultados obtenidos podemos afirmar que no se aprecian grandes diferencias entre ellas en lo que respecta a la protección de los espermatozoides durante el proceso de refrigeración y congelación. Cabe destacar que, una vez lavados los espermatozoides refrigerados, la yema de huevo fresca proporcionó valores significativamente superiores de viabilidad, tanto en el primer año como en el segundo, respecto al resto de tratamientos, aunque en el segundo año no se diferenciara significativamente de la yema de huevo en polvo. Además, una vez lavados los espermatozoides, la yema de huevo en polvo proporcionó valores significativamente superiores de viabilidad tras el HOST, tanto el primer año como en el segundo de edad de los donantes. Aunque desconocemos si el uso de los distintos tipos de yema de huevo en la conservación de los espermatozoides pudiera provocar marcados efectos en la fertilidad de las dosis conservadas.

En concreto, al analizar la viabilidad e integridad de la membrana plasmática y acrosomal o la actividad mitocondrial, así como la cantidad movimiento espermático o la morfometría de los espermatozoides descongelados no se apreció un marcado efecto debido al tipo de yema usado. De hecho, resultados similares ya habían sido reportados por Marco-Jimenez y col., (2004) al comparar yema de huevo en polvo con yema de huevo fresca en ovinos de la raza Guirra respecto a la integridad del acrosoma, aunque sí se detectó un incremento significativo en la motilidad total cuando los espermatozoides habían sido criopreservados en yema de huevo en polvo en comparación con la yema de huevo fresca. De igual manera, Wall y Foote, (1999) al comparar yema de huevo clarificada con yema de huevo fresca en la criopreservación de espermatozoides de toro tampoco observaron diferencias en la viabilidad y fertilidad espermática, mientras que Fernández-Santos y col., (2006) sí observaron una mejora en la calidad espermática cuando utilizaban yema de huevo clarificado en la criopreservación de espermatozoides del ciervo Ibérico. La explicación de estas diferencias entre especies se puede deber a las diferencias existentes en la composición de membrana plasmática, en el porcentaje de yema de huevo en el diluyente, en los aditivos incluidos, en el tiempo de refrigeración y/o en el método de congelación (Fernández-Santos y col., 2006; Waterhouse y col., 2006).

Sin embargo, en cuanto a la calidad del movimiento espermático observamos algunas diferencias significativas dependiendo del tipo de yema usado. Concretamente, la YH Fresco parece proporcionar un mayor porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, mientras que la YH en polvo provoca un descenso de la VCL, tanto en los espermatozoides refrigerados como descongelados en las dos edades estudiadas, disminuyendo de igual manera la VSL y LIN, especialmente en animales de 2 años cuando sus espermatozoides fueron conservados en YHP. Esta disminución de los parámetros cinéticos de los espermatozoides podría ser debida al aumento en la viscosidad del medio al utilizar la yema de huevo en polvo, tal y como también observaron Marco-Jiménez y col. (2004). Esta alta viscosidad del diluyente, después de la reconstitución de la YH en polvo en el medio de crioconservación, parece ser debida a que las altas temperaturas alcanzadas durante el proceso de pasteurización desnaturalizan las proteínas de la yema de huevo dándole esta mayor consistencia gelatinosa (Miranda y col., 2000). Así, teniendo en cuenta

este último aspecto, las diferencias entre los 3 tipos de tema de huevo en lo que se refiere a su capacidad de criopreservación de los espermatozoides del morueco podría considerarse pequeña o incluso despreciable.

En cambio, la eliminación del plasma seminal previa a la conservación de los espermatozoides y/o la edad de los moruecos donantes de semen sí parecen ejercer un mayor efecto en la viabilidad y funcionalidad espermática. Según nuestros resultados, el lavado mediante centrifugación del semen proporcionó un efecto beneficioso en la criopreservación de los espermatozoides de morueco, tal y como se aprecia en los valores de viabilidad e integridad de las membranas, especialmente tras la descongelación. Sin embargo, no podemos asegurar cuál es la causa de esta mayor supervivencia, ya que podría deberse a varios motivos. Uno podría ser que la eliminación del plasma seminal del medio de criopreservación puede mejorar la capacidad crioprotectora de la yema de huevo contra el shock por frío, ya descrito en diferentes especies como el conejo (Corteel, 1980; Ritar y Salamon, 1991), el macho cabrío (Aboagla y Terada 2003; Bispo y col., 2011), el cerdo (Bathgate y col., 2006) o el caballo (Martin y col., 1979). Otra posible explicación podría ser que en la técnica de separación del plasma seminal mediante el método de la centrifugación, además de eliminar el plasma seminal, también se elimine un gran porcentaje de espermatozoides muertos y dañados (Cebrián y col., 2010).

No obstante, no podemos olvidar que existe una importante controversia sobre la necesidad o no de eliminar el plasma. Mientras que algunos autores destacan la importancia del plasma seminal en el mantenimiento de la movilidad y la viabilidad de los espermatozoides de toro (Maxwell y col., 1996), morueco (Ashworth y col., 1994; Graham 1994; Maxwell y Watson, 1996) y cerdo (Maxwell y col., 1996), otros describen sus efectos perjudiciales en los mismos parámetros espermáticos tras la congelación-descongelación (de Lamirande y Gagnon 1984; Dott y col., 1979; García y Graham, 1987; Watson 1981; Schmehl y col., 1986; Moore y col., 2005). Aunque también existen autores que no apreciaron ningún efecto cuando adicionaron plasma seminal a los espermatozoides después de la criopreservación (Morrier y col., 2003; de Graaf y col., 2007; Domínguez y col., 2008; Rovegno y col., 2012).

De hecho, la controversia de la eliminación o no del plasma seminal en la conservación se hace evidente en nuestros propios resultados, ya que mientras la eliminación del plasma parece aumentar los porcentajes de supervivencia espermática, independientemente de la edad del macho, por otro lado, observamos que aquellos espermatozoides conservados en presencia del plasma seminal presentan menores índices de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado. En otras palabras, el plasma podría proteger a los espermatozoides de sufrir el proceso denominado como *criocapitación*. Destacar que en nuestro caso, también observamos que los espermatozoides lavados pero conservados con YH en polvo presentaron índices de *criocapitación* inferiores a los obtenidos en el resto de tratamientos. Además, debemos tener en consideración que los diferentes componentes del plasma varían entre especies, entre machos y pueden aparecer y desaparecer en función de factores ambientales, tales como la temporada de la recolección, la temperatura, la nutrición o el estrés (Pérez-Pé y col., 2001; Muiño-Blanco y col., 2008).

La edad de los sementales fue un factor determinante en los parámetros de calidad seminal evaluados en fresco, siendo superiores en aquellas muestras procedentes de moruecos de 2 años con relación a las obtenidas de machos de 1 año. Tal y como reportó Folch (1984) en ovinos de la raza Aragonesa, la concentración espermática en machos de 9 meses es del 50 al 75 % de la que presentan los moruecos adultos. También Martínez y col., (1998), al comparar moruecos de 3-4 años de edad con individuos de 1 año en las razas Coriedale, Merino Rambouillet y Romney Marsh, reportaron que la concentración seminal se incrementó en 15.78 % y la viabilidad en 11,58 % en los animales adultos respecto a los datos obtenidos en animales jóvenes.

Estos resultados se deben posiblemente a que el tamaño y el peso del parénquima testicular son parámetros altamente correlacionados con la producción y calidad seminal y fertilidad. En moruecos, el volumen de los testículos aumenta paralelamente al crecimiento corporal hasta que éste alcance el pleno estado adulto (Beltrán de Heredia, 2009), lo que sugiere que moruecos de mayor edad producen mayor cantidad y calidad de semen que los jóvenes, muchos de los cuales no habrían completado su crecimiento corporal y madurez sexual. Tal y como lo demostraron Colas y Zinsner (1975) al comparar moruecos de las

razas Ile France y Lacaune, los porcentajes de fertilidad aumentaron con la edad de los donantes, siendo de 45.5 % y 54.0 % al año de edad y de 62.2 % y 61.5 % a los dos años en las dos razas, respectivamente.

De hecho, esta superioridad de la calidad seminal en los sementales de 2 años se mantuvo durante la refrigeración y congelación-descongelación con valores superiores de viabilidad, integridad acrosomal, resistencia osmótica (HOST) y porcentaje de espermatozoides vivos con actividad mitocondrial alta en todos los tratamientos estudiados. Resultados similares en integridad funcional de membrana, con actividad mitocondrial y estructura de cromatina compacta reportó Lymberopoulos, y col. (2010) en moruecos de 4-5 años de edad al comparar con animales de 1-2 años, con incremento de la fertilidad del un 15% y prolificidad de más de un 0.56%. Así como también Rodríguez-Almeida y col. (2008), en espermatozoides congelados-descongelados de las razas Pelibuey y Blackbelly con yema de huevo al 20 %, encontraron valores superiores de reacción acrosómica en animales jóvenes (un año de edad), sin diferencias significativas en la viabilidad con espermatozoides de moruecos adultos.

También la edad parece influir, aunque de manera desigual según el tratamiento y el parámetro cinético analizado, en la calidad y cantidad de movimiento espermático. Concretamente se observó una superioridad por efecto de la edad en la motilidad total solo cuando los espermatozoides fueron conservados en un medio a base de YH en polvo (lavados y no-lavados) y en medio a base de YH clarificada, pero en presencia de plasma seminal. Por otra parte, mientras que la edad no afectó la motilidad progresiva tras la refrigeración, fue significativamente superior en los espermatozoides procedentes de machos de 2 años tras la descongelación, lo que sugiere que la edad no tan solo mejora las características seminales de los eyaculados evaluadas en fresco, sino que favorece la capacidad de resistencia de los espermatozoides a la crioconservación. De hecho, tanto tras la refrigeración como tras la descongelación, hubo un incremento significativo en todos los parámetros cinéticos estudiados, a excepción de la amplitud lateral del desplazamiento de la cabeza (ALH) cuando los donantes de semen eran un año mayor, independientemente del tratamiento de conservación utilizado. De igual manera reportaron Cabrera y col., (1998) en

macho cabrío adulto un incremento de la motilidad progresiva de lo que presentaban animales jóvenes. También, en ovinos, Rodríguez-Almeida y col. (2008) entre otros autores señalan que los parámetros cinéticos están influenciados, entre otros factores, por la madurez sexual.

Por último, las dimensiones y forma de la cabeza de los espermatozoides congelados-descongelados no se vieron modificadas por el efecto de la edad del donante, la eliminación o no del plasma seminal o el tipo de yema de huevo utilizado durante la conservación, presentando valores que están dentro del rango descrito en moruecos (Maroto-Morales y col., 2010; Bravo, 2010).

En conclusión, los resultados presentados en este estudio sugieren que los espermatozoides de moruecos de 2 años tienen mayor concentración, calidad inicial y resistencia o supervivencia al proceso de refrigeración y congelación-descongelación que los espermatozoides de animales más jóvenes. De igual manera, la eliminación del plasma seminal mediante centrifugación mejora los resultados de supervivencia seminal tras el proceso de refrigeración y congelación-descongelación, aunque no podemos concluir si esta superioridad es debida a la ausencia de plasma en el medio de congelación o a una supuesta selección de los espermatozoides ejercida durante su procesamiento. Por último, la yema de huevo en polvo puede utilizarse de forma satisfactoria en la refrigeración y congelación de espermatozoides ovinos, substituyendo el uso tradicional de la yema de huevo fresco y aportando una mayor homogeneidad y seguridad sanitaria en la elaboración de los diluyentes de conservación, mientras que la adición de yema de huevo clarificada no supone una ventaja en la supervivencia tras la conservación. No obstante, más estudios deben llevarse a cabo para confirmar si los resultados de calidad analizada *in vitro* de estas dosis seminales conservadas se corresponderían a los posibles resultados de fertilidad obtenidos mediante técnicas de fecundación *in vitro* y de inseminación artificial.

BIBLIOGRAFÍA

Aboagla, E.M.E.; Terada, T. (2003) - Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol Reprod.*, 69(4): 1245-1250.

Aisen, E. G.; Veturino, A. (2004) – Recolección y evaluación del semen. En Reproducción ovina y caprina. Ed. Aisen, E. Inter-Medica. Argentina. pp: 55-69.

Ali, A.B.T.; Bomboi, G.; Floris, B. (2013) - Replacing chicken yolk with yolks from other sources in ram semen diluents and their effects on fertility *in vitro*. *Small Ruminant Research.*, 113: 405–410.

Anton, M.; Martinet, V.; Dalgalarondo, M.; Beaumal, V.; David-Briand, E.; Rabesona, A, H. (2003) - Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chem.*, 83: 175–183.

Ashworth, P.J.C.; Harrison, R.A.P.; Miller, N.G.A.; Plummer, J.M.; Watson, P.F. (1994) - Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reprod Fertil Dev.*, 173-180.

Babiak, I.; Glogowski, J.; Luczynski, M.J.; Luczynski, M.; Demianowicz, W. (1999) - The effect of egg yolk, lowdensity lipoproteins, methylxanthines and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of northern pike (*Esox lucius*) spermatozoa. *Theriogenology.*, 52: 473–479.

Barrios, B.; Pérez-Pé, R.; Gallego, M.; Tato, A.; Osada, J.; Muino-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A. (2000) - Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod.*, 1531-1537.

Barrios, B.; Fernandez-Juan, M.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A. (2005) - Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *J Androl.*, 26: 539-549.

Bathgate, R., Maxwell, W.M.; Evans, G. (2006) - Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals.*, 41: 68-73.

Beltrán de Heredia, I. (2009) – Reproducción y control reproductivo en el macho. En Ovinotecnia (Producción y Economía de la Especie). Eds: Sañudo, C.; Cepero Briz, R. Prensas Universitarias de Zaragoza. Zaragoza, España. pp: 105-114.

Bergeron, A.; Crete, M.H.; Brindle, Y.; Manjunath, P. (2004) - Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol. Reprod.*, 70: 708–717.

Bergeron, A.; Manjunath, P. (2006) - Newinsights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol. Reprod. Dev.*, 73: 1338–1344.

Bispo, C.A.S.; Pugliesi, G.; Galvão, P.; Rodrigues, M.T.; Ker, P.; Filgueiras, B. (2011) - Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 100: 54– 58.

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

Bravo, J. (2010) - Estudio de la influencia de la estación sobre los parámetros seminales y morfométricos del espermatozoide del morueco de la raza Ile de France. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura, España.

Cabrera, F.; González, F.; Batista, M.; Forga, J.; Calero, P.; Gracia, A. (1998) - Influencia de la edad y los factores ambientales sobre la producción seminal del macho de la agrupación caprina canaria (variedad Majorera) a lo largo del todo el año. En: Producción Ovina y Caprina. XXIII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. pp: 525-528

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 Dom Anim.*, 40: 191–195.

Cebrián, J.; Muiño-Blanco, T.; Pérez-Pé, R.; Casao, A. (2010) – Manejo y conservación del semen. En: Manejo reproductivo en ganado ovino. Cordinadores: Abecia, A; Focada, F. Edt.Servet. Zaragoza, España. pp: 127-135.

Colas, G.; Zinsner, F. (1975) – Production spermatique et croissance testiculaire chez l'agneau de race Ile de France et Prealpes. Journées de Recherche Ovine et Caprine en France. París. Ed. ITOVIC (París).

Corteel, J.M, (1980) - Effets du plasma séminal sur la survie et la fertilité des spermatozoides conservés in vitro. *Reprod Nutr Develop.*, 20: 1111–1123.

Dominguez, M.P.; Falcinelli, A.; Hozbor, F.; Sanchez, E.; Cesari, A.; Alberio, R.H. (2008) - Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology.*, 69: 564–573.

Dott, H.M.; Harrison, R.A.P.; Foster, G.C.A. (1979) - The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. *J Reprod Fertil.*, 55: 113-124.

Dauphas, S.; Beaumal, B.; Riaublanc, A.; Anton, M. (2006) - Hen Egg Yolk Low-Density Lipoproteins Film Spreading at the Air-Water and Oil-Water Interfaces. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 3733-3737.

Evans, G.; Maxwell, W.M.C. (1990) – Inseminación artificial de ovejas y cabras. (Acribia). Zaragoza. Pp. 160.

Fernandez-Juan, M.; Gallego, M.; Barrios, B.; Osada, J.; Cebrián-Pérez, J.A.; Muiño-Blanco, T. (2006) - Immunohistochemical localization of sperm-preserving proteins in the ram reproductive tract. *J Androl.*, 27: 588-595.

Fernández-Santos, M.R.; Estesó, M.C.; Montoro, V.; Soler, A.J.; Garde, J.J. (2006) - Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: Effects of egg yolk, glycerol and cooling rate. *Theriogenology.*, 66: 1931–1942.

Folch, J. (1984) - Manejo reproductivo de los ovinos de carne y sus bases fisiológicas. Eds. Institución “Fernando el Católico” Zaragoza, España. pp: 43-46.

García M.A.; Graham, E.F. (1987) - Dialysis of bovine semen and its effect on fresh and freeze-thawed spermatozoa. *Cryobiology.*, 24: 446–454.

Garde, J.J.; del Olmo, A.; Soler, A.J.; Espeso, G.; Gomendio, M.; Roldan, R. S. (2008) - Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier’s gazelle (*Gazella cuvieri*). *Animal Reproduction Science.*, 108: 384–401.

de Graaf, S.P.; Evans, G.; Gillan, L.; Guerra, M.M.P.; Maxwell, W.M.C.; O'Brien, J.K. (2007) - The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. *Theriogenology.*, 67: 217–227.

Graham, J.K.; Foote, R.H. (1987) - Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology.*, 24: 42–52.

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: 1151-62.

Hancock, J.L. (1957) - The morphology of boar spermatozoa. *J. R. microsc. Soc.*, 76: 84-97.

Hidalgo, M.; Rodríguez, I.; Dorado, J. (2006) -Influence of staining and sampling procedure a goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology.*, 66: 996-1003.

Hildebrandt, T.B.; Reid, C.; Krieg, R.; Ji, W.Z.; Fassbender, M.; Hermes, R. (2006) - The successful double cryopreservation of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) semen in large volume using the directional freezing technique with reduced concentration of cryoprotectant. *Theriogenology.*, 65: 788 –98.

Holt, C.; Holt, W.V.; Moore, H.D. (1996) - Choice of operating conditions to minimize sperm subpopulation sampling bias in the assessment of boar semen by computer-assisted semen analysis. *J. Androl.* 17: 587-596.

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

Johnson, L.A.; Weitze, K.F.; Fiser, P.; Maxwell, W.M.C. (2000) - Storage of boar semen. *Animal of Reproduction Science*, 62: 143-172.

Kampschmidt, R. F.; Mayer, D.T.; Heman, H.A. (1953) - Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *J Dairy Sci.*, 36:733–42.

Kulaksız, R.; Cebi, C.; Akcay, E.; Daskin, A. (2010) -The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small Ruminant Research.*, 88: 12–15.

de Lamirande E, Gagnon C, 1984: Origin of a motility inhibitor within the male reproductive tract. *J Androl.*, 5: 269–276.

Lamia, A.; Daniel, T.; Laëtitia, J.; Chantal, T.; Olivier, G.; Jean, L.C.; Marc, A. (2004) - Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl1, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology.*, 61: 895–907.

Manjunath, P.; Nauc, V.; Bergeron, A.; Menard, M. (2002) - Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol. Reprod.*, 67: 1250–1258.

Marco-Jimenez, F.; Puchades, S.; Moce, E.; Viudes-De-Cartro, M.; Vicente, J.; Rodriguez, M. (2004) - Use of Powdered Egg Yolk vs Fresh Egg Yolk for the Cryopreservation of Ovine Semen. *Reprod Dom Anim.*, 39: 438–441.

Martin, J.C.; Klug, E.; Gunzel, A.R. (1979) - Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility.*, 27: 47-51.

Martínez, R.; Vásquez, R.; Cerquera, A.; Espinosa, E. (1998) – Caracterización de la respuesta a criopreción y evaluación por prueba de reacción agrosómica *in vitro* de la fertilidad del semen ovino. *Rev. Corpica. Colombia.* 11: 90-97.

Maroto-Morales, A. (2012) - Evaluación objetiva de la morfometría de los espermatozoides de ovino (*Ovis aries*). Relacionados con la fertilidad. Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Castilla-La Mancha, España.

Maxwell, W.M.C.; Welch, G.R.; Johnson, L.A. (1996) - Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev.*, 8: 1165–1178.

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.; de Graaf, S.P.; El-Hajj Ghaoui, R.; Evans, G. (2007) - Seminal plasma effects on sperm handling and fertility. En: *Juengel JI, Murria JF and Smith MF* (ed). *Reproduction in Domestic Ruminants VI*. Nottingham UK: Nottingham University Press; 13-38.

Miranda, J.; Guerrero, A.F.; Partal, P. (2000) - Reología de derivados de la yema de huevo deshidratada. *Grasas y Aceites*. 51: 244–250.

Moore, A.I.; Squires, E.L.; Graham, J.K. (2005) - Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology.*, 63: 2372–2381.

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.

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

Muiño-Blanco, T.; Pérez-Pé, R.; Cebrián-Pérez, J.A. (2008) - Seminal Plasma Proteins and Sperm Resistance to Stress. *Reprod Dom Anim.*, 43 (Suppl. 4), 18–31.

Nagy, S.; Jansen, J.; Topper, E.K.; Gadella, B.M. (2003) - A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol. Reprod.*, 68: 1828-1835.

Pace, M.; Graham, P. (1974) - Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J. Animal Science.*, 39 (6): 1144-1149.

Pérez-Pé, R.; Barrios, B.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A. (2001) – Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in anaqueous two-phase system. *J Chrom B.*, 76: 113–121.

Quinn, P.J.; Chow, P.Y.W. (1980) - Evidence that phospholipids protects spermatozoa from cold shock at a plasmamembrane site. *J. Reprod. Fertil.*, 60: 403–407.

Ritar, A.J.; Salamon, S. (1991) - Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. *Small Ruminant Research*, 4(1), 29-37.

Rodríguez-Almeida, F.; Ávila, C.O.; Anchondo, A, Sánchez-Ramírez, B.; Jiménez, J.A. (2008) - Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. *Agrociencia-Mexico*. 42 (4): 399-406.

Rovegno, M.; Beringui, W.; Monteiro, A.; Mota, C.; Visintin, J.A.; Ortiz, M.E. (2013) - Assessment of post-thawed ram sperm viability after incubation with seminal plasma. *Cell Tissue Bank.*, 14: 333–339.

Salamon, S.; Maxwell, W.M.C. (1995) - Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci.*, 38: 1-36.

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

Schmeh, M.K.; Anderson, S.P.; Vazquez, I.A.; Graham, E.F. (1986) - The effect of dialysis of extended ram semen prior to freezing on post-thaw survival and fertility. *Cryobiology.*, 23: 406-414.

Thibier, M.; Guerin, B. (2000) - Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci.*, 62: 233-251.

Wall, R.J.; Foote, R.H.; (1999) - Fertility of bull sperm frozen and stored in clarified egg yolk-Tris-glycerol extender. *J. Dairy Sci.*, 82: 817-821.

Watson, P.F.; Martin, C.A. (1975) - The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 °C. *Aust. J. Biol. Sci.*, 28: 145-152.

Watson, P.F. (1981) - The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. G.J.Morris & A.Clark, eds. Academic Press, New York, pp: 189-218.

4.2. CAPITULO II

Estudio de diferentes diluyentes libres de aditivos de origen animal y otras alternativas a la tradicional crioconservación espermática en moruecos.

ABSTRACT

Our first aim was to study potential extenders free from additives of animal origin using as cryoprotectant soybean lecithin or butylated hydroxytoluene (BHT), and also the efficiency of trehalose as an alternative of glycerol on sperm cryopreservation. Secondly, we also assessed the buffer system effect comparing Tes-Tris buffer system (TEST) vs Tris and citric acid buffer system (TRIS), testing simultaneously the inclusion of BHT (5.0 mM) as antioxidant on ram sperm cryosurvival. Briefly, fresh ejaculates from 8 young rams (1 year old approximately) were collected by artificial vagina and immediately mixed in equal quantities. Pooled semen was washed by centrifugation and the pellet was split into 6 equal aliquots and re-suspended in one of the 6 different Tris-based media with BHT (0.6mM), soybean lecithin 1% (w/v) or powered egg yolk (15%,v/v) as cryoprotectant supplemented by 5% of glycerol or 100mM of trehalose. In the second experiment, washed semen was split into 8 equal aliquots and diluted in a 1% (w/v) soybean lecithin or in a 15% (v/v) powered egg yolk-based media with TEST or TRIS buffer system and with or without BHT (5.0mM). All of the 8 different extenders were supplemented by 5% glycerol. Afterwards, all sperm samples were refrigerated at 5° C for 4 hours before being frozen in nitrogen liquid vapors. Sperm motility was analyzed by computer assisted sperm analysis (ISAS®) and viability, acrosomal integrity and viability after hyposmotic test (HOST) were determined by eosine/nigrosine stain after refrigeration. After thawing, viability, and acrosome integrity were determined by by eosine/nigrosine stain, as well sperm motility and morphometry by ISAS ® (mean±SE, n=6). Refrigerated and frozen/thawed sperm preserved in a BHT-based media showed the lowest values ($p<0.001$) in all the assessed quality parameters, meanwhile no differences were observed between sperm preserved in a soybean lecithin or powered egg yolk based media, even both cryoprotectant had a better effect on sperm cryosurvival, when they were combined with glycerol. On the other hand, the buffer system TRIS provided a higher thawed sperm quality ($p<0.001$) than the TEST buffer, independently of the cryoprotectant used. Finally, the presence of BHT as antioxidant improved all the parameters evaluated on sperm preserved in the media with buffer system TRIS, also independently of the cryoprotectant used.

INTRODUCCIÓN

Generalmente, la yema de huevo ha sido utilizada en los diluyentes de crioconservación de semen (Salamon y Maxwell, 2000; Leboeuf y col., 2000), a pesar de contener sustancias que interfieren en el metabolismo celular reduciendo la motilidad espermática (Demaniowicz y Strzezek, 1996). Además, la tendencia a eliminar componentes de origen animal en los diluyentes de crioconservación hace que la posibilidad de utilizar un sustituto a la yema de huevo sea muy deseable. En los últimos años se han sugerido diferentes propuestas como la adición de lecitinas de origen vegetal como lecitina de soja, por su alto contenido de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en los diluyentes de criopreservación de espermatozoides de toro (Aires y col., 2003), caballo (Aurich y col., 2007), cerdo (Zhang y col., 2009) y morueco (Gil y col., 2003; de Paz y col., 2010; Forouzanfar y col., 2010), llegándose a comercializar como el diluyente Bioexcell® en moruecos, el Biociphos Plus® en toro o incluso el Andromed® en humana. De la misma manera, la inclusión del butil hidroxitolueno (BHT) como crioprotector ha sido propuesto como un sustituto fiable de la yema de huevo en la criopreservación del semen de caprino (Abd Elhakeam, 2001; Khalifa y col., 2008).

Por otro lado, el glicerol, que a su vez es el crioprotector penetrante más utilizado en los diluyentes de congelación, es potencialmente citotóxico (Holt, 2000; Watson, 2000), no siendo la base de sus propiedades crioprotectoras completamente conocidas (Aires y col., 2003). De nuevo, la búsqueda de diluyentes crioprotectores alternativos y de composición definida para la crioconservación de espermatozoides de morueco está más que justificada. Uno de los candidatos propuestos a sustituir el glicerol como crioprotector es la trehalosa (Molinia y col., 1994; Sánchez-Partida y col., 1998) ya que promueve la deshidratación celular, reduciendo los efectos negativos de la formación de cristales de hielo (Aisen y col., 2002; 2005) y es capaz de interaccionar con los fosfolípidos y proteínas de la membrana, proporcionándole una mayor flexibilidad contra el daño celular provocado por la congelación (Aisen y col., 2002; Bucak y col., 2007). De esta manera, el uso de trehalosa representa una alternativa al glicerol muy interesante (Tonieto y col., 2010).

Otro aspecto crucial en la conservación del semen es el mantenimiento del pH del diluyente en el que los espermatozoides son diluidos, puesto que el pH interno del espermatozoide está directamente relacionado con el pH del diluyente y, a su vez, con la motilidad (Jones y Bavister, 2000). La adición de agentes tamponadores a los diluyentes de conservación ayudan a controlar el pH, siendo la solución más empleada el tampón TRIS y/o citrato, el cual es incluido como componente básico de los diluyentes de crioconservación espermática (Salamon y Maxwell, 2000). A pesar de los escasos estudios realizados para evaluar otras alternativas a estos tampones en la composición de diluyentes semi-sintéticos, parecen existir evidencias que sugieren que la utilización de tampones zwitterion mejora la calidad *in vitro* de los espermatozoides de muchas especies (Tuli y Holtz, 1992; Molinia y col., 1994; Yániz y col., 2011). De hecho, Graham y col., (1972) ya demostraron que el tampón zwitterionic Tes combinado con Tris (TEST) resultó ser el sistema tampón más satisfactorio para congelar espermatozoides de toro. Este sistema TEST ha sido también utilizado en la congelación de espermatozoides de morueco (Anel y col., 2003) y de gacela (Garde y col., 2008).

Asimismo, es importante valorar y reducir en lo posible el daño oxidativo sobre la membrana de los espermatozoides, ya que la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la crioconservación (Alvarez y Storey, 1992) disminuye la supervivencia y capacidad fecundante de las dosis criopreservadas para la Inseminación Artificial (Maxwell y Watson, 1996). Una manera de reducir los efectos perjudiciales de las ROS podría ser la adición de componentes con capacidad antioxidante al diluyente de congelación para bloquear o prevenir el estrés oxidativo. Entre los diferentes componentes antioxidantes, el butil hidroxitolueno (BHT), que es un análogo sintético de la vitamina E, ha sido probado con resultados satisfactorios en distintas especies como en espermatozoides de toro (Ijaz y col., 2009), de morueco (Watson y Anderson, 1983) y de cerdo (Roca y col., 2004).

El objetivo de este segundo capítulo fue en primer lugar comparar la eficiencia de distintas combinaciones de crioprotectores como la yema de huevo en polvo, lecitina de soja o el BHT, junto al glicerol o a la trehalosa, así como también la eficacia de dos sistemas tampón como son el TRIS y TEST en medios de conservación a base de yema

de huevo en polvo o de lecitina de soja, junto con la suplementación o no de BHT como antioxidante en la refrigeración y criopreservación de espermatozoides ovinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos utilizados procedían de la casa comercial Sigma-Aldrich, excepto la yema de huevo en polvo que procedía de NIVE (Nunspeet Holland Eiproducten).

Los siguientes experimentos se llevaron a cabo entre las instalaciones del IRTA en Caldes de Montbui y la Universidad Autónoma de Barcelona. Para ello, se utilizaron 8 moruecos (4 de raza Xisqueta y 4 de Aranesa), a los que se les colectó semen con vagina artificial 2 días/semana y 2 eyaculados/día en otoño, a la de edad de un año aproximadamente, realizando un total de 6 réplicas en cada experimento. Tras la recogida de los eyaculados, y manteniéndolos en un Baño María a 37°C, se procedió a valorar su motilidad masal y volumen siguiendo la clasificación de Evans y Maxwell (1990). A continuación, los eyaculados eran mezclados en un solo tubo (*pool*), a partir del cual se dividía en varias alícuotas según el número de tratamientos que se pretendiera estudiar en cada experimento. Seguidamente, cada una de las alícuotas era diluida (1:6) con la solución base TGC (Salamon y Maxwell, 2000), y centrifugada a 600 g durante 10 minutos. Una vez eliminado el sobrenadante, y el sedimento era diluido de nuevo en 9 mL de la solución TGC para realizar una segunda centrifugación (600xg por 10'). Finalmente, el sobrenadante era descartado y el sedimento de las distintas alícuotas era recuperado para su posterior procesamiento en los experimentos 1 y 2.

Experimento 1: Efecto de la combinación de diferentes crioprotectores en los medios de conservación de espermatozoides ovinos

En este primer experimento, tras el proceso de centrifugación de la mezcla de eyaculados se obtuvieron 6 alícuotas de semen lavado. Tres de las alícuotas fueron resuspendidas (1:4) en la solución TGC a una concentración final de 5% de glicerol y a la que se le había agregado previamente uno de los crioprotectores: yema de huevo en polvo 15 % (v/v), lecitina de soja 1% (w/v) o butil hidroxitolueno (BHT) (0.6mM),

dando lugar a 3 tratamientos distintos de conservación. De igual manera, las otras 3 alícuotas procedentes del lavado de la mezcla de eyaculados fueron resuspendidas (1:4) también en solución TGC, pero con una concentración final de 100mM de Trehalosa junto con uno de los 3 crioprotectores: yema de huevo en polvo 15 % (v/v), lecitina 1% (w/v) o butil hidroxitolueno BHT (0.6mM), dando lugar a otros 3 tratamientos distintos de conservación. Todas las soluciones utilizadas para la conservación espermática contenían penicilina benzatínica (1000 UI/mL) y sulfato de estreptomicina (1.0 mg/mL), con el objetivo de evitar posible contaminaciones.

La metodología utilizada para la adición del BHT en las distintas soluciones fue similar a la descrita anteriormente por Khalifa y col., (2008). Para ello, se disolvió 0.013 gr de butil hidroxitolueno (BHT) en 0.25 ml de dimetilsulfoxido (DMSO) para obtener una concentración final de 0.60 mM de BHT y de 35.2mM de DMSO en los distintos diluyentes.

Experimento 2: Efecto del antioxidante BHT y del sistema tampón sobre la conservación de espermatozoides ovinos en medios a base de yema de huevo en polvo o lecitina de soja.

Para la refrigeración y crioconservación de los espermatozoides en este segundo experimento se utilizaron dos diluyentes base, la solución TGC descrita anteriormente y la solución TTG a base del tampón TEST y compuesta por 209 mM Tes (N-[Tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetanosulfónico), 99 mM Tris ([hidroximetil]aminometano) y 27.75 mM D (+)-Glucosa, ajustada a un pH 7.17 ± 0.02 y una osmolaridad 330 ± 2.01 mOsm (Garde y col., 2008). De igual manera que en el experimento 1, el plasma seminal era eliminado mediante centrifugación, obteniendo 8 alícuotas de semen lavado procedente de la mezcla de eyaculados. Seguidamente, 2 de las alícuotas fueron resuspendidas (1:4) en la solución TGC con un 5% de glicerol y yema de huevo en polvo al 15 % (v/v), una de ellas en presencia de BHT (5mM) en el diluyente y la otra sin BHT, mientras que otras 2 eran también resuspendidas (1:4) en la solución TGC, pero con lecitina de soja 1% (w/v), una en presencia de BHT y otra sin el antioxidante, dando lugar a 4 tratamientos distintos de conservación. Por otra parte, las otras 4 alícuotas de espermatozoides restantes fueron procesadas siguiendo la misma metodología, pero en solución TTG, dando lugar a otros 4 tratamientos distintos de

conservación. Brevemente, 2 alícuotas fueron resuspendidas en solución TEST con YHP, una en presencia de BHT y la otra sin BHT, mientras que las otras 2 se resuspendieron en diluyente TEST a base de lecitina de soja con y sin BHT como antioxidante.

Una vez homogenizadas las distintas suspensiones, tanto en el experimento 1 como en el 2, los tubos eran introducidos en un recipiente con 10 ml de agua a 20 °C, colocados en una nevera portátil (Dometic-Waeco®) a 5 °C y trasladados desde del IRTA a una cámara de frío de la Facultad de Veterinaria de la UAB. Tras aproximadamente 3h30' de permanecer las suspensiones espermáticas en refrigeración se les agregaron los mismos diluyentes correspondientes, con la finalidad de llegar a una concentración final de 400×10^6 de espermatozoides/mL. A continuación, las distintas alícuotas refrigeradas fueron envasadas manualmente en pajuelas de 0.25 mL (IMV, L'Aigle Cedex, France) y selladas con alcohol polivinílico. Una vez transcurridas las 4 horas de refrigeración, las pajuelas fueron congeladas en vapores de nitrógeno líquido (LN₂), a 5 cm por encima del nivel de LN₂ durante 10 minutos, para finalmente ser sumergidas en él para su almacenamiento hasta su descongelación.

Análisis de los parámetros de calidad seminal

La viabilidad y morfología espermática de la mezcla de eyaculados en fresco, tras 4 h de refrigeración y tras la descongelación de las muestras conservadas con los distintos tratamientos se evaluó por medio la tinción de eosina-nigrosina, tal y como se describe en el primer capítulo. El test de endosmosis (HOST) se realizó únicamente tras la mezcla de eyaculados en fresco y tras 4 h de refrigeración. La morfometría de las muestras se evaluó en fresco y tras la descongelación, mientras que la cantidad y calidad de movimiento de los espermatozoides en las distintas suspensiones espermáticas se evaluó tras la refrigeración y post-descongelación mediante el sistema ISAS® (Proiser R+D S.D., Valencia).

Análisis Estadístico

En los dos experimentos, los datos de viabilidad, integridad de membrana plasmática, morfometría y los parámetros cinéticos descriptores del movimiento

espermático (variables dependientes), se analizaron utilizando el procedimiento GLM (ANOVA) de SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.), siendo los valores obtenidos expresados como media \pm error estándar de la media. Se realizó 6 repeticiones en cada tratamiento. Cuando las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$), se realizó el test de Bonferroni de comparación de medias a posteriori. La normalidad y homogeneidad de varianza de los parámetros espermáticos se comprobaron con el tests de Kolmogorv-Smirnov y Levene. Las variables dependientes que no cumplieron con los supuestos de igualdad de varianza y distribución normal fueron sometidas a una transformación arcoseno, antes del análisis estadístico.

RESULTADOS

Experimento 1. Efecto de la combinación de diferentes crioprotectores en los medios de conservación de espermatozoides ovinos

Los resultados obtenidos tras el análisis seminal de la mezcla de eyaculados son una concentración seminal de 2.902 ± 165.6 millones de espermatozoides/mL, una viabilidad estimada por E/N del $66.6 \% \pm 2.4$, una integridad funcional de sus membranas tras la prueba de HOST del $41.8 \% \pm 9.4$, una integridad acrosomal de $80.2 \% \pm 2.1$, una motilidad masal de 2.1 ± 0.1 y un porcentaje de anormalidades espermáticas de $21.8 \% \pm 2.7$. Al comparar los resultados obtenidos de viabilidad tras el proceso de refrigeración (Tabla 1.1), se observa que aquellos espermatozoides conservados en BHT como crioprotector sustituto de la yema de huevo, independientemente de estar combinado con glicerol o trehalosa, presentaron valores inferiores al resto de tratamientos, aunque solo significativamente diferentes con los conservados con glicerol, tanto con YHP como con lecitina. Respecto a la capacidad de resistencia al shock hipoosmótico, la tendencia fue similar, presentando valores inferiores de integridad funcional de la membrana en aquellos espermatozoides conservados en BHT, especialmente en combinación con trehalosa, difiriendo éste último significativamente del resto de tratamientos que no contenían BHT como crioprotector. A su vez, el diluyente a base de yema de huevo en polvo complementado con glicerol (YHP-G) proporcionó valores superiores a los obtenidos en los demás tratamientos, aunque sin diferencias significativas con lo observado en el medio también a base de yema de

huevo en polvo pero complementado con trehalosa (YHP-T) y con el obtenido en el medio a base de lecitina con glicerol (LS-G).

Tabla 1.1. Efecto de la combinación de diferentes crioprotectores en los medios de conservación de espermatozoides ovinos sobre la viabilidad, resistencia osmótica (HOST) y motilidad espermática tras la refrigeración (media \pm se, n=6).

Tratamiento	YHP-G	LS-G	BHT-G	YHP-T	LS-T	BHT-T
Viabilidad	55.3 \pm 5.8 ^a	53.3 \pm 1.7 ^a	40.3 \pm 1.3 ^b	48.4 \pm 1.4 ^{ab}	49.1 \pm 3.6 ^{ab}	39.1 \pm 3.6 ^b
HOST (%)	34.6 \pm 3.0 ^a	31.3 \pm 2.0 ^{ab}	25.1 \pm 3.1 ^{bc}	29.3 \pm 0.5 ^{ab}	27.9 \pm 1.8 ^b	20.3 \pm 1.3 ^c
MT (%)	77.6 \pm 3.9 ^a	70.5 \pm 1.4 ^a	45.2 \pm 1.4 ^{bc}	69.8 \pm 4.6 ^a	60.2 \pm 7.6 ^{ab}	41.2 \pm 3.6 ^c
MP (%)	45.8 \pm 7.1 ^a	43.7 \pm 3.2 ^a	25.2 \pm 1.1 ^{bc}	35.6 \pm 3.7 ^{ab}	34.9 \pm 1.8 ^{ab}	20.1 \pm 1.1 ^c
VCL(μm/s)	106.5 \pm 3.9 ^a	97.4 \pm 5.7 ^a	58.2 \pm 2.6 ^b	66.7 \pm 2.8 ^b	66.8 \pm 4.3 ^b	61.7 \pm 0.9 ^b
VSL (μm/s)	38.4 \pm 2.6 ^a	35.2 \pm 1.5 ^a	18.3 \pm 1.1 ^d	28.5 \pm 2.5 ^b	24.1 \pm 0.8 ^{bc}	20.5 \pm 1.8 ^{cd}
VAP (μm/s)	62.3 \pm 3.2 ^a	53.9 \pm 3.2 ^b	31.4 \pm 1.3 ^d	42.2 \pm 2.3 ^c	36.6 \pm 2.6 ^{cd}	33.3 \pm 2.0 ^d
LIN (%)	43.6 \pm 2.3 ^a	40.6 \pm 3.5 ^{ab}	34.9 \pm 1.5 ^{bc}	35.9 \pm 1.1 ^{bc}	39.1 \pm 1.5 ^{abc}	33.3 \pm 1.0 ^c
STR (%)	65.1 \pm 2.3 ^a	63.5 \pm 2.4 ^a	56.5 \pm 0.8 ^{bc}	63.7 \pm 1.5 ^a	60.9 \pm 1.8 ^{ab}	53.3 \pm 1.8 ^c
ALH(μm)	4.7 \pm 0.2 ^a	4.9 \pm 0.3 ^a	3.1 \pm 0.1 ^b	3.0 \pm 0.1 ^b	3.5 \pm 0.2 ^b	3.2 \pm 0.1 ^b
BCF (Hz)	7.4 \pm 0.3 ^a	5.2 \pm 0.4 ^b	3.6 \pm 0.3 ^c	5.7 \pm 0.3 ^b	4.3 \pm 0.2 ^c	4.3 \pm 0.4 ^c

^{a,d} Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre tratamientos (YHP-G: YH en polvo + glicerol, LS-G: lecitina + glicerol, BHT-G: butil hidroxitolueno + glicerol, YHP-T: YH en polvo + trehalosa, LS-T: lecitina + trehalosa, BHT-T: butil hidroxitolueno + trehalosa). MT: motilidad total, MP: motilidad progresiva, VCL: velocidad curvilínea, VSL: velocidad rectilínea, VAP: velocidad media, LIN: índice de linealidad, STR: índice de rectitud, ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, BCF: frecuencia de batida. Numero de espermatozoides =7,063

De la misma manera, la mayoría de los parámetros cinéticos analizados mediante el sistema ISAS de las distintas suspensiones espermáticas sometidas a estudio (Tabla 1.1.) parecen mostrar un patrón semejante a lo anteriormente descrito, observándose los valores más bajos en los espermatozoides conservados en BHT, tanto con glicerol como con trehalosa, y los valores intermedios en el resto de tratamientos con trehalosa, mientras que los superiores se observan en aquellos refrigerados en medios con glicerol, independientemente de si estaban combinados con YHP o Lecitina de soja. De las diferencias significativas observadas entre los distintos tratamientos, se destaca que en ninguno de los distintos parámetros analizados se encontraron diferencias entre los espermatozoides conservados en YHP respecto a los conservados

en lecitina de soja, tanto cuando eran combinados con glicerol como cuando éste era substituido por trehalosa, a excepción de la frecuencia (BCF), que presentaron valores significativamente superiores cuando eran conservados en presencia de yema de huevo en polvo, siendo significativamente superior al resto de tratamientos en el caso de combinarla con el glicerol, tal y como sucedió también al analizar la velocidad media (VAP), difiriéndose solo entre la observada en los espermatozoides conservados en YHP y la presentada en el caso de usar LS al combinarse con el glicerol.

De nuevo, una vez analizados los distintos parámetros espermáticos tras la descongelación de las muestras seminales (Tabla 1.2.), los resultados siguieron la misma tendencia que la observada en los espermatozoides refrigerados, es decir, valores superiores en los tratamientos a base de glicerol y valores intermedios en los tratamientos a base de trehalosa, ya sean combinados con yema de huevo en polvo o lecitina, mientras que los peores resultados se observaron siempre en los tratamientos que contenían BHT como sustituto de la YHP o de la lecitina de soja. No obstante, las diferencias fueron más marcadas entre estas 3 categorías tras la descongelación que tras la refrigeración, mostrando valores significativamente superiores en el caso de conservarlos en presencia de glicerol, independientemente de si se combinaba con YHP o lecitina.

Tabla 1.2. Efecto de la combinación de diferentes crioprotectores en los medios de conservación de espermatozoides ovinos sobre la viabilidad y motilidad espermática tras la congelación/descongelación (media \pm se, n=6).

Tratamien.	YHP-G	LS-G	BHT-G	YHP-T	LS-T	BHT-T
Viabilidad	33.0 \pm 0.8 ^a	31.9 \pm 1.2 ^a	17.3 \pm 1.5 ^c	23.8 \pm 1.8 ^b	23.2 \pm 1.5 ^b	19.9 \pm 3.1 ^{bc}
MT (%)	48.4 \pm 3.3 ^a	44.4 \pm 3.3 ^a	20.5 \pm 1.4 ^d	35.1 \pm 1.4 ^b	28.9 \pm 0.8 ^{bc}	23.8 \pm 1.3 ^{cd}
MP (%)	24.0 \pm 2.7 ^a	22.7 \pm 0.9 ^a	10.5 \pm 0.4 ^c	17.3 \pm 0.5 ^b	17.1 \pm 0.7 ^b	12.0 \pm 0.5 ^c
VCL (μm/s)	61.8 \pm 2.9 ^a	54.9 \pm 3.4 ^a	43.6 \pm 1.6 ^b	40.3 \pm 3.9 ^{bc}	33.8 \pm 1.9 ^{cd}	31.5 \pm 0.5 ^d
VSL (μm/s)	28.1 \pm 2.4 ^a	26.8 \pm 1.9 ^a	14.8 \pm 0.2 ^c	19.1 \pm 0.7 ^b	15.7 \pm 0.5 ^{bc}	14.4 \pm 1.1 ^c
VAP (μm/s)	39.9 \pm 2.4 ^a	36.2 \pm 0.5 ^a	24.6 \pm 0.5 ^c	28.9 \pm 1.7 ^b	31.5 \pm 1.5 ^b	24.7 \pm 0.9 ^c
LIN (%)	57.4 \pm 0.9 ^a	54.9 \pm 2.6 ^a	38.4 \pm 1.3 ^d	47.5 \pm 1.6 ^{bc}	48.3 \pm 3.9 ^b	41.4 \pm 1.5 ^{cd}
STR (%)	70.8 \pm 0.4 ^a	70.5 \pm 1.2 ^a	59.9 \pm 1.1 ^b	63.3 \pm 3.3 ^b	62.2 \pm 2.2 ^b	61.3 \pm 1.4 ^b
ALH (μm)	2.7 \pm 0.1 ^{ab}	2.9 \pm 0.1 ^a	1.8 \pm 0.0 ^d	2.4 \pm 0.3 ^{bc}	2.2 \pm 0.1 ^{cd}	2.0 \pm 0.1 ^{cd}
BCF (Hz)	7.1 \pm 0.3 ^a	6.6 \pm 0.4 ^a	2.8 \pm 0.2 ^c	4.6 \pm 0.4 ^b	4.4 \pm 0.4 ^b	2.2 \pm 0.3 ^c

^{a,d}Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre tratamientos (**YHP-G**: YH en polvo + glicerol, **LS-G**: lecitina + glicerol, **BHT-G**: butil hidroxitolueno + glicerol, **YHP-T**: YH en polvo + trehalosa, **LS-T**: lecitina + trehalosa, **BHT-T**: butil hidroxitolueno + trehalosa). **MT**: motilidad total, **MP**: motilidad progresiva, **VCL**: velocidad curvilínea, **VSL**: velocidad rectilínea, **VAP**: velocidad media, **LIN**: índice de linealidad, **STR**: índice de rectitud, **ALH**: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, **BCF**: frecuencia de batida. Número de espermatozoides = 2,953

Al comparar las medidas morfométricas de los espermatozoides frescos con los espermatozoides criopreservados no se observó ningún efecto sobre la forma de la cabeza, pero sí sobre sus dimensiones (Tabla 1.3.). De esta manera, se observó, tras el análisis mediante el ISAS, que la longitud de la cabeza de los espermatozoides frescos es significativamente superior a la de los espermatozoides criopreservados en BHT, tanto en glicerol como en trehalosa, sin observarse diferencias con el resto de tratamientos. Además, tampoco los valores del ancho, área y perímetro de la cabeza de los espermatozoides frescos difirieron significativamente de los valores obtenidos tras descongelar espermatozoides conservados en medios a base de yema de huevo en polvo, tanto combinado con glicerol como con trehalosa, así como tampoco el ancho de la cabeza de los espermatozoides congelados en lecitina combinada con glicerol.

Respecto a las dimensiones de los espermatozoides congelados en diferentes medios de congelación, no se observaron diferencias de las dimensiones de la cabeza

entre tratamientos, a excepción del medio a base de BHT con glicerol que muestran, en la longitud, área y perímetro de la cabeza espermática, valores significativamente inferiores a los observados con ambos medios a base de YHP (con glicerol y con trehalosa). Igualmente, los valores del ancho de cabeza la YHP en glicerol fue significativamente superior al BHT con glicerol y trehalosa, y a la lecitina con trehalosa.

Tabla 1.3. Parámetros morfométricos de dimensión de cabeza de espermatozoides ovinos frescos y criopreservados con diferentes combinaciones de crioprotectores (media \pm es, n=6).

Tratamientos	Longitud (μm)	Ancho (μm)	Área (μm^2)	Perímetro (μm)
YHP-G	8.5 \pm 0.0 ^{ab}	4.9 \pm 0.0 ^a	34.6 \pm 0.2 ^{ab}	23.5 \pm 0.1 ^{ab}
LS-G	8.4 \pm 0.0 ^{abc}	4.8 \pm 0.0 ^{ab}	33.6 \pm 0.4 ^{bc}	23.2 \pm 0.1 ^{bc}
BHT-G	8.3 \pm 0.0 ^c	4.7 \pm 0.0 ^c	32.6 \pm 0.3 ^c	22.8 \pm 0.1 ^c
YHP-T	8.5 \pm 0.0 ^{ab}	4.8 \pm 0.0 ^{ab}	34.2 \pm 0.2 ^{ab}	23.4 \pm 0.1 ^{ab}
LS-T	8.5 \pm 0.1 ^{ab}	4.8 \pm 0.0 ^{bc}	33.5 \pm 0.4 ^{bc}	23.1 \pm 0.1 ^{bc}
BHT-T	8.3 \pm 0.0 ^{bc}	4.8 \pm 0.0 ^{bc}	33.2 \pm 0.3 ^{bc}	23.0 \pm 0.1 ^{bc}
Fresco	8.6 \pm 0.1 ^a	4.9 \pm 0.0 ^a	35.3 \pm 0.3 ^a	23.9 \pm 0.2 ^a

^{a,d} Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre tratamientos (**YHP-G**: YH en polvo + glicerol, **LS-G**: lecitina + glicerol, **BHT-G**: butil hidroxitolueno + glicerol, **YHP-T**: YH en polvo + trehalosa, **LS-T**: lecitina + trehalosa, **BHT-T**: butil hidroxitolueno + trehalosa) en los parámetros morfométricos. Numero de espermatozoides =6,467.

Por lo que hace referencia a los parámetros de forma de la cabeza de los espermatozoides, como se ha mencionado anteriormente, no se apreciaron diferencias entre frescos y descongelados ni entre los distintos tratamientos de congelación, siendo los valores medios de elipticidad de 1.8 ± 0.0 , de elongación de 0.3 ± 0.0 , de rugosidad de 0.8 ± 0.0 y de regularidad de 0.9 ± 0.0 .

Experimento 2: Efecto del antioxidante BHT y del sistema tampón sobre la conservación de espermatozoides ovinos en medios a base de yema de huevo en polvo o lecitina de soja

Los resultados obtenidos tras el análisis inicial en fresco de la mezcla de eyaculados utilizados en este segundo experimento son una concentración seminal de

3.051 ± 190.2 millones de espermatozoides/mL, un porcentaje de viabilidad estimada por E/N de $68.1 \% \pm 1.6$, de integridad acrosomal $81.5 \% \pm 1.8$, de resistencia osmótica tras la prueba de HOST de $45.9 \% \pm 1.8$, de anomalías espermáticas de $23.5 \% \pm 3.7$ y una motilidad masal de 2.2 ± 0.2 .

Tras el análisis a las 4 horas de refrigeración de las distintas suspensiones espermáticas se observó que el tratamiento que proporcionó valores superiores en todos los parámetros analizados (Tabla 2.1.) fue el que consistía en conservar los espermatozoides en un medio a base de yema de huevo en polvo con el sistema tampón TRIS y con BHT como antioxidante, aunque éste no difirió significativamente en ningún parámetro de lo observado en el mismo medio, pero habiendo sustituido la yema de huevo por lecitina de soja. Igualmente, este mismo tratamiento, YHP en tampón TRIS y con BHT, a pesar de presentar valores superiores, tampoco proporcionó resultados significativamente diferentes a los obtenidos en el resto de tratamientos de integridad física (viabilidad) y funcional de sus membranas plasmáticas (HOST), motilidad total y progresiva, a excepción de lo obtenido en los medios donde se usó TEST como tampón, pero sin adicionar el antioxidante.

En cuanto a los parámetros cinéticos de velocidad espermática tras la refrigeración, los valores presentados por aquellos espermatozoides conservados en el medio a base de YHP en TRIS y con BHT fueron de nuevo significativamente superiores a los observados en los medios donde el sistema tampón usado fue el TEST.

Tabla 2.1. Efecto del antioxidante BHT y del sistema tampón en medios a base de yema de huevo en polvo o lecitina de soja sobre la viabilidad, test HOST y parámetros cinéticos de los espermatozoides refrigerados de moruecos (media \pm se, n=6).

Tratamien.	YHP-TRIS	LS-TRIS	YHP-TRIS +BHT	LS-TRIS +BHT	YHP-TEST	LS-TEST	YHP-EST +BHT	LS-EST +BHT
Viabilidad	52.6 \pm 4.9 ^{ab}	48.3 \pm 1.4 ^{abc}	56.2 \pm 0.7 ^a	52.8 \pm 2.1 ^{ab}	43.6 \pm 1.5 ^{bc}	40.6 \pm 1.6 ^c	47.1 \pm 1.6 ^{abc}	48.3 \pm 1.7 ^{abc}
HOST (%)	25.7 \pm 0.5 ^{ab}	23.2 \pm 1.6 ^{ab}	28.5 \pm 0.9 ^a	26.4 \pm 2.0 ^{ab}	21.0 \pm 1.8 ^b	20.2 \pm 0.8 ^b	24.1 \pm 1.3 ^{ab}	25.2 \pm 1.6 ^{ab}
MT (%)	78.4 \pm 1.4 ^{ab}	75.1 \pm 1.9 ^{ab}	83.1 \pm 2.1 ^a	84.5 \pm 1.6 ^a	69.2 \pm 3.3 ^b	67.4 \pm 2.8 ^b	76.8 \pm 1.7 ^{ab}	74.1 \pm 3.9 ^{ab}
MP (%)	40.6 \pm 4.3 ^{ab}	38.1 \pm 1.2 ^{abc}	45.1 \pm 0.9 ^a	44.2 \pm 3.0 ^a	26.3 \pm 1.3 ^c	28.7 \pm 4.5 ^{bc}	40.1 \pm 3.8 ^{ab}	39.4 \pm 0.6 ^{ab}
VCL(μm/s)	102.1 \pm 3.2 ^{abc}	90.4 \pm 5.8 ^{bcd}	112.4 \pm 3.2 ^a	106.5 \pm 5.7 ^{ab}	85.9 \pm 2.2 ^{cd}	82.7 \pm 3.9 ^d	95.1 \pm 2.7 ^{bcd}	90.8 \pm 1.2 ^{bcd}
VSL(μm/s)	40.0 \pm 1.9 ^{ab}	35.7 \pm 1.2 ^{bcd}	46.3 \pm 3.5 ^a	43.7 \pm 2.6 ^{ab}	27.2 \pm 1.9 ^{cd}	26.0 \pm 1.7 ^d	39.5 \pm 2.8 ^{ab}	37.4 \pm 2.1 ^{abc}
VAP(μm/s)	51.1 \pm 2.3 ^b	50.8 \pm 3.1 ^b	68.8 \pm 1.8 ^a	66.5 \pm 3.1 ^a	44.5 \pm 2.0 ^b	42.8 \pm 2.3 ^b	52.6 \pm 1.4 ^b	50.8 \pm 2.3 ^b
LIN (%)	41.8 \pm 2.7 ^{abc}	41.6 \pm 1.6 ^{abc}	48.9 \pm 1.7 ^a	46.1 \pm 2.0 ^{ab}	33.7 \pm 0.7 ^d	32.7 \pm 1.6 ^d	39.6 \pm 1.0 ^{bcd}	35.7 \pm 1.4 ^{cd}
STR (%)	61.8 \pm 1.3 ^b	59.3 \pm 0.9 ^b	68.0 \pm 1.5 ^a	67.0 \pm 1.8 ^a	54.6 \pm 1.3 ^{cd}	50.7 \pm 1.0 ^d	60.6 \pm 0.9 ^b	58.3 \pm 2.3 ^{bc}
ALH(μm)	4.2 \pm 0.3 ^{ab}	4.1 \pm 0.2 ^{ab}	4.5 \pm 0.2 ^a	4.4 \pm 0.3 ^a	3.4 \pm 0.2 ^b	3.9 \pm 0.2 ^{ab}	4.0 \pm 0.1 ^{ab}	3.9 \pm 0.2 ^{ab}
BCF (Hz)	7.2 \pm 0.2 ^b	6.9 \pm 0.1 ^{bc}	8.9 \pm 0.7 ^a	8.1 \pm 0.3 ^{ab}	5.3 \pm 0.2 ^{cd}	4.8 \pm 0.3 ^d	7.9 \pm 0.4 ^{ab}	7.1 \pm 0.3 ^b

^{a,d}Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre tratamientos (**YHP-TRIS**: YH en polvo + TRIS, **LS-TRIS**: lecitina + TRIS, **YHP-TRIS+BHT**: YH en polvo + TRIS + butil hidroxitolueno, **LS-TRIS+ BHT**: lecitina + TRIS + butil hidroxitolueno, **YHP-TEST**: YH en polvo + TEST, **LS-TEST**: lecitina + TEST, **YHP-TEST+BHT**: YH en polvo + TEST + butil hidroxitolueno, **LS-TEST+BHT**: lecitina + TEST + butil hidroxitolueno). **MT**: motilidad total, **MP**: motilidad progresiva, **VCL**: velocidad curvilínea, **VSL**: velocidad rectilínea, **VAP**: velocidad media, **LIN**: índice de linealidad, **STR**: índice de rectitud, **ALH**: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, **BCF**: frecuencia de batida. Numero de espermatozoides =11,054

a excepción de la velocidad rectilínea observada en aquellos que habían estado en TEST, pero en presencia también del antioxidante. Asimismo, este tratamiento a base de yema de huevo en polvo con TRIS y BHT presentó velocidades significativamente superiores a las encontradas cuando los espermatozoides fueron conservados también con el sistema tampón TRIS, pero en un medio a base de lecitina de soja y sin la presencia del antioxidante. Por lo que hace referencia al índice de linealidad no se apreciaron diferencias entre los distintos tratamientos debidas al crioprotector usado o a la presencia o no del antioxidante, pero sí en función del sistema tampón empleado, presentado valores generalmente inferiores en el caso de usar TEST, y siendo significativamente diferentes al compararlos con el índice obtenido en el caso de usar el tratamiento a base YHP+TRIS+BHT. El índice de rectitud obtenido en los dos medios con el sistema TRIS y en presencia de BHT, tanto con YHP como con lecitina, presentaron valores significativamente superiores al resto de tratamientos, siendo en los medios con TEST y en ausencia del antioxidante los que peores resultados presentaron.

En cambio, no se encontraron diferencias en los valores del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) entre los distintos tratamientos, a excepción del valor obtenido en aquellos espermatozoides que fueron conservados en YHP y con TEST como tampón respecto a los conservados en presencia de BHT como antioxidante y con TRIS, independientemente del crioprotector usado. También la conservación de los espermatozoides en medio a base de YHP con TRIS y en presencia de BHT permitió observar valores significativamente superiores de frecuencia de batido respecto al resto de tratamientos, a excepción de la BCF registrada en espermatozoides conservados también en el medio con TRIS con lecitina y en el medio con TEST con YHP, ambos en presencia del antioxidante, los cuales no difirieron del primero. Destacar que, de nuevo, los valores más bajos en este parámetro fueron observados en los medios con el sistema TEST como tampón y en ausencia del antioxidante.

Una tendencia similar a lo ocurrido tras la refrigeración, se pudo apreciar una vez analizadas las muestras descongeladas (Tabla 2.2.), con diferencias significativas en la mayoría de los parámetros estudiados entre aquellos espermatozoides conservados en el medio a base de YHP en TRIS y con BHT respecto a las conservadas en medios con TEST como tampón, a excepción de la velocidad rectilínea y media y la linealidad obtenida en las muestras conservadas también con TEST, pero con el antioxidante.

Tabla 2.2. Efecto del antioxidante BHT y del sistema tampón en medios a base de yema de huevo en polvo o lecitina de soja sobre la viabilidad y parámetros cinéticos de los espermatozoides congelados-descongelados de morueco (media \pm se, n=6).

Tratamien.	YHP-TRIS	LS-TRIS	YHP-TRIS +BHT	LS-TRIS +BHT	YHP-TEST	LS-TEST	YHP-TEST +BHT	LS-TEST +BHT
Viabilidad	23.5 \pm 2.2 ^{ab}	21.1 \pm 1.2 ^{abc}	26.8 \pm 0.8 ^a	25.7 \pm 1.1 ^a	16.8 \pm 1.5 ^c	17.9 \pm 1.1 ^{bc}	17.7 \pm 0.9 ^{bc}	18.2 \pm 1.2 ^{bc}
MT (%)	31.8 \pm 1.5 ^{abc}	30.1 \pm 3.7 ^{bc}	36.5 \pm 2.0 ^a	35.4 \pm 2.6 ^{ab}	20.7 \pm 0.5 ^d	17.0 \pm 1.5 ^d	27.1 \pm 1.0 ^c	26.5 \pm 1.7 ^c
MP (%)	8.2 \pm 1.0 ^b	19.0 \pm 1.5 ^b	23.1 \pm 1.7 ^a	20.2 \pm 0.5 ^{ab}	12.9 \pm 1.6 ^c	8.2 \pm 0.9 ^d	14.6 \pm 0.9 ^c	14.3 \pm 1.5 ^c
VCL (μm/s)	61.6 \pm 3.9 ^{ab}	61.9 \pm 5.5 ^{ab}	67.9 \pm 3.1 ^a	63.6 \pm 3.2 ^{ab}	50.7 \pm 2.6 ^c	48.5 \pm 1.8 ^c	55.1 \pm 1.9 ^{bc}	57.6 \pm 5.5 ^{bc}
VSL (μm/s)	26.6 \pm 3.6 ^{ab}	25.5 \pm 1.3 ^{abc}	32.7 \pm 3.9 ^a	30.0 \pm 2.4 ^a	19.6 \pm 0.9 ^{bc}	18.6 \pm 0.9 ^c	27.4 \pm 2.4 ^a	26.0 \pm 2.9 ^{ab}
VAP (μm/s)	40.5 \pm 3.8 ^a	40.5 \pm 1.1 ^a	43.3 \pm 4.6 ^a	41.1 \pm 2.4 ^a	27.4 \pm 1.2 ^b	25.3 \pm 0.8 ^b	38.3 \pm 3.8 ^a	37.8 \pm 2.1 ^a
LIN (%)	47.6 \pm 2.8 ^a	45.5 \pm 1.8 ^{ab}	50.7 \pm 2.9 ^a	49.1 \pm 4.6 ^a	38.5 \pm 1.3 ^{bc}	36.2 \pm 3.5 ^c	48.1 \pm 2.5 ^a	47.6 \pm 3.1 ^a
STR (%)	64.7 \pm 3.6 ^{abc}	61.9 \pm 2.3 ^{bcd}	69.2 \pm 2.4 ^a	68.4 \pm 1.4 ^{ab}	57.0 \pm 2.7 ^{de}	50.2 \pm 1.6 ^e	60.3 \pm 1.3 ^{cd}	58.5 \pm 2.1 ^{cd}
ALH (μm)	3.3 \pm 0.2 ^{abc}	3.0 \pm 0.1 ^{abc}	3.8 \pm 0.3 ^a	3.7 \pm 0.2 ^{ab}	2.6 \pm 0.2 ^{cd}	2.2 \pm 0.1 ^d	2.7 \pm 0.1 ^{cd}	2.9 \pm 0.2 ^{bcd}
BCF (Hz)	5.1 \pm 0.6 ^b	4.2 \pm 0.1 ^{bc}	7.0 \pm 0.1 ^a	6.9 \pm 0.3 ^a	4.1 \pm 0.3 ^{bc}	3.1 \pm 0.2 ^c	4.5 \pm 0.4 ^b	4.1 \pm 0.2 ^{bc}

^{a,d}Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre tratamientos (**YHP-TRIS**: YH en polvo + TRIS, **LS-TRIS**: lecitina + TRIS, **YHP-TRIS+BHT**: YH en polvo + TRIS + butil hidroxitolueno, **LS-TRIS+ BHT**: lecitina + TRIS + butil hidroxitolueno, **YHP-TEST**: YH en polvo + TEST, **LS-TEST**: lecitina + TEST, **YHP-TEST+BHT**: YH en polvo + TEST + butil hidroxitolueno, **LS-TEST+BHT**: lecitina + TEST + butil hidroxitolueno). **MT**: motilidad total, **MP**: motilidad progresiva, **VCL**: velocidad curvilínea, **VSL**: velocidad rectilínea, **VAP**: velocidad media, **LIN**: índice de linealidad, **STR**: índice de rectitud, **ALH**: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, **BCF**: frecuencia de batida. Numero de espermatozoides = 5,921

Por otra parte, a pesar de que el medio a base de YHP en TRIS y con BHT proporcionó los mayores valores en todas las características seminales estudiadas, éstos no se diferenciaron de los valores presentados en aquellos espermatozoides conservados también en medios con TRIS, a excepción de la inferior motilidad progresiva y menor frecuencia de batido observada en aquellos medios donde no se añadió BHT y de la menor motilidad total e índice de rectitud observados en el caso de usar lecitina de soja en TRIS y sin BHT.

Cabe destacar que no se observó ningún efecto significativo del tipo de crioprotector utilizado, salvo una única excepción entre la superior motilidad progresiva ($p < 0.05$) observada en los espermatozoides conservados en medio con TEST y sin BHT cuando se usó yema de huevo en polvo respecto a cuando el crioprotector fue la lecitina de soja. Por lo que hace referencia a la existencia de un posible efecto del antioxidante, éste fue desigual dependiendo del sistema tampón usado. Concretamente, el efecto del BHT fue escaso en los medios donde se utilizó el TRIS, siendo solo significativo con una mayor frecuencia de batido en ambos crioprotectores y una, también, mayor motilidad progresiva cuando el crioprotector era la yema de huevo. Por el contrario, cuando los espermatozoides eran congelados en medios con TEST como sistema tampón, la presencia de BHT proporcionó valores superiores y significativos de motilidad total, de velocidad rectilínea y media, de índice de linealidad y de rectitud, tanto con la YHP como con la lecitina como crioprotectores, mostrando también un positivo efecto en la motilidad progresiva solo en el caso de usar lecitina.

De los estudios morfométricos de la cabeza mediante el sistema ISAS de 7.831 espermatozoides, entre frescos y descongelados, no se observó ningún efecto sobre la forma de la cabeza, pero sí sobre sus dimensiones (Tabla 2.3.). Las dimensiones de la cabeza (longitud, ancho, área y perímetro) de los espermatozoides en fresco son significativamente superiores a las de los espermatozoides criopreservados, a excepción de las de aquellos espermatozoides que fueron conservados en YHP y en TRIS. De hecho, los valores observados en este tratamiento (YHP+TRIS) en presencia o no del antioxidante fueron significativamente superiores, sin apreciarse diferencias entre ambos, en todos los parámetros de dimensión de la cabeza respecto a todos los obtenidos con el resto de tratamientos de congelación. Solo no se observaron diferencias en el ancho y área de la cabeza entre aquellos conservados también en YHP pero con

BHT, independientemente del tampón usado y entre el perímetro observado en el medio a base de YHP y el de lecitina, ambos con BHT y TRIS. Respecto a los parámetros de forma de la cabeza de los espermatozoides, no se apreciaron diferencias entre frescos y descongelados ni entre los distintos tratamientos de congelación, siendo los valores medios de elipticidad de 1.8 ± 0.0 , de elongación de 0.3 ± 0.0 , de rugosidad de 0.8 ± 0.0 y de regularidad de 0.9 ± 0.0 .

Tabla 2.3. Parámetros morfométricos de dimensión de la cabeza de espermatozoides ovinos frescos y criopreservados con diferentes tratamientos (media \pm es).

Tratamientos	Longitud (μm)	Ancho (μm)	Área (μm^2)	Perímetro (μm)
YHP-TRIS	$8.4 \pm 0.0^{\text{ab}}$	$4.8 \pm 0.0^{\text{ab}}$	$33.7 \pm 0.2^{\text{ab}}$	$23.2 \pm 0.1^{\text{ab}}$
LS-TRIS	$8.2 \pm 0.0^{\text{c}}$	$4.6 \pm 0.0^{\text{d}}$	$31.9 \pm 0.2^{\text{d}}$	$22.6 \pm 0.1^{\text{d}}$
YHP-TRIS+BHT	$8.3 \pm 0.0^{\text{b}}$	$4.8 \pm 0.0^{\text{bc}}$	$33.0 \pm 0.2^{\text{bc}}$	$23.0 \pm 0.1^{\text{bc}}$
LS-TRIS+BHT	$8.2 \pm 0.0^{\text{c}}$	$4.6 \pm 0.0^{\text{d}}$	$31.9 \pm 0.2^{\text{d}}$	$22.7 \pm 0.1^{\text{cd}}$
YHP-TEST	$8.2 \pm 0.0^{\text{c}}$	$4.6 \pm 0.0^{\text{d}}$	$32.0 \pm 0.2^{\text{d}}$	$22.5 \pm 0.1^{\text{d}}$
LS-TEST	$8.2 \pm 0.0^{\text{c}}$	$4.6 \pm 0.0^{\text{d}}$	$31.6 \pm 0.2^{\text{d}}$	$22.5 \pm 0.1^{\text{d}}$
YHP-TEST+BHT	$8.2 \pm 0.0^{\text{c}}$	$4.7 \pm 0.0^{\text{cd}}$	$32.3 \pm 0.2^{\text{cd}}$	$22.6 \pm 0.0^{\text{d}}$
LS-TEST+BHT	$8.2 \pm 0.0^{\text{c}}$	$4.6 \pm 0.0^{\text{d}}$	$31.9 \pm 0.3^{\text{d}}$	$22.6 \pm 0.1^{\text{d}}$
Fresco	$8.5 \pm 0.0^{\text{a}}$	$4.9 \pm 0.0^{\text{a}}$	$34.5 \pm 0.1^{\text{a}}$	$23.4 \pm 0.1^{\text{a}}$

^{a,d} Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre tratamientos (**YHP-TRIS**: YH en polvo + TRIS, **LS-TRIS**: lecitina + TRIS, **YHP-TRIS+BHT**: YH en polvo + TRIS + butil hidroxitolueno, **LS-TRIS+ BHT**: lecitina + TRIS + butil hidroxitolueno, **YHP-TEST**: YH en polvo + TEST, **LS-TEST**: lecitina + TEST, **YHP-TEST+BHT**: YH en polvo + TEST + butil hidroxitolueno, **LS-TEST+BHT**: lecitina + TEST + butil hidroxitolueno, **Fresco**: semen fresco colectado).

DISCUSIÓN

Según los resultados obtenidos en el experimento 1, el butil hidroxitolueno (BHT) no parece ser un crioprotector adecuado ni un sustituto fiable de la yema de huevo para la conservación de espermatozoides ovinos como había sido propuesto en un principio. De hecho, los espermatozoides conservados en BHT, junto a glicerol o a trehalosa, presentaron los valores más bajos, en términos de viabilidad, integridad funcional o resistencia osmótica de la membrana plasmática, parámetros de velocidad,

progresión y dirección de la cabeza de los espermatozoides, tanto tras el proceso de refrigeración como el de la congelación y descongelación. Resultados similares han sido reportados por Ball y col. (2001) en caballos, Graham y Hammerstedt (1992) en toros e incluso por Watson y Anderson (1983) en moruecos, donde la inclusión de BHT como crioprotector en los diluyentes de conservación no mejoró las características de los espermatozoides tras la descongelación. Sin embargo, Kalifa y col. (2008) obtuvieron una mejora en la motilidad y fertilidad de espermatozoides caprinos descongelados, cuando utilizaron 0.6mM de BHT como crioprotector, en comparación a la yema de huevo en fresco. Estos resultados contradictorios podrían deberse a la existencia de diferencias en la composición de la membrana de los espermatozoides en las distintas especies, concentración de BHT incluido en el diluyente, composición del diluyente y tiempo de refrigeración (Watson y Anderson, 1983; Ball y col., 2001; Roca y col., 2004).

Respecto a los otros dos crioprotectores utilizados en el presente estudio, nuestros resultados parecen mostrar una capacidad similar de la yema de huevo en polvo y de la lecitina de soja a la hora de conservar los espermatozoides ovinos, no observándose diferencias en la viabilidad, integridad funcional de la membrana plasmática y cantidad de movimiento entre los espermatozoides refrigerados, tanto combinados con glicerol como con trehalosa. No obstante, la yema de huevo en polvo y la lecitina tuvieron un mejor efecto crioprotector cuando se complementaron con glicerol, como se aprecia en todos los parámetros cinéticos evaluados tras la refrigeración, lo que le confiere a la trehalosa un posible efecto negativo sobre la motilidad espermática (Chen y col., 1993).

Además, esta tendencia observada en los espermatozoides refrigerados, se mantuvo de manera más notable todavía tras la descongelación de las muestras, obteniéndose valores superiores de calidad seminal en los tratamientos a base de glicerol e intermedios en los diluyentes a base de trehalosa, independientemente de si se combinaban con YHP o lecitina, mientras que los peores resultados siempre se obtuvieron en los tratamientos que contenían BHT como sustituto de la YHP o de la lecitina de soja. De igual manera, Nur y col., (2010), también en espermatozoides de morueco, observaron que los medios de crioconservación que contenían glicerol o propanodiol proporcionaban mejor motilidad post-descongelación en comparación con

la trehalosa y la sacarosa, aunque sin mostrar diferencias significativas en la integridad del acrosoma o del ADN.

No obstante, otros investigadores no pudieron apreciar este mayor efecto crioprotector del glicerol, obteniendo una calidad seminal, después de descongelar, similar para los diluyentes con glicerol y trehalosa (Moura, 1995; Toniato, 2010). Estas diferencias entre autores sobre el efecto del glicerol en la crioconservación podría explicarse, en parte, a que utilizado en altas concentraciones puede llegar a tener una acción tóxica (Hammerstedt y Graham, 1992), causando un posible daño osmótico a los espermatozoides (Watson, 1995). Daño que dependerá, a su vez, de las tasas de enfriamiento y congelación, de la composición del diluyente y del método de adicionar el glicerol (Anel y col., 2003), lo que dificulta la comparación entre resultados de diferentes laboratorios. Sin embargo, a pesar de ello, el glicerol es considerado como el crioprotector más eficaz en rumiantes (Leibo y Songsasen, 2002), tal y como hemos podido corroborar en nuestro experimento. De hecho, la inclusión de trehalosa como crioprotector en los diluyentes de congelación de semen es un tema controvertido, ya que mientras algunos autores describen una mejora en la viabilidad espermática post-descongelación del perro (Yildiz y col., 2000) y morueco (Matsuoka y col., 2006), otros en espermatozoides de toro la rechazan (Chen y col., 1993), ya que parece disminuir la supervivencia y capacidad fecundante de las dosis conservadas como ha sido descrito en espermatozoides de toro (Foote y col., 1993) o de conejo (Dalimata y Graham, 1997).

Por otra parte, como ya se ha comentado previamente, la acción crioprotectora de la yema de huevo en polvo y de la lecitina es atribuida en gran parte a la lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales se adhieren a la superficie de la membrana del espermatozoide, reemplazando los fosfolípidos de la membrana que se pierden o son dañados, y formando una película protectora en la superficie, aumentando así la tolerancia de los espermatozoides al shock de frío durante la congelación (Moussa y col., 2002; Bergeron y Manjunath, 2006; Furouzanfar y col., 2010). Sin embargo, a pesar de haberse descrito que la lecitina es un crioprotector de origen vegetal que parece mejorar los parámetros de calidad seminal post-congelación en ovinos (de Paz y col., 2010; Forouzanfar y col., 2010), en búfalos (Akhter y col., 2010) y en caballos (Aurich y col., 2007), existen autores, como Del Valle y col., (2012), que indican que la inclusión de lecitina en los medios de criopreservación de espermatozoides de morueco

ocasiona graves daños en la membrana de las mitocondrias, afectando la motilidad y fertilidad. De igual manera, O'Hara y col., (2010) observaron que la inclusión de diluyente comercial Andromed® en el medio de refrigeración de los espermatozoides de moruecos durante 72 horas a 5°C, ocasionaba una disminución en la tasa de formación de blastocistos *in vitro*, así como también se ha detectado una reducción en la tasa de preñez en ovejas inseminadas por el método intracervical al utilizar semen congelado en este diluyente (Hiwasa y col., 2009). En este contexto, nuestros resultados solo mostraron una cierta superioridad significativa en espermatozoides refrigerados en YHP respecto a los refrigerados con lecitina de soja, ambos combinados con glicerol, en los valores de velocidad media y de frecuencia de batido, diferencias que tras la descongelación desaparecieron, por lo que necesitaríamos poder realizar otro tipo de análisis tanto *in vitro* como *in vivo*, con especial atención a las tasas de fertilidad de nuestras dosis, para poder confirmar si ambos crioprotectores son igualmente eficaces.

En cuanto al tipo de sistema tampón utilizado para conservar los espermatozoides ovinos, los resultados obtenidos en el segundo experimento parecen sugerir la utilización del sistema TRIS como tampón de elección, especialmente en la congelación, ya que en la mayoría de los parámetros analizados, tanto de integridad física y funcional de membranas como de cantidad y calidad de movimiento, los valores fueron estadísticamente superiores a los obtenidos cuando se usó el sistema TEST, independientemente del crioprotector utilizado. Una posible explicación a los resultados obtenidos sería que el tampón TRIS ayuda a amortiguar mejor la deshidratación celular mediante la creación de una fuerza osmótica (Molinia y col., 1994), aumentando de este modo la estabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide, y neutralizando los ácidos generados durante el almacenamiento *in vitro* (Ijaz y col., 1989). De hecho, tal como describen Tuli y Holtz (1992) en conejos, éstos observaron una mayor viabilidad y motilidad total en espermatozoides criopreservados en tampón TRIS comparado con BES y TEST. De igual manera, Rasul y col., (2000), en espermatozoides descongelados de búfalo, describieron un incremento de la motilidad lineal, aunque sin diferencias en la integridad de la membrana plasmática y acrosomal al comparar el tampón TRIS con el TEST, así como también ha sido descrito una menor fertilidad de los espermatozoides de morueco congelados en tapones zwitterion que en medios a base de Tris con glucosa y yema de huevo (Salamon y Maxwell 2000).

Sin embargo, cabe destacar que en nuestro experimento, la presencia de BHT como antioxidante redujo las diferencias observadas en los distintos parámetros debidas al tampón utilizado. Además, también en aquellos espermatozoides conservados en el sistema tampón a base de TRIS se aprecia la tendencia a presentar valores superiores en todos los caracteres espermáticos evaluados cuando el antioxidante está presente en el medio, independientemente del crioprotector empleado. Esta mejoría en la calidad seminal se debe posiblemente a que el BHT se incorpora a la membrana de los espermatozoides para prevenir o reducir la actividad dañina de los radicales libres, mediante la conversión de los radicales peroxil a hidroperóxidos (Aitken y Clarkson, 1987), interaccionando con los componentes del diluyente y minimizando el daño durante la crioconservación de espermatozoides.

Similar a lo observado en el primer experimento, tampoco en este segundo hemos podido detectar diferencias significativas entre los dos crioprotectores utilizados en ninguno de los parámetros analizados, salvo únicamente el valor significativamente superior de motilidad progresiva registrada en espermatozoides congelados en el tampon TEST y en ausencia de antioxidante con la yema de huevo en polvo como crioprotector, respecto a su equivalente pero con lecitina. Solamente mencionar que, a pesar de no diferenciarse significativamente, la calidad seminal tras la refrigeración y descongelación fue siempre superior en aquellos espermatozoides conservados en un medio a base de yema de huevo en polvo en un sistema tampón TRIS y en presencia de BHT como antioxidante, pero tampoco lo suficientemente mejor como para poder descartar a la lecitina como su fiable sustituto.

Por último, referente al análisis de los parámetros morfométricos tras el proceso de crioconservación, nuestros resultados no mostraron ningún cambio significativo en la forma de la cabeza de los espermatozoides en ninguno de los distintos tratamientos estudiados respecto a los espermatozoides frescos ni en el primer experimento, donde se comparaban distintas combinaciones de crioprotectores, ni tampoco en el segundo donde además estudiábamos el efecto del tipo de tampón o de la presencia o no de antioxidante. Contrariamente, otros investigadores demostraron que el proceso de criopreservación produce cambios en la forma de la cabeza de los espermatozoides ovinos post-congelados (Bravo, 2010) y también en caprinos (Hidalgo y col., 2005). Estos hallazgos nos indican el distinto comportamiento que exhiben las células

espermáticas de las distintas especies ante los procesos de criopreservación u otro tipo de factores como el tipo de crioprotector y aditivos en los diluyentes (Hidalgo y col., 2007a).

No obstante, en cuanto a las dimensiones de la cabeza espermática se observó una disminución de la longitud cuando los espermatozoides eran congelados en BHT como crioprotector, tanto combinado con glicerol como con trehalosa respecto al fresco, así como el ancho, pero solo al combinarse con glicerol. En cambio, en los espermatozoides congelados en medios a base de YHP no hubo diferencias significativas en ningún parámetro de dimensión de la cabeza, ni con glicerol ni con trehalosa, así como tampoco en los valores de longitud y ancho en aquellos conservados en medios a base de lecitina.

Sin embargo, en el segundo experimento, las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides crioconservados se redujeron significativamente en todos tratamientos estudiados respecto a los frescos, a excepción de aquellos que fueron conservados en YHP con TRIS como sistema tampón, aunque éstos no difirieran en sus dimensiones cuando eran conservados también en presencia del antioxidante en tampón TRIS. Modificaciones similares han sido reportados en diferentes especies (Marco-Jiménez y col., 2006; Gravance y col., 1998; Hidalgo y col., 2007b; Rubio-Guillén y col., 2007; Rijsselaere y col., 2004), con una disminución de las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides post-congelados. Una de las causas principales de estos cambios se deben a los efectos de la adición del agente crioprotector (Hammerstedt y col., 1992), el cual sería responsable de la salida de agua del compartimento intracelular, causando la reducción del tamaño de la cabeza espermática. En el momento de la descongelación, las células con la membrana funcional integrarán agua y podrán recuperar su volumen celular, mientras que las muertas seguirán presentando un tamaño menor. De este modo, como apuntan Marco-Jiménez y col., (2006), la morfometría espermática actuaría de modo indirecto como indicador de la funcionalidad de la membrana espermática, lo que nos ayudaría a reforzar la hipótesis sobre la elección del medio a base de yema de huevo en polvo en un sistema tampón TRIS con o sin BHT como tratamiento de elección para la crioconservación de espermatozoides ovinos.

En conclusión, los resultados del presente estudio sugieren que la adición de BHT no es un crioprotector adecuado para la criopreservación de espermatozoides de morueco, mientras que la yema de huevo en polvo y la lecitina de soja muestran una superior capacidad protectora tanto en la refrigeración y como en la crioconservación espermática, siendo esta capacidad similar entre ambos crioprotectores y todavía mayor cuando se complementan con el glicerol en diluyentes con un sistema tampón TRIS. Así mismo, se recomienda añadir BHT como antioxidante en los medios de conservación, ya que parece mejorar la calidad seminal tras la conservación, independientemente del crioprotector utilizado y especialmente junto con el sistema tampón TRIS. Sin embargo, es preciso realizar nuevos análisis, especialmente test de fertilidad *in vitro* e *in vivo* para confirmar dichos resultados.

BIBLIOGRAFÍA

Abd Elhakeam, A.A. (2001) - Studies on preservation of goat semen: A cold dilution method for improving storageability. Proceedings of the Egyptian Society of Animal Reproduction and Fertility, 13th Annual Congress, Giza, Egypt, 147–157.

Aires, V.A.; Hirsch, K.D.; Mueller-Schloesser, F.; Bogner, K.; Mueller-Schloesser, S.; Hirsch, E. (2003) - In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology.*, 60: 269–279.

Aisen, E.G.; Medina, V.H.; Venturino, A. (2002) - Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology.*, 57: 1801-1808.

Aisen, E.; Quintana, M.; Medina, V.; Morello, H.; Venturino, A. (2005) - Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology.*, 50: 239–249.

Aitken, R.J.; Clarkson, J.S. (1987) - Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl.*, 9: 367-376.

Akhter, S.; Ansari, M.S.; Rakha, B.A.; Andrabi, S.M.; Iqbal, S.; Ullah, N. (2010) - Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell® extender. *Theriogenology.*, 74: 951–955.

Alvarez, J.G.; Storey, B.T. (1992) - Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl.*, 13: 232-241.

Anel, L.; de Paz, P.; Álvarez, M.; Chamorro, C.A.; Boixo, J.C.; Manso, A.; González, M.; Kaabi, M.; Anel, E. (2003) - Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology.*, 60: 1293–1308.

Anel, L.; Kaabi, M.; Abroug, B.; Alvarez, M.; Anel, E.; Boixo, J. (2005) - Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology.*, 63: 1235–1247.

Aurich, C.; Seeber, P.; Müller-Schlösser, F. (2007) - Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5 degrees. *Reprod Domest Anim.*, 42(4): 445–448.

Ball, B. A.; Medina, V.; Gravance, C.G.; Bumber, J. (2001) - Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology.*, 56: 577-589.

Bergeron, A.; Manjunath, P. (2006) - New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev.*, 73: 1338–1344.

Bravo, J. (2010) - Estudio de la influencia de la estación sobre los parámetros seminales y morfométricos del espermatozoide del morueco de la raza Ile de France. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria de la universidad de Extremadura, España.

Bucak, M. N.; Atessahin, A.; Varıslı, O.; Yüce, A.; Tekin, N.; Akçay, A. (2007) - The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. *Theriogenology.*, 67: 1060–1067.

Chen, Y.; Foote, R.H.; Brockett, C.C. (1993) - Effect of source, trehalose, hypotaurine, taurine and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology.*, 30: 423–431

Dalimata, A.M.; Graham, J.K. (1997) - Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology.*, 48: 831–841.

Del Valle, I.; Gómez-Dura, A.; Holt, W.V.; Muiño-Blanco, T.; Cebria-Perez, J.A. (2012) - Soy Lecithin Interferes With Mitochondrial Function in Frozen-Thawed Ram Spermatozoa. *Journal of Andrology.*, 33, (4): 717-725.

Demaniowicz, W.; Strzezek, J. (1996) - The effect of lipoprotein fraction from egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state, *Reprod. Domest. Anim.*, 31: 279–280.

Evans, G.; Maxwell, W.M.C. (1990) – Inseminación artificial de ovejas y cabras. (Acribia). Zaragoza. Pp. 160.

Foote, R.H.; Chen, Y.; Brockett, C.C.; Kaproth, M.T. (1993) - Fertility of bull spermatozoa frozen in whole milk extender with trehalose, taurine, or blood serum. *DJ Dairy Sci.*, 76: 1908–1913.

Forouzanfar, M.; Sharafi, M.; Hosseini, S.; Ostadhosseini, S.; Hajian, M.; Hosseini, L.; Abedi, P.; Nili, N.; Rahmani, H.; Nasr-Esfahani, M.(2010) - In vitro comparison of egg

yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology.*, 73: 480–487.

Garde, J.J.; del Olmo, A.; Soler, A.J.; Espeso, G.; Gomendio, M.; Roldan, E.R.S. (2008) - Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*). *Animal Reproduction Science.*, 108: 384–401.

Gil, J.; Rodriguez-Irazoqui, M.; Lundeheim, N.; Soderquist, L.; Roderiguez-Martinez, H. (2003) - Fertility of ram semen in Bioxcell and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology.*, 59: 1157–1170.

Graham, E.F.; Crabo, B.G.; Brown, K.I. (1972) - Effect of some zwitter ion buffers on the freezing and storage of spermatozoa. *Int. Bull. J. Dairy Sci.*, 55: 372–378.

Graham, J.K.; Hammerstedt, R.H. (1992) - Differential effects of butylated hydroxytoluene analogs on bull sperm subjected to cold-induced membrane stress. *Cryobiology.*, 29: 106–117.

Gravance C.G.; Vishwanath, R.; Pitt, C.; Garner, D.L.; Casey, P.J. (1998) - Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *J. Androl.*, 19: 704-709.

Hammerstedt, R.H.; Graham, J.K. (1992) - Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology.*, 29: 26-38.

Hidalgo, M.; Rodríguez, I.; Dorado, J.; Sanz, J.; Soler, C. (2005) - Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry. *Vet. Med. Czech.*, 50: 24-32.

Hidalgo, M.; Rodríguez, I.; Dorado, J.; Soler, C. (2007a) - Morphometric classification of spanish thoroughbred stallion sperm heads. *Anim. Reprod. Sci.*, 99: 100–109.

Hidalgo, M.; Rodríguez, I.; Dorado, J.M. (2007b) - The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Anim. Reprod. Sci.*, 100: 61-72.

Hiwasa, M.; Kohno, H.; Togari, T.; Okabe, K.; Fukui, Y. (2009) - Fertility after different artificial insemination methods using a synthetic semen extender in sheep. *J Reprod Dev.*, 55: 50–54.

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

Ijaz, A.; Hunter, A.G.; Graham, E.F. (1989) - Identification of the capacitating agent for bovine sperm in egg yolk–TEST semen extender. *J. Dairy Sci.*, 72: 2700–2706.

Ijaz, A.; Hussain, A.; Aleem, M.; Yousaf, M. S.; Rehman, H. (2009) - Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology.*, 71: 1326-1329.

Jones, J.; Bavister, B. (2000) - Acidification of intracellular pH in bovine spermatozoa suppresses motility and extends viable life. *J. Androl.*, 21: 616-624.

Khalifa, T. A. A.; Lymberopoulos, A. G.; El-Saidy, B.E. (2008) - Testing usability of butylated hydroxytoluene in conservation of goat semen. *Reprod. Domest. Anim.*, 43: 525-530.

Leboeuf, B.; Restall, B.; Salamon, S. (2000) - Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci*, 62(1-3): 113-115.

Leibo, S.P.; Songsasen, N. (2002) - Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*, 57: 303-326.

Marco-Jiménez, F.; Viudes de Castro, M.P.; Balasch, S.; Mocé, E.; Silvestre, M.A.; Gómez, E.A.; Vicente, J.S. (2006) - Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology*, 52: 295-304.

Martí, J.I.; Martí, E.; Cebrián-Pérez, E.; Muiño-Blanco, T. (2003) - Survival rate and antioxidant enzyme activity of ram spermatozoa after dilution with different extenders or selection by a dextran swim-up procedure. *Theriogenology.*, 60: 1025–1037.

Matsuoka, T.; Imai, H.; Kohno, H.; Fukui, Y. (2006) - Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozenthawed ram spermatozoa. *J. Reprod., Dev.* 52: 675–683.

Maxwell, W.M.C.; Watson, P.F. (1996) - Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci*, 42: 55-65.

Molinia, F.C.; Evans, G.; Maxwell, W.M. (1994) - In vitro evaluation of zwitterions buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reprod. Nutr., Dev.* 34: 491–500.

Moura, A.; Deschamps, J.C.; Moraes, J.C.F. (1995) - Effect of the concentration and addition temperature of trehalose in extenders on freezing ram semen in straws. *Ciência Rural.*, 25: 105–109.

Moussa, M.; Martinet, V.; Trimeche, A.; Tainturier, D.; Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull semen. *Theriogenology.*, 57: 1695–1706.

Nur, Z.; Zik, B.; Ustuner, B.; Sagirkaya, H.; Ozguden, C.G. (2010) - Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology.*, 73: 1267–1275.

O’Hara, L.; Hanrahan, J.P.; Richardson, L.; Donovan, A.; Fair, S. (2010) - Effect of storage duration, storage temperature, and diluents on the viability and fertility of fresh ram semen. *Theriogenology.*, 73: 541–549.

O’ Meara, C.; Hanrahan, J.; Donovan, A.; Fair, S.; Rizos, D.; Wade, M.; Boland, M.; Evans, A.; Lonergan, P. (2005) - Relationship between in vitro fertilization of ewe oocytes and the fertility of ewes following cervical artificial insemination with frozen thawed semen. *Theriogenology.*, 64: 1797–1808.

de Paz, P.; Estes, M.; Alvarez, M.; Mata, M.; Chamorro, C.; Anel, L. (2010) - Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. *Theriogenology.*, 74(4): 663–671.

Rasul, Z.; Anzar, M.; Jalali, S.; Ahmad, N. (2000) - Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science.*, 59: 31–41.

Rijsselaere, T.; van Soom, A.; Hoflack, G.; Maes, D.; de Kruif, A. (2004) - Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser. *Theriogenology.*, 62: 1292-1306.

Roca, J.; Gil, M. G.; Hernandez, M.; Parrilla, I.; Vazquez, J.M.; Martinez, E. A. (2004) - Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *J. Androl.*, 25: 397-405.

Rubio-Guillén, J.; Gonzalez, D.; Garde, J.J.; Estes, M.C.; Fernández Santos, M.R.; Rodríguez-Gíl, J.E.; Madrid-Bury, N.; Quintero-Moreno, A. (2007) - Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reprod. Dom. Anim.*, 42: 354-357.

Salamon, S.; Maxwell, W.M.C. (1995) - Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci.*, 38: 1-36.

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

Sánchez-Partida, L.G.; Setchell, B.P.; Maxwell, W.M.C. (1998) - Effect of compatible solutes and diluent composition on the post-thaw motility of ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, 10: 347–357.

Tonieto, R.A.; Goularte, K.L.; Gastal, G.D.A.; Schiavon, R.S.; Deschamps, J.C.; Lucia, J. (2010) - Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Ruminant Research.*, 93: 206–209.

Tuli, R.K.; Holtz, W. (1992) - The effect of zwitterions buffers on the freezability of Boer goat semen. *Theriogenology.*, 37: 947–951.

Watson, P. F.; Anderson, W. (1983) - Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. *J. Reprod. Fertil.*, 69: 229-235.

Watson, P.F. (1995) - Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fert Dev.*, 7: 871-891.

Watson, P.F. (2000) - The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.*, 60-61: 481-492.

Yániz, J.L.; Mateos, J.A.; Santolaria, P. (2011) - Zwitterionic buffers preserve ram semen quality more efficiently than TRIS during storage at 15 °C. *Small Ruminant Research.*, 95: 54–60.

Yildiz, C.; Kaya, A.; Aksoy, M.; Tekeli, T. (2000) - Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology.*, 54: 579–585.

Zhang, S.S.; Hu, J.H.; Li, Q.W.; Jian, W.L.; Zhang, X.Y. (2009) - The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *African Journal of Biotechnology.*, 8 (22): 6476-6480.

4.3. CAPITULO III

Estudio sobre la necesidad de la eliminación del plasma seminal en la congelación de semen de morueco y elección de la concentración óptima de BHT como antioxidante en los diluyentes de conservación espermática.

ABSTRACT

The necessity of eliminate seminal plasma (PS) by centrifugation before ram semen cryopreservation was assessed. Simultaneously, we studied the supplementation of different concentrations of BHT as antioxidant (0.6mM, 2mM and 5mM) on the extender in order to find the optimal concentration for a better ram sperm cryopreservation. Therefore, fresh ejaculates from 8 rams (4 *Xisqueta* and 4 of *Aranesa* breed) of approximately 2 years old were collected, immediately mixed in equal quantities and split into 2 aliquots. One of them was diluted (1:6) in Tris-based media and centrifugated at 600xg/10m twice, meanwhile the other aliquot was not washed. Afterwards, washed and unwashed sperm were re-suspended in one of different Tris-based media with 5% glycerol and 15% powdered egg yolk (YHP) supplemented or not with BHT y/or PS according the next treatments: 1) washed sperm diluted in YHP without any supplementation, 2) washed sperm diluted in YHP + 0.6 mM BHT, 3) washed sperm diluted in YHP + 2 mM BHT, 4) washed sperm diluted in YHP + 5 mM BHT, 5) washed sperm in YHP + 0.5 ml PS and 6) diluted in YHP + 5 mM BHT + 0.5 ml PS, 7) unwashed sperm diluted in YHP and 8) unwashed sperm diluted in YHP + 5mM BHT. Afterwards, sperm samples were refrigerated at 5° C for 4 hours before being frozen in nitrogen liquid vapors. Sperm motility was analyzed by computer assisted sperm analysis (ISAS®) and viability, acrosome integrity and viability after hyposmotic test (HOST) were determined by eosine/nigrosine stain after refrigeration. Moreover, after thawing, plasmatic and acrosomal membrane integrity and mitochondrial activity were determined by flow citometry, as well sperm motility and morphometry by ISAS ® (mean±SE, n=6). The comparison of the different concentrations of BHT showed us that the addition of 5 mM of BHT, independently of the presence of PS in the extenders, provided the best sperm parameters after preservation comparing it with the other treatments. Moreover, according to our results, sperm washing had a beneficial effect on ram sperm cryopreservation. However we can not explain the reason, besides the supplementation with 13% of PS in the extenders will not improve the parameters of seminal quality, but will not be worse.

INTRODUCCIÓN

Existen importantes factores que influyen en el éxito de la crioconservación como es el enfriamiento, congelación, descongelación y adición del crioprotector (Salamon y Maxwell, 2000). Todos estos procedimientos producen choque térmico y ataque oxidativo sobre la membrana de los espermatozoides con la generación de especies reactivas al oxígeno (ROS), lo cual disminuye la supervivencia y capacidad fecundante de las dosis conservadas para la Inseminación Artificial (Maxwell y Watson, 1996). La gran susceptibilidad de los espermatozoides a la producción excesiva de ROS se debe a que su membrana plasmática tienen un alto contenido de ácidos grasos insaturados, lo cual la hace susceptible a sufrir peroxidación lipídica (Amann y Pickett, 1987).

Durante la crioconservación, el incremento en la producción de ROS provoca la peroxidación lipídica, produciendo una pérdida del 60% de los ácidos grasos polinsaturados en la membrana plasmática (Álvarez y col., 1987), lo que conlleva a la pérdida de la integridad de ésta, alterándose la cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica de la membrana (Baumber y col., 2000). De igual manera, el daño oxidativo en las proteínas puede causar la pérdida de su actividad catalítica, daño en la integridad de proteínas estructurales o interrumpir la regulación de las vías metabólicas (Cárdenas, 2006). El ADN también constituye una diana del ROS, principalmente el ADN mitocondrial (Aitken y col., 1993; Ollero y col., 2001). Este ADN, por su localización, se encuentra expuesto a un flujo constante y elevado de ROS procedente de la cadena respiratoria, además el H_2O_2 causa una elevada fragmentación del ADN (Baumber y col., 2002). Dicha peroxidación está relacionada con la pérdida de la movilidad, viabilidad, integridad acrosomal, disminución del potencial de la membrana mitocondrial, fragmentación de ADN, capacidad de fecundación reducida y muerte celular (Watson, 1981; Fiser y Fairfull, 1989; Baumber y col., 2002)

Una manera de reducir los efectos perjudiciales de las ROS podría ser la adición de componentes con capacidad antioxidantes al diluyente de congelación para bloquear o prevenir el estrés oxidativo. Entre los diferentes componentes antioxidantes, el butil

hidroxitolueno (BHT), que es un análogo sintético de la vitamina E, ha sido probado con éxito en distintas especies como en espermatozoides de pavo (Donoghue y Donoghue, 1997), de búfalo (Ijaz y col., 2009), caballo (Ball y col., 2001), toro (Shoae y Zamiri, 2008), cerdo (Roca y col., 2004), moruecos (Farshad y col., 2010) y en macho cabrío (Khalifa y col., 2008), concluyendo éste último con la posibilidad de utilizar el BHT como un auxiliar o incluso un sustituto fiable de la yema de huevo en la crioconservación de semen, como ya ha sido comentado y estudiado en capítulos anteriores del presente trabajo.

Por otra parte, el plasma seminal cumple la función de regular todo los procesos que ocurren, tanto a nivel espermático como a nivel del tracto genital de la hembra y en la fecundación, principalmente en la nutrición, protección, regulación de la motilidad y capacitación de los espermatozoides, reconocimiento y unión entre gametos (Johnson y col., 2000). En la actualidad se está despertando un creciente interés en la utilización de plasma seminal o alguno de sus componentes, fundamentalmente proteínas (Caballero y col., 2004; Barrios y col., 2005; Hernández y col., 2007; Maxwell y col., 2007), como aditivo de los diluyentes espermáticos, para la posible estabilización de las membranas plasmáticas de los espermatozoides durante este proceso. Debido a la capacidad del plasma seminal de aumentar la resistencia de los espermatozoides al choque térmico por frío y reducir e incluso “revertir” el estado de capacitación espermática (Pursel y col., 1973; Vadnais y col., 2005), cabe pensar que su presencia durante la crioconservación podría eliminar o amortiguar el estado de criocapacitación, estado por el cual la vida del espermatozoide se ve seriamente limitada y, consecuentemente, su capacidad fecundante se reduce (Green y Watson, 2001; Kaneto y col., 2002). De esta manera, el plasma seminal en los medios de congelación podría alargar la longevidad de los espermatozoides mediante la unión de alguno de sus factores proteicos a la membrana plasmática, inhibiendo, en cierto grado, cambios estructurales y fisiológicos (Fraser y col., 1990; Maxwell y Johnson, 1999; Barrios y col., 2000).

Sin embargo, a pesar de que el plasma seminal es el medio natural de conservación de los espermatozoides, su efecto en el mantenimiento de la motilidad y viabilidad espermática es objeto de controversia, por lo que en la práctica, o bien se diluye el semen

usando un diluyente adecuado, o se separan los espermatozoides del plasma seminal mediante diferentes métodos como la centrifugación. Concretamente, el método de centrifugación permite eliminar el plasma seminal, tanto del semen fresco como del descongelado, y a su vez, incrementar la proporción de células con morfología normal y/o seleccionar poblaciones más motiles (Cebrián y col., 2010). No obstante, los efectos de la centrifugación dependen de la intensidad del lavado (Ritar y Salamon, 1982) y del diluyente utilizado (Ritar y Salamon, 1991) que pueden provocar daños en las células espermáticas y pérdidas del 6 al 15% de los espermatozoides (Ritar y Salamon, 1982; Leboeuf, y col., 2000).

El objetivo del presente estudio pretende valorar la suplementación de los medios de conservación con diferentes concentraciones de butil hidroxitolueno (0.6mM, 2.0mM y 5.0mM) como antioxidante y estudiar la necesidad o no de la eliminación del plasma seminal, junto con el análisis del posible efecto ejercido por el método de lavado o centrifugación en los diferentes parámetros de calidad seminal de los espermatozoides durante todo el proceso de refrigeración y crioconservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos utilizados procedían de la casa comercial Sigma-Aldrich, excepto la yema de huevo en polvo que procedía de NIVE (Nunspeet Holland Eiproducten).

Diseño experimental

El siguiente experimento se llevó a cabo entre las instalaciones del IRTA en Caldes de Montbui y la Universidad Autónoma de Barcelona. Para ello, se utilizaron 8 moruecos (4 de raza Xisqueta y 4 de Aranesa), a los que se les colectó semen con vagina artificial 2 días/semana y 2 eyaculados/día en otoño, a la de edad de 2 años aproximadamente, realizando un total de 6 réplicas en cada experimento. Tras la recogida de los eyaculados, y manteniéndolos en un Baño María a 37°C, se procedió a valorar su motilidad masal y

volumen siguiendo la clasificación de Evans y Maxwell (1990). A continuación, los eyaculados eran mezclados en un solo tubo (*pool*), a partir del cual se valoró la viabilidad y morfología de los espermatozoides mediante la tinción vital eosina/negrosina (Hancock, 1951), así como el análisis de la funcionalidad de la membrana plasmática mediante el test hiposmótico (test HOST; Jeyendran y col., 1984). Seguidamente, la mezcla de eyaculados se dividió en dos alícuotas. Una de ellas se diluyó (1:6) con una solución TCG descrita anteriormente y se centrifugó a 600 g durante 10 minutos. A continuación, se eliminó el sobrenadante, y el sedimento fue de nuevo resuspendido en 9 mL de la solución TGC para realizar una segunda centrifugación (600xg por 10'). Una vez descartado el sobrenadante, el sedimento fue recuperado para su posterior procesamiento, mientras que la otra alícuota permaneció sin ser lavada.

Finalmente, las anteriores alícuotas se dividieron de manera que se obtuvieron 6 alícuotas de semen que había sido centrifugado (lavado) y otras 2 alícuotas de semen que permaneció sin lavar. A continuación, las ocho alícuotas de semen fueron resuspendidas (1:4) en la solución TGC a una concentración final de 5% de glicerol y 15% de yema de huevo (v/v), pero conteniendo cada una de las soluciones de TGC, los distintos tratamientos que a continuación se describen:

- a) Semen lavado y diluyente sin antioxidante
- b) Semen lavado y diluyente con 0.6mM de BHT
- c) Semen lavado y diluyente con 2.0mM de BHT
- d) Semen lavado y diluyente con 5.0mM de BHT
- e) Semen lavado y diluyente con un 13 % (v/v) de plasma seminal
- f) Semen lavado y diluyente con un 13 % (v/v) de plasma seminal más BHT (5.0mM)
- g) Semen no lavado y diluyente sin antioxidante
- h) Semen no lavado y diluyente con 5.0mM de BHT

Todas las soluciones utilizadas para la conservación de los espermatozoides contenían 1000 UI/ml de penicilina benzatinica y 1.0 mg/ml de sulfato de estreptomycin, con el objetivo de evitar posible contaminaciones. Una vez homogenizadas las distintas

suspensiones, los tubos eran introducidos en un recipiente con 10 ml de agua a 20 °C, colocados en una nevera portátil (Dometic-Waeco®) a 5 °C y trasladados desde del IRTA a una cámara de frío de la Facultad de Veterinaria de la UAB. Tras aproximadamente 3h30' de permanecer las suspensiones espermáticas en refrigeración se les agregaron los diluyentes correspondientes, con la finalidad de llegar a una concentración final de 400×10^6 de espermatozoides/mL. A continuación, las distintas alícuotas refrigeradas se envasaron manualmente en pajuelas de 0.25 mL (IMV, L' Aigle Cedex, France) y sellaron con alcohol polivinílico. Una vez transcurridas las 4 horas de refrigeración, las pajuelas fueron congeladas en vapores de nitrógeno líquido (LN₂), a 5 cm por encima del nivel de LN₂ durante 10 minutos, para finalmente ser sumergidas en él para su almacenamiento hasta su descongelación.

Para la obtención del plasma seminal, se utilizó parte de la mezcla de eyaculados de semen fresco (*pool*) de los 8 moruecos, para lo cual, se colocaron 1.0 ml de semen en tubos Eppendorf, y se centrifugaron a 10,000 g, en una centrifuga a 5°C (Microfuge®) durante 10 minutos. A continuación, el sobrenadante era recuperado para volver a ser centrifugado durante otros 10 minutos a 10.000 g. Tras esta última centrifugación, el sobrenadante (plasma) fue recuperado cuidadosamente evitando cualquier contaminación del sedimento y posteriormente añadido a los diferentes diluyentes.

La metodología utilizada para la adición del BHT en las distintas soluciones fue similar a la descrita anteriormente por Khalifa y col., (2008), utilizándose varias concentraciones de BHT (0.6, 2.0 y 5.0 mM) disueltas en DMSO y con una concentración final de DMSO en el medio de conservación espermática de 0.25% (v/v, 35.2 mM).

Análisis de los parámetros de calidad seminal

El análisis de la viabilidad, morfología espermática y test de endosmosis (HOST) mediante la tinción de eosina-nigrosina se realizó únicamente tras la mezcla de eyaculados en fresco y tras 4 h de refrigeración de las distintas muestras conservadas, tal y como se describe en el primer capítulo. La cantidad y calidad de movimiento de los espermatozoides

en las distintas suspensiones espermáticas se evaluó tras la refrigeración y post-descongelación mediante el sistema ISAS[®] (Proiser R+D S.D., Valencia). Para evaluar conjuntamente la integridad física y funcional de la membrana plasmática, la integridad del acrosoma y la actividad mitocondrial de los espermatozoides tras la descongelación, las muestras fueron sometidas a diferentes tinciones con fluorocromos, tal como se describe en el primer capítulo, y analizadas mediante citometría de flujo.

Análisis Estadístico

Los datos de viabilidad, morfología, integridad funcional de la membrana plasmática, integridad del acrosoma, actividad mitocondrial, morfometría y los parámetros cinéticos descriptores del movimiento espermático (variables dependientes), se analizaron mediante el procedimiento GLM (ANOVA) de SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.), siendo los valores obtenidos expresados como media \pm error estándar de la media. Se realizó 6 repeticiones en cada tratamiento. Cuando las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$), se realizó el test de Bonferroni de comparación de medias a posteriori. La normalidad y homogeneidad de varianza de los parámetros espermáticos se comprobaron con el tests de Kolmogorv-smirnov y Levene. Las variables dependientes que no cumplieron con los supuestos de igualdad de varianza y distribución normal fueron sometidas a una transformación arcoseno, antes del análisis estadístico.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos tras el análisis seminal de la mezcla de eyaculados son una concentración seminal de 3.621 ± 256.2 millones de espermatozoides/mL, una viabilidad estimada por E/N del $89.2 \% \pm 2.1$ e integridad funcional de sus membranas tras la prueba de HOST del $67.4 \% \pm 2.5$, una integridad del acrosoma del $83.9 \% \pm 1.5$ %, una motilidad masal de 2.59 ± 0.11 y un porcentaje de anormalidades espermáticas de $23.5 \% \pm 3.2$.

Al comparar los resultados obtenidos de viabilidad tras el proceso de refrigeración (Tabla 1.), se observa que aquellos espermatozoides sin lavar y conservados en ausencia de

BHT presentaron valores inferiores al resto de tratamientos, aunque solo significativamente diferentes con los presentados por los espermatozoides lavados y conservados con BHT (5.0mM), complementados o no con plasma seminal en el diluyente. Además, estos dos últimos tratamientos fueron los que a su vez proporcionaron una mayor capacidad de resistencia al shock hipoosmótico respecto al resto de tratamientos.

De la misma manera, la mayoría de los parámetros cinéticos analizados mediante el sistema ISAS de las distintas suspensiones espermáticas sometidas a estudio (Tabla 1.) parecen mostrar un patrón semejante a lo anteriormente descrito, especialmente en lo que se refiere a las diferencias observadas en la motilidad total y progresiva y en linealidad, presentándose los valores más bajos en los espermatozoides sin lavar conservados en ausencia de BHT, los valores intermedios en el resto de tratamientos, mientras que los valores superiores se observaron en aquellos espermatozoides lavados y refrigerados con BHT (5.0mM), independientemente de si estaban combinados o no con plasma seminal, y sin diferencias significativas entre ambos. Respecto a la VAP, mencionar que únicamente el tratamiento donde los espermatozoides no fueron lavados y fueron conservados en ausencia del antioxidante presentaron valores significativamente inferiores al resto de los tratamientos, así como destacar que tampoco existieron diferencias entre ninguno de los tratamientos en los valores del movimiento lateral de la cabeza y la frecuencia de batido.

Una vez analizados los distintos parámetros espermáticos tras la descongelación de las muestras seminales (Tabla 2.), los resultados siguieron, incluso más claramente, la misma tendencia observada en los espermatozoides refrigerados en todos los parámetros cinéticos, mostrando 3 categorías de resultados, es decir, valores significativamente superiores en los espermatozoides lavados y crioconsevados con BHT al 5.0mM, independientemente de si estaban complementados o no con plasma seminal, inferiores en los espermatozoides no lavados y en ausencia del antioxidante e intermedios en el resto de tratamientos estudiados, a excepción de los valores de VCL e índice de rectitud obtenidos en el tratamiento donde los espermatozoides fueron congelados sin lavar previamente, pero con BHT (5.0 mM) en el medio, los cuales no difirieron de lo registrado en el mismo tratamiento pero sin presencia de antioxidante.

Tabla 1. Efecto de la adición de plasma seminal y/o BHT a diferentes concentraciones en los medios de conservación sobre la viabilidad, resistencia osmótica y motilidad de espermatozoides ovinos lavados y no lavados tras la refrigeración (media \pm se, n=6).

Tratamientos	Lavados	Lavados 0.6 BHT	Lavados 2.0 BHT	Lavados 5.0 BHT	Lavados +PS	Sin lavar	Sin lavar 5.0 BHT	Lavados 5.0BHT+PS
Viabilidad (%)	76.9 \pm 3.0 ^{ab}	77.0 \pm 3.2 ^{ab}	75.2 \pm 3.4 ^{ab}	85.4 \pm 0.4 ^b	77.7 \pm 4.2 ^{ab}	67.8 \pm 0.9 ^a	74.8 \pm 4.7 ^{ab}	87.4 \pm 3.0 ^b
HOST (%)	49.4 \pm 3.1 ^b	48.8 \pm 2.1 ^b	49.0 \pm 2.7 ^b	61.2 \pm 3.4 ^a	49.3 \pm 0.7 ^b	41.0 \pm 3.7 ^b	47.2 \pm 1.1 ^b	62.5 \pm 2.9 ^a
MT (%)	76.6 \pm 1.6 ^b	75.3 \pm 1.1 ^b	77.6 \pm 3.3 ^b	89.3 \pm 1.6 ^a	78.3 \pm 3.0 ^b	58.9 \pm 5.4 ^c	77.7 \pm 1.6 ^b	86.7 \pm 2.3 ^a
MP (%)	41.5 \pm 0.9 ^b	41.2 \pm 5.7 ^b	42.9 \pm 4.3 ^b	53.8 \pm 3.3 ^a	43.3 \pm 1.6 ^b	29.5 \pm 0.8 ^c	40.2 \pm 1.2 ^b	54.7 \pm 1.9 ^a
VCL(μm/s)	103.2 \pm 4.4 ^b	108.8 \pm 1.5 ^{ab}	109.7 \pm 5.1 ^{ab}	117.4 \pm 4.6 ^{ab}	107.8 \pm 1.9 ^{ab}	82.6 \pm 3.5 ^c	102.8 \pm 1.0 ^b	119.1 \pm 2.0 ^a
VSL (μm/s)	63.1 \pm 2.6 ^{bc}	62.4 \pm 2.0 ^{bc}	61.0 \pm 2.9 ^c	70.1 \pm 1.9 ^{ab}	61.7 \pm 1.1 ^{bc}	55.2 \pm 0.5 ^c	61.7 \pm 1.5 ^{bc}	72.3 \pm 3.3 ^a
VAP (μm/s)	83.9 \pm 4.2 ^a	81.7 \pm 2.9 ^a	83.5 \pm 3.4 ^a	87.5 \pm 1.6 ^a	82.3 \pm 2.7 ^a	70.3 \pm 1.2 ^b	81.3 \pm 0.5 ^a	88.0 \pm 2.9 ^a
LIN (%)	57.4 \pm 0.5 ^b	58.2 \pm 0.7 ^b	57.1 \pm 0.5 ^b	62.1 \pm 1.6 ^a	57.5 \pm 1.1 ^b	50.5 \pm 1.6 ^c	57.7 \pm 2.4 ^b	64.5 \pm 1.4 ^a
STR (%)	76.8 \pm 0.6 ^{bc}	74.4 \pm 1.2 ^c	76.5 \pm 1.5 ^{bc}	81.7 \pm 1.3 ^a	76.8 \pm 1.0 ^{bc}	67.7 \pm 1.2 ^d	75.7 \pm 1.5 ^c	80.6 \pm 0.7 ^a
ALH(μm)	3.9 \pm 0.2	3.6 \pm 0.1	3.5 \pm 0.2	3.3 \pm 0.2	3.4 \pm 0.1	3.5 \pm 0.2	3.4 \pm 0.1	3.4 \pm 0.1
BCF (Hz)	11.4 \pm 0.5	10.1 \pm 0.6	10.5 \pm 0.7	10.5 \pm 0.4	10.5 \pm 0.6	10.4 \pm 0.5	10.1 \pm 0.4	10.6 \pm 0.4

^{a,d}Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre tratamientos (**Lavado**: YH en polvo lavado, **Lavado0.6BHT**: Lavado + BHT(0.6mM), **Lavado2.0BHT**: Lavado + BHT(2.0mM), **Lavado5.0BHT**: Lavado + BHT(5.0mM), **Lavado+PS**: Lavado + 0.5 ml de plasma seminal, **Sin lavar**: YH en polvo sin lavar, **Sin lavar5.0BHT**: Sin lavar + BHT(5.0mM), **Lavado5.0BHT+PS**: Lavado + BHT(5.0mM) + 0.5ml de plasma seminal). **MT**: motilidad total, **MP**: motilidad progresiva, **VCL**: velocidad curvilínea, **VSL**: velocidad rectilínea, **VAP**: velocidad media, **LIN**: índice de linealidad, **STR**: índice de rectitud, **ALH**: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, **BCF**: frecuencia de batida. Numero de espermatozoides = 9,358

Tabla 2. Efecto de la adición de plasma seminal y/o BHT a diferentes concentraciones en los medios de conservación sobre la motilidad de espermatozoides ovinos lavados y no lavados tras la descongelación (media \pm se, n=6).

Tratamientos	Lavados	Lavados 0.6 BHT	Lavados 2.0 BHT	Lavados 5.0 BHT	Lavados +PS	Sin lavar	Sin lavar 5.0 BHT	Lavados 5.0BHT+PS
MT (%)	34.5 \pm 4.9 ^{ab}	35.0 \pm 5.5 ^{ab}	34.6 \pm 1.3 ^{ab}	45.7 \pm 1.1 ^a	33.8 \pm 6.0 ^{ab}	25.2 \pm 1.0 ^b	37.3 \pm 5.2 ^{ab}	47.3 \pm 2.2 ^a
MP (%)	21.3 \pm 0.9 ^b	22.1 \pm 1.1 ^b	20.7 \pm 0.8 ^b	29.0 \pm 0.7 ^a	21.3 \pm 0.7 ^b	16.0 \pm 2.4 ^c	22.3 \pm 1.5 ^b	30.8 \pm 0.5 ^a
VCL(μ m/s)	76.5 \pm 3.3 ^b	77.5 \pm 1.2 ^b	76.5 \pm 4.3 ^b	87.2 \pm 1.2 ^a	78.1 \pm 0.8 ^b	67.5 \pm 0.6 ^c	74.2 \pm 2.6 ^{bc}	85.1 \pm 3.4 ^a
VSL (μ m/s)	36.0 \pm 3.7 ^b	35.4 \pm 1.7 ^b	36.0 \pm 2.2 ^b	41.7 \pm 2.7 ^a	35.1 \pm 1.5 ^b	28.4 \pm 0.8 ^c	35.8 \pm 1.3 ^b	42.6 \pm 0.7 ^a
VAP (μ m/s)	46.0 \pm 1.8 ^b	44.0 \pm 4.2 ^b	46.1 \pm 3.1 ^b	54.5 \pm 1.4 ^a	45.2 \pm 1.3 ^b	37.4 \pm 1.5 ^c	45.1 \pm 1.9 ^b	57.5 \pm 0.8 ^a
LIN (%)	42.8 \pm 2.3 ^b	43.9 \pm 2.6 ^b	43.7 \pm 3.2 ^b	52.6 \pm 0.8 ^a	42.5 \pm 1.7 ^b	35.0 \pm 0.4 ^c	42.1 \pm 2.4 ^b	50.6 \pm 1.2 ^a
STR (%)	73.4 \pm 2.3 ^{bc}	72.6 \pm 2.2 ^{bc}	71.3 \pm 2.4 ^c	80.3 \pm 1.0 ^a	71.8 \pm 2.0 ^c	65.1 \pm 2.3 ^d	70.7 \pm 2.0 ^{cd}	79.5 \pm 1.1 ^a
ALH(μ m)	3.0 \pm 0.1	3.1 \pm 0.1	2.9 \pm 0.1	3.0 \pm 0.1	3.1 \pm 0.1	3.1 \pm 0.2	2.9 \pm 0.1	3.0 \pm 0.1
BCF (Hz)	10.6 \pm 0.5	11.1 \pm 0.3	10.5 \pm 0.7	10.8 \pm 0.7	11.3 \pm 0.4	11.4 \pm 0.6	11.5 \pm 0.2	10.6 \pm 0.4

^{a,d}Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre tratamientos (**Lavado**: YH en polvo lavado, **Lavado0.6BHT**: Lavado + BHT(0.6mM), **Lavado2.0BHT**: Lavado + BHT(2.0mM), **Lavado5.0BHT**: Lavado + BHT(5.0mM), **Lavado+PS**: Lavado + 0.5 ml de plasma seminal, **Sin lavar**: YH en polvo sin lavar, **Sin lavar5.0BHT**: Sin lavar + BHT(5.0mM), **Lavado5.0BHT+PS**: Lavado + BHT(5.0mM) + 0.5ml de plasma seminal). **MT**: motilidad total, **MP**: motilidad progresiva, **VCL**: velocidad curvilínea, **VSL**: velocidad rectilínea, **VAP**: velocidad media, **LIN**: índice de linealidad, **STR**: índice de rectitud, **ALH**: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, **BCF**: frecuencia de batida. Numero de espermatozoides = 3920

El análisis de los parámetros obtenidos mediante citometría de flujo (Tabla 3.) de viabilidad, integridad acrosomal y actividad mitocondrial de los espermatozoides tras la descongelación, confirman de nuevo lo que se había descrito en el análisis de la motilidad, observándose que los espermatozoides lavados previamente y congelados en un medio con una concentración de 5 mM de BHT, complementados o no con plasma seminal, presentaron una viabilidad significativamente superior a la de los espermatozoides no lavados y conservados en ausencia del antioxidante, quienes presentaron los valores inferiores, mientras que el resto de tratamientos presentaron valores intermedios. Únicamente destacar que esta población de espermatozoides viables hace referencia mayoritariamente a espermatozoides con membrana plasmática y acrosomal intactas y con una actividad mitocondrial alta, ya que el resto de subpoblaciones detectadas por el citómetro con membrana plasmática intacta presentaron valores muy bajos (de alrededor de un 1% o menos) y sin diferencias significativas apreciables entre tratamientos.

Tabla 3. Efecto de la adición de plasma seminal y/o BHT a diferentes concentraciones en los medios de conservación sobre viabilidad, integridad acrosomal y actividad mitocondrial de espermatozoides ovinos lavados y no lavados descongelados (media \pm se, n=6).

Tratamiento	Viabilidad	VAI	VAD	VSI	VSD	AI	VD
Lavados	37.2 \pm 2.7 ^b	34.5 \pm 2.6 ^b	1.3 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	62.2 \pm 1.9	1.4 \pm 0.1
Lavados 0.6 BHT	37.8 \pm 2.7 ^b	35.4 \pm 2.7 ^b	1.1 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	62.6 \pm 1.7	1.2 \pm 0.1
Lavados 2.0 BHT	40.3 \pm 1.5 ^b	37.7 \pm 1.5 ^b	1.1 \pm 0.2	1.4 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	63.4 \pm 2.1	1.2 \pm 0.1
Lavados 5.0 BHT	46.3 \pm 0.6 ^a	43.3 \pm 0.4 ^a	0.8 \pm 0.3	0.8 \pm 0.1	0.3 \pm 0.2	69.1 \pm 1.6	1.1 \pm 0.2
Lavados +PS	38.3 \pm 1.4 ^b	35.5 \pm 1.3 ^b	1.2 \pm 0.3	1.4 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	65.5 \pm 1.3	1.3 \pm 0.2
Sin lavar	31.1 \pm 2.9 ^c	28.7 \pm 2.7 ^c	1.3 \pm 0.3	1.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.2	63.7 \pm 2.8	1.4 \pm 0.2
Sin lavar 5.0 BHT	40.2 \pm 0.9 ^b	38.1 \pm 1.0 ^b	0.9 \pm 0.2	1.0 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	60.6 \pm 1.2	1.0 \pm 0.1
Lavados 5.0 BHT+PS	47.2 \pm 1.9 ^a	45.2 \pm 1.8 ^a	0.8 \pm 0.2	0.8 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	65.8 \pm 3.7	1.0 \pm 0.1

^{a,d}Diferentes letras dentro de una misma columna representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre tratamientos (**Lavado**: YH en polvo lavado, **Lavado0.6BHT**: Lavado + BHT(0.6mM), **Lavado2.0BHT**: Lavado + BHT(2.0mM), **Lavado5.0BHT**: Lavado + BHT(5.0mM), **Lavado+PS**: Lavado + 0.5 ml de plasma seminal, **Sin lavar**: YH en polvo sin lavar, **Sin lavar5.0BHT**: Sin lavar + BHT(5.0mM), **Lavado5.0BHT+PS**: Lavado + BHT(5.0mM) + 0.5ml de plasma seminal). **VAI**: vivos con actividad mitocondrial y acrosoma intacta, **VAD**: vivos con actividad mitocondrial y con acrosoma dañado, **VSI**: vivos sin actividad mitocondrial y acrosoma intacto, **VSD**: vivos sin actividad

mitocondrial y con acrosoma dañado, **AI**: vivos y muertos con acrosoma intacto, **AD**: vivos con acrosoma dañado.

Respecto a la capacidad de resistencia osmótica de los espermatozoides descongelados (Tabla 4.), se aprecia un comportamiento similar a lo observado tras descongelar, es decir, valores significativamente superiores en los espermatozoides lavados y crioconsevados con BHT al 5.0mM, con y sin la adición de plasma seminal, inferiores en los espermatozoides no lavados y en ausencia del BHT e intermedios en el resto de tratamientos. Aunque en este caso, los espermatozoides conservados, una vez lavados, en YHP sin antioxidante, presentaron una menor capacidad de resistencia al shock hipoosmótico que la observada en caso de los espermatozoides no lavados y conservados en presencia de BHT (5 mM). Destacar que cuando los espermatozoides descongelados son sometidos al estrés hipoosmótico, los tratamientos que presentaron un menor porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática y acrosomal intactas pero con baja actividad mitocondrial fueron aquellos en los que los espermatozoides fueron conservados con el BHT a una concentración de 5 mM, independientemente de haber sido lavados o complementados con plasma seminal.

Tabla 4. Efecto de la adición de plasma seminal y/o BHT a diferentes concentraciones en los medios de conservación sobre la viabilidad, integridad acrosomal y actividad mitocondrial de espermatozoides ovinos descongelados (lavados y no lavados) tras el shock hipoosmótico (media \pm se, n=6).

Tratamiento	Viabilidad	VAI	VAD	VSI	VSD	AI	VD
Lavados	30.2 \pm 0.9 ^b	22.6 \pm 0.8 ^b	3.0 \pm 0.1 ^a	3.6 \pm 0.5 ^a	1.0 \pm 0.0	55.3 \pm 2.1	4.0 \pm 0.3 ^a
Lavados 0.6 BHT	31.4 \pm 1.5 ^{bc}	24.9 \pm 1.0 ^b	2.2 \pm 0.4 ^{ab}	3.2 \pm 0.7 ^a	1.0 \pm 0.0	55.2 \pm 3.1	3.2 \pm 0.4 ^{ab}
Lavados 2.0 BHT	33.1 \pm 1.0 ^{bc}	26.1 \pm 1.0 ^{bc}	2.2 \pm 0.5 ^{ab}	3.7 \pm 0.5 ^a	1.1 \pm 0.1	54.8 \pm 3.0	3.3 \pm 0.2 ^{ab}
Lavados 5.0 BHT	42.9 \pm 0.5 ^d	38.6 \pm 1.0 ^d	1.5 \pm 0.3 ^b	1.5 \pm 0.9 ^b	1.3 \pm 0.2	62.2 \pm 2.4	2.9 \pm 0.3 ^b
Lavados +PS	31.1 \pm 0.9 ^{bc}	24.5 \pm 1.0 ^b	1.9 \pm 0.1 ^b	3.7 \pm 0.8 ^a	1.0 \pm 0.1	56.7 \pm 1.8	2.9 \pm 0.1 ^b
Sin lavar	25.3 \pm 1.5 ^a	18.1 \pm 1.3 ^a	3.0 \pm 0.1 ^a	3.5 \pm 0.6 ^a	1.0 \pm 0.1	55.2 \pm 1.8	4.0 \pm 0.3 ^a
Sin lavar 5.0 BHT	34.5 \pm 1.3 ^c	30.3 \pm 1.4 ^c	1.5 \pm 0.1 ^b	1.6 \pm 0.6 ^b	1.1 \pm 0.0	55.3 \pm 2.6	2.6 \pm 0.6 ^b
Lavados 5.0 BHT+PS	43.5 \pm 1.7 ^d	39.4 \pm 1.1 ^d	1.3 \pm 0.2 ^b	1.4 \pm 0.4 ^b	1.3 \pm 0.1	62.5 \pm 1.3	2.7 \pm 0.2 ^b

^{a,d}Diferentes letras dentro de una misma columna representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre tratamientos (**Lavado**: YH en polvo lavado, **Lavado0.6BHT**: Lavado + BHT(0.6mM), **Lavado2.0BHT**: Lavado + BHT(2.0mM), **Lavado5.0BHT**: Lavado + BHT(5.0mM), **Lavado+PS**: Lavado + 0.5 ml de plasma seminal, **Sin lavar**: YH en polvo sin lavar, **Sin lavar5.0BHT**: Sin lavar + BHT(5.0mM), **Lavado5.0BHT+PS**: Lavado + BHT(5.0mM) + 0.5ml de plasma seminal). **VAI**: vivos con actividad mitocondrial y acrosoma intacta, **VAD**: vivos con actividad mitocondrial y con acrosoma dañado, **VSI**: vivos sin actividad mitocondrial y acrosoma intacto, **VSD**: vivos sin actividad mitocondrial y con acrosoma dañado, **AI**: vivos y muertos con acrosoma integro, **VD**: vivos con acrosoma dañado.

Al hacer la comparación de las medidas morfométricas mediante el sistema ISAS, de los espermatozoides frescos con los espermatozoides lavados y no lavados y criopreservados en yema de huevo en polvo con diferentes concentraciones de BHT, independientemente si estaban combinados con plasma seminal, no se observó ninguna diferencia significativa de dimensiones y forma de cabeza, obteniéndose los siguientes valores medios de longitud de la cabeza ($8.5 \pm 0.0 \mu\text{m}$), ancho ($4.9 \pm 0.0 \mu\text{m}$), área ($34.5 \pm 0.4 \mu\text{m}^2$), perímetro ($23.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$), elipticidad (1.7 ± 0.0), elongación (0.3 ± 0.0), rugosidad (0.8 ± 0.0) y regularidad (0.9 ± 0.0).

DISCUSIÓN

Los valores medios de la mayoría de parámetros espermáticos del semen fresco fueron similares a los registrados en razas de ovinos, como la Gallega (Barrio y col., 1995), la Guirra (Marco-Jiménez y col., 2003), Latxa (Beltrán de Heredia, 1995), e inferiores a los obtenidos en Asaff y Churra (Alvarez y col., 2000), Manchega (Alcaide y col., 2001) y raza Ile France (Bravo, 2010), obtenidos en la región mediterránea en condiciones climáticas casi similares a las acaecidas en nuestra experiencia.

Una manera de superar los efectos perjudiciales de ROS en la calidad de los espermatozoides después del descongelado es incluir antioxidantes exógenos al diluyente de criopreservación para disminuir o prevenir el estrés oxidativo. Para algunos autores, la adición de BHT al diluyente de criopreservación en espermatozoides de diferentes especies ha mostrado tener efectos beneficiosos (Ijaz y col., 2009; Neagu y col., 2010), mientras que en otros trabajos se ha descrito un efecto perjudicial (Ball y col., 2001) con respecto a la mejora de la supervivencia espermática. Estos hallazgos indican que todavía existen dificultades técnicas al utilizar el BHT en los medios de criopreservación de semen en las diferentes especies.

Los resultados del presente estudio muestran que los espermatozoides lavados y conservados en yema de huevo en polvo con la adición de 5.0 mM de BHT, independientemente de estar combinados o no con plasma seminal en el diluyente de criopreservación presentan valores significativamente superiores de viabilidad y resistencia osmótica de la membrana plasmática, de actividad mitocondrial e integridad del acrosoma y de motilidad total y progresiva, así como mejores valores en los diferentes descriptores cinéticos en comparación con los demás tratamientos. Resultados similares han sido reportados por Watson y Anderson (1983) con una concentración de BHT del 4 mM, mientras que Farshal y col., (2010) obtuvieron los mejores parámetros de calidad seminal con la adición de 2.0 y 3.0 mM de BHT, ambos en espermatozoides de morueco sin lavar, teniendo como medio de criopreservación el compuesto por el tampón Tris y yema de huevo fresco y congelados en vapores de nitrógeno.

En otras especies, como en el caprino, Kalifa y col., (2008) obtuvieron una mejora en la motilidad progresiva post-congelación de los espermatozoides similar a nuestros resultados, así como en la fertilidad, cuando utilizaron 5.0 mM de BHT incluido en el diluyente, en comparación a concentraciones de 0.3, 0.6, 2.0 y 8.0mM de BHT. Otros autores consiguieron los mejores resultados de viabilidad, motilidad, integridad funcional de la membrana plasmática y menor daño en el acrosoma, con la adición de 1 y 2.0 mM de BHT en los medios de criopreservación de espermatozoides de búfalo (Ijas y col., 2009), de 0.2 y 1.6 mM de BHT en toro (Asadpour y col., 2012) o de 1.0 mM de BHT en perro (Neagu y col., 2010). En apoyo a estos anteriores resultados, un estudio llevado a cabo *in vitro* demostró que la adición de 0.4 mM de BHT al diluyente de congelación fue beneficioso para el espermatozoide de verraco, ya que aumentó la capacidad de los espermatozoides de penetrar el ovocito (Roca y col., 2004).

Estas diferencias entre especies o incluso laboratorios respecto a qué concentración de BHT es la óptima podría deberse a que el efecto potencial de BHT en la prevención de los daños oxidativos en los espermatozoides durante la criopreservación depende de muchos factores, tales como la composición del diluyente, tasa de dilución, enfriamiento y el método concreto de congelación-descongelación (Ball y col., 2001; Roca y col., 2004; Kalifa y col., 2008), así como la composición de la membrana espermática en las distintas especies. En espermatozoides ovinos, la membrana plasmática tiene una baja relación colesterol/fosfolípidos (Darin-Bennett y White, 1977), así como un alto contenido de fosfolípidos insaturados (Watson, 2000) si la comparamos con otras especies, lo que podría explicar, al menos en parte, nuestro resultados.

De todos modos, el mecanismo exacto por el cual el BHT parece provocar mejoras en los procesos de congelación de los espermatozoides no es del todo conocido. Hammerstedt y col., (1976) indican que el BHT, es un antioxidante fenólico, que se incorpora en la membrana de los espermatozoides, disminuyendo la viscosidad de los lípidos de membrana y reduciendo así los cambios de permeabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide durante el proceso de criopreservación. Asimismo, el BHT parece prevenir o reducir la actividad dañina de los radicales libres, mediante la conversión

de los radicales peróxil a hidroperóxidos, e interacciona con los componentes del diluyente para minimizar el daño durante la refrigeración y criopreservación del espermatozoide (Killian y col., 1989; Aitken y Clarkson, 1988; Aitken, 1995).

Por otra parte, según nuestros resultados, el lavado mediante centrifugación del semen proporcionó un efecto beneficioso en la criopreservación de los espermatozoides de morueco, tal y como se aprecia en los valores de viabilidad, integridad de las membranas plasmática y acrosomal, parámetros cinéticos de velocidad, de progresión y actividad mitocondrial, especialmente tras la descongelación. Sin embargo, tal y como se mencionó en el primer capítulo, todavía no podemos asegurar cuál es la causa de esta mayor supervivencia, ya que podría deberse a varios motivos. Uno podría ser que la eliminación del plasma seminal del medio de crioconservación puede mejorar la capacidad crioprotectora de la yema de huevo contra el shock por frío, ya descrito en diferentes especies (Corteel, 1980; Aboagla y Terada 2003; Bispo y col., 2011; Bathgate y col., 2006; Martim y col., 1979) o bien que en la técnica de separación del plasma seminal mediante el método de la centrifugación, además de eliminar el plasma seminal, elimine también un porcentaje de los espermatozoides dañados y muertos, con la selección de poblaciones más motiles y en algunos casos, de mayor viabilidad (Cebrián y col., 2010).

Sin embargo, en el presente estudio, la adición de plasma seminal en el medio de conservación de los espermatozoides lavados antes de la criopreservación no empeoró la capacidad crioprotectora del huevo, tal y como muestran los valores de viabilidad, integridad funcional de la membrana plasmática, parámetros de velocidad, progresión y dirección de la cabeza de los espermatozoides obtenidos tanto tras el proceso de refrigeración como el de la congelación y descongelación. De hecho, cuando comparamos el tratamiento que mejores resultados nos ha proporcionado, es decir, la congelación de espermatozoides lavados en un medio a base de yema de huevo en polvo con un 5 mM BHT, ninguno de los parámetros analizados difirió de los observados con el mismo tratamiento pero adicionando un 13% de plasma seminal. Se ha descrito que la adición de entre un 10 a un 40 % de plasma seminal en los medios de crioconservación aumenta la resistencia de los espermatozoides al choque de frío, reduciendo o incluso revertiendo el

estado de criocapacitación (Pérez-Pé y col., 2001; Barrios y col., 2005) y mejorando la viabilidad en espermatozoides de toro (Maxwell y col., 1996), morueco (Ashworth y col., 1994; Graham 1994) y cerdo (Maxwell y col., 1998). En cambio, otros trabajos realizados en espermatozoides de caballos (Moore y col., 2005) y también de moruecos (Morrier y col., 2003) han descrito que la inclusión de 10 y 25 % de plasma seminal no mejoró las características del semen tras la refrigeración, así como tampoco la inclusión de un 30 % de plasma seminal mejoró las características de los espermatozoides ovinos no lavados post-descongelación (Rovegno y col., 2013). Incluso existen autores que describen efectos negativos del plasma seminal sobre la motilidad (de Lamirande y Gagnon, 1984) o la viabilidad (Garcia y Grahan 1987a; Kawano y col., 2003) y la supervivencia después de la congelación-descongelación (Watson 1981; Schmehl y col., 1986; Moore y col., 2005).

Es evidente que el papel del plasma seminal en la criopreservación es un tema controvertido debido a la compleja composición del plasma seminal, ya que, como se ha descrito en el capítulo uno, además de proteínas, existen otros componentes, como compuestos de bajo peso molecular, que podrían resultar nocivos para los espermatozoides, y que varían según las especies (Garcia y Grahan, 1987b; Catt y col., 1997). No obstante, en nuestro caso, el plasma seminal añadido no parece tener efecto, ya sea porque la cantidad añadida del 13 %, no fuera la suficiente para mostrar diferencias o por la composición del plasma seminal de nuestros machos, la cual puede verse afectada por factores ambientales, tales como la temporada de la recolección, la temperatura, la nutrición o el estrés (Pérez-Pé y col., 2001, Muiño-Blanco y col., 2008). Independientemente de cuál sea el motivo, en nuestras condiciones, el semen no lavado proporciona los peores resultados tras la conservación, a no ser que añadamos el BHT (5 mM), el cual nos mejora los resultados hasta igualar los valores obtenidos cuando el plasma seminal es eliminado por centrifugación, lo que nos demuestra de nuevo la bondad del antioxidante BHT. Por otra parte, si se produce o no una selección “involuntaria” de los espermatozoides durante la mera centrifugación, más análisis deberían haberse llevado a cabo para poder afirmarlo, aunque la posibilidad tampoco puede ser descartada.

En conclusión, la adición de BHT en una concentración de 5.0mM mejora los parámetros de calidad seminal en los espermatozoides, lavados y no lavados, crioconservados en yema de huevo en polvo. Además, la centrifugación previa de los espermatozoides para eliminar el plasma seminal mejora la criosupervivencia, mejora que parece no deberse a la ausencia del plasma seminal, ya que la suplementación con 13 % plasma seminal en los medios de crioconservación de los espermatozoides lavados no tuvo efecto en los parámetros de calidad seminal. Sin embargo, más estudios deben llevarse a cabo para confirmar estos resultados como pruebas de fertilidad *in vitro* e *in vivo* a través de la inseminación artificial.

BIBLIOGRAFÍA

Aboagla, E.M.E.; Terada, T. (2004) - Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62(6): 1160-1172.

Aitken, R. J.; Clarkson, J.S. (1988) - Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of spermatozoa preparation techniques. *J. Androl.* 9: 367-376.

Aitken, R.J.; Harkiss, D.; Buckingham, D. (1993) - Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J Reprod Fertil.* 98: 257-65.

Aitken, R. J. (1995) - Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7:659-668.

Alcaide, V.; Manso, A.; Moyano, J.C.; García-Cervigón, M.; Palomares, M.D.; Montoro, V. (2001) – Influencia de los implantes de melatonina sobre la calidad seminal en los moruecos del esquema de selección de la raza ovina Manchega. Producción ovina y caprina. Nº XXVI-SEOC. Sevilla, España. pp: 959-963.

Alvarez, J. G.; Touchstone, J.C.; Blasco, L.; Storey, B.T. (1987) - Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa:

Superoxide dismutase as a major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.* 23: 338-348.

Álvarez, M.; Kaabi, M.; Boixo, J.C.; Anel, E.; Chamorro, C.A.; Martínez, S.; Anel, L. (2000) - Características seminales de las razas ovinas Churra y Assaf. Producción ovina y caprina. Nº XXV-SEOC.Teruel, España. 567-569

Amann, R.; Pickett, B. (1987) - Principles of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 7: 145-173

Asadpour, R.; Tayefi-Nasrabadi, H. (2012) - The effect of butylated hydroxytoluene (BHT) on bull spermatozoa frozen in two different extenders. *Comp Clin Pathol.* 21: 577–581.

Ashworth, P.J.C.; Harrison, R.A.P.; Miller, N.G.A.; Plummer, J.M.; Watson, P.F. (1994) - Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* 6: 173–180.

Ball, B. A.; Medina, V.; Gravance, C.G.; Bumber, J. (2001) - Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology* 56: 577-589.

Barrio, F.; Peña, A.I.; Quintela, L.A.; Herradóm, P.G. (1995) - Influencia del factor individual sobre las características espermáticas de la raza ovina Gallega. Producción ovina y caprina. Nº XX-SEOC. Madrid, España.127-130.

Barrios, B.; Pérez-Pé, R.; Gallego, M.; Tato, A.; Osada, J.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A. (2000) - Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of Reproduction*, 63: 1531-37.

Barrios, B.; Fernandez-Juan, M.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A. (2005) - Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *J Androl.*26: 539-549.

Bathgate, R., Maxwell, W.M.; Evans, G. (2006) - Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 41: 68-73.

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: 895-902.

Baumber, J.; Ball, B.A.; Linfor, J.J.; Meyers, S.A. (2002) - Reactive oxygen species and cryopreservation promote deoxyribonucleic acid (DNA) damage in equine sperm. *Theriogenology* 58: 301-302.

Beltrán de Heredia, I. (1995) – Estudio de la producción y calidad del semen de moruecos de la raza Latxa. Resultados obtenidos con distintas técnicas de congelación e inseminación (Tesis). 326

Bispo, C.A.S.; Pugliesi, G.; Galvão, P.; Rodrigues, M.T.; Ker, P.; Filgueiras, B. (2011) - Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 100: 54– 58.

Bravo, J. (2010). Estudio de la influencia de la estación sobre los parámetros seminales y morfométricos del espermatozoide del morueco de la raza Ile de France. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria de la universidad de Extremadura, España.

Caballero, I.; Vázquez, J.M.; Centurión, F.; Rodríguez-Martínez, H.; Parrilla, I.; Cuello, C.; Martínez, E.A. (2004) - Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma

on the viability of largely extended boar spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 39: 370-75.

Cárdenas, R.N.; Pedraza, C.J. (2006) - Especies reactivas de oxígeno y sistema antioxidante: aspectos básicos. *Educación química*. 17: 164-165.

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. Dom. Anim.* 32: 251-258.

Cebrián, J.; Muiño-Blanco, T.; Pérez-Pé, R.; Casao, A. (2010) – Manejo y conservación del semen. En: Manejo reproductivo en ganado ovino. Cordinadores: Abecia, A; Focada, F. Edt.Servet. Zaragoza, España. pp:127.

Corteel, J.M, (1980) - Effets du plasma séminal sur la survie et la fertilité des spermatozoides conservés in vitro. *Reprod Nutr Develop* 20: 1111–1123.

Darin-Bennett, A.; White, I.G. (1977) - Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, 14: 466-70.

Donoghue, A. N.; Donoghue, D.J. (1997) - Effects of water and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. *Poult. Sci.* 76:1440-1445.

Evans, G.; Maxwell, W.M.C. (1990) – Inseminación artificial de ovejas y cabras. (Acribia). Zaragoza. pp: 160.

Farshad, A.; Khalili, B.; Jafaroghli, M. (2010) - Effects of Butylated Hydroxytoluene on Freezability of Ram Spermatozoa. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol. 23, No. 10: 1276 - 1281

Fiser, P. S.; Fairful, R. W. (1989) - The effect of glycerol related osmotic changes on post thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 26: 64-69.

Fraser, L.R.; Harrison, R.A.; Herod, J.E. (1990) - Characterization of a decapacitation factor associated with epididymal mouse spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 89: 135-140.

García, M.A.; Graham, E.F. (1987a) - Dialysis of bovine semen and its effect on fresh and freeze-thawed spermatozoa. *Cryobiology* 24: 446-454.

García, M.A.; Graham, E.F. (1987b) - Effects of low-molecular weight fractions (LMWF) from milk, egg yolk and seminal plasma on freezability of bovine spermatozoa. *Criobiology*. 24: 429-436.

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.

Green, C.E. y Watson, P.F. (2001) - Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, 122: 889-898.

Hammerstedt, R. H.; Amann, R.P.; Rucinsky, T.; Morsel, I.I.; Lepock, P.D. (1976) - Use of spin labels and electron spin resonance spectroscopy to characterize membrane of bovine sperm: the effect of butylated hydroxytoluene and cold shock. *Biol. Reprod.* 14: 381-397.

Hancock, J.L. (1957) - The morphology of boar spermatozoa. *J. R. microsc. Soc.* 76: 84-97.

Hernández, M.; Roca, J.; Calvete, J.J.; Sanz, L.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A.; Vázquez, J.M.; Martínez, E.A. (2007) - Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *Journal of Andrology*, 28: 689-97.

Ijaz, A.; Hussain, A.; Aleem, M.; Yousaf, M. S.; Rehman, H. (2009) - Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 71: 1326-1329.

Jeyendran, R.S.; Vanderven, H.H.; Perez-Pelaez, M.; Crabo, B.G.; Zaneveld, L.J.D. (1984) - Development of an assays to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*. 70: 219-228.

Johnson, L.A.; Weitze, K.F.; Fiser, P.; Maxwell, W.M.C. (2000) - Storage of boar semen. *Animal of Reproduction Science*, 62: 143-172.

Kaneto, M.; Harayama, H.; Miyake, M.; Kato. (2002) - Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins. *Anim. Reprod. Sci.*, 73: 197-209.

Kawano, N.; Shimada, M.; Terada, T. (2003) - Motility and penetration competence of frozen-thawed miniature pig spermatozoa are substantially altered by exposure to seminal plasma before freezing. *Theriogenology*. 61: 351-364.

Khalifa, T. A. A.; Lymberopoulos, A. G.; El-Saidy, B.E. (2008) - Testing usability of butylated hydroxytoluene in conservation of goat semen. *Reprod. Domest. Anim.* 43: 525-530.

Killian, G.; Honadel, T.; McNutt, T.; Henault, M.; Wegner, C.; Dunlap, C. (1989) - Evaluation of butylated hydroxytoluene as a cryopreservative added to whole or skim milk diluent for bull semen. *J. Dairy Sci.* 72: 1291-1295.

de Lamirande, E.; Gagnon, C. (1984) - Origin of a motility inhibitor within the male reproductive tract. *J Androl.* 5: 269-276.

Leboeuf, B.; Restall, B.; Salamon, S. (2000) - Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 62(1-3): 113-41.

Marco-Jiménez, F.; Puchades, S.; Rodríguez, M.; Vicente, J.S. (2003) – Estudio de la influencia de la estacionalidad sobre la calidad seminal de moruecos de la raza Guirra. Producción ovina y caprina. Nº XXVIII-SEOC. *Badajoz, España.188-190*

Martin, J.C.; Klug, E.; Gunzel, A.R. (1979) - Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility*, 27: 47-51.

Matsuoka, T.; Imai, H.; Kohno, H.; Fukui, Y. (2006) - Effect of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. *J. Reprod. Dev.* 52: 675-683.

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.; Welch, G.R.; Johnson, L.A. (1996) - Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev.* 8: 1165–1178.

Maxwell, W.M.C.; Long, C.R.; Johnson, L.A.; Dobrinsky, J.R.; Welch, G.R. (1998) – The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev.* 10: 433–440.

Maxwell, W.M.C.; Johnson, L.A. (1999) - Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*, 52: 1353-62.

Maxwell, W.M.C.; de Graaf, S.P.; El-Hajj Ghaoui, R.; Evans, G. (2007) - Seminal plasma effects on sperm handling and fertility. En: *Juengel JI, Murria JF and Smith MF* (ed).

Reproduction in Domestic Ruminants VI. Nottingham UK: Nottingham University Press:13-38.

Moore, A.I.; Squires, E.L.; Graham, J.K. (2005) - Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*. 63: 2372–2381.

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.

Muiño-Blanco, T.; Pérez-Pé, R.; Cebrián-Pérez, J.A. (2008) - Seminal Plasma Proteins and Sperm Resistance to Stress. *Reprod Dom Anim* 43 (Suppl. 4), 18–31.

Neagu, V.R.; Macías, B.; Salazar, C.; Morillo, A.; Ortega, C.; González, L.; Tapia, J.A.; Peña, F.J. (2010) - Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. *Theriogenology*, 73: 645–650.

Ollero, M.; Gil-Guzmán, E.; López, M.C.; Sharma, R.K.; Agarwal, A.; Larson, K.; Evenson, D.; Thomas, J.A.; Álvarez, C.J. (2001) – Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum. Reprod*. 16: 1912- 1921.

Pérez-Pé, R.; Barrios, B.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A. (2001) – Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in anaqueous two-phase system. *J Chrom B*.760: 113–121.

Pursel, V.G.; Johnson, L.A.; Schulman, L.L. (1973) - Effect of dilution, seminal plasma, and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *Journal of Animal Science*, 37: 528–31.

Ritar, A.J.; Salamon, S. (1982) – Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.* 35 (3): 305-312.

Ritar, A.J.; Salamon, S. (1991) - Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. *Small Ruminant Research*, 4(1), 29-37.

Roca, J.; Gil, M. G.; Hernandez, M.; Parrilla, I.; Vazquez, J.M.; Martinez, E. A. (2004) - Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *J. Androl.* 25: 397-405.

Roca, J.; Rodriguez-Martinez, H.; Vazquez, J.M.; Bolarin, A.; Hernandez, M.; Saravia, F.; Wallgren, M.; Martinez, E.A. (2006) - Strategies to improve the fertility of frozen-thawed boar semen for artificial insemination. *Reprod Suppl.* 62: 261-275.

Rovegno, M.; Beringui, W.; Monteiro, A.; Mota, C.; Visintin, J.A.; Ortiz, M.E. (2013) - Assessment of post-thawed ram sperm viability after incubation with seminal plasma. *Cell Tissue Bank.* 14: 333–339.

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

Schmeh, M.K.; Anderson, S.P.; Vazquez, I.A.; Graham, E.F. (1986) - The effect of dialysis of extended ram semen prior to freezing on post-thaw survival and fertility. *Cryobiology.* 23: 406–414

Shoae, A.; Zamiri, M. J. (2008) - Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender. *Anim. Reprod. Sci.* 104: 414-418.

Vadnais, M.L.; Kirkwood, R.N.; Specher, D.J.; Chou, K. (2005) - Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. *Animal of Reproduction Science*, 90: 347-54.

Watson, P. F. (1981) - The role of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. *J. Reprod. Fertil.* 62: 483-492.

Watson, P. F.; Anderson, W. (1983) - Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. *J. Reprod. Fertil.* 69: 229-235.

Watson, P.F. (2000) - The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, **61**: 481-492.

4.4. CAPITULO IV

Efecto del fotoperiodo y edad del donante, de la adición de antioxidantes en el diluyente, de la aplicación de implantes de melatonina en primavera y del individuo sobre la conservación de semen de morueco.

ABSTRACT

The aim of this last chapter was to compile some of the results obtained from experiments made along 2 years in order to assess the potential effect of semen donor age, photoperiod during semen collection, antioxidant inclusion on the extenders, application of melatonin implants outside breeding season and the individual effect on ram sperm cryopreservation. Therefore, in the first study of this chapter, fresh ejaculates were collected during 2 consecutive years from 8 rams at the age of 14 and 26 months old (in negative photoperiod) and from 4 males of 18 and 30 months old (in positive photoperiod). Immediately after semen collection, the ejaculates were mixed in equal quantities and pooled semen was washed by centrifugation. Afterwards, washed semen was split into two aliquots, one was re-suspended in Tris-based media with BHT (5.0 mM) and the other in the same extender, but without antioxidant. The second study was performed only in spring of two consecutive years, dividing the males into two groups of 4 rams, with and without implants of melatonin, at the age of 18 and 30 months. Likewise, after semen collection, pooled semen was washed, split into 2 aliquots and re-suspended in TRIS-based media with or without BHT (5 mM) when semen came from 18 months old males and with or without melatonin (1mM) when semen was from males of 30 months old. Finally, in the third experiment, ejaculates of each male (8 rams of 2 years old approximately) were collected, washed and re-suspended in a Tris-based media individually. All the extenders were supplemented with 15% (v/v) powdered egg yolk and 5% of glycerol and refrigerated for 4 hours at 5°C before freezing. Sperm motility was analyzed by computer assisted sperm analysis (ISAS®) and viability, acrosome integrity and viability after hyposmotic test (HOST) were determined by eosine/nigrosine stain after refrigeration. Moreover, after thawing, plasmatic and acrosomal membrane integrity and mitochondrial activity were determined by flow cytometry, as well sperm motility and morphometry by ISAS ® (mean±SE, n=6). Our results show that even 26 months years males have a better sperm quality during preservation, the same quality could be achieved in semen from 18 months old males, with the inclusion BHT in the extenders, also in unfavourable photoperiod. Again, the inclusion of BHT, independently of the donor age and photoperiod, seems to improve the quality sperm parameters during preservation, meanwhile melatonin, as antioxidant in the media,

does not have any effect. Either the use of the implants of melatonin does not show any advantage in order to achieve a better cryopreservation of the semen collected out of breeding season. Finally, the cryopreservation of semen from individual males seems to show the existence of bad, good and regular freezer males, although more analysis should be done, specially *in vivo* and *in vitro* fertility tests, and a higher number of males should be tested in order to confirm these three male donor categories.

INTRODUCCIÓN

En ovinos, la conducta sexual y la calidad del semen son los principales factores que limitan la eficiencia de la reproducción en el macho a lo largo de año. Estos factores pueden variar según la raza (Avdi y col., 2004), la estación del año (Schanbacher y Lunstra, 1976) y la nutrición (Mukasa-MugerwayEzaz, 1992). Los moruecos son reproductores estacionales en los que el fotoperiodo es la señal ambiental principal que controla la actividad reproductiva, y que a su vez depende de su localización geográfica. Como la mayoría de razas de ovinos y caprinos de latitudes elevadas (norte de Europa), éstos manifiestan una marcada estacionalidad reproductiva (Chemineau y col., 1988). El periodo de actividad reproductiva comienza al final del verano cuando el fotoperiodo disminuye y finaliza en el invierno cuando el número diario de horas de luz empieza a aumentar. Así en los moruecos en estación no reproductiva se observa una disminución del volumen y diámetro testicular (Colas y col., 1986) y deterioro en la calidad del semen (Boland y col., 1985; Karagiannidis y col., 2000), así como también una alteración del perfil hormonal (Langford y col., 1987), afectando el desempeño reproductivo de los moruecos. En latitud media o baja, la estacionalidad tiende a disminuir en las razas que habitan cerca del Ecuador, como el caso de las razas mediterráneas donde el anestro estacional es de 51 a 131 días (Forcada y col., 2000) y donde la nutrición y las relaciones sociales influyen en el desarrollo del ciclo anual de reproducción.

Las variaciones en la duración del fotoperiodo en los moruecos son recibidas por la glándula pineal y transformadas en señal endocrina a través de la melatonina, que regula la secreción de otras hormonas implicadas en el comienzo y finalización de la actividad

reproductiva (Bittman y col., 1985). Generalmente, la secreción de melatonina sigue un ritmo circadiano, con niveles bajos durante el día y altos en la noche, es decir, una larga duración en la secreción de melatonina es percibida como un día corto, mientras que una duración breve de secreción se percibe como un día largo (Bittman y col., 1985). Por ello, el uso de implantes de melatonina en el morueco durante la estación no reproductiva se ha asociado con mejoras en parámetros reproductivos como el diámetro escrotal, la producción y calidad espermática (Palacín y col., 2008), ejerciendo su acción principalmente en el eje hipotálamo-hipofisario (Webster y col., 1991). Recientes estudios han demostrado la presencia de esta hormona y su variación estacional, junto con la testosterona, en el plasma seminal (Casao y col., 2010a), lo que, además de su acción relevante a nivel testicular y de las glándulas accesorias, sugiere también una acción directa sobre la célula espermática (Casao y col., 2010b).

Del mismo modo, la estacionalidad puede condicionar los períodos de congelación del semen para su utilización posterior. El semen de morueco congelado en primavera es de menor calidad que el congelado durante el otoño (Ortavant y col., 1985; D' Alessandro y Martemucci, 2003) ya que en primavera se va a producir mayor daño estructural y funcional en los espermatozoides descongelados, por una menor resistencia al shock térmico y estrés oxidativo provocado por la formación de gran cantidad de especies reactivas al oxígeno (ROS) o moléculas que contienen radicales libres, debido a un mecanismo antioxidante deteriorado (Pérez-Pé y col., 2001; D'Alessandro y Martemucci 2003; Agarwal y col., 2003), resultando en una reducción de la movilidad y viabilidad, lo cual disminuye la supervivencia y capacidad fecundante de las dosis conservadas para la Inseminación Artificial (Maxwell, 1980; Maxwell y Watson, 1996). Una manera de reducir los efectos perjudiciales de las ROS podría ser la adición de componentes con capacidad antioxidante al diluyente de congelación para bloquear o prevenir el estrés oxidativo. Entre los diferentes componentes antioxidantes, la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), ha sido probado en la criopreservación de semen de distintas especies como en el toro (Ashraf y col., 2013), en moruecos (Succu y col., 2011) y en porcinos (Jang y col., 2010), mejorando la motilidad, viabilidad y la integridad de la membrana, después de la descongelación. Este efecto positivo en la mejora de la calidad seminal, puede deberse a la

capacidad que tiene la melatonina como depurador eficaz de radicales libres y como antioxidante general (Tan y col., 2007). También, el butil hidroxitolueno (BHT), antioxidante sintético fenólico análogo de la vitamina E, ha sido utilizado en la crioconservación de espermatozoides de diferentes especies, describiéndose efectos beneficiosos por muchos investigadores, como Watson y Anderson (1983) en morueco, Donoghue y Donoghue (1997) en pavos, Killian y col., (1989) y Shoaie y Zamiri (2008) en el toro, Roca y col., (2004) en cerdo y Khalifa y col., (2006) en espermatozoides caprinos.

Por último, de manera similar a lo observado en otras especies, no todos los moruecos presentan la misma calidad y producción de eyaculados (Alvarez y col., 2000) ni la misma capacidad de éstos para resistir la congelación-descongelación (Marinov y Dacheva, 1984). A este respecto, se ha informado sobre diferencias en la congelabilidad entre individuos de una misma raza (Barrio y col., 1995; Medrano y Holt, 1998). Las diferencias en la congelabilidad del eyaculado también afectan a su posterior capacidad fecundante. Así, se ha observado en moruecos que los espermatozoides criopreservados provenientes de eyaculados de buenos congeladores tienen una tasa de penetración del ovocito *in vitro* superior a la de los espermatozoides de machos malos congeladores (O'Meara y col., 2008). La diferencia en la congelabilidad parece ponerse en marcha en el momento de la eyaculación, puesto que Rath y Niemann, (1997) observaron que las diferencias de congelabilidad entre verracos se dan en muestras eyaculadas, pero no cuando los espermatozoides son colectados en la cola del epidídimo. Como ya se ha comentado, variaciones individuales en la congelación del semen han sido documentadas también en otras especies como en el caballo (Amann y Pickett, 1987) y el toro (Thomas y col., 1997). En el caso del morueco, varios estudios indican que la variabilidad en la congelación de eyaculados podría estar relacionada con los programas de mejoramiento genético tradicional, que seleccionan reproductores en función a los parámetros productivos y morfológicos, sin tener en cuenta la fertilidad ni la capacidad de criopreservación de sus eyaculados (Leboeuf y col., 2000), lo que probablemente sea una de las razones del poco progreso alcanzado en la aplicación de nuevos protocolos de congelación de semen y nuevas técnicas de inseminación (Anel y col., 2006)

Los objetivos de este último capítulo son, en primer lugar, recopilar resultados obtenidos a lo largo de 2 años de experimental con el propósito de valorar el posible efecto de la edad del donante y fotoperiodo durante la recolecta del semen, la inclusión de antioxidantes en los medios de conservación (BHT vs melatonina), la aplicación de implantes de melatonina fuera de la época reproductiva, así como analizar el efecto del individuo o donante sobre la criopreservación de semen de morueco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento 1. Efecto de la edad del donante, fotoperiodo y presencia de antioxidante en el diluyente (butil hidroxitolueno) sobre la crioconservación del semen de morueco.

El experimento se llevó a cabo a lo largo de 2 años consecutivos, iniciándose en otoño del 2011 y concluyendo en primavera del 2013, entre las instalaciones del IRTA en Caldes de Montbui, donde están alojados los sementales, ubicadas en una latitud 41° 38' N, y longitud 2° 10' E, y la Universidad Autónoma de Barcelona. Para ello, se utilizaron 4 machos en los periodos de primavera (2 de raza Xisqueta y 2 de Aranesa) u 8 moruecos en los fotoperiodos negativos (4 de raza Xisqueta y 4 de Aranesa), a los que se les colectó semen con vagina artificial 2 días/semana y 2 eyaculados/día, en diferentes edades y épocas del año; a la edad de 14 y 26 meses en fotoperiodo negativo y 18 y 30 meses en fotoperiodo positivo, realizando un total de 6 réplicas en cada edad.

Tras la recogida de los eyaculados, y manteniéndolos en un Baño María a 37°C, se procedió a valorar su motilidad masal y volumen siguiendo la clasificación de Evans y Maxwell (1990). A continuación, los eyaculados eran mezclados en un solo tubo (*pool*), a partir del cual se dividía en dos alícuotas, excepto en el caso de machos de 30 meses, donde solo se dispuso de una única alícuota. Seguidamente, cada una de las alícuotas era diluida (1:6) con la solución base TGC descrita en el primer capítulo y centrifugada a 600 g durante 10 minutos. Una vez eliminado el sobrenadante, el sedimento era diluido de nuevo en 9 mL de la solución TGC para realizar una segunda centrifugación (600xg por 10'). Finalmente,

el sobrenadante era descartado y el sedimento de las alícuotas era recuperado para su posterior procesamiento.

De esta manera, una vez centrifugadas las alícuotas de semen de cada edad (14, 18, 26 y 30 meses), éstas fueron resuspendidas (1:4) en una solución TGC a una concentración final de 5 % de glicerol y 15 % (v/v) de yema de huevo en polvo, de manera que una de las alícuotas de cada edad se diluía en presencia de butil hidroxitolueno (BHT) (5.0 mM) en el diluyente y la otra sin BHT, con excepción de la alícuota de los machos de 30 meses que no presentan BHT, dando lugar a 7 tratamientos distintos de conservación.

Todas las soluciones utilizadas para la conservación de los espermatozoides contenían 1000 UI/ml de penicilina benzatinica y 1.0 mg/ml de sulfato de estreptomicina, con el objetivo de evitar posible contaminaciones. La metodología utilizada para la adición del BHT en las distintas soluciones fue similar a la que se describe en el segundo capítulo, así como la refrigeración, transporte y posterior proceso de congelación de las distintas suspensiones homogenizadas, de cada edad y fecha.

Experimento 2. Efecto de los implantes de melatonina, edad del donante y presencia de antioxidantes (butil hidroxitolueno vs melatonina) en el diluyente sobre la criopreservación de semen de morueco en primavera.

Este experimento se llevó a cabo en la primavera de 2 años consecutivos. Para ello, en el primer año del estudio, los animales de aproximadamente 16 meses de edad se dividieron en dos grupos homogéneos: el primer grupo recibió 3 implantes subcutáneos de 18 mg melatonina (Melovine, Ceva Salud Animal) por morueco y el segundo grupo no recibió implante. Al siguiente año, cuando los animales contaban con unos 28 meses de edad fueron también divididos al azar en 2 grupos; a 4 moruecos se les colocó 3 implantes subcutáneos de melatonina y los otros 4 no recibieron implante.

Pasados dos meses tras colocar los implantes, se les colectó semen con vagina artificial 2 días/semana y 2 eyaculados/día en primavera, a la de edad de 18 meses y 30

meses respectivamente, realizando un total de 6 réplicas en cada experimento. Tras la recogida de los eyaculados, y manteniéndolos en un Baño María a 37°C, se procedió a valorar su motilidad masal y volumen siguiendo la clasificación de Evans y Maxwell (1990). A continuación, los eyaculados eran mezclados en dos tubos (*pool*), en uno los procedentes de sementales con implantes y en el otro de animales a los que no se les aplicó el implante. Seguidamente, cada una de las alícuotas era diluida en TGC y centrifugada tal como se realizó en el primer experimento, obteniendo las diferentes alícuotas para su posterior procesamiento. En el primera fase del presente experimento tras el proceso de centrifugación de la mezcla de eyaculados se obtuvieron 4 alícuotas de semen lavado, la mitad de las cuales fueron resuspendidas (1:4) en la solución TGC a una concentración fina de 5 % glicerol y 15 % (v/v) de yema de huevo en polvo más 5.0 mM de BHT y las otras alícuotas sin la presencia del antioxidante, dando lugar a 4 tratamientos distintos: espermatozoides procedentes de animales de 18 meses de edad con implantes o sin implantes y conservados en presencia o no de 5mM BHT.

De igual manera, en la segunda fase del experimento realizada en la primavera del siguiente año, se obtuvieron 4 alícuotas de semen lavado (2 procedentes de animales de 30 meses de edad con implantes y 2 de animales sin implante de la misma edad), las cuales fueron resuspendidas (1:4) también en solución TGC a una concentración final de 5 % de glicerol y 15 % (v/v) de yema de huevo en polvo, con o sin la adición de melatonina (1mM), dando lugar a otros 4 tratamientos distintos: espermatozoides procedentes de animales con implantes o sin implantes y conservados en presencia o no de 1mM de melatonina. Todas las soluciones utilizadas para la conservación de los espermatozoides contenían 1000 UI/ml de penicilina benzatinica y 1.0 mg/ml de sulfato de estreptomina, con el objetivo de evitar posible contaminaciones.

La metodología utilizada para la adición del BHT en las distintas soluciones fue similar a la que se describe en el segundo capítulo. La melatonina se disolvió en dimetilsulfoxido (DMSO) y PBS (Succu, y col., 2011) para obtener una concentración final de 1mM de melatonina y de 0.1 % de DMSO.

Una vez homogenizadas las distintas suspensiones, tanto en la primera fase del experimento como en la segunda, los tubos fueron transportados y procesados para su conservación, tal y como se describe en apartados anteriores.

Experimento 3. Efecto del individuo en la criopreservación del semen en moruecos

Para la realización de este experimento se utilizaron 8 moruecos (4 de raza Xisqueta y 4 de Aranesa), a los que se les colectó semen con vagina artificial 2 días/semana y 2 eyaculados/día en otoño del 2012, realizando un total de 6 réplicas por morueco. Tras la recogida de los eyaculados, y manteniéndolos en un Baño María a 37°C, se procedió a valorar su motilidad masal y volumen siguiendo la clasificación de Evans y Maxwell (1990). A continuación, los 2 eyaculados de cada uno de los moruecos se diluyeron (1:6) con la solución TGC y se centrifugaron a 600 g durante 10 minutos. Una vez eliminado el sobrenadante, el sedimento era diluido de nuevo en 9 mL de la solución TGC para realizar una segunda centrifugación (600xg por 10'). Finalmente, el sobrenadante era descartado y el sedimento de las distintas alícuotas era recuperado para su posterior procesamiento.

Así, se obtuvieron una alícuota de cada uno de los 8 machos, es decir, un total de 8 alícuotas de semen lavado. Las ocho alícuotas fueron resuspendidas individualmente (1:4) en la solución TGC a una concentración final de 5% de glicerol y 15 % (v/v) de yema de huevo en polvo, dando lugar a 8 muestras individuales que fueron conservadas. Todas las soluciones utilizadas para la conservación de los espermatozoides contenían 1000 UI/ml de penicilina benzatinica y 1.0 mg/ml de sulfato de estreptomicina, con el objetivo de evitar posible contaminaciones. Una vez homogenizada las suspensiones, los tubos con las muestras seminales se transportaron y procesaron como en los apartados anteriores.

Análisis de los parámetros de calidad seminal

En el primer experimento, la viabilidad y morfología espermática de la mezcla de eyaculados en fresco, tras 4 h de refrigeración y tras la descongelación de las muestras conservadas con los distintos tratamientos se evaluó por medio de la tinción de eosina-

nigrosina y el test de endosmosis (HOST), tal y como se describe en el primer capítulo. Asimismo, se evaluó la cantidad y calidad de movimiento de los espermatozoides en las distintas suspensiones espermáticas tras la refrigeración y post-descongelación mediante el sistema ISAS[®] (Proiser R+D S.D., Valencia) como también la morfometría de las muestras en fresco y tras la descongelación.

En los experimentos 2 y 3, la viabilidad y morfología espermática de la mezcla de eyaculados en fresco y tras 4 h de refrigeración de las muestras conservadas con los distintos tratamientos o de los distintos individuos se evaluó por medio la tinción de eosina-nigrosina y el test de endosmosis (HOST), tal y como se describe en el primer capítulo. Asimismo, se evaluó la cantidad y calidad de movimiento de los espermatozoides en las distintas suspensiones espermáticas tras la refrigeración y post-descongelación mediante el sistema ISAS[®] (Proiser R+D S.D., Valencia), como también la morfometría de las muestras en fresco y tras la descongelación. Para evaluar conjuntamente la integridad física y funcional de la membrana plasmática, la integridad del acrosoma y la actividad mitocondrial de los espermatozoides tras la descongelación, las muestras fueron sometidas a la tinción con fluorocromos descrita en el primer capítulo y analizadas a través del citómetro de flujo.

Análisis Estadístico

Los datos de viabilidad, integridad funcional de membrana plasmática, integridad del acrosoma, actividad mitocondrial, morfometría y los parámetros cinéticos descriptores del movimiento espermático (variables dependientes) se analizaron utilizando el procedimiento GLM (ANOVA) de SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.), siendo los valores obtenidos expresados como media \pm error estándar de la media. Se realizó 6 repeticiones en cada tratamiento. Cuando las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$), se realizó el test de Bonferroni de comparación de medias a posteriori. La normalidad y homogeneidad de varianza de los parámetros espermáticos se comprobaron con el tests de Kolmogorv-Smirnov y Levene. Las variables dependientes que no cumplieron con los supuestos de igualdad de varianza y distribución normal fueron sometidas a una transformación arcoseno, antes del análisis estadístico.

RESULTADOS

Experimento 1. Efecto de la edad del donante, fotoperiodo y presencia de antioxidante en el diluyente (butil hidroxitolueno) sobre la crioconservación del semen de morueco.

Tras el análisis inicial de la mezcla de eyaculados de los 8 moruecos (Tabla 1.1.) en diferentes edades y épocas de año, se puede observar que existe un efecto de la edad en algunos de los parámetros estudiados como la viabilidad espermática, la capacidad de resistencia al shock hipoosmótico, integridad del acrosoma y la concentración seminal ($p < 0.001$), pero no en el volumen, motilidad masal y porcentaje de formas anormales

Tabla 1.1. Resultados de parámetros de calidad seminal del semen fresco de moruecos en diferentes edades y fotoperiodos (media±es, n=6)

Edad/época	Edad (meses) y Fotoperiodo (+/-)			
	14(-)	18(+)	26(-)	30(+)
Volumen (ml)	0.9±0.3	1.0±0.2	1.2±0.3	1.2±0.2
Motilidad masal	2.3±0.3	2.5±0.2	2.8±0.2	2.9±0.3
Viabilidad (%)	68.1±1.6 ^a	88.7±1.3 ^b	89.2±2.1 ^b	89.3±1.6 ^b
HOST (%)	46.0±1.9 ^a	47.1±2.4 ^a	67.4±2.5 ^c	55.7±1.3 ^b
Integridad acrosomal (%)	67.9±3.1 ^a	84.8±3.2 ^b	87.9±3.4 ^b	85.9±1.1 ^b
Anormalidades (%)	28.5±3.7	25.4±5.6	26.5±3.2	24.9±3.5
Concentración ($\times 10^6/\text{ml}$)	3051.0±190.2 ^a	3099.8±189.9 ^a	3520.0±248.1 ^b	3490.2±201.2 ^b

^{a-c} Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.001$). (-): fotoperiodo negativo, (+): fotoperiodo positivo, Anormalidades (anormalidades cabeza: alargada, piriforme, amorfa, enana, acrosomas dañados, anormalidades de la pieza intermedia: angulada, engrosada, asimétrica, anormalidades de la cola: corto, angulado, enrollado, restos citoplasmáticos: gota citoplasmática proximal y distal, etc...)

De hecho, se observa que la viabilidad espermática y la integridad del acrosoma del semen procedente de animales de 14 meses fue significativamente inferior a las observadas

en el semen procedente de machos de 18 meses de edad o mayores, independientemente de la época del año en que se produjo la recogida del semen. También la capacidad de resistencia al shock hipoosmótico y la concentración espermática registradas fueron menores significativamente en semen de los individuos más jóvenes (14 meses), aunque no se diferenciaron de los valores observados en estos parámetros en eyaculados recolectados en primavera de sementales de 18 meses. Destacar que los espermatozoides procedentes de machos mayores a 18 meses, la capacidad de resistencia al shock hipoosmótico fue significativamente superior en aquellos que habían sido recolectados durante el fotoperiodo negativo a la edad de 26 meses.

Al comparar los resultados obtenidos tras el proceso de refrigeración (Tabla 1.2.), se observa la misma tendencia que en el caso del semen fresco, obteniéndose valores de viabilidad en los espermatozoides refrigerados procedentes de animales de 14 meses significativamente inferiores, independientemente de la presencia o no de antioxidantes en el medio de conservación, respecto a todos los obtenidos en el resto de edades y tratamientos. También la capacidad de resistencia al shock hipoosmótico fue menor significativamente en espermatozoides refrigerados procedente de los individuos más jóvenes (14 meses), sin observarse ningún efecto beneficioso de la adición del BHT, y sin diferenciarse de la resistencia observada en espermatozoides recolectados en primavera de sementales de 18 meses. No obstante, a esta misma edad (18 meses) y en época desfavorable, la adición del antioxidante si produjo un aumento del número de espermatozoides resistentes al shock hipoosmótico, sin llegar a presentar diferencias significativas con la capacidad de resistencia mostrada por espermatozoides procedentes de animales mayores, de 26 y 30 meses, recolectados en fotoperiodo negativo y positivo respectivamente, pero sin haber sido conservados en presencia del BHT. De hecho, este efecto beneficioso del antioxidante se repitió cuando los espermatozoides procedentes de animales de 26 meses y recolectados en época favorable fueron conservados con BHT, presentando valores marcadamente superiores al resto de edades y tratamientos estudiados.

Por lo que hace referencia al porcentaje de motilidad total y progresiva, la edad del donante no produjo un efecto en los valores observados en espermatozoides conservados en

ausencia de BHT en el medio, no apreciándose diferencias significativas entre ellos. En cambio, la adición del antioxidante volvió a producir un aumento en los valores de estos parámetros cinéticos respecto a los conservados sin BHT, como se observa especialmente en el caso de espermatozoides colectados en otoño de animales de 26 meses, los cuales tampoco difirieron de los obtenidos en espermatozoides colectados en primavera y a la edad 18 meses de los donantes, también en presencia de BHT.

Tabla 1.2. Efecto de la edad del donante, fotoperiodo y presencia de antioxidante BHT en el medio sobre la viabilidad, resistencia osmótica (HOST) y parámetros cinéticos de los espermatozoides refrigerados de moruecos (media \pm se, n=6).

Edad/época	sin antioxidante				con antioxidante		
	14(-)	18(+)	26(-)	30(+)	14(-)BHT	18(+)BHT	26(-)BHT
Viabilidad(%)	52.6 \pm 4.9 ^a	72.2 \pm 1.5 ^b	76.9 \pm 3.0 ^{bc}	79.3 \pm 1.3 ^{bcd}	56.2 \pm 0.7 ^a	80.3 \pm 1.5 ^{cd}	85.4 \pm 1.4 ^d
HOST (%)	25.7 \pm 0.5 ^a	30.4 \pm 2.0 ^a	49.4 \pm 3.1 ^b	49.6 \pm 2.0 ^b	28.5 \pm 0.9 ^a	45.7 \pm 3.4 ^b	61.2 \pm 3.4 ^c
MT (%)	78.4 \pm 1.4 ^a	81.7 \pm 1.5 ^{ab}	77.8 \pm 1.6 ^a	81.7 \pm 1.1 ^{ab}	83.1 \pm 2.1 ^b	88.6 \pm 1.1 ^c	89.3 \pm 1.6 ^c
MP (%)	40.6 \pm 2.3 ^{ab}	39.6 \pm 0.9 ^{ab}	41.5 \pm 0.9 ^{ab}	33.8 \pm 3.6 ^a	45.1 \pm 0.9 ^b	47.1 \pm 1.7 ^{bc}	53.8 \pm 3.3 ^c
VCL(μ m/s)	102.1 \pm 3.2 ^{bc}	74.3 \pm 1.8 ^a	103.2 \pm 4.4 ^{bc}	111.8 \pm 4.1 ^{cd}	112.4 \pm 3.2 ^{cd}	97.0 \pm 4.9 ^b	117.4 \pm 4.6 ^d
VSL (μ m/s)	40.0 \pm 1.9 ^a	46.9 \pm 3.8 ^a	63.1 \pm 2.6 ^{bc}	67.3 \pm 4.5 ^{bc}	46.3 \pm 3.5 ^a	59.3 \pm 3.1 ^b	70.1 \pm 1.9 ^c
VAP (μ m/s)	51.1 \pm 2.3 ^a	56.3 \pm 1.8 ^a	83.9 \pm 4.2 ^c	92.3 \pm 4.8 ^c	68.8 \pm 1.8 ^b	74.2 \pm 2.6 ^b	87.5 \pm 1.6 ^c
LIN (%)	41.8 \pm 2.7 ^a	57.6 \pm 3.3 ^c	57.4 \pm 0.5 ^c	59.4 \pm 2.4 ^{cd}	48.9 \pm 1.4 ^b	65.8 \pm 1.9 ^d	62.1 \pm 1.6 ^{cd}
STR (%)	61.8 \pm 1.3 ^a	70.8 \pm 0.9 ^b	76.8 \pm 0.9 ^c	71.4 \pm 1.6 ^b	68.0 \pm 1.5 ^b	81.8 \pm 1.3 ^d	81.7 \pm 0.6 ^d
ALH(μ m)	4.4 \pm 0.3 ^c	3.1 \pm 0.2 ^a	3.9 \pm 0.2 ^b	3.3 \pm 0.1 ^a	4.5 \pm 0.2 ^c	2.9 \pm 0.1 ^a	3.2 \pm 0.2 ^a
BCF (Hz)	7.2 \pm 0.2 ^a	11.4 \pm 0.5 ^c	11.4 \pm 0.5 ^c	9.0 \pm 0.7 ^b	7.6 \pm 0.7 ^a	10.5 \pm 0.5 ^c	10.5 \pm 0.4 ^c

^{a,d}Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre tratamientos (**14(-)**: 14 meses de edad en fotoperiodo negativo, **18(+)**: 18 meses de edad en fotoperiodo positivo, **26(-)**: 26 meses de edad en fotoperiodo negativo, **30(+)**: 30 meses de edad en fotoperiodo positivo, **14(-)BHT**: 14 meses de edad en fotoperiodo negativo y BHT en el medio, **18(+)BHT**: 18 meses de edad en fotoperiodo positivo y BHT en el medio, **26(-)BHT**: 26 meses de edad en fotoperiodo negativo y BHT en el medio). **MT**: motilidad total, **MP**: motilidad progresiva, **VCL**: velocidad curvilínea, **VSL**: velocidad rectilínea, **VAP**: velocidad media, **LIN**: índice de linealidad, **STR**: índice de rectitud, **ALH**: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, **BCF**: frecuencia de batida. Numero de espermatozoides =15,350

En cuanto a la velocidad curvilínea (VCL), no se observa un claro efecto ni de la edad, ni de la época de año ni tampoco de la adición del antioxidante en el medio, observándose los valores más bajos en los espermatozoides refrigerados procedentes de

animales de 18 meses colectados en primavera y los superiores en los recolectados en otoño a partir de individuos de 26 meses de edad y conservados en presencia de BHT. Sin embargo, en cuanto a otros parámetros cinéticos como la velocidad rectilínea (VSL), la media (VAP), el índice de linealidad y de rectitud parece existir una cierta tendencia a aumentar a medida que aumenta la edad del donante sin un marcado efecto de la época del año cuando son conservados en ausencia de BHT. Asimismo, al añadir el antioxidante en el medio de conservación, esta tendencia del efecto de la edad se sigue manteniendo, incrementando de forma significativa los valores respecto a los obtenidos en ausencia del BHT. Por otro lado, la frecuencia de batido (BCF) no parece mostrar un patrón semejante tan evidente a lo anteriormente descrito, a pesar de que sí se observan los valores más bajos en los espermatozoides refrigerados procedente de los animales más jóvenes (14 meses) con o sin la adición del antioxidante, mientras que respecto a la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), estos mismos espermatozoides presentaron los valores superiores en relación al resto de tratamientos.

Una tendencia similar a lo ocurrido tras la refrigeración, se pudo apreciar una vez analizadas las muestras descongeladas (Tabla 1.3.), aunque en este caso, observamos un incremento de la viabilidad espermática post-descongelación a medida que aumenta la edad de los donantes de semen, estabilizándose una vez los animales han alcanzado los 26 meses de edad. Incremento que, a su vez, fue mayor en el caso de adicionar BHT en el medio de criconservación. Respecto a la motilidad total y progresiva tras la descongelación no se observaron diferencias significativas debidas a la edad del donante, apreciándose sólo un incremento significativo cuando se adicionó BHT en el medio y una vez los donantes habían alcanzado los 18 meses de edad.

También en los parámetros descriptores de velocidad espermática parece apreciarse la tendencia a aumentarse los valores de VCL, VSL y VAP debido al incremento de la edad, incremento que se acentúa al adicionar antioxidante en el medio, siempre que los donantes de semen sean mayores a los 14 meses. De hecho, este incremento debido a la edad se hace todavía más evidente cuando observamos los valores de índice de linealidad y rectitud obtenidos, aunque no siempre existan diferencias significativas entre los espermatozoides de distintas edades, como sucede en el caso de los espermatozoides

conservados en presencia de BHT. Cabe destacar que en el parámetro de amplitud del desplazamiento lateral de cabeza no hay diferencias entre espermatozoides procedente de animales de distintas edades con o sin presencia del antioxidante en el medio, únicamente se observaron diferencias en aquellos procedentes de animales de 26 meses y recolectados en otoño que habían sido congelados en presencia de BHT con valores significativamente superiores a los obtenidos en aquellos procedentes de animales de su misma edad o menores pero en ausencia del antioxidante. Por otro lado, la frecuencia de batido (BCF) parece mostrar un patrón semejante a lo observado en los refrigerados con los valores más bajos en los espermatozoides descongelados procedentes de los animales más jóvenes (14 meses) con o sin la adición del antioxidante.

Tabla 1.3. Efecto de la edad del donante, fotoperiodo y presencia de antioxidante BHT en el medio sobre la viabilidad y los parámetros cinéticos de los espermatozoides criopreservados de moruecos (media \pm se, n=6)

Edad/época	sin antioxidante				con antioxidante		
	14(-)	18(+)	26(-)	30(+)	14(-)BHT	18(+)BHT	26(-)BHT
Viabilidad (%)	23.5 \pm 2.2 ^a	30.4 \pm 0.9 ^b	37.2 \pm 2.7 ^{cd}	35.5 \pm 1.0 ^c	26.8 \pm 0.8 ^a	40.3 \pm 0.9 ^d	46.2 \pm 0.6 ^e
MT (%)	31.8 \pm 1.5 ^a	28.0 \pm 2.9 ^a	34.5 \pm 4.9 ^a	33.9 \pm 1.2 ^a	36.5 \pm 2.0 ^a	44.1 \pm 3.7 ^b	45.7 \pm 1.1 ^b
MP (%)	18.2 \pm 1.0 ^a	18.5 \pm 3.2 ^a	21.3 \pm 0.9 ^a	20.3 \pm 2.6 ^a	23.1 \pm 1.7 ^a	29.4 \pm 0.7 ^b	29.0 \pm 0.7 ^b
VCL (μ m/s)	61.6 \pm 3.9 ^a	78.4 \pm 2.5 ^{cd}	76.5 \pm 3.3 ^{bc}	92.5 \pm 6.5 ^e	67.8 \pm 2.3 ^a	93.3 \pm 1.9 ^e	87.2 \pm 1.2 ^{de}
VSL (μ m/s)	26.6 \pm 3.6 ^a	42.8 \pm 1.4 ^{cd}	38.0 \pm 2.7 ^{bc}	48.4 \pm 5.2 ^d	32.7 \pm 3.3 ^a	49.8 \pm 1.4 ^d	41.7 \pm 2.7 ^{cd}
VAP (μ m/s)	40.5 \pm 3.8 ^a	55.6 \pm 2.0 ^{bc}	48.0 \pm 1.8 ^b	64.4 \pm 6.0 ^{cd}	43.3 \pm 4.6 ^a	66.8 \pm 0.5 ^d	54.5 \pm 1.4 ^{bc}
LIN (%)	42.8 \pm 2.8 ^a	49.3 \pm 2.2 ^{ab}	47.6 \pm 2.3 ^{ab}	51.8 \pm 2.8 ^{bc}	50.7 \pm 2.9 ^{bc}	57.6 \pm 0.7 ^c	52.6 \pm 0.8 ^{bc}
STR (%)	64.7 \pm 3.6 ^a	67.4 \pm 2.3 ^{ab}	73.4 \pm 2.3 ^{bcd}	72.9 \pm 2.4 ^{bc}	69.2 \pm 2.4 ^{bc}	77.6 \pm 0.8 ^{cd}	80.3 \pm 1.0 ^d
ALH (μ m)	3.0 \pm 0.2 ^a	3.1 \pm 0.2 ^a	3.0 \pm 0.1 ^a	3.3 \pm 0.1 ^{ab}	3.5 \pm 0.3 ^{ab}	3.4 \pm 0.1 ^{ab}	3.8 \pm 0.1 ^b
BCF (Hz)	5.1 \pm 0.6 ^a	10.5 \pm 0.4 ^d	10.6 \pm 0.5 ^d	8.3 \pm 0.3 ^c	7.0 \pm 0.1 ^b	10.8 \pm 0.3 ^d	10.0 \pm 0.7 ^d

^{a,d}Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre tratamientos (**14(-)**: 14 meses de edad en fotoperiodo negativo, **18(+)**: 18 meses de edad en fotoperiodo positivo, **26(-)**: 26 meses de edad en fotoperiodo negativo, **30(+)**: 30 meses de edad en fotoperiodo positivo, **14(-)BHT**: 14 meses de edad en fotoperiodo negativo y BHT en el medio, **18(+)BHT**: 18 meses de edad en fotoperiodo positivo y BHT en el medio, **26(-)BHT**: 26 meses de edad en fotoperiodo negativo y BHT en el medio). **MT**: motilidad total, **MP**: motilidad progresiva, **VCL**: velocidad curvilínea, **VSL**: velocidad rectilínea, **VAP**: velocidad media, **LIN**: índice de linealidad, **STR**: índice de rectitud, **ALH**: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, **BCF**: frecuencia de batida. Numero de espermatozoides =5,485

Al hacer la comparación de las medidas morfométricas obtenidas mediante el ISAS de los espermatozoides en fresco y descongelados, en las diferentes muestras seminales, no se observó ningún efecto sobre la forma de la cabeza, pero sí sobre sus dimensiones (Tabla 1.4.). Concretamente se observó que las dimensiones de la cabeza (ancho, área y perímetro) de los espermatozoides criopreservados procedentes de animales de 14 y 18 meses de edad, fueron significativamente inferiores a las obtenidas en el resto de muestras descongeladas obtenidas a partir de animales de 26 meses de edad y de los espermatozoides frescos de animales de las cuatro edades testadas, independientemente de la presencia o no del BHT. Algo similar pudo observarse en el caso de la longitud de la cabeza de los espermatozoides, a excepción de que se observó una superioridad significativa en este parámetro en los espermatozoides descongelados procedentes de individuos de 26 y 30 meses y los espermatozoides frescos de animales de las 4 edades, respecto a la longitud presentada por los espermatozoides descongelados procedentes de machos más jóvenes pero conservados en presencia del antioxidante. Destacar que no hubo ningún efecto de la edad de los donantes ni en la forma ni en las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides frescos.

Por lo que hace referencia al efecto del antioxidante en las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides descongelados en los tratamientos no se observaron diferencias significativas cuando se compara espermatozoides conservados con o sin antioxidante procedentes de animales de la misma edad, únicamente se observó un incremento significativo del ancho de la cabeza cuando comparamos espermatozoides de animales de 26 meses que habían sido conservados con el antioxidante.

Respecto a los parámetros de forma de la cabeza de los espermatozoides, como se ha mencionado anteriormente, no se apreciaron diferencias entre frescos y descongelados ni entre los distintas edades testadas, siendo los valores medios de elipticidad de 1.8 ± 0.0 , de elongación de 0.3 ± 0.0 , de rugosidad de 0.8 ± 0.0 y de regularidad de 0.9 ± 0.0 .

Tabla 1.4. Efecto de la edad del donante, fotoperiodo y presencia de antioxidante BHT en el medio sobre los parámetros morfométricos de dimensión de cabeza de espermatozoides frescos y criopreservados de moruecos (media \pm es, n=6).

Edad/época	Longitud (μm)	Ancho (μm)	Área (μm^2)	Perímetro (μm)
F14(-)	8.5 \pm 0.0 ^b	5.0 \pm 0.0 ^c	34.9 \pm 0.2 ^b	23.9 \pm 0.1 ^{cd}
F18(+)	8.5 \pm 0.0 ^b	5.0 \pm 0.0 ^c	35.3 \pm 0.5 ^b	24.1 \pm 0.2 ^d
F26(-)	8.5 \pm 0.0 ^b	5.0 \pm 0.0 ^c	35.0 \pm 0.2 ^b	24.0 \pm 0.1 ^d
F30(+)	8.5 \pm 0.0 ^b	5.1 \pm 0.0 ^c	35.7 \pm 0.1 ^b	24.2 \pm 0.1 ^d
14(-)	8.4 \pm 0.0 ^{ab}	4.8 \pm 0.0 ^a	33.7 \pm 0.2 ^a	23.2 \pm 0.1 ^{ab}
18(+)	8.4 \pm 0.0 ^{ab}	4.8 \pm 0.0 ^a	33.4 \pm 0.2 ^a	23.3 \pm 0.1 ^{ab}
26(-)	8.5 \pm 0.0 ^b	4.9 \pm 0.0 ^b	34.9 \pm 0.2 ^b	23.7 \pm 0.1 ^c
30(+)	8.5 \pm 0.0 ^b	5.0 \pm 0.0 ^c	35.3 \pm 0.2 ^b	23.7 \pm 0.1 ^c
14(-)BHT	8.3 \pm 0.0 ^a	4.8 \pm 0.0 ^a	33.0 \pm 0.2 ^a	23.0 \pm 0.1 ^a
18(+)BHT	8.3 \pm 0.0 ^a	4.8 \pm 0.0 ^a	33.4 \pm 0.4 ^a	23.0 \pm 0.1 ^a
26(-)BHT	8.5 \pm 0.0 ^b	5.0 \pm 0.0 ^c	35.0 \pm 0.2 ^b	23.6 \pm 0.1 ^{bc}

^{a,d} Diferentes letras en la misma columna representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre tratamientos (**F14(-)**: semen fresco de 14 meses de edad en fotoperiodo negativo, **F18(+)**: semen fresco de 18 meses de edad en fotoperiodo positivo, **F26(-)**: semen fresco de 26 meses de edad en fotoperiodo negativo, **F30(+)**: semen fresco de 30 meses de edad en fotoperiodo positivo, **14(-)**: 14 meses de edad en fotoperiodo negativo, **18(+)**: 18 meses de edad en fotoperiodo positivo, **26(-)**: 26 meses de edad en fotoperiodo negativo, **30(+)**: 30 meses de edad en fotoperiodo positivo, **14(-)BHT**: 14 meses de edad en fotoperiodo negativo y BHT en el medio, **18(+)BHT**: 18 meses de edad en fotoperiodo positivo y BHT en el medio, **26(-)BHT**: 26 meses de edad en fotoperiodo negativo y BHT en el medio).

Experimento 2. Efecto de los implantes de melatonina, edad del donante y presencia de antioxidantes (butil hidroxitolueno vs melatonina) en el diluyente sobre la criopreservación del semen de morueco en primavera.

Tras el análisis inicial de la mezcla de eyaculados en cada uno de los grupos de machos de 18 ó 30 meses de edad con o sin implante de melatonina (Tabla 2.1.) no se apreciaron diferencias significativas en los parámetros de volumen de eyaculado, motilidad masal, viabilidad, integridad del acrosoma y anormalidades espermáticas ni por efecto de la edad ni por el hecho de haberseles aplicado o no implantes de melatonina. En cambio, la concentración espermática fue significativamente superior tanto en los animales de mayor edad, como a su vez en los grupos de animales con implante de melatonina. También la

integridad funcional de la membrana espermática o resistencia osmótica (HOST) fue significativamente superior en animales de mayor edad, apreciándose únicamente un efecto beneficioso de la aplicación de los implantes de melatonina en aquellos animales de mayor edad (30 meses).

Tabla 2.1. Parámetros de calidad del semen fresco de moruecos de 18 y 30 meses de edad, con o sin implantes de melatonina en primavera.

Edad del donante	18 meses		30 meses	
	sin	con	sin	con
Implantes				
Volumen (ml)	0.9±0.1	1.1±0.1	1.2±0.2	1.2±0.2
Motilidad masal	2.5±0.2	2.4±0.1	2.9±0.1	2.9±0.2
Viabilidad (%)	88.7±1.3	90.6±0.9	89.3±1.6	92.3±3.0
HOST (%)	47.1±2.4 ^a	48.4±0.6 ^a	55.7±1.3 ^b	63.9±7.0 ^c
Integridad Acrosomal (%)	86.4±3.6	89.9±1.7	87.8±2.9	90.1±1.6
Anormalidades (%)	25.4±5.6	23.5±4.9	24.9±3.2	22.8±4.9
Concentración (x10⁶/ml)	3099.8±189.9 ^a	3391±205.3 ^b	3490.2±201.2 ^b	3825.9±189.2 ^c

^{a-c} Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Anormalidades (anormalidades cabeza: alargada, piriforme, amorfa, enana, acrosomas dañados, anormalidades de la pieza intermedia: angulada, engrosada, asimétrica, anormalidades de la cola: corto, angulado, enrollado, restos citoplasmáticos: gota citoplasmática proximal y distal, etc...)

Tras el análisis de las distintas suspensiones espermáticas refrigeradas se observó que la edad de los donantes tuvo un significativo efecto, ya que los valores inferiores de integridad física (viabilidad) y funcionalidad de sus membranas plasmáticas (HOST) se observaron en aquellos espermatozoides procedentes de animales de 18 meses sin antioxidante (Tabla 2.1.), independientemente de haberseles aplicado o no implantes de melatonina. De hecho, tampoco se observaron diferencias debidas a la aplicación o no de implantes en animales de 30 meses. En cambio, la adición de antioxidante, ya fuera BHT o melatonina, incrementó los valores de ambos parámetros en ambas edades, hasta eliminar las diferencias observadas debidas a la edad, no apreciándose diferencias entre los espermatozoides de animales de 18 meses conservados en BHT y lo observado en animales de 30 meses conservados sin la presencia de antioxidante.

Tabla 2.2. Efecto de la edad del donante, de la aplicación de implantes de melatonina y presencia de antioxidantes en el diluyente sobre la viabilidad, resistencia osmótica (HOST) y parámetros cinéticos de espermatozoides refrigerados de morueco (media \pm se, n=6)

Tratamientos	18m	18m(I)	18m+BHT	18m(I) +BHT	30m	30m(I)	30m+M	30m(I)+M
Viabilidad (%)	72.2 \pm 1.5 ^a	70.5 \pm 0.7 ^a	80.3 \pm 1.5 ^{bc}	79.2 \pm 0.9 ^{bc}	79.3 \pm 1.3 ^{bc}	77.5 \pm 3.1 ^b	82.2 \pm 2.0 ^c	83.4 \pm 2.0 ^c
HOST (%)	30.4 \pm 2.0 ^a	32.6 \pm 3.6 ^a	45.7 \pm 3.4 ^{cd}	42.9 \pm 5.6 ^{bc}	49.6 \pm 2.0 ^{cd}	45.1 \pm 3.0 ^{cd}	56.4 \pm 4.2 ^d	52.3 \pm 4.1 ^{cd}
MT (%)	81.7 \pm 1.5 ^a	80.0 \pm 3.4 ^a	88.6 \pm 1.1 ^b	88.8 \pm 1.2 ^b	81.7 \pm 1.1 ^a	82.1 \pm 2.3 ^a	82.9 \pm 1.8 ^{ab}	83.3 \pm 2.7 ^{ab}
MP (%)	39.6 \pm 0.9 ^{ab}	40.7 \pm 2.3 ^{ab}	47.1 \pm 1.7 ^b	46.4 \pm 2.4 ^b	33.8 \pm 3.6 ^a	32.7 \pm 2.1 ^a	35.2 \pm 2.1 ^a	37.3 \pm 4.2 ^a
VCL(μm/s)	74.3 \pm 1.8 ^a	77.5 \pm 6.5 ^a	97.0 \pm 4.9 ^b	93.8 \pm 1.1 ^b	111.8 \pm 4.1 ^c	114.8 \pm 3.2 ^c	115.9 \pm 3.3 ^c	132.1 \pm 4.9 ^c
VSL(μm/s)	46.9 \pm 3.8 ^a	46.6 \pm 3.9 ^a	59.3 \pm 3.1 ^b	61.1 \pm 4.3 ^{bc}	67.3 \pm 4.5 ^{bcd}	66.1 \pm 1.5 ^{bcd}	71.1 \pm 2.2 ^{cd}	75.2 \pm 3.6 ^d
VAP (μm/s)	56.3 \pm 1.8 ^a	58.1 \pm 4.8 ^a	74.2 \pm 2.6 ^b	77.1 \pm 4.1 ^b	92.3 \pm 4.8 ^c	91.6 \pm 2.1 ^c	97.4 \pm 2.1 ^c	100.5 \pm 4.7 ^c
LIN (%)	57.6 \pm 3.3 ^a	61.5 \pm 4.4 ^{abc}	65.8 \pm 1.9 ^{bc}	67.5 \pm 2.3 ^c	59.4 \pm 2.4 ^{ab}	57.7 \pm 1.1 ^a	60.7 \pm 0.9 ^{abc}	60.5 \pm 1.2 ^{abc}
STR (%)	70.8 \pm 0.9 ^a	73.8 \pm 2.1 ^a	81.8 \pm 1.3 ^b	84.3 \pm 2.6 ^b	71.4 \pm 1.6 ^a	70.8 \pm 1.1 ^a	72.1 \pm 1.4 ^a	73.1 \pm 1.3 ^a
ALH(μm)	3.1 \pm 0.2	3.6 \pm 0.2	3.0 \pm 0.1	3.7 \pm 0.2	3.3 \pm 0.1	3.6 \pm 0.2	3.4 \pm 0.1	3.7 \pm 0.2
BCF (Hz)	11.4 \pm 0.5 ^a	10.2 \pm 1.3 ^a	10.5 \pm 0.5 ^a	10.0 \pm 0.6 ^a	7.8 \pm 0.2 ^b	7.7 \pm 0.4 ^b	7.5 \pm 0.3 ^b	7.8 \pm 0.3 ^b

^{a,d}Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre tratamientos (**18m**: 18 meses de edad, **18m(I)**: 18 meses de edad con Implante, **18m+BHT**: 18 meses y BHT en el diluyente, **18m(I)BHT**: 18 meses de edad con Implante y BHT en el diluyente, **30m**: 30 meses de edad, **30m(I)**: 30 meses de edad con implante, **30m+M**: 30 meses de edad y melatonina en el diluyente, **30m(I)+M**: 30 meses de edad con implante y melatonina en el diluyente). **MT**: motilidad total, **MP**: motilidad progresiva, **VCL**: velocidad curvilínea, **VSL**: velocidad rectilínea, **VAP**: velocidad media, **LIN**: índice de linealidad, **STR**: índice de rectitud, **ALH**: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, **BCF**: frecuencia de batida. Numero de espermatozoides =12,689

Respecto a la motilidad total y progresiva espermática no se observaron diferencias entre las distintas edades de los machos, ni tampoco al hecho de llevar implantado o no melatonina. Sin embargo, la adición de BHT en la conservación de espermatozoides procedentes de donantes de 18 meses supuso un incremento significativo en la motilidad total observada respecto a lo observado en aquellos procedentes de individuos de la misma edad o mayores, pero conservados en su ausencia. Respecto a la motilidad progresiva parece existir esta misma tendencia, es decir, la presencia de BHT en los medios de conservación de espermatozoides de individuos de 18 meses incrementó la progresividad de su motilidad, aunque sin llegar a diferenciarse de la de los espermatozoides procedentes de machos de la misma edad, pero sin BHT en el medio, y sí haciéndolo de la motilidad progresiva observada en espermatozoides de animales mayores (30 meses), a pesar de haber sido conservados en presencia de melatonina como antioxidante.

En cuanto a los parámetros de velocidad, la adición del BHT en el medio produjo un incremento significativo de los valores más bajos observados en los espermatozoides conservados en animales de menor edad (18 meses con y sin implante de melatonina) sin la adición de BHT. Además también la edad de los donantes supuso un aumento en estos 3 parámetros, diferenciándose de todos los valores observados en los individuos más jóvenes independientemente de la aplicación o no de implantes de melatonina, salvo alguna excepción en el caso de VSL. Destacar que en el caso de los espermatozoides procedente de donantes de 30 meses, la adición de melatonina en el medio no supuso ningún incremento de los valores observados, así como tampoco en los índices de linealidad y rectitud, donde la tendencia fue la de mostrar valores significativamente superiores en los espermatozoides que habían sido conservados en BHT. Donde sí existió un marcado efecto de la edad del donante fue en el parámetro de frecuencia de batido (BCF), siendo menor en espermatozoides procedentes de animales de 30 meses, independientemente de la aplicación de melatonina o de la suplementación con antioxidante en el medio de conservación.

Tabla 2.3. Efecto de la edad del donante, de la aplicación de implantes de melatonina y presencia de antioxidantes en el diluyente sobre los parámetros cinéticos de espermatozoides criopreservados de moruecos (media \pm se, n=6)

Tratamientos	18m	18m(I)	18m+BHT	18m(I)+BHT	30m	30m(I)	30m+M	30m(I)+M
MT (%)	28.0 \pm 2.9 ^a	30.6 \pm 0.5 ^a	44.1 \pm 3.7 ^b	42.9 \pm 1.4 ^b	39.9 \pm 1.2 ^b	40.0 \pm 3.1 ^b	42.5 \pm 5.2 ^b	41.9 \pm 5.5 ^b
MP (%)	18.5 \pm 3.2 ^a	18.6 \pm 1.7 ^a	29.4 \pm 0.7 ^b	28.0 \pm 2.1 ^b	20.3 \pm 2.6 ^a	15.7 \pm 0.9 ^a	19.6 \pm 1.5 ^a	21.1 \pm 3.1 ^a
VCL(μ m/s)	78.4 \pm 2.5 ^a	81.8 \pm 2.9 ^a	93.9 \pm 1.9 ^b	97.3 \pm 4.0 ^b	92.5 \pm 6.5 ^{ab}	82.1 \pm 6.8 ^{ab}	92.8 \pm 6.9 ^{ab}	91.9 \pm 5.1 ^{ab}
VSL(μ m/s)	42.8 \pm 1.4	43.5 \pm 1.3	49.8 \pm 1.4	49.9 \pm 1.9	48.4 \pm 5.2	48.1 \pm 4.5	48.6 \pm 6.5	52.3 \pm 5.4
VAP(μ m/s)	55.6 \pm 2.0	56.8 \pm 2.3	66.8 \pm 0.5	64.7 \pm 2.6	64.4 \pm 6.0	62.7 \pm 6.1	66.8 \pm 6.8	69.8 \pm 6.3
LIN (%)	49.3 \pm 2.2 ^a	51.3 \pm 0.9 ^a	57.6 \pm 0.7 ^b	56.5 \pm 0.8 ^b	52.8 \pm 2.8 ^{ab}	53.1 \pm 2.8 ^{ab}	53.4 \pm 2.6 ^{ab}	54.3 \pm 2.5 ^{ab}
STR (%)	67.4 \pm 2.3 ^a	68.6 \pm 2.3 ^a	77.6 \pm 0.8 ^b	76.7 \pm 0.5 ^b	72.9 \pm 2.4 ^{ab}	70.2 \pm 1.9 ^a	72.5 \pm 2.1 ^{ab}	71.6 \pm 2.0 ^{ab}
ALH(μ m)	3.5 \pm 0.2 ^a	3.3 \pm 0.2 ^a	3.6 \pm 0.1 ^a	3.4 \pm 0.1 ^a	2.7 \pm 0.1 ^b	2.0 \pm 0.2 ^b	2.9 \pm 0.2 ^b	2.5 \pm 0.1 ^b
BCF(Hz)	10.5 \pm 0.4 ^a	10.7 \pm 0.5 ^a	10.8 \pm 0.3 ^a	10.8 \pm 0.4 ^a	8.3 \pm 0.3 ^b	7.8 \pm 0.7 ^b	7.9 \pm 0.3 ^b	8.0 \pm 0.2 ^b

^{a,d}Diferentes letras en la misma fila representan diferencias significativas ($P<0.001$) entre tratamientos (**18m**: 18 meses de edad, **18m(I)**: 18 meses de edad con Implante, **18m+BHT**: 18 meses y BHT en el diluyente, **18m(I)+BHT**: 18 meses de edad con Implante y BHT en el diluyente, **30m**: 30 meses de edad, **30m(I)**: 30 meses de edad con implante, **30m+M**: 30 meses de edad y melatonina en el diluyente, **30m(I)+M**: 30 meses de edad con implante y melatonina en el diluyente). **MT**: motilidad total, **MP**: motilidad progresiva, **VCL**: velocidad curvilínea, **VSL**: velocidad rectilínea, **VAP**: velocidad media, **LIN**: índice de linealidad, **STR**: índice de rectitud, **ALH**: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, **BCF**: frecuencia de batida. Numero de espermatozoides =7,895

De hecho, en cuanto al efecto del implante de melatonina, no se observa ningún efecto significativo en ninguno de los parámetros analizados de los espermatozoides refrigerados en animales de las dos edades.

Una vez analizado los distintos parámetros cinéticos de los espermatozoides descongelados (Tabla 2.3.), se observó que ninguno de estos parámetros se vio afectado por la aplicación de implantes subcutáneos de melatonina, independientemente de la edad o tratamiento de conservación. En cambio, la adición del antioxidante BHT en espermatozoides de animales de 18 meses incrementó los valores de motilidad total y progresiva, velocidad curvilínea e índice de linealidad y rectitud respecto a los espermatozoides procedentes de animales de la misma edad pero sin haber sido conservados con BHT en el medio, aunque sin observarse diferencias con los valores obtenidos en espermatozoides procedentes de animales de 30 meses. Únicamente la motilidad progresiva fue superior significativamente cuando los espermatozoides fueron conservados en presencia de BHT en el diluyente, parámetro que no se vio afectado por la edad de los donantes ni por la adición de melatonina en el medio como antioxidante. Tampoco la velocidad rectilínea ni la media se vieron afectadas por ningún de los factores a estudio, ya que no se presentaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos y edades. Por el contrario si se observó un significativo descenso de la ALH y BCF en los espermatozoides de individuos de 30 meses respecto a los de los más jóvenes, independientemente de haber sido conservados con o sin antioxidante.

El análisis de los distintos parámetros obtenidos mediante citometría de flujo en las distintas suspensiones espermáticas sometidas a estudio (Tabla 2.4.) parece indicar que la adición del antioxidante BHT en espermatozoides de animales de 18 meses incrementó los valores de viabilidad respecto a los valores observados en espermatozoides criopreservados en su ausencia, independientemente de la edad de los donantes y de haber sido conservados o no con melatonina. No obstante, los espermatozoides procedentes de machos de 30 meses presentaron valores de viabilidad superiores a la de los más jóvenes conservados sin BHT, aunque esta superioridad debida a la edad desapareció cuando se analizó únicamente el porcentaje de células viables con acrosoma intacto y con actividad mitocondrial, difiriendo

de forma significativa y positiva aquellos espermatozoides conservados en BHT, independientemente si el donante había sido implantado con melatonina o no. De hecho, se puede observar que tanto el porcentaje de vivos con acrosoma dañado (“criocapacitados”) como el de espermatozoides viables con baja actividad mitocondrial y acrosoma intacto fueron significativamente mayores en los espermatozoides de animales de 30 meses, sin afectar el tratamiento utilizado. Por otra parte, la integridad acrosomal fue también significativamente superior en aquellos espermatozoides conservados en BHT que en el resto de tratamientos. De hecho, la adicción de melatonina como antioxidante en los medios de criopreservación no mejoró ningún parámetro de calidad espermática evaluada, así como tampoco el implante de melatonina en los machos.

Tabla 2.4. Efecto de la edad del donante, de la aplicación de implantes de melatonina y presencia de antioxidantes en el diluyente sobre la viabilidad, actividad mitocondrial y estado del acrosoma de los espermatozoides criopreservados de moruecos (media \pm se, n=6)

Tratamient.	Viabilidad	VAI	VAD	VSI	VSD	Integridad Acrosomal	Criocapacitados
18m	30.4 \pm 0.9 ^a	27.7 \pm 1.1 ^a	1.3 \pm 0.7 ^{ab}	1.4 \pm 0.4 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	49.3 \pm 1.5 ^{bc}	1.3 \pm 0.4 ^{ab}
18m(I)	29.1 \pm 0.5 ^a	25.3 \pm 1.9 ^a	1.7 \pm 0.8 ^{ab}	1.9 \pm 0.8 ^a	0.2 \pm 0.1 ^a	48.0 \pm 2.1 ^{bc}	1.9 \pm 0.5 ^{ab}
18m+BHT	40.3 \pm 0.9 ^c	39.0 \pm 1.0 ^b	0.3 \pm 0.1 ^a	1.0 \pm 0.3 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	63.5 \pm 3.0 ^a	0.3 \pm 0.1 ^a
18m(I)+BHT	38.2 \pm 0.5 ^c	36.8 \pm 0.3 ^b	0.2 \pm 0.0 ^a	1.1 \pm 0.3 ^a	0.1 \pm 0.1 ^a	61.5 \pm 2.1 ^a	0.3 \pm 0.1 ^a
30m	35.5 \pm 1.0 ^b	27.6 \pm 1.6 ^a	2.7 \pm 0.5 ^b	4.6 \pm 0.9 ^b	0.7 \pm 0.1 ^b	51.2 \pm 2.1 ^{bc}	3.4 \pm 0.3 ^b
30m(I)	33.9 \pm 1.4 ^b	25.9 \pm 1.6 ^a	2.7 \pm 0.4 ^b	4.5 \pm 0.8 ^b	0.8 \pm 0.4 ^b	49.3 \pm 2.7 ^{bc}	3.5 \pm 0.6 ^b
30m+M	33.1 \pm 1.3 ^b	25.7 \pm 1.9 ^a	2.4 \pm 0.5 ^b	4.2 \pm 0.7 ^b	0.8 \pm 0.3 ^b	44.9 \pm 2.1 ^c	3.2 \pm 0.4 ^b
30m(I)+M	35.0 \pm 1.0 ^b	27.4 \pm 1.0 ^a	2.4 \pm 0.5 ^b	4.7 \pm 0.4 ^b	0.5 \pm 0.1 ^b	50.4 \pm 2.2 ^{bc}	2.8 \pm 0.3 ^b

^{a,d}Diferentes letras en la misma columna representan diferencias significativas ($P<0.001$) entre tratamientos (**18m**: 18 meses de edad, **18m(I)**: 18 meses de edad con Implante, **18m+BHT**: 18 meses y BHT en el diluyente, **18m(I)+BHT**: 18 meses de edad con Implante y BHT en el diluyente, **30m**: 30 meses de edad, **30m(I)**: 30 meses de edad con implante, **30m+M**: 30 meses de edad y melatonina en el diluyente, **30m(I)+M**: 30 meses de edad con implante y melatonina en el diluyente) **VAI**: vivos con actividad mitocondrial y acrosoma intacta, **VAD**: vivos con actividad mitocondrial y con acrosoma dañado, **VSI**: vivos sin actividad mitocondrial y acrosoma intacto, **VSD**: vivos sin actividad mitocondrial y con acrosoma dañado, **Integridad Acrosomica**: vivos y muertos con integridad acrosomal, **Criocapacitados**: vivos con acrosoma dañado.

Respecto a la capacidad de resistencia osmótica tras la descongelación (Tabla 2.5.), se aprecian de nuevo valores inferiores en la funcionalidad de las membranas plasmáticas de los espermatozoides congelados en ausencia de BHT y procedentes de machos de menor edad. Por otra parte, la integridad acrosomal fue también significativamente superior en aquellos espermatozoides conservados en BHT. Sin embargo, al someter los espermatozoides descongelados al shock osmótico, se observa un ligero efecto significativo de la presencia de melatonina en el medio cuando se congelan espermatozoides de animales de 30 meses, incrementando el porcentaje de espermatozoides viables con actividad mitocondrial y acrosoma intacto respecto a los conservados en ausencia de antioxidante, BHT o melatonina, e independientemente de la edad del semental. Destacar que aquellos espermatozoides conservados en BHT de animales de 18 meses presentaron la incidencia más baja de espermatozoides viables con baja actividad mitocondrial o acrosoma dañado.

Tabla 2.5. Efecto de la edad del donante, de la aplicación de implantes de melatonina y presencia de antioxidantes en el diluyente sobre la resistencia osmótica tras el HOST de los espermatozoides criopreservados de moruecos (media \pm se, n=6)

Tratamientos	Viabilidad	VAI	VAD	VSI	VSD	Integridad Acrosomal	criocapacitados
18m	27.4 \pm 1.1 ^a	17.5 \pm 1.7 ^a	5.8 \pm 0.8 ^{bc}	3.6 \pm 1.3 ^b	0.5 \pm 0.3	38.3 \pm 3.4 ^a	6.3 \pm 0.6 ^{bc}
18m(I)	25.3 \pm 0.8 ^a	15.2 \pm 1.0 ^a	5.5 \pm 0.5 ^{bc}	4.2 \pm 0.7 ^b	0.5 \pm 0.2	32.8 \pm 4.8 ^a	6.0 \pm 0.4 ^{bc}
18m+BHT	37.7 \pm 1.0 ^c	34.2 \pm 1.7 ^c	1.5 \pm 0.3 ^a	1.7 \pm 0.3 ^a	0.3 \pm 0.2	51.7 \pm 2.9 ^b	1.8 \pm 0.3 ^a
18m(I)+BHT	36.6 \pm 0.8 ^c	33.0 \pm 1.4 ^c	1.8 \pm 0.5 ^a	1.5 \pm 0.3 ^a	0.3 \pm 0.1	53.8 \pm 3.2 ^b	2.1 \pm 0.3 ^a
30m	30.9 \pm 1.3 ^b	17.0 \pm 1.6 ^a	7.0 \pm 1.4 ^{bc}	6.3 \pm 1.1 ^c	0.5 \pm 0.1	39.7 \pm 5.0 ^a	7.5 \pm 0.8 ^{bc}
30m(I)	31.8 \pm 1.4 ^b	15.1 \pm 1.7 ^a	8.5 \pm 1.9 ^c	7.9 \pm 0.2 ^c	0.3 \pm 0.1	38.7 \pm 1.2 ^a	8.8 \pm 1.0 ^c
30m+M	32.6 \pm 0.9 ^b	23.0 \pm 1.2 ^b	5.2 \pm 0.5 ^b	3.7 \pm 0.3 ^b	0.7 \pm 0.2	39.0 \pm 2.4 ^a	5.9 \pm 0.4 ^b
30m(I)+M	32.5 \pm 1.6 ^b	23.2 \pm 1.6 ^b	5.1 \pm 0.9 ^b	3.6 \pm 0.3 ^b	0.6 \pm 0.2	41.0 \pm 1.3 ^a	5.7 \pm 0.6 ^b

^{a,d} Diferentes letras en la misma columna representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre tratamientos (**18m**: 18 meses de edad, **18m(I)**: 18 meses de edad con Implante, **18m+BHT**: 18 meses y BHT en el diluyente, **18m(I)+BHT**: 18 meses de edad con Implante y BHT en el diluyente, **30m**: 30 meses de edad, **30m(I)**: 30 meses de edad con implante, **30m+M**: 30 meses de edad y melatonina en el diluyente, **30m(I)+M**: 30 meses de edad con implante y melatonina en el diluyente). **VAI**: vivos con actividad mitocondrial y acrosoma intacta, **VAD**: vivos con actividad mitocondrial y con acrosoma dañado, **VSI**: vivos sin actividad mitocondrial y acrosoma intacto, **VSD**: vivos sin actividad mitocondrial y con acrosoma dañado, **Integridad Acrosomal**: vivos y muertos con integridad acrosomal, **Criocapacitados**: vivos con acrosoma dañado.

Los morfometría de la cabeza entre espermatozoides frescos y descongelados fue similar en la forma, pero no, en sus dimensiones (Tabla 2.6.). De hecho, no se observaron diferencias significativas en las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides frescos debidas a la edad o de la aplicación de los implantes, aunque sí entre las dimensiones de los espermatozoides frescos (18 y 30 meses) con los descongelados procedentes de los animales más jóvenes, independientemente de estar conservados o no con BHT. En cambio, los espermatozoides descongelados de los animales de mayor edad (con o sin implante de melatonina) y en ausencia de antioxidante (melatonina) en el medio de congelación no difirieron de las dimensiones de los frescos en ninguno de los parámetros excepto el perímetro, mientras que el resto de tratamientos no presentaron diferencias entre ellos.

Tabla 2.6. Efecto de la edad, implante de melatonina y antioxidantes en la morfometría de la cabeza de espermatozoides frescos y criopreservados de moruecos (media \pm es).

Tratamientos	Longitud (μm)	Ancho (μm)	Área (μm^2)	Perímetro (μm)
F18m	8.5 \pm 0.0 ^b	5.0 \pm 0.0 ^b	35.3 \pm 0.5 ^b	24.1 \pm 0.2 ^c
F18m(I)	8.5 \pm 0.0 ^b	5.0 \pm 0.0 ^b	35.4 \pm 0.5 ^b	24.1 \pm 0.1 ^c
F30m	8.5 \pm 0.0 ^b	5.0 \pm 0.0 ^b	35.7 \pm 0.3 ^b	24.2 \pm 0.1 ^c
F30m(I)	8.5 \pm 0.0 ^b	5.1 \pm 0.0 ^b	35.5 \pm 0.2 ^b	24.1 \pm 0.2 ^c
18m	8.4 \pm 0.0 ^a	4.8 \pm 0.0 ^a	33.4 \pm 0.2 ^a	23.1 \pm 0.1 ^a
18m(I)	8.3 \pm 0.1 ^a	4.8 \pm 0.1 ^a	33.8 \pm 0.7 ^a	23.0 \pm 0.1 ^a
18m+BHT	8.3 \pm 0.0 ^a	4.8 \pm 0.0 ^a	33.4 \pm 0.4 ^a	23.0 \pm 0.1 ^a
18m(I)+BHT	8.2 \pm 0.0 ^a	4.8 \pm 0.0 ^a	32.6 \pm 0.3 ^a	23.0 \pm 0.1 ^a
30m	8.5 \pm 0.0 ^b	5.0 \pm 0.0 ^b	35.3 \pm 0.2 ^b	23.7 \pm 0.1 ^b
30m(I)	8.5 \pm 0.0 ^b	5.0 \pm 0.0 ^b	35.4 \pm 0.3 ^b	23.7 \pm 0.1 ^b
30m+M	8.3 \pm 0.0 ^a	4.8 \pm 0.0 ^a	32.8 \pm 0.2 ^a	22.8 \pm 0.1 ^a
30m(I)+M	8.4 \pm 0.0 ^a	4.8 \pm 0.0 ^a	33.3 \pm 0.4 ^a	23.0 \pm 0.1 ^a

^{a,d}Diferentes letras en la misma columna representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre tratamientos (**F18m**: semen fresco de 18 meses de edad, **F18m(I)**: semen fresco de 18 meses de edad con implante, **F30m**: semen fresco de 30 meses de edad, **F30m(I)**: semen fresco de 30 meses de edad con implante, **18m**: 18 meses de edad, **18m(I)**: 18 meses de edad con Implante, **18m+BHT**: 18 meses y BHT en el diluyente, **18m(I)+BHT**: 18 meses de edad con Implante y BHT en el diluyente, **30m**: 30 meses de edad, **30m(I)**: 30 meses de edad con implante, **30m+M**: 30 meses de edad y melatonina en el diluyente, **30m(I)+M**: 30 meses de edad con implante y melatonina en el diluyente).

Respecto a los parámetros de forma de la cabeza de los espermatozoides, como se ha mencionado anteriormente, no se apreciaron diferencias entre frescos y descongelados entre las dos edades testadas en los distintos tratamientos, siendo los valores medios de elipticidad de 1.8 ± 0.0 , de elongación de 0.3 ± 0.0 , de rugosidad de 0.8 ± 0.0 y de regularidad de 0.9 ± 0.0 .

Experimento 3. Efecto del individuo en la criopreservación del semen de moruecos

Teniendo en cuenta el reducido número de individuos (4) en cada una de las razas, el análisis inicial del semen fresco de los moruecos utilizados en las distintas experiencias que componen el presente trabajo indicó los siguientes valores medios \pm error standard para la raza Xisqueta y Aranesa, respectivamente, de volumen de eyaculado de 1.2 ± 0.1 vs 1.3 ± 0.1 mL, motilidad masal 2.8 ± 0.6 vs 2.7 ± 0.5 , anormalidades espermáticas de 21.6 ± 4.3 vs 30.3 ± 7.7 %, viabilidad estimada por E/N de 81.9 ± 2.9 vs 78.6 ± 5.1 %, integridad del acrosoma de 83.6 ± 4.3 vs 85.6 ± 6.4 %, integridad funcional de sus membranas tras la prueba de HOST de 60.5 ± 6.5 vs 67.8 ± 5.6 % y una concentración espermática de 3341.9 ± 306.7 vs 3627.8 ± 287.1 millones de espermatozoides/mL, sin observar diferencias significativas en los diferentes parámetros evaluados entre las dos razas.

En cuanto al factor individuo sobre la calidad del semen fresco, independientemente de la raza a la que pertenezca, no se observaron diferencias significativas en los valores de motilidad masal, viabilidad, integridad acrosomal e integridad funcional de sus membranas tras la prueba de HOST entre machos (Tabla 3.1.). Asimismo, al comparar los valores de volumen del eyaculado, solamente los machos 71 y 81 proporcionaron eyaculados de volumen significativamente superior al resto de machos. Igualmente los porcentajes de anormalidades de los espermatozoides del macho 71 fueron inferiores a los machos 76 y 81, sin diferenciarse de los valores presentados por el resto de machos. En lo que respecta a la concentración espermática, se observan tres categorías, los valores más bajos en el semen de los machos 76 y 80, los intermedios en el resto de machos, mientras que el superior se observó en el macho 81.

Tabla 3.1. Características seminales del semen fresco de los moruecos utilizados en los distintos experimentos que conforman esta tesis (media \pm es.)

Machos	Volumen (ml)	Motilidad masal	Concentración (n x 10 ⁶ /ml)	Viabilidad (%)	Integridad Acrosomal (%)	Formas Anormales (%)	HOST (%)
70 (X)	1.2 \pm 0.2 ^a	3.0 \pm 0.7	3552.5 \pm 208.3 ^b	87.3 \pm 2.5	90.7 \pm 2.6	13.6 \pm 3.9 ^{ab}	66.9 \pm 4.2
71 (X)	1.7 \pm 0.1 ^b	2.7 \pm 0.6	3497.8 \pm 281.6 ^{bc}	85.6 \pm 1.9	82.5 \pm 2.4	11.8 \pm 2.8 ^a	51.3 \pm 10.1
74 (X)	0.9 \pm 0.1 ^a	2.5 \pm 0.5	3239.8 \pm 380.1 ^{cd}	80.3 \pm 3.5	88.5 \pm 1.8	18.8 \pm 2.3 ^{ab}	71.2 \pm 2.3
76 (X)	0.9 \pm 0.1 ^a	2.8 \pm 0.5	3077.5 \pm 356.6 ^d	74.2 \pm 3.6	72.8 \pm 10.2	43.2 \pm 9.8 ^b	52.4 \pm 9.4
78 (A)	0.9 \pm 0.1 ^a	3.0 \pm 0.5	3685.3 \pm 209.5 ^{ab}	78.8 \pm 4.8	85.3 \pm 11.2	18.2 \pm 4.9 ^{ab}	68.4 \pm 6.5
79 (A)	1.0 \pm 0.1 ^a	3.0 \pm 0.4	3745.8 \pm 324.5 ^{ab}	78.8 \pm 5.0	87.5 \pm 4.3	32.1 \pm 9.1 ^{ab}	64.9 \pm 6.5
80 (A)	1.1 \pm 0.1 ^a	2.3 \pm 0.3	3113.5 \pm 345.9 ^d	81.0 \pm 4.1	86.7 \pm 4.2	26.7 \pm 6.1 ^{ab}	69.7 \pm 5.7
81 (A)	2.0 \pm 0.1 ^b	2.6 \pm 0.6	3966.5 \pm 268.5 ^a	75.6 \pm 6.3	83.0 \pm 5.8	44.3 \pm 10.5 ^b	68.3 \pm 3.8

^{a-b} Distinto superíndice dentro de una misma columna indica diferencias ($p < 0.05$). Formas Anormales (anormalidades en cabeza, acrosomas, pieza intermedia y cola, gotas citoplasmáticas, etc...). (X): raza Xisqueta; (A): de raza Aranesa.

Tras la refrigeración, no se observaron diferencias significativas entre individuos en la viabilidad, resistencia osmótica (HOST) y parámetros cinéticos, excepto la superior linealidad de los espermatozoides de los machos 70 y 74 (Tabla 3.2.).

Tabla 3.2. Efecto del macho sobre la calidad seminal tras la refrigeración (media \pm se, n=6)

Individuos	70	71	74	76	78	79	80	81
Viabilidad	83.3 \pm 1.3	76.9 \pm 1.2	78.6 \pm 2.6	74.6 \pm 3.8	71.6 \pm 4.5	75.8 \pm 3.4	83.3 \pm 1.3	70.4 \pm 6.2
HOST (%)	57.3 \pm 1.3	50.9 \pm 1.2	52.6 \pm 2.6	48.6 \pm 3.8	45.6 \pm 4.5	49.8 \pm 3.4	57.3 \pm 1.3	44.4 \pm 6.2
MT (%)	77.0 \pm 5.8	69.6 \pm 2.3	67.3 \pm 6.3	54.7 \pm 3.1	64.6 \pm 4.1	61.8 \pm 5.3	73.1 \pm 6.2	59.9 \pm 5.9
MP (%)	35.8 \pm 3.2	28.4 \pm 3.2	33.2 \pm 2.1	30.4 \pm 1.2	33.2 \pm 2.3	31.1 \pm 3.5	39.6 \pm 5.4	30.6 \pm 2.0
VCL(μm/s)	106.5 \pm 3.9	102.8 \pm 4.5	96.5 \pm 2.7	91.6 \pm 3.9	106.6 \pm 6.2	85.7 \pm 5.6	99.9 \pm 5.1	103.4 \pm 5.9
VSL(μm/s)	60.5 \pm 2.2	55.9 \pm 4.4	56.9 \pm 3.8	56.5 \pm 4.1	54.4 \pm 3.8	47.3 \pm 3.9	53.5 \pm 7.1	59.4 \pm 3.7
VAP(μm/s)	82.1 \pm 3.5	78.8 \pm 4.1	75.8 \pm 4.3	73.4 \pm 4.7	73.6 \pm 4.3	62.8 \pm 5.4	72.9 \pm 6.5	79.9 \pm 5.4
LIN (%)	72.9 \pm 5.2 ^a	53.6 \pm 2.5 ^b	74.5 \pm 3.2 ^a	58.6 \pm 2.5 ^b	50.6 \pm 2.6 ^b	53.8 \pm 2.7 ^b	53.6 \pm 5.1 ^b	55.9 \pm 1.6 ^b
STR (%)	69.9 \pm 5.1	69.5 \pm 1.9	73.7 \pm 2.1	73.0 \pm 1.7	72.1 \pm 2.7	72.4 \pm 2.4	71.7 \pm 3.7	72.2 \pm 0.5
ALH(μm)	3.5 \pm 0.1	3.4 \pm 0.2	3.0 \pm 0.2	2.9 \pm 0.2	3.7 \pm 0.2	2.9 \pm 0.2	3.4 \pm 0.1	3.4 \pm 0.2
BCF (Hz)	9.4 \pm 0.5	9.3 \pm 0.6	9.5 \pm 0.8	8.0 \pm 0.3	10.6 \pm 0.7	9.1 \pm 0.6	10.3 \pm 0.9	8.8 \pm 0.7

^{a,d} Diferentes letras en la misma fila representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre moruecos. **MT**: motilidad total, **MP**: motilidad progresiva, **VCL**: velocidad curvilínea, **VSL**: velocidad rectilínea, **VAP**: velocidad media, **LIN**: índice de linealidad, **STR**: índice de rectitud, **ALH**: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, **BCF**: frecuencia de batida. Numero de espermatozoides = 5,626

Sin embargo, contrariamente a lo observado tras la refrigeración, al comparar los valores de los distintos parámetros cinéticos analizados mediante el sistema ISAS tras la congelación-descongelación de los espermatozoides de los distintos machos sometidos a estudio (Tabla 3.3.), sí se observaron diferencias significativas entre individuos en la mayoría de los parámetros, a excepción del ALH y BFC donde no se apreció ningún efecto debido al individuo. Así, se encontraron machos (76 y 81), cuyos espermatozoides descongelados presentaron, generalmente, los valores más bajos en todos los parámetros cinéticos, mientras que otros machos (70, 74 y 78) presentaron los valores superiores, quedando un tercer grupo de machos (71, 79 y 80) que presentaron valores intermedios.

Tabla 3.3. Efecto del individuo sobre los parámetros cinéticos de espermatozoides ovinos congelados-descongelados (media \pm se, n=6).

Individuos	70	71	74	76	78	79	80	81
MT (%)	47.6 \pm 5.6 ^a	37.3 \pm 1.3 ^b	48.5 \pm 1.5 ^a	25.0 \pm 2.5 ^c	49.2 \pm 0.8 ^a	43.7 \pm 5.7 ^{ab}	38.4 \pm 1.5 ^b	27.6 \pm 3.4 ^c
MP (%)	27.7 \pm 0.5 ^a	19.6 \pm 1.0 ^b	29.1 \pm 0.8 ^a	15.2 \pm 0.7 ^c	28.7 \pm 1.2 ^a	20.3 \pm 0.6 ^b	21.3 \pm 0.8 ^b	16.8 \pm 0.6 ^c
VCL(μ m/s)	98.9 \pm 1.9 ^a	90.2 \pm 6.2 ^{ab}	94.5 \pm 8.3 ^{ab}	78.4 \pm 9.8 ^b	94.1 \pm 3.7 ^{ab}	91.5 \pm 8.7 ^{ab}	91.5 \pm 3.9 ^{ab}	81.0 \pm 5.6 ^{ab}
VSL (μ m/s)	57.7 \pm 5.6 ^a	49.0 \pm 2.2 ^{ab}	57.1 \pm 4.8 ^a	36.7 \pm 5.6 ^b	58.3 \pm 4.3 ^a	44.2 \pm 4.8 ^b	39.8 \pm 3.1 ^b	38.5 \pm 2.2 ^b
VAP (μ m/s)	69.8 \pm 6.7 ^a	62.4 \pm 1.5 ^{ab}	70.4 \pm 6.1 ^a	49.9 \pm 3.1 ^c	72.1 \pm 2.8 ^a	61.6 \pm 6.0 ^{bc}	53.9 \pm 3.3 ^{bc}	48.1 \pm 2.3 ^c
LIN (%)	60.9 \pm 2.2 ^a	48.4 \pm 2.4 ^b	61.6 \pm 1.1 ^a	45.8 \pm 2.8 ^b	62.4 \pm 1.0 ^a	48.4 \pm 1.3 ^b	49.1 \pm 2.1 ^b	49.4 \pm 3.3 ^b
STR (%)	79.9 \pm 1.6 ^a	69.7 \pm 2.4 ^b	80.9 \pm 0.7 ^a	69.9 \pm 2.0 ^b	81.1 \pm 2.1 ^a	69.7 \pm 3.1 ^b	69.2 \pm 1.8 ^b	67.3 \pm 3.1 ^b
ALH (μ m)	3.6 \pm 0.2	3.7 \pm 0.2	3.3 \pm 0.2	3.3 \pm 0.3	3.6 \pm 0.1	3.1 \pm 0.3	3.2 \pm 0.3	3.7 \pm 0.2
BFC (Hz)	7.8 \pm 0.6	8.2 \pm 0.2	9.1 \pm 0.7	9.1 \pm 0.7	7.9 \pm 0.7	8.1 \pm 0.8	8.0 \pm 0.7	7.0 \pm 0.3

^{a,d} Diferentes letras en la misma fila representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre moruecos. **MT**: motilidad total, **MP**: motilidad progresiva, **VCL**: velocidad curvilínea, **VSL**: velocidad rectilínea, **VAP**: velocidad media, **LIN**: índice de linealidad, **STR**: índice de rectitud, **ALH**: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, **BFC**: frecuencia de batida. Numero de espermatozoides = 2,816

El análisis de los parámetros obtenidos mediante citometría de flujo (Tabla 3.4.) nos confirmó lo que el análisis de motilidad por ISAS parecía indicar en el sentido de observar 3 grupos de sementales: buenos, regulares y malos congeladores, en esta ocasión, en función de los porcentajes de viabilidad, actividad mitocondrial e integridad del acrosoma tras la descongelación. De nuevo, los machos 76 y 81(malos congeladores) presentaron los valores más bajos, los superiores se observaron en los espermatozoides criopreservados de

los machos 70, 74 y 78, (buenos congeladores), mientras que el resto presentaron valores medios (regulares congeladores), con diferencias significativas más marcadas en estas tres categorías o grupos. Respecto al porcentaje de espermatozoides vivos con actividad mitocondrial y acrosomas dañados (posible “criocapacitación”), los valores presentados por los espermatozoides del macho 76 fueron significativamente superiores al resto de machos. Asimismo, este mismo macho (76), junto con el macho 78, presentaron porcentajes significativamente superiores de espermatozoides vivos con acrosoma intacto pero baja actividad mitocondrial, a excepción del macho 71 que no se diferenció significativamente.

Tabla.3.4. Efecto del individuo en la viabilidad espermática, integridad acrosomal y actividad mitocondrial en espermatozoides descongelados de moruecos (media \pm se, n=6).

Individuo	Viabilidad	VAI	VAD	VSI	VSD	Integridad Acrosomal
70	42.5 \pm 0.9 ^a	41.5 \pm 0.8 ^a	0.4 \pm 0.1 ^a	0.6 \pm 0.1 ^a	0.0 \pm 0.0	71.6 \pm 2.1 ^a
71	32.9 \pm 0.4 ^b	31.7 \pm 0.5 ^b	0.4 \pm 0.2 ^a	0.8 \pm 0.3 ^{ab}	0.0 \pm 0.0	59.3 \pm 1.8 ^b
74	43.2 \pm 1.3 ^a	42.1 \pm 1.3 ^a	0.6 \pm 0.1 ^a	0.6 \pm 0.1 ^a	0.0 \pm 0.0	73.8 \pm 2.3 ^a
76	27.7 \pm 0.7 ^c	24.4 \pm 0.6 ^c	1.6 \pm 0.1 ^b	1.6 \pm 0.2 ^b	0.0 \pm 0.0	51.2 \pm 1.5 ^c
78	43.0 \pm 0.9 ^a	40.4 \pm 0.9 ^a	0.8 \pm 0.2 ^a	1.4 \pm 0.4 ^b	0.0 \pm 0.0	70.1 \pm 2.6 ^a
79	31.7 \pm 1.3 ^b	30.4 \pm 1.2 ^b	0.5 \pm 0.1 ^a	0.7 \pm 0.2 ^a	0.0 \pm 0.0	59.1 \pm 1.6 ^b
80	33.7 \pm 1.0 ^b	32.5 \pm 1.1 ^b	0.5 \pm 0.1 ^a	0.7 \pm 0.2 ^a	0.0 \pm 0.0	62.7 \pm 2.1 ^b
81	28.0 \pm 0.7 ^c	27.1 \pm 0.9 ^c	0.3 \pm 0.1 ^a	0.6 \pm 0.2 ^a	0.0 \pm 0.0	49.4 \pm 2.2 ^c

^{a,d}Diferentes letras representan diferencias significativas ($P<0.001$) entre moruecos. **VAI**: vivos con actividad mitocondrial y acrosoma intacta, **VAD**: vivos con actividad mitocondrial y con acrosoma dañado, **VSI**: vivos sin actividad mitocondrial y acrosoma intacta, **VSD**: vivos sin actividad mitocondrial y con acrosoma dañado, **Integridad Acrosomal**: vivos y muertos con integridad acrosomal.

Del mismo modo, en la capacidad de resistencia de los espermatozoides descongelados al shock hipoosmótico (Tabla 3.5.), se aprecia un comportamiento similar en la integridad de la membrana plasmática y en el porcentaje de espermatozoides vivos con actividad mitocondrial alta y acrosomas íntegros a lo observado antes de someterlos a un estrés osmótico. Es decir, valores superiores en los machos 70, 74 y 78 (buenos congeladores), valores intermedios en el resto de machos, mientras que los peores resultados se observaron siempre en los machos 76 y 81 (malos congeladores). Por lo que hace referencia a los espermatozoides vivos y acrosomas dañados (*criocapacitación*), se

aprecian los valores más bajos en los machos 70 y 74 con respecto al resto de machos, a excepción del macho 78 que no presentó diferencias significativas en este parámetro. Asimismo, los valores de los espermatozoides vivos con acrosoma intacto pero sin actividad mitocondrial fueron inferiores en los machos 70, 74 y 78 que el resto de machos. Por otra parte, los valores más bajos de integridad acrosomal se aprecia en los machos 76 y 81 con respecto al resto de machos.

Tabla.3.5. Efecto del individuo en la viabilidad espermática, integridad acrosomal y actividad mitocondrial en espermatozoides descongelados de moruecos tras ser incubados en solución hiposmótica (HOST) (media \pm se, n=6).

Individuo	Viabilidad	VAI	VAD	VSI	VSD	Integridad Acrosomal	Criocapacitados
70	40.5 \pm 0.6 ^a	38.1 \pm 0.6 ^a	0.9 \pm 0.0 ^a	1.3 \pm 0.1 ^a	0.2 \pm 0.0 ^a	69.8 \pm 2.8 ^a	1.1 \pm 0.1 ^a
71	31.3 \pm 0.7 ^b	27.0 \pm 0.5 ^b	1.7 \pm 0.4 ^c	2.3 \pm 0.2 ^b	0.3 \pm 0.0 ^b	59.8 \pm 3.8 ^a	2.0 \pm 0.2 ^c
74	41.3 \pm 1.1 ^a	39.1 \pm 1.0 ^a	0.6 \pm 0.1 ^a	1.4 \pm 0.1 ^a	0.2 \pm 0.0 ^a	68.5 \pm 3.0 ^a	0.8 \pm 0.2 ^a
76	22.5 \pm 1.1 ^c	17.9 \pm 0.9 ^c	1.8 \pm 0.1 ^c	2.4 \pm 0.3 ^b	0.4 \pm 0.0 ^c	46.0 \pm 3.8 ^b	2.2 \pm 0.1 ^c
78	42.0 \pm 1.3 ^a	39.2 \pm 1.2 ^a	1.0 \pm 0.0 ^{ab}	1.4 \pm 0.1 ^a	0.4 \pm 0.0 ^c	68.3 \pm 3.4 ^a	1.4 \pm 0.1 ^{ab}
79	29.9 \pm 0.5 ^b	25.5 \pm 0.7 ^b	1.8 \pm 0.1 ^c	2.4 \pm 0.3 ^b	0.3 \pm 0.0 ^b	59.2 \pm 4.6 ^a	2.1 \pm 0.1 ^c
80	31.3 \pm 0.6 ^b	27.3 \pm 0.5 ^b	1.7 \pm 0.1 ^c	2.0 \pm 0.1 ^b	0.3 \pm 0.0 ^b	65.8 \pm 3.9 ^a	2.0 \pm 0.1 ^c
81	23.7 \pm 0.9 ^c	19.8 \pm 1.4 ^c	1.4 \pm 0.1 ^{bc}	2.2 \pm 0.1 ^b	0.3 \pm 0.0 ^b	47.8 \pm 5.4 ^b	1.7 \pm 0.1 ^{bc}

^{a,d}Diferentes letras en la misma fila representan diferencias significativas ($P < 0.001$) entre moruecos. **VAI:** vivos con actividad mitocondrial y acrosoma intacta, **VAD:** vivos con actividad mitocondrial y con acrosoma dañado, **VSI:** vivos sin actividad mitocondrial y acrosoma intacta, **VSD:** vivos sin actividad mitocondrial y con acrosoma dañado, **Integridad Acrosomal:** vivos y muertos con integridad acrosomal, **Criocapacitados:** vivos con acrosoma dañado.

DISCUSIÓN

El análisis del semen fresco de nuestros donantes nos indica (Experimento 1) que la calidad seminal inicial aumenta significativamente con la edad, hecho constatado en otras razas ovinas como en la Romanov (Sañudo y col., 1986), Coriedale, Merino Rambouillet y Romney Marsh (Martinez y col., 1998), o como en la raza Rasa Aragonesa, donde la concentración espermática a los 9 meses de edad es del 50 al 75 % de la que presentan los moruecos adultos (Folch, 1984).

Esta tendencia a presentar una mejor calidad seminal con la edad se apreció también tras la refrigeración y criopreservación de los espermatozoides con valores superiores en la viabilidad e integridad funcional de la membrana cuando los donantes eran mayores de 18 meses de edad. De hecho, Lymberopoulos y col., (2010) en espermatozoides descongelados de ovinos de la raza Chios, al comparar moruecos jóvenes (1-2 años) y adultos (4-5 años) ya encontraron valores superiores de viabilidad y actividad mitocondrial alta en espermatozoides procedentes de animales adultos. De igual manera, la edad parece influir en los parámetros cinéticos analizados durante la conservación espermática. Concretamente se observó una superioridad debida a la edad en la mayoría de parámetros cinéticos de velocidad y linealidad de las trayectorias espermáticas, lo que sugiere que la edad podría favorecer la capacidad de resistencia de los espermatozoides a la criopreservación, como ya ha sido reportado en ovinos (Wiemer y Ruttle, 1987; Osinowo y col., 1988).

También en espermatozoides de toro, Hallap y col., (2004) indicaron que el incremento de la edad de 1 a 4 años estaba acompañado por una mayor motilidad e integridad de las membranas plasmática de los espermatozoides descongelados. Estos resultados se deben posiblemente a que el tamaño y el peso del parénquima testicular son parámetros altamente correlacionados con la producción y calidad seminal y con la fertilidad. En moruecos, el volumen de los testículos aumenta paralelamente al crecimiento corporal, hasta que éste alcance el pleno estado adulto (Folch, 2000; Beltrán de Heredia, 2009; Lymberopoulos y col., 2010), por lo que moruecos de mayor edad producirían mayor cantidad y calidad de semen que los jóvenes, muchos de los cuales no habrían completado su crecimiento corporal y alcanzado la madurez sexual a la edad de 14 meses como se observa en nuestro resultados.

Por otra parte, según los resultados obtenidos en los experimentos 1 y 2 del presente capítulo, el butil hidroxitolueno (BHT) es un compuesto antioxidante que mejora la calidad de los espermatozoides ovinos durante su conservación. De hecho, la inclusión de BHT en los medios de conservación de espermatozoides de animales de 18 y 26 meses de edad, ya fuera en el fotoperiodo positivo como en el negativo, mejoró los parámetros de viabilidad, integridad funcional de la membrana plasmática, parámetros de velocidad, progresión y

dirección de la cabeza de los espermatozoides, tanto tras el proceso de refrigeración como en la congelación y descongelación. Resultados similares han sido reportados por Roca y col., (2004) en cerdos, Ijaz y col., (2008) en búfalos, Kalifa y col., (2008) en cabras e incluso por Farshad y col., (2010) en moruecos, donde la inclusión de BHT como antioxidante en los diluyentes de conservación mejoró la calidad seminal de los espermatozoides tras la descongelación. Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual el butil hidroxitolueno mejora la calidad espermática no es del todo conocido (Farshad y col., 2010). Hammerstedt y col., (1976) indica que el BHT es un antioxidante fenólico, que se incorpora a la membrana plasmática del espermatozoide disminuyendo la viscosidad de los lípidos de membrana, reduce los cambios de permeabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide durante el proceso de criopreservación, e igualmente previene o reduce la actividad dañina de los radicales libres, mediante la conversión de los radicales peroxil a hidroperóxidos (Aitken y Clarkson, 1987).

Sin embargo, cabe destacar que la inclusión de BHT como antioxidante en los diluyentes de conservación en espermatozoides de animales de 14 meses de edad y durante fotoperiodo negativo, solo mejoró los valores de los parámetros cinéticos de motilidad total, velocidad media y de progresión tras la refrigeración de los espermatozoides, así como la velocidad rectilínea, de progresión y frecuencia de batido de los espermatozoides descongelados. Una posible explicación a estos resultados podría ser que los moruecos de menor edad producen generalmente semen de peor calidad con espermatozoides posiblemente más sensibles a la acción y a la cantidad de ROS presentes, lo que hace insuficiente el presumible efecto beneficioso del BHT en muchos otros parámetros de calidad observado en espermatozoides procedentes de individuos de mayor edad (Killian y col., 1989; Lymberopoulos y col., 2010).

Desgraciadamente, el estudio del efecto del fotoperiodo sobre la calidad seminal inicial y post-conservación espermática es difícil de determinar en el presente trabajo, ya que no existió la posibilidad de analizar el efecto de fotoperiodos distintos con donantes de la misma edad. No obstante, tras el análisis del semen fresco (Experimento 1), los resultados parecen indicar que el fotoperiodo, una vez alcanzada la edad de 18 meses de los

donantes, no influyó excesivamente en la viabilidad, integridad del acrosoma, ni morfología de los espermatozoides, pero sí en la capacidad de resistencia al shock hiposmótico. Mientras que se observa una tendencia a presentar una mayor resistencia al shock hiposmótico de los espermatozoides frescos a medida que aumenta la edad de los donantes, en el caso de colectar el semen durante el fotoperiodo positivo esta tendencia no solo desaparece, si no que además retrocede. Sin embargo, cuando analizamos los resultados obtenidos tras la refrigeración, la capacidad de resistencia al shock hiposmótico es similar en espermatozoides procedentes de individuos de 26 meses recolectados en otoño que la registrada en espermatozoides de individuos de 30 meses recolectados en fotoperiodo positivo. De hecho, entre estos dos grupos de espermatozoides, el fotoperiodo, teniendo en cuenta la diferencia de edad de los donantes, no parece provocar grandes diferencias en los parámetros estudiados, solamente en algunos de los parámetros descriptores del movimiento como el índice de rectitud, ALH y BCF tras la refrigeración y los parámetros de velocidad tras la congelación. Así, los resultados obtenidos, donde la influencia del fotoperiodo es poca, fueron similares a los descritos en otras razas ovinas como la Leccese (D'Alessandro y col., 2001), Churra y Assaf (Mazariego y col., 2010) y en razas caprinas como la Murciano-Granadina (Roca y col., 1992) o la Florida (Dorado y col., 2003). Sin embargo, otros autores registraron valores máximos en fotoperiodo negativo y mínimos en positivo en razas como la Latxa en el noroeste de Navarra y País Vasco (Beltrán de Heredia, 1995), la Romney Marsh en el sur de Chile (Sepúlveda y col., 2002) o la Dohme Merino en la Patagonia Argentina (Buffoni, 2013), si bien estas diferencias pueden ser consecuencias de factores raciales, ambientales y geográficos (Delgadillo y col., 1999; Roca y col., 1991).

De la misma manera, nuestros resultados obtenidos después del refrigerado y descongelado de las dosis seminales fueron irregulares, no observándose diferencias significativas en la mayoría de parámetros de calidad seminal evaluados en los dos fotoperiodos y edades en estudio. Resultados similares han sido reportados por Aguado y col., (1994) en ovinos de la raza Manchega, quienes no observaron diferencias significativas en la motilidad ni integridad de las membranas acrosomal y plasmática de espermatozoides descongelados. Tampoco D'Alessandro y col., (2003) en espermatozoides

descongelados de ovinos de la raza Leccesa encontraron diferencias en la motilidad y porcentaje de espermatozoides con acrosomas dañados, aunque si obtuvieron los valores más altos de viabilidad en fotoperiodo negativo. Estos escasos cambios debidos al fotoperiodo encontrados en la calidad espermática de los moruecos de razas autóctonas de la península ibérica se deben a que son poco estacionales (Chagas y Silva, 1992; Jordana y Jordana 1995), como la mayoría de razas en la región mediterránea, las cuales están sujetas a un clima moderado y pequeñas diferencias entre días cortos (9 a 10 horas) y días largos (14 a 15 horas), lo que condiciona una cierta flexibilidad de la época reproductiva (Forcada y col., 2000). A pesar de existir estudios que indican menor capacidad fecundante del semen obtenido en primavera que del colectado en otoño (Colas, 1981; Guerin, 1990), otros autores reportan tasas de fertilidad similares cuando utilizan semen colectado durante todos los meses del año (Hill y col., 1998).

Respecto al segundo experimento, el análisis inicial del semen fresco parece indicar que la aplicación de implantes de melatonina en los machos mejoró la concentración espermática del semen en las dos edades testadas y la resistencia al shock hipotermico sólo en espermatozoides de los animales de mayor edad, es decir, de 30 meses. En cambio, ni el volumen de eyaculado, ni la motilidad masal, ni la integridad acrosomal, ni la morfología de los espermatozoides se vieron afectados por la aplicación de los implantes. De hecho, en trabajos previos de Bravo y Roy (2003), donde se utilizaron implantes de melatonina en 12 machos de las razas Ile France y Merino Precoz, con muestreo semanal durante 4 meses en estación no reproductiva, tampoco se encontraron diferencias en volumen del eyaculado, pero si en la concentración espermática a favor del tratamiento de melatonina. Igualmente Beltrán de Heredia (1995), utilizando moruecos de la raza Latxa, encontró mejoras significativas en la concentración espermática, aunque también en el volumen del eyaculado con el uso del melatonina. En general, existen varios estudios en diferentes razas donde revelan que la melatonina administrada en estación no reproductiva puede mejorar la calidad del esperma (Chemineau y col., 1992; Garde y col., 1996; Kaya y col., 2000).

Sin embargo, la aplicación de los implantes de melatonina no pareció mejorar la calidad del semen una vez refrigerado o descongelado de machos de 18 y 30 meses de

edad. Resultados contradictorios han sido reportados por Casao y col., (2007) y Kaya y col., (2000) en moruecos de diferentes razas, donde la aplicación de implantes de melatonina mejoró la motilidad e integridad acrosomal tras la descongelación, mientras que Romao y col., (2003) en moruecos de la razas Merina Preta y Campanica a los 66 días después del implante de melatonina no observaron ninguna diferencia en los parámetros de calidad seminal post-descongelación, así como tampoco influyó en la tasa de fertilidad, cuando se comparó espermatozoides de animales tratados con no tratados. De nuevo, estos resultados tan dispares, probablemente se deban a que la mayoría de razas mediterráneas son poco estacionales (Pelletier y col., 2000; Forcada y col., 2000; Azcona y col., 2001). Por esta razón la mayoría de tratamientos con implante de melatonina en fotoperiodo positivo no alteran significativamente la calidad del semen en estas localizaciones geográficas. En cambio, en latitudes más elevadas, con el tratamiento de melatonina fue posible mejorar la calidad del semen descongelado (Fiser y Barra, 1984; Fiser y Fairfull, 1983, 1986; Zheltobryuk y col., 1990, citados por Salamon y Maxwell, 1995; Kaya y col., 2001), la fertilidad y prolificidad (Palacín y col., 2008).

Por otra parte, también en este segundo experimento 2, se estudió, además del efecto de la edad de los donantes y de la aplicación de implantes de melatonina, la adición de antioxidantes en el medio de conservación sobre la calidad del semen extraído únicamente durante el fotoperiodo positivo. Como ya vimos en el primer experimento, la adición del BHT en el medio de conservación de espermatozoides procedentes de individuos de 18 meses supuso una mejora en la viabilidad, integridad funcional de la membrana plasmática, parámetros de velocidad, progresión y dirección de la cabeza de los espermatozoides tanto tras el proceso de refrigeración como en la congelación/descongelación, así como también en el porcentaje de espermatozoides vivos con actividad mitocondrial alta y acrosoma intacto, hechos que no se describieron cuando el antioxidante usado fue la melatonina y los espermatozoides procedían de individuos de 30 meses. De hecho, la melatonina solo mejoró ligeramente la viabilidad tras la refrigeración en el caso de espermatozoides procedentes de animales implantados. Esta ausencia de efecto de la melatonina como antioxidante en el presente trabajo es opuesta a lo descrito por otros autores como Succu y col., (2010), quienes obtuvieron una mejora de la

viabilidad, motilidad e integridad de ADN, con la adición de 1 mM de melatonina en los medios de crioconservación de espermatozoides de morueco o como Ashrafi y col., (2013) en espermatozoides de toro, donde la inclusión de melatonina fue de 3mM en los diluyentes y supuso una mejora de la motilidad y viabilidad espermática post-descongelación. Estos resultados contradictorios podrían deberse a la concentración de melatonina en el diluyente, composición del diluyente y tiempo de refrigeración (Hardeland, 2005; Dominguez-Rebolledo y col., 2010).

En cuanto a los resultados de morfometría espermática obtenidos en fresco y tras el proceso de crioconservación, no se mostró ningún cambio significativo en la forma de la cabeza de los espermatozoides en ninguno de los tratamientos estudiados, ni en el primer experimento, donde se comparaban el efecto de la edad del donante, fotoperiodo y presencia de antioxidante BHT en el diluyente, ni tampoco en el segundo donde se estudió también el efecto de la edad, la administración de implantes de melatonina y la presencia de antioxidantes durante el fotoperiodo desfavorable. Contrariamente, otros investigadores demostraron que el proceso de criopreservación produce cambios en la forma de la cabeza de los espermatozoides ovinos post-congelados (Bravo, 2010, en Ile de France; Morato-Morales 2012, en Manchego). Estos resultados contradictorios que exhiben las células espermáticas de la misma especie ante los procesos de criopreservación podrían deberse a factores como la edad, el tipo de crioprotector y aditivos en los diluyentes (Tejerina, 2007; Martí, y col., 2011).

Por otra parte, en ninguna de las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides frescos se encontraron diferencias significativas al comparar las diferentes edades de los sementales. Sin embargo, el proceso de la congelación y descongelación disminuyó significativamente todas las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides procedentes de animales de 18 meses de edad. Modificaciones similares han sido descritas en diferentes especies (Gravance y col., 1995; Mohasmed, 1995; Buendía y col., 2002; Soler y col., 2005; Martí, y col., 2011), así como diferencias entre individuos de una misma especie (Tejerina y col., 2005). No obstante, en nuestro caso no se pudo apreciar ningún otro efecto sobre la morfometría espermática, ni de la adición de BHT ni tampoco de la aplicación de

implantes de melatonina. Únicamente la suplementación de melatonina como antioxidante en el diluyente redujo significativamente las dimensiones de los espermatozoides descongelados procedentes de machos de 30 meses.

Así, teniendo en cuenta las dimensiones obtenidas en las diferentes edades, podemos indicar que las modificaciones de los parámetros morfométricos después del proceso de criopreservación dependen principalmente de la estabilización de la madurez sexual de los moruecos (Martí, y col., 2011), complementado con efectos de la adición del crioprotector y aditivos durante la fase de congelación-descongelación que provocan estrés osmótico y formación/dilución del hielo que causarán la pérdida de la integridad acrosómica tras la descongelación (Peláez, 2003; Bwanga y col., 1991), lo que provocará la exocitosis de los componentes de la matriz acrosomal y, consecuentemente, una pérdida del volumen global de la célula. La deshidratación progresiva que sufre la célula durante este proceso biotecnológico acarreará a su vez una disminución del volumen de la cabeza espermática (England, 1993). A este fenómeno debemos de sumar la reducción del espacio ocupado por el núcleo al producirse una condensación de la cromatina durante la congelación (Royére y col., 1988), sin olvidar las alteraciones citoesqueléticas que sufre el espermatozoide que repercutirán en la morfometría (Watson, 2000; Petrunkina y col., 2004), así como también tener en cuenta las alteraciones que se producen en la membrana plasmática a causa de los procesos de congelación que afectarán en el tamaño celular (Parks y Graham, 1992; Peña y col., 2005). El plasmalema es el encargado de regular el intercambio de sustancias con el exterior y mantener el volumen interno, la pérdida de funcionalidad del mismo produce una salida de contenido citoplasmático y la consecuente reducción de volumen (Petrunkina y col., 2004).

Por último, en el tercer experimento hemos querido analizar la calidad seminal de cada uno de nuestros donantes a la edad de 26 meses, tanto en fresco como tras la conservación de sus espermatozoides, ya que en todos experimentos previos llevados a cabo en el presente trabajo de investigación, hemos realizado de forma sistemática la mezcla de eyaculados procedentes de diferentes machos con el objetivo de minimizar el efecto individuo a favor de los factores que pretendíamos estudiar. Así, obtuvimos que los

valores medios de la mayoría de parámetros espermáticos del semen fresco de los machos de las razas Xisqueta y Aranesea fueron superiores a los registrados en razas de ovinos, como la Gallega (Barrio y col., 1995), la Guirra (Marco-Jiménez y col., 2002) o la Latxa (Betrán de Heredia, 1995), similares a los obtenidos en Asaff y Churra (Alvarez y col., 2000), Manchega (Alcaide y col., 2001) y raza Ile France (Bravo, 2010), e inferiores a la de otras razas de aptitud cárnica como la Rasa Aragonesa (Ollero y col., 1994), obtenidos en localizaciones geográficas y condiciones climáticas casi similares a las acaecidas en nuestra experiencia.

Independientemente de la raza, encontramos ligeras variaciones individuales en el volumen de eyaculado y concentración seminal. Mayores fueron las diferencias respecto al porcentaje de anomalías espermáticas e integridad acrosomal, y ninguna diferencia significativa en cuanto a la motilidad masal, viabilidad y capacidad de resistencia al shock hiposomótico. Resultados similares han sido reportados Garde, (1993); Aguado y col., (1998) en ovinos e incluso por Barrio y col., (1995) en moruecos de la raza Gallega, quienes encontraron diferencias individuales en el volumen, morfología espermática y concentración seminal, pero, a diferencia de nuestros resultados, también en viabilidad, integridad funcional de sus membranas tras la prueba de HOST, producción espermática y acrosomas normales, aunque es preciso destacar que el número de sementales que disponíamos para realizar nuestro estudio es claramente insuficiente para poder obtener rotundas conclusiones. No obstante, estas variaciones existentes entre machos en relación a las características seminales puede atribuirse a variaciones individuales en el desarrollo y funcionalidad del testículo, así como su endocrinología (Beltrán de Heredia, 2009), puesto que, la producción y calidad seminal está estrechamente relacionado con el tamaño testicular, o más concretamente con el peso testicular, que ha sido ampliamente documentado en pequeños rumiantes (Vijil y col., 1986; Lincoln, 1989; Ritar y col., 1992; Delgadillo y col., 1995).

Por otra parte, no deja de llamarnos la atención que en los parámetros analizados tras la refrigeración no se apreciara ninguna diferencia significativa entre espermatozoides de los distintos donantes, ni en la viabilidad, ni en la capacidad de resistencia al shock

hiposmótico o integridad funcional de la membrana plasmática, así como tampoco en ningún parámetro cinético de cantidad y calidad del movimiento, a excepción del índice de linealidad que fue superior en 2 machos, cada uno de una raza. Sin embargo, la susceptibilidad de los espermatozoides a la crioconservación no fue igual para todos los moruecos, debido a que los espermatozoides de algunos moruecos sobreviven a la congelación-descongelación con menos daño que otros, independientemente de la calidad inicial, tal como lo reporta en moruecos Evan (1991) o Thurston y col. (2001), en caballos Amann y Pickett (1987), en cerdos, Holt y col. (2005) o en toros, Eyestone y First (1989).

Basándose en las diferencias de calidad seminal después del descongelado, los moruecos del presente trabajo fueron clasificados como machos “buenos congeladores”, los cuales se caracterizan por presentar valores superiores en los parámetros de viabilidad, integridad de la membrana plasmática y acrosomal, parámetros cinéticos de velocidad, de progresión, dirección de la cabeza, porcentaje de espermatozoides vivos con actividad mitocondrial alta y acrosomas intactos, machos “regulares congeladores”, con valores medios en los parámetros de calidad seminal y, por último los “malos congeladores” con valores más bajos en los parámetros de calidad seminal. Estas diferencias en la congelabilidad entre machos podría deberse a una defectuosa espermatogénesis o fallas en la maduración en el epidídimo, principalmente en machos malos congeladores (Calvin y Bedford, 1971), lo que llevaría a la aparición de diferencias entre eyaculados de malos congeladores y buenos congeladores en parámetros como la longitud de las cadenas de ácidos grasos poli-insaturados de la membrana citoplasmática o los niveles de colesterol de dicha membrana (Waterhouse y col., 2006). Otra causa podría ser diferencias en los niveles intracelulares de proteínas o en la resistencia ambiental del espermatozoide (Holt y col., 2005; Hernández y col., 2007). En este sentido, se ha descrito en verracos una mayor presencia de la proteína HSP90 en el semen de buenos congeladores cuando se comparan con los malos congeladores (Casas y col., 2010). De esta forma, los buenos congeladores tendrán una mayor protección contra el enfriamiento y choque osmótico producidos durante la congelación-descongelación. En toros, Killian y col., (1993) encontraron una asociación entre los buenos congeladores y malos congeladores y la composición de sus proteínas del plasma seminal. En ese estudio, se observó como dos proteínas (26 kDa/6'2 pI y 55

kDa/4,5 pI) predominaban en los buenos congeladores, mientras que otras dos proteínas (16 kDa/4'1 pI y 16 kDa/6'7 pI) prevalecían en los malos congeladores. En moruecos, se ha reportado, la presencia de proteínas RSVP14 y RSVP20, en el plasma seminal que pueden afectar la calidad del semen después de la criopreservación (Barrios y col., 2005). Igualmente, en el caso del verraco, varios estudios indican que la variabilidad en la congelación de eyaculados está relacionada con la línea genética de la que proceden los machos (Thurston y col., 2001), si bien la heredabilidad genética para esta característica de congelabilidad es baja (Safranski y col., 2011). A pesar de ello, se ha llegado a la identificación por marcadores moleculares polimórficos de fragmentos amplificados asociados a verracos buenos congeladores y malos congeladores (Thurston y col., 2002).

En conclusión, el presente trabajo sugiere que a pesar de que los espermatozoides procedentes de moruecos de 26 meses de edad presentaron una mejor calidad seminal inicial en cuanto a presentar una mayor concentración y resistencia al shock osmótico que los procedentes de animales más jóvenes, durante su conservación, la supuesta inferioridad de los espermatozoides procedentes de donantes más jóvenes, en concreto de 18 meses, puede ser fácilmente contrarrestada con la adición de BHT en los medios de conservación, mejorando sustancialmente la calidad de los espermatozoides refrigerados o incluso descongelados, teniendo en cuenta, además, que en nuestro caso esta edad (18 meses) coincidía con la denominada época desfavorable o fotoperiodo positivo. Por otra parte, así como el BHT ha demostrado tener cualidades interesantes para su utilización en la elaboración de los medios de conservación de espermatozoides ovinos, independientemente de la edad del donante o del fotoperiodo en el que se realice la recolecta de semen, la melatonina, como antioxidante en el medio, no parece mejorar la calidad espermática durante la conservación de las células espermáticas. Tampoco el uso de implantes de melatonina parece haber proporcionado ninguna ventaja a la hora de conservar espermatozoides fuera del fotoperiodo negativo, probablemente debido a que las razas autóctonas Aranesa y Xisqueta son poco estacionales en cuanto a producción y calidad espermática. Por otra parte, la congelación-descongelación de manera individualizada de espermatozoides de los diferentes moruecos parece mostrar la existencia de individuos malos congeladores, buenos congeladores y también machos “regulares” congeladores,

aunque muchos más estudios, con especial atención al análisis de fertilidad *in vivo* e *in vitro*, así como con un mayor número de individuos testados, deberían llevarse a cabo para poder confirmar la existencia de estas tres supuestas categorías de machos donantes.

BIBLIOGRAFÍA

Abecia, J.A.; Valares, J.A.; Forcada, F.; Palacín, I.; Martín, S.; Martino, A. (2007) - The effect of melatonin on the reproductive performance of three sheep breeds in Spain. *Small Ruminant Research*, 69: 10- 16.

Agarwal, A.; Saleh, R.A.; Bedaiwy, M.A. (2003) - Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.*, 79: 829-843.

Aguado, M.J.; Garde, J.; Perez-Guzman, M.D.; Montoro, V.; Vázquez, I. (1994) - Variaciones estacionales de la crioresistencia del semen de morueco Manchego. Producción ovina y caprina. N° XIX-SEOC. Burgos, España. pp: 507-509

Aguado, M.J.; Garcia-Cervigon, M.; Manso, A.; Perez-Guzman, M.D.; Garde, J.; Montoro, V. (1998) – Estudio preliminar del poder fecundante del semen de ovino manchego. N° XXIII-SEOC. pp: 521-524.

Aitken, R.J.; Clarkson, J.S. (1987) - Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 81: 459–469.

Alcaide, V.; Manso, A.; Moyano, J.C.; García-Cervigón, M.; Palomares, M.D.; Montoro, V. (2001) – Influencia de los implantes de melatonina sobre la calidad seminal en los moruecos del esquema de selección de la raza ovina Manchega. Producción ovina y caprina. N° XXVI-SEOC. Sevilla, España. pp: 959-963.

Álvarez, M.; Kaabi, M.; Boixo, J.C.; Anel, E.; Chamorro, C.A.; Martínez, S.; Anel, L. (2000) - Características seminales de las razas ovinas Churra y Assaf. Producción ovina y caprina. Nº XXV-SEOC. Teruel, España. pp: 567-569.

Amann, R.P.; Pickett, B.W. (1987) - Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.*, 7: 145–173

Anel, L.; Alvarez, M.; Martinez-Pastor, F.; Garcia-Macias, V.; Anel, E.; de Paz, P. (2006) - Improvement Strategies in Ovine Artificial Insemination. *Reprod Dom Anim.*, 41 (Suppl. 2), 30–42.

Ashraf, I.; Kohram, H.; Ardabili, F. (2013) - Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science.*, 139: 25– 30.

Avdi, M.; Banos, G.; Stefos, K.; Chemineau, P. (2004) - Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of chios and serres rams. *theriogenology*, 62: 275- 282.

Azcona, V.A.; González, A.M.; Jurado, J.C.M.; García-Cervigón, M.; Pasamontes, M.D.P.; Ángulo, V.M. (2001) - influencia de los implantes de melatonina sobre la calidad seminal en los moruecos del esquema de selección de la raza ovina manchega. Nº XXVI-SEOC, Sevilla, España. pp: 997-982.

Barrio, F.; Peña, A.I.; Quíntela, L.A.; Herradóm, P.G. (1995) - Influencia del factor individual sobre las características espermáticas de la raza ovina Gallega. Producción ovina y caprina. Nº XX-SEOC. Madrid, España. pp: 127-130.

Barrios, B.; Fernandez-Juan, M.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A. (2005) - Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *J Androl.*, 26: 539-549.

Beltrán de Heredia, I. (1995) – Estudio de la producción y calidad del semen de moruecos de la raza Latxa. Resultados obtenidos con distintas técnicas de congelación e inseminación (Tesis). 326.

Beltrán de Heredia, I. (2009) – Reproducción y control reproductivo en el macho. En Ovinotecnia (Producción y Economía de la Especie). Eds: Sañudo, C.; Cepero Briz, R. Prensas Universitarias de Zaragoza. Zaragoza, España. pp:105-114.

Bittman, E.L.; Kaynard, A.H.; Olster, D.H.; Robinson, J.E.; Yellon, S.M.; Karsch, F.J. (1985) - Pineal melatonin mediates photoperiodic control of pulsatile luteinizing-hormone secretion in the ewe. *Neuroendocrinology.*, 40: 409-418

Boland, M.P.; Al-Kamali, A.A.; Crosby, T.F.; Haynes, N.B.; Howles, C.M. (1985) - The influence of breed, season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido and plasma hormone concentration in rams. *Anim Reprod Sci.*, 9: 241-252

Bravo, J.A.; Roy, T.J. (2003) - Influencia de los implantes de melatonina sobre las características espermáticas y actividad sexual del morueco en estación no sexual. N° XXVIII-SEOC. Badajoz, España. pp: 152-159.

Bravo, J. (2010). Estudio de la influencia de la estación sobre los parámetros seminales y morfométricos del espermatozoide del morueco de la raza Ile de France. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura, España.

Buendía, P.; Soler, C.; Paolicchi, F.; Gago, G.; Urquieta, B.; Pérez-Sánchez, F.; Bustos-Obregón, E. (2002) - Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using Sperm-Class Analyzer computer-assisted system. *Theriogenology*, 57: 1207-1218.

Buffoni, A. (2013) - Efecto de los implantes de melatonina sobre los rendimientos en la obtención de embriones in vivo, la calidad seminal y la actividad reproductiva de ovinos

en la región patagónica argentina. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, España. 163.

Bwanga, C.O.; De Braganca, M.M.; Einarsson, S.; Rodríguez-Martínez, H. (1990) - Cryopreservation of boar semen in mini- and maxi- straws. *J. Vet. Med. A.*, 37: 65-658.

Calvin, H.I.; Bedford, J.M. (1971) - Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod Fertil*, 13: 65–75.

Casao, A.; Vega, S.; Pérez-Pe, R.; Cebrián-Pérez, J.A.; Muiño-Blanco, T.; Abecia., J.A.; Forcada, F.; Palacín, I. (2007) - Efecto de los implantes de melatonina en la motilidad del semen de morueco de raza aragonesa en época de anestro. ITEA, Zaragoza, España. pp:6-8.

Casao, A.; Cebrian, I.; Asumpcao, M.E.; Pérez-Pé, R.; Abecia, J.A.; Forcada, F.; Cebrián-Pérez, J.A.; Muiño-Blanco, T. (2010a) - Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8: 1477-7827.

Casao, A.; Mendoza, N.; Pérez-Pé, R.; Grasa, P.; Abecia, J.A.; Forcada, F.; Cebrián-Peréz, J.A.; Muiño-Blanco, T. (2010b) – Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *Journal of Pineal Research*, 48 (1): 39- 46,

Casas, I.; Sancho, S.; Ballester, J.; Briz, M.; Pinart, E.; Bussalleu, E. (2010) - The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. *Theriogenology.*, 74: 940–950.

Chagas, J; Silva, J.N. (1992) - Inseminación artificial en ovinos. Editorial. S.P.O.C., 3 (1): 61-80

Chemineau, P.; Malpaux, B.; Pelletier, J.; Leboeru, B.; Deletang, F.; Pobel, P.; Brice, G. (1988) - Emploi des implants de mélatonine et des traitements photoperiodiques pour maîtriser la reproduction chez les ovins et les caprins. *INRA Prod. Anim.*, 91 (1): 45-60

Chemineau, P. (1992) - Medio ambiente y reproducción animal. In: Conferencia de clausura de las VI Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, Salamanca, España.

Colas, G. (1981) - Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier île-de-France. ii. Fécondance: relation avec les entées qualitatifs observés *in vitro*. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 21(3): 399-407.

Colas, G., Guerin, Y.; Lemaire, Y.; Montassier, Y.; Despierres, J. (1986) - Seasonal variations in the testicular diameter and sperm morphology of Vendean and Texel rams. *Reproduction Nutrition Development.*, 26: 863-875.

D'Alessandro, A.G.; Colonna, M.A.; Bellitti, A.; Martemucci, G. (2001) - Variazioni durante l'anno delle caratteristiche quantitative e qualitative del seme in arieti di razza Leccese (Variations during the year in quantitative and qualitative semen characteristics in Leccese rams). *Zoot. Nutr. Anim.*, 27: 221-230.

D'Alessandro, A.G.; Martemucci, G. (2003) - Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. *Animal Reproduction Science.*, 79: 93-102.

Delgadillo, J.A.; Hochereau-De Reviers, M.T.; Daveau, A.; Chemineau, P. (1995) - Effect of short photoperiodic cycles on male genital tract and testicular parameters in male goats (*Capra hircus*). *Reprod. Nutr. Dev.*, 35 (5): 549-558.

Delgadillo, J.A.; Canedo, G.A.; Chemineau, P.; Guillaume, D. (1999) - Evidence for an annual reproductive rhythm independent of food availability in male Creole goats in subtropical northern Mexico. *Theriogenology.*, 52: 727-737.

Dominguez-Revolledo, A.E.; Fernandez-Santos, M.R.; Bisbal, A.; Ros-Santaella, J.L.; Ramon, M.; Carmona, M.; Martinez-Pastor, F. (2001) – Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. *Reprod Fertil. Dev.*, 22: 856-870.

Donoghue, A. N.; Donoghue, D.J. (1997) - Effects of water and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. *Poult. Sci.*, 76: 1440-1445.

Dorado, J.; Rodriguez, I.; Hidalgo, M.; Perez, C.C.; Corral, S.; Sanz, J.; Sanchez, M. (2003) - Estudio del efecto de la estación sobre la calidad del esperma del macho cabrío de raza Florida. Nº. XXVIII Jornadas Científicas de la SEOC, Cáceres España. pp: 205-210.

England, G.C. (1993) - Cryopreservation of dog semen: a review. *J. Reprod. Fertil.*, 47: 243-255.

Evans, G. (1988) - Current topics in artificial insemination of sheep. *Aust. J. Biol. Sci.*, 41: 103-116.

Evans, G.; Maxwell, W.M.C. (1990) – Inseminación artificial de ovejas y cabras. (Acribia). Zaragoza. pp: 160.

Eyestone, W.H.; First, N.L. (1989) - Variation in bovine embryo development in vitro due to bulls. *Theriogenology.*, 31: 191-200.

Farshad, A.; Khalili, B.; Jafaroghli, M. (2010) - Effects of Butylated Hydroxytoluene on Freezability of Ram Spermatozoa. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 23: 10: 1276 – 1281.

Folch, J. (1984) - Manejo reproductivo de los ovinos de carne y sus bases fisiológicas. Eds. Institución “Fernando el Católico” Zaragoza, España. pp: 43-46.

Folch, J. (2000) – Manejo del morueco. Producción ovina y caprina. Nº XXV-SEOC. Teruel, España. pp: 61-64.

Forcada, F.; Abecia, J.A.; Zarazaga, L.A.; Lozano, M. (2000) - Importancia del fotoperiodo en la regulación de la actividad reproductora. *Ovis*, 71: 13-32.

Garde, J. (1993) – Congelación del semen en la especie ovina: características biológicas de las dosis descongeladas. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, España.

Garde, J.; Pérez-Guzmán, M.D.; Pérez, S.S.; Garzón, A.; Montoro, V. (1996) Características seminales de corderos de raza Manchega tratados con implantes de melatonina. *Arch. Zootec.*, 45: 395-401.

Gravance, C.G.; Lewis, K.M.; Casey, P.J. (1995) - Computer automated sperm head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa. *Theriogenology.*, 44: 989-1002.

Guerin, Y. (1990) - Méthodes de conservation de la semence ovine. *Élevage & Insemination.*, 236: 3-14.

Hallap, T.; Haard, M.; Jaakma, U.; Larsson, B.; Rodriguez-Martinez, H. (2004) - Variations in quality of frozen-thawed semen from Swedish Red and White AI sires at 1 and 4 years of age. *Int J Androl.*, 27: 166-171.

Hammerstedt, R. H.; Amann, R.P.; Rucinsky, T.; Morsel, I.I.; Lepock, P.D. (1976) - Use of spin labels and electron spin resonance spectroscopy to characterize membrane of bovine sperm: the effect of butylated hydroxytoluene and cold shock. *Biol. Reprod.*, 14: 381-397.

Hardeland, R. (2005) – Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine.*, 27: 119-130.

Hernández M, Roca J, Gil MA, Vázquez JM, Martínez EA. (2007) - Adjustments on the

cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology.*, 67: 1436–1445.

Hill, J.R.; Thompson, J.A.; Perkins, N.R. (1998) - Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of Merino ewes under commercial conditions: a survey. *Theriogenology.*, 49: 697-709.

Holt, W.V.; Medrano, A.; Thurston, L.M.; Watson, P.F. (2005) -The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology.*, 63: 370–382.

Ijaz, A.; Hussain, A.; Aleem, M.; Yousaf, M. S.; Rehman, H. (2009) - Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology.*, 71: 1326-1329

Jang, H.Y.; Kim, Y.H.; Kim, B.W.; Park, I.C.; Cheong, H.T.; Kim, J.T.; Park, C.K.; Kong, H.S.; Lee, H.K.; Yang, B.K. (2010) - Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. *Reprod. Domest. Anim.*, 45: 943–950.

Jordana, J.; Jordana, J. (1995) – La Raza ovina Xisqueta: descripción, situación actual y perspectivas. *Avances en alimentación y mejora animal.*, 35(2): 11-18.

Karagiannidis, A.; Varsakelis, Alexopoloulos, C.; Amarantidis, I. (2000) - Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *Small Rum Res.*, 37: 125-130.

Kaya, A.; Baspinar, N.; Yildiz, C.; Kurtoglu, F.; Ataman, M.B.; Haliloglu, S. (2000) - Influence of melatonin implantation on sperm quality, biochemical composition of the seminal plasma and plasma testosterone levels in rams. *Rev Med Vet.*, 151: 1143–1146.

Kaya, A.; Aksoy, M.; Baspönar, N.; Yöldöz, C.; Ataman, N.B. (2001) - Effect of Melatonin Implantation to Sperm Donor Rams on Post-thaw Viability and Acrosomal Integrity of Sperm Cells in the Breeding and Non-breeding Season. *Reprod Dom Anim.*, 36: 211-215.

Khalifa, T.; Lymberopoulos, A.; EL-Saidy, A. (2006) - Testing usability of butylated hydroxytoluene in conservation of goat semen. *Reprod. Domest. Anim.*, 43: 525-530.

Khalifa, T. A. A.; Lymberopoulos, A. G.; El-Saidy, B.E. (2008) - Testing usability of butylated hydroxytoluene in conservation of goat semen. *Reprod. Domest. Anim.*, 43: 525-530.

Killian,G.; Honadel, T.; McNutt, T.; Henault, M.; Wegner, C.; Dunlap, D. (1989) - Evaluation of butylated hydroxytoluene as a cryopreservative added to whole or skim milk diluent for bull semen. *J. Dairy Sci.*, 72: 1291-1295.

Killian, G.J.; Chapman, D.A.; Rogowski, L.A. (1993) - Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod.*, 49: 1202–1207.

Langford, G.A.; Ainsworthl, C.; Marcus, G.J.; Shrestha, J.N.B. (1987) - Photoperiod entrainment of testosterone, luteinizing hormone, folliclestimulating hormone and prolactine cyclesin rams in relation to testis size and semen quality. *Biol Reprod.*, 37: 489-499.

Leboeuf, B.; Restall, B. Salamon, S. (2000) - Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science.*, 62: 113–141.

Lincoln, G.A. (1989) - Seasonal aspects of testicular function. In: Burguer H. Krester D (eds). *The testis*. New York, pp: 329-385.

Lymberopoulos, A.G.; Tsakmakidis, I.A.; Khalifa, T.A.A. (2010) - Effect of ram age on structural and functional competence of frozen-thawed spermatozoa in dairy sheep. *Reprod Dom Anim.*, 45: 572-578.

Marco-Jiménez, F.; Puchades, S.; Rodríguez, M.; Vicente, J.S. (2003) – Estudio de la influencia de la estacionalidad sobre la calidad seminal de moruecos de la raza Guirra. Producción ovina y caprina. Nº XXVIII-SEOC. Badajoz, España. pp: 188-190.

Marinov, P.; Dacheva, D. (1984) - Individual variation of ram semen freezability and its correlation to K, Na and citric acid levels in seminal plasma. 10th I.C.A.R.. Illionis, 3: 385-388.

Maroto-Morales, A. (2012) - Evaluación objetiva de la morfometría de los espermatozoides de ovino (*Ovis aries*). Relacionados con la fertilidad. Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Castilla-La Mancha. España.

Martí, J.I.; Aparicio, I.M.; García-Herreros, M. (2011) - Head morphometric changes in cryopreserved ram spermatozoa are related to sexual maturity. *Theriogenology.*, 75: 473-481.

Martínez, R.; Vásquez, R.; Cerquera, A.; Espinosa, E. (1998) – Caracterización de la respuesta a criopreservación y evaluación por prueba de reacción acrosómica *in vitro* de la fertilidad del semen ovino. Rev. Corpica. Colombia.1:1. pp: 90-97.

Maxwell, W.M.C. (1980) - Fertility of Ram Semen Frozen in Autumn and Spring. *Proc Austr Soc Reprod Biol.*, 12: 8-15.

Maxwell, W.M.C.; Watson, P.F. (1996) - Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci.*, 42: 55-65.

Mazariengos, V.; Vazquez, J.M.; Garrido, C.; Salvador, S.; De la Fuente, D. (2010) - Influencia de la raza, época del año y ritmo de recogida sobre las características del semen fresco de ganado ovino. N° XXXV-SEOC. Valladolid, España. pp: 150-157.

Medrano, A.; Holt, W.V. (1998) - Inter-individual boar sperm susceptibility to reezingthawing protocols. *Arch Zootec.*, 47: 319–327.

Mukasa-Mugerwa, E.; Ezaz, Z. (1992) - Relationship of testicular growth and size to age, body weight and onset of puberty in Menz ram lambs. *Theriogenology.*,38: 979-988.

Ollero, M.; Pascual, M.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián, J.A.; López-Pérez, M.J. (1994) - Calidad y maduración espermática en ovino dependiente de la frecuencia de eyaculación. 7^{as}. Jornadas Internacionales de Reproducción Animal. Murcia, pp.126.

O' Meara, C.M.; Hanrahan, J.P.; Prathalingam, N.S.; Owen, J.S.; Donovan,A.; Fair, S.; Ward, F.; Wade, M.; Evans, A.C.O.; Lonergan, P. (2008) - Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology.*, 69: 513–522.

Ortavant, R.; Pelletier, J.; Ravault, J.P.; Thimonier, J.; Volland-Nail, P. (1985) - Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm mammals. *Oxford Rev Reproducción Biology.*, 7: 305-354.

Osinowo, O.A.; Ahmed, M.S.; Ekpe, G.A. (1988) - Semen quality and sperm output of Yankasa rams at different ages. *Theriogenology.*, 29: 381-386.

Palacin, I.; Abecia, J.A.; Forcada, F.; Casao, A.; Cebrián, J.A.; Muiño, T.; Palacios, C.; Pontes, J.M. (2008) - Effects of exogenous melatonin treatment on out-of-season ram fertility. *Italian Journal of Animal Science.*,7 (2): 199-206.

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

Peláez, J. (2003) - Criopreservación de semen porcino: aportaciones al estudio de la calidad seminal y la capacidad fecundante. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de la Universidad de León, España.

Pelletier, J.; Bodin, L.; Hanocq, E.; Malpoux, B.; Teyssier, J.; Thimonier, J.; Chemineau, P. (2000) - Association between expression of reproductive seasonality and alleles of the gene for Melia receptor in the ewe. *Biology of Reproduction.*, 62:1096-1101.

Peña, F.J.; Johannisson, A.; Wallgren, M.; Rodríguez-Martínez, H. (2005) - A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. *Int. J. Androl.*, 28: 107-114.

Pérez-Pé, R.; Barrios, B.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A. (2001) - Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in anaqueous two-phase system. *J Chrom B.*, 760: 113-121.

Petrunkina, A.M.; Simon, K.; Gunzel-Apel, A.R., Topfer-Petersen, E. (2004) - Requirement for an intact cytoskeleton for volume regulation in boar spermatozoa. *Reproduction.*, 127: 105-115.

Rath, D.; Niemann, H. (1997) - In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculates or frozen-thawed epididimal semen obtained from identical boars. *Theriogenology.*, 47: 785-793.

Ritar, A.J.; Mendoza, G.; Salamon, S.; White, I.G. (1992) - Frequent semen collection and sperm reserves of the male Angora goat (*Capra hircus*). *J. Reprod. Fertil.*, 95 (1): 97-102.

Roca, J.; Martínez, E.; Vázquez, J.M.; Ruiz, S.; Coy, P. (1991) - Influencia de la edad sobre los parámetros reproductivos de machos cabríos de raza Murciano-Granadina. *Archivos de Zootecnia*, 40: 173-179.

Roca, J.; Martínez, E.; Vázquez, J.M.; Coy, P. (1992) - Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area. *Animal Reproduction Science.*, 29 (3-4): 255-262.

Roca, J.; Gil, M. G.; Hernández, M.; Parrilla, I.; Vázquez, J.M.; Martínez, E. A. (2004) - Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *J. Androl.*, 25: 397-405.

Romao, R.J.; Bettencourt, E.M.V.; Bettencourt, C.M.V.; Matos, C.A.P. (2003) - Efecto del tratamiento con implantes de melatonina en fertilidad de semen congelado de carneros de las razas ovinas Merina Preta y Campanica. Nº XXVIII-SEOC. Badajoz, España. pp: 204-209.

Royère, S.; Hamamah, J.C.; Nicolle, C.; Barhelemy, J.; Lansac, J. (1988) - Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: fluorescence acridine orange staining and Feulgen-DNA cytophotometric studies. *Gamete Res.*, 21: 51-57.

Safranski, T.J.; Ford, J.J.; Rohrer, G.A.; Guthrie, H.D. (2011) - Plenary contribution to International Conference on Boar Semen Preservation. Genetic selection for freezability and its controversy with selection for performance. *Reprod Domest Anim.*, 46: 31-34.

Salamon, S.; Maxwell, W.M.C. (1995) - Frozen storage of ram semen EL Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science.*, 38: 1-36.

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

Sañudo, C.; Folch, J. y Sierra, I. (1986) - Evolución del crecimiento testicular, tasa de L H y comportamiento sexual en los corderos prepúberes Rasa Aragonesa y cruzados Romanov x Rasa Aragonesa. ITEA. Zaragoza, España. 66: 53-61.

Schanbacher, B.B.; Lunstra, D.D. (1976) - Seasonal changes in sexual activity and serum levels of LH and testosterone in Finnish Landrace and Suffolk rams. *J AnimSci.*, 43: 644-650.

Sepúlveda, N.; Risopatrón, J.; Muller, C.; Herrera, M.; Rodero, E. (2002) - Características reproductivas y seminales de carneros Romney Marsh en latitud de 38°44' sur. N° XXVII-SEOC. Valencia, España. pp: 108-1112.

Shoae, A.; Zamiri, M.J. (2008) - Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender. *Anim. Reprod.*, 104: 414-418.

Soler, C.; Gadea, B.; Soler, A.J.; Fernández-Santos, M.R.; Estesó, M.C.; Núñez, J.; Moreira, P.N.; Núñez, M.; Gutiérrez, R.; Sancho, M.; Garde, J.J. (2005) - Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red deer sperm morphometry by computerized analysis with ISAS. *Theriogenology*, 64: 1236-1243.

Succu, S.; Berlinguer, F.; Pasciu, V.; Satta, V.; Leoni, G.G.; Naitana, S. (2011) - Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *J. Pineal Res.*, 50: 310–318.

Tan, D.X.; Manchester, L.C.; Terron, M.P. (2007) - One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res.*, 42: 28–42.

Tejerina, F.; Domínguez, J.C.; González Urdiales, R.; Alegre, B.; Alegre, E.; Castejón, M.; Ferreras, A.; Cárdenas, S.; Bernal, S.; Campos, J. (2005) - Morphometric characterization

of the boar sperm head by using a Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) programme. *Reprod. Dom. Anim.*, 40: 368-369.

Tejerina, F. (2007) – Valoración mediante imágenes digitales del semen descongelado de verraco. Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de León. España. pp: 328.

Thomas, C.A.; Garner, D.L.; DeJarnette, J.M.; Marshall, C.E. (1997) - Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod.*, 56: 991-8.

Thurston, L.; Watson, P.F.; Mileham, A. J.; Holt, W. (2001) - Morphologically Distinct Sperm Subpopulations Defined by Fourier Shape Descriptors in Fresh Ejaculates Correlate With Variation in Boar Semen Quality Following Cryopreservation. *J. Andrology.*, 22: 382–394

Thurston, L.M.; Siggins, K.; Mileham, A.J.; Watson, P.F.; Holt, W.V. (2002) - Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biol Reprod.*, 66: 545–554.

Vijil, E.; Gonzalo, C.; Ruiz-Poveda, J.; Ciudad, C. (1986) - Evolución estacional del diámetro testicular en el ovino Karakul: Repercusión sobre el comportamiento copulatorio y características seminales. CENSYRA de Valdepeñas, pp: 132-149.

Waterhouse, K.E.; Hofmo, P.O.; Tverdal, A.; Miller, R.R. (2006) - Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction.*, 131: 887-894.

Watson, P. F.; Anderson, W. (1983) - Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. *J. Reprod. Fertil.*, 69: 229-235.

Watson, P.F. (2000) - The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61: 481- 492.

Webster, J.R.; Suttie, J.M.; Veenliet, B.A.; Manley, T.R.; Littlejohn, R.P. (1991) - Effect of melatonin implants on secretion of luteinizing-hormone in intact andcastrated rams. *Journal of Reproduction and Fertility.*, 92: 21-31.

Wiemer, K.E.; Ruttle, J.L. (1987) - Semen characteristics, scrotal circumference and bacterial isolates of fine wool range rams. *Theriogenology.*, 28: 625-637.

5. DISCUSIÓN GENERAL

5. DISCUSIÓN GENERAL

Durante los últimos 60 años, la yema de huevo fresca (YHF) se ha incluido de forma rutinaria en la mayoría de los protocolos de criopreservación del semen de especies domésticas y salvajes (Bogart y Mayer, 1950; Wall y Foote, 1999; Salomon y Maxwell, 2000; Manjunath y col., 2002; Bergeron y col., 2004; Lamia y col., 2004). Sin embargo, la **yema de huevo**, a pesar de ser el crioprotector no penetrante más comúnmente usado por su capacidad de estabilizar la membrana del espermatozoide (Salamon y Maxwell, 2000), contiene sustancias que pueden interferir en el metabolismo celular reduciendo la motilidad espermática (Moussa y col., 2002), que junto con la heterogeneidad de su composición entre lotes de huevos y el potencial riesgo de contaminación microbiológica, hacen que la posibilidad de utilizar otras **alternativas a la yema de huevo fresca** sea muy deseable.

Es por ello, que nos planteamos comparar la capacidad crioprotectora de la yema de huevo clarificada (YHC), la cual nos permite eliminar algunos de los componentes de la yema de huevo (por ej. gránulos) que se adhieren a la membrana y que tienen un efecto negativo en la motilidad y respiración espermática (Pace y Graham, 1974), así como la yema de huevo en polvo (YHP), en donde la contaminación bacteriana es destruida por la pasteurización y nos permite respetar las leyes establecidas para el consumo humano. Así, tras estudiar los resultados obtenidos podemos afirmar que no se aprecian grandes diferencias entre ellas en lo que respecta a la protección de los espermatozoides durante el proceso de refrigeración y congelación, al analizar la viabilidad e integridad de la membrana plasmática y acrosomal o la actividad mitocondrial tras la descongelación, así como tampoco en la cantidad movimiento espermático o en la morfometría de los espermatozoides descongelados.

De hecho, resultados similares ya habían sido reportados por Marco-Jimenez y col., (2004) al comparar yema de huevo en polvo con yema de huevo fresca en ovinos de la raza Guirra respecto a la integridad del acrosoma, con un incremento significativo en la motilidad total cuando los espermatozoides habían sido criopreservados en yema de huevo en polvo en comparación con la yema de huevo fresca. De igual manera, Wall y col.

(1999), al comparar yema de huevo clarificada con yema de huevo fresca en la criopreservación de espermatozoides de toro, tampoco observaron diferencias en la viabilidad y fertilidad espermática, a pesar de que Fernández-Santos y col., (2006) si obtuvieron una mejora en la criopreservación de espermatozoides del ciervo Ibérico al utilizar yema de huevo clarificada. Estas diferencias se pueden deber a las diferencias existentes en la composición de membrana plasmática entre especies, en el porcentaje de yema de huevo en el diluyente, en los aditivos incluidos, en el tiempo de refrigeración y/o en el método de congelación (Fernández-Santos y col., 2006; Waterhouse y col., 2006).

Por otra parte, nuestros resultados indican claramente que la eliminación del plasma seminal previa a la conservación mediante centrifugación del semen (lavado) proporciona un efecto beneficioso en la criopreservación de los espermatozoides de morueco, independientemente de la edad, tal y como se aprecia en los valores de viabilidad, integridad funcional de las membranas plasmática y acrosomal, parámetros cinéticos de velocidad, de progresión y mayor actividad mitocondrial, especialmente tras la descongelación. Sin embargo, no podemos asegurar cuál es la causa de esta mayor supervivencia, ya que podría deberse a varios motivos. Uno podría ser que la eliminación o ausencia del plasma seminal en el medio de crioconservación mejora la capacidad crioprotectora de la yema de huevo contra el shock por frío, ya descrito en diferentes especies como el conejo (Corteel, 1980; Ritar y Salamon, 1991), el macho cabrío (Aboagla y Terada 2003; Bispo y col., 2011), el cerdo (Bathgate y col., 2006) o el caballo (Martim y col., 1979). Aunque otra posible explicación podría ser que durante la técnica de separación del plasma seminal, mediante el método de la centrifugación, además de eliminar el plasma seminal, se esté eliminando una proporción de los espermatozoides dañados y muertos, con la selección de poblaciones más motiles y en algunos casos, de mayor viabilidad (Cebrián y col., 2010).

Así, con el objetivo de averiguar cuál podía haber sido el motivo de la obtención de una mejor crioconservación espermática al practicar el lavado o centrifugación del semen, en el capítulo 3 de esta tesis doctoral, nos planteamos añadir plasma seminal (13 %) en los medios de conservación de los espermatozoides lavados antes de la criopreservación,

observando que con ello no se empeoraba la capacidad crioprotectora del huevo. En otras palabras, la presencia de plasma seminal en los medios de conservación, tal y como observamos en los valores de los distintos parámetros analizados de viabilidad, integridad funcional de la membrana plasmática y motilidad de los espermatozoides obtenidos tras el proceso de refrigeración y de congelación/descongelación, no parece afectar negativamente a la supervivencia de los espermatozoides de morueco, por lo que nuestra hipótesis se decantaría hacia la posible selección de los espermatozoides ejercida durante la centrifugación del semen. No obstante, para poder afirmar con rotundidad este hecho deberíamos haber analizado antes y después del lavado del semen la calidad espermática de nuestras muestras, lo que por motivos circunstanciales del tiempo y método de trabajo no alcanzamos a realizar.

De hecho, varios autores han descrito que la adición de entre un 10 a un 40 % de plasma seminal en los medios de crioconservación aumenta la resistencia de los espermatozoides al choque de frío, reduciendo o incluso revertiendo el estado de criocapacitación (Pérez-Pé y col., 2001; Barrios y col., 2005) y mejorando la viabilidad en espermatozoides de toro (Maxwell y col., 1996), morueco (Ashworth y col., 1994; Graham 1994) y cerdo (Maxwell y col., 1998). Aunque también existen otros trabajos realizados en espermatozoides de caballos (Moore y col., 2005) o incluso también de moruecos (Morrier y col., 2003) que reportan que la inclusión de 10 y 25 % de plasma seminal no mejoraba las características del semen tras la refrigeración, así como tampoco la inclusión de un 30 % de plasma seminal aumentaba la calidad de los espermatozoides ovinos no lavados post-descongelación (Rovegno y col., 2013) o incluso existen autores que describen efectos negativos del plasma seminal sobre la motilidad (de Lamirande y Gagnon, 1984), viabilidad (García y Graham, 1987a; Kawano y col., 2003) y supervivencia espermática tras la congelación-descongelación (Watson 1981; Schmehl y col., 1986; Moore y col., 2005).

Es evidente que el papel del plasma seminal en la criopreservación es un tema controvertido debido a la compleja composición del plasma seminal, ya que, además de proteínas, existen otros componentes, como compuestos de bajo peso molecular, que podrían resultar nocivos para los espermatozoides, los cuales varían según la especie

(García y Grahan, 1987b; Catt y col., 1997). No obstante, en nuestro caso, el plasma seminal añadido no parece tener efecto, ya sea porque la cantidad añadida del 13 %, no fuera la suficiente para mostrar diferencias o por la composición del plasma seminal de nuestros machos, la cual puede verse afectada por factores ambientales, tales como la temporada de la recolección, la temperatura, la nutrición o el estrés (Pérez-Pé y col., 2001, Muiño-Blanco y col., 2008)

Siguiendo con el afán de buscar alternativas a la yema de huevo para la elaboración de medios de conservación espermática libres de crioprotectores de origen animal y de composición definida, en el segundo capítulo de esta tesis se planteó valorar la eficacia de otros crioprotectores como la lecitina de soja o el BHT, combinados con el crioprotector más frecuentemente utilizado, el glicerol, o en su lugar, la trehalosa, debido a la toxicidad descrita del primero. De esta manera, los resultados obtenidos indican que el butil hidroxitolueno (BHT) no parece ser un crioprotector adecuado ni un sustituto fiable de la yema de huevo para la conservación de espermatozoides ovinos, independientemente de estar combinado con glicerol o trehalosa, presentando los peores parámetros de calidad espermática, en términos de viabilidad, integridad funcional o resistencia osmótica de la membrana plasmática, parámetros de velocidad, progresión y dirección de la cabeza de los espermatozoides, tanto tras el proceso de refrigeración como el de la congelación y descongelación.

Resultados similares han sido reportados por Ball y col. (2001) en caballos, Graham y Hammerstedt (1992) en toros e incluso por Watson y Anderson (1983) en moruecos, donde la inclusión de BHT como crioprotector en los diluyentes de conservación no mejoró las características de los espermatozoides tras la descongelación. Sin embargo, en semen caprino, Kalifa y col. (2008) obtuvieron una mejora en la motilidad y fertilidad de los espermatozoides descongelados, cuando utilizaron 0.6mM de BHT como crioprotector, en comparación a la yema de huevo en fresco. De nuevo, estas contradicciones entre equipos de investigación podrían deberse a las diferencias en la composición de la membrana espermática en cada especie, en la concentración de BHT incluida en el diluyente, o incluso

en la composición del diluyente y tiempo de refrigeración (Watson y Anderson, 1983; Ball y col., 2001; Roca y col., 2004).

Por lo que hace referencia a los otros dos crioprotectores utilizados en el estudio, la yema de huevo en polvo y la lecitina de soja, los resultados parecen mostrar una capacidad similar entre ambos a la hora de conservar los espermatozoides ovinos, no observándose diferencias en la viabilidad, integridad funcional de la membrana plasmática y cantidad de movimiento entre los espermatozoides refrigerados, tanto combinados con glicerol como con trehalosa. No obstante, ambos crioprotectores, tanto la yema de huevo en polvo como la lecitina de soja, tuvieron un mejor efecto crioprotector cuando se complementaron con glicerol, como se aprecia en todos los parámetros cinéticos evaluados tras la refrigeración, lo que le confiere a la trehalosa un posible efecto negativo sobre la motilidad espermática (Chen y col., 1993). Además, esta tendencia, se mantuvo de manera más notable todavía tras la descongelación de las muestras, obteniéndose valores superiores de calidad seminal en los tratamientos a base de glicerol e intermedios en los diluyentes a base de trehalosa, independientemente de si se combinaban con YHP o lecitina, mientras que los peores resultados siempre se obtuvieron en los tratamientos que contenían BHT como sustituto de la YHP o de la lecitina de soja.

De igual manera, Nur y col., (2010), también en espermatozoides de morueco, observaron que los medios de crioconservación que contenían glicerol o propanodiol proporcionaban mejor motilidad post-descongelación en comparación con la trehalosa y la sacarosa, aunque sin mostrar diferencias significativas en la integridad del acrosoma o del ADN de los espermatozoides. No obstante, otros investigadores no pudieron apreciar este mayor efecto crioprotector del glicerol, obteniendo una calidad seminal después de descongelar similar para los diluyentes con trehalosa (Maura, 1995; Toniato, 2010). Estas diferencias entre autores sobre el efecto del glicerol en la crioconservación podría explicarse, en parte, a que utilizado en altas concentraciones puede llegar a tener una acción tóxica (Hammerstedt y Graham, 1992), causando un posible daño osmótico a los espermatozoides (Watson, 1995), daño que dependerá, a su vez, de las tasas de enfriamiento y congelación, de la composición del diluyente y del método de adicionar el

glicerol (Anel y col., 2003), lo que dificulta la comparación entre resultados de diferentes laboratorios. Sin embargo, a pesar de ello, el glicerol sigue siendo considerado como el crioprotector más eficaz en espermatozoides de rumiantes (Leibo y Songsasen, 2002), tal y como hemos podido corroborar en nuestro experimento.

Por otra parte, la acción crioprotectora de la lecitina de soja, tal y como sucede también en la yema de huevo, es atribuida en gran parte a la lipoproteínas de baja densidad (LDL), que se adhieren a la superficie del espermatozoide, reemplazando los fosfolípidos de la membrana que se pierden o son dañados, formando una película protectora y aumentando así la tolerancia de los espermatozoides al shock de frío durante la congelación (Moussa y col., 2002 ; Bergeron y Manjunath, 2006; Furouzanfar y col., 2010). Sin embargo, a pesar de haberse descrito esta capacidad de la soja como crioprotector de origen vegetal mejorando los parámetros de calidad seminal post-congelación en ovinos (de Paz y col., 2010; Forouzanfar y col., 2010), en búfalos (Akhter y col., 2010) y en caballos (Aurich y col., 2007), existen autores, como Del Valle y col., (2012), que indican que la inclusión de lecitina en los medios de criopreservación de espermatozoides de morueco ocasiona graves daños en la membrana de las mitocondrias, afectando la motilidad y fertilidad. En este contexto, nuestros resultados solo mostraron una cierta superioridad significativa en espermatozoides refrigerados en YHP respecto a los refrigerados con lecitina de soja, ambos combinados con glicerol, en los valores de velocidad media y de frecuencia de batido, diferencias que tras la descongelación desaparecieron, por lo que necesitaríamos poder realizar otro tipo de análisis tanto *in vitro* como *in vivo*, con especial atención a las tasas de fertilidad de nuestras dosis, para poder confirmar si ambos crioprotectores son igualmente eficaces.

Paralelamente, en este segundo capítulo de la tesis, también se pretendió comparar la eficacia de 2 sistemas tamponadores distintos, TRIS vs TEST, en la conservación de espermatozoides ovinos con diluyentes a base de yema de huevo en polvo o lecitina de soja. Así, tras el análisis de los resultados, se sugiere la utilización del sistema TRIS como tampón de elección, especialmente en la congelación, ya que en la mayoría de los parámetros obtenidos, tanto de integridad física y funcional de membranas como de

cantidad y calidad de movimiento, los valores fueron estadísticamente superiores a los obtenidos cuando se usó el sistema TEST, independientemente del crioprotector utilizado. Una posible explicación a estos resultados sería que el tampón TRIS ayuda a amortiguar mejor el proceso de deshidratación celular mediante la creación de una fuerza osmótica (Molinia y col., 1994), aumentando de este modo la estabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide, y neutralizando los ácidos generados durante el almacenamiento *in vitro* (Ijaz y col., 1989).

De hecho, tal como describen Tuli y Holtz (1992) en conejos, se observa una mayor viabilidad y motilidad total en espermatozoides criopreservados en tampón TRIS comparado con BES y TEST. De igual manera, Rasul y col., (2000) en espermatozoides descongelados de búfalo describieron un incremento de la motilidad lineal, aunque sin diferencias en la integridad de la membrana plasmática y acrosomal, al comparar el tampón TRIS con el TEST, así como una fertilidad menor de los espermatozoides de morueco congelados en tampones zwitterion que en medios a base de Tris con glucosa y yema de huevo (Salamon y Maxwell 2000).

En cuanto al análisis de los parámetros morfométricos (capítulo 2) tras el proceso de crioconservación, nuestros resultados no mostraron ningún cambio significativo en la forma de la cabeza de los espermatozoides en ninguno de los distintos tratamientos estudiados respecto a los espermatozoides frescos, ni en el primer experimento, donde se comparaban distintas combinaciones de crioprotectores, ni tampoco en el segundo donde, además de estudiar el efecto del tipo de tampón, se evaluó también la presencia o no de BHT en los diluyentes, pero en este caso, como antioxidante. Contrariamente, otros investigadores demostraron que el proceso de criopreservación produce cambios en la forma de la cabeza de los espermatozoides ovinos post-congelados (Bravo, 2010) y también en caprinos (Hidalgo y col., 2005). Estos hallazgos nos indican el distinto comportamiento que exhiben las células espermáticas de las distintas especies ante los procesos de criopreservación o ante otros factores como el tipo de crioprotector y aditivos en los diluyentes (Hidalgo y col., 2007a).

Sin embargo, en cuanto a las dimensiones de la cabeza obtenidas en el primer experimento, sí se observó una disminución de la longitud cuando los espermatozoides eran crioconservados en BHT como crioprotector, tanto en glicerol como en trehalosa respecto al fresco, así como del ancho pero solo en el caso de combinarse con glicerol. En cambio, en los espermatozoides congelados en medios a base de YHP no hubo diferencias significativas en ningún parámetro de dimensión de la cabeza, ni con glicerol ni con trehalosa, así como tampoco en los valores de longitud y ancho en aquellos conservados en medios a base de lecitina. No obstante, en el segundo experimento, las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides crioconservados se redujeron significativamente en todos tratamientos estudiados respecto a los frescos, a excepción de aquellos que fueron conservados en YHP con TRIS como sistema tampón, aunque éstos no difirieran en sus dimensiones de los conservados en el mismo medio pero en presencia del antioxidante. Modificaciones similares han sido reportados en diferentes especies (Marco-Jiménez y col., 2006; Gravance y col., 1998; Hidalgo y col., 2007b; Rubio-Guillén y col., 2007; Rijsselaere y col., 2004), con una disminución de las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides post-congelados.

Una de las causas principales de estos cambios se deben a los efectos de la adición del agente crioprotector (Hammerstedt y col., 1992), el cual sería responsable de la salida de agua del compartimento intracelular, causando la reducción del tamaño de la cabeza espermática. En el momento de la descongelación, las células con la membrana funcional integrarán agua y podrán recuperar su volumen celular, mientras que las muertas seguirán presentando un tamaño menor. De este modo, como apuntan Marco-Jiménez y col., (2006), la morfometría espermática actuaría de modo indirecto como indicador de la funcionalidad de la membrana espermática, lo que nos ayudaría a apoyar la hipótesis sobre la elección del medio a base de yema de huevo en polvo en un sistema tampón TRIS con o sin BHT como tratamiento de elección para la crioconservación de espermatozoides ovinos.

Los resultados de la utilización de BHT como aditivo antioxidante (capítulo 2) en los medios de conservación en el sistema tampón a base de TRIS se aprecia la tendencia a presentar valores superiores en todos los caracteres espermáticos evaluados cuando el

antioxidante está presente en el medio, independientemente del crioprotector empleado. Igualmente en el capítulo 3, al comparar la suplementación de los medios de conservación con diferentes concentraciones de BHT (0.6mM, 2.0mM y 5.0mM) como antioxidante, observamos que los espermatozoides lavados y conservados en yema de huevo en polvo, independientemente de estar combinados o no con plasma seminal en el diluyente de crioconservación presentan valores significativamente superiores de viabilidad y resistencia osmótica de la membrana plasmática, de actividad mitocondrial e integridad del acrosoma y de motilidad total y progresiva, así como mejores valores en los diferentes descriptores cinéticos cuando se adicionó BHT al 5 mM, siendo ésta la concentración óptima en nuestras condiciones de conservación.

Resultados similares han sido reportados por Watson y Anderson (1983) con una concentración de BHT del 4 mM, mientras que Farshal y col., (2010) obtuvieron los mejores parámetros de calidad seminal con la adicción de 2.0 y 3.0 mM de BHT, ambos en espermatozoides de morueco sin lavar, teniendo como medio de criopreservación el compuesto por el tampón Tris y yema de huevo fresco y congelados en vapores de nitrógeno. En otras especies, como en el caprino, Kalifa y col., (2008) obtuvieron una mejora en la motilidad progresiva post-congelación de los espermatozoides similar a nuestros resultados, así como en la fertilidad, cuando utilizaron 5.0 mM de BHT incluido en el diluyente, en comparación a concentraciones de 0.3, 0.6, 2.0 y 8.0mM de BHT. Otros autores consiguieron los mejores resultados de viabilidad, motilidad, integridad funcional de la membrana plasmática y menor daño en el acrosoma, con la adición de 1 y 2.0 mM de BHT en los medios de criopreservación de espermatozoides de búfalo (Ijas y col., 2009), de 0.2 y 1.6 mM de BHT en toro (Asadpour y col., 2012) o de 1.0 mM de BHT en perro (Neagu y col., 2010). En apoyo a estos anteriores resultados, un estudio llevado a cabo *in vitro* demostró que la adición de 0.4 mM de BHT al diluyente de congelación fue beneficioso para el espermatozoide de verraco, ya que aumentó la capacidad de los espermatozoides de penetrar el ovocito (Roca y col., 2004).

Estas diferencias entre especies o incluso laboratorios respecto a qué concentración de BHT es la óptima podría deberse a que el efecto potencial de BHT en la prevención de los daños oxidativos en los espermatozoides durante la criopreservación depende de

muchos factores, tales como la composición del diluyente, tasa de dilución, enfriamiento y el método concreto de congelación-descongelación (Ball y col., 2001; Roca y col., 2004; Kalifa y col., 2008), así como la composición de la membrana espermática en las distintas especies. En espermatozoides ovinos, la membrana plasmática tiene una baja relación colesterol/fosfolípidos (Darin-Bennett y White, 1977), así como un alto contenido de fosfolípidos insaturados (Watson, 2000) si la comparamos con otras especies, lo que podría explicar, al menos en parte, nuestro resultados. Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual el butil hidroxitolueno mejora la calidad espermática no es del todo conocido (Farshad y col., 2010). Hammerstedt y col., (1976) indica que el BHT es un antioxidante fenólico, que se incorpora a la membrana plasmática del espermatozoide disminuyendo la viscosidad de los lípidos de membrana, reduce los cambios de permeabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide durante el proceso de criopreservación, e igualmente previene o reduce la actividad dañina de los radicales libres, mediante la conversión de los radicales peroxil a hidroperóxidos (Aitken y Clarkson, 1987).

De hecho, cuando se comparó en el último capítulo de la presente tesis, el efecto de la edad del donante y fotoperiodo de recolecta del semen, la inclusión de BHT en los medios de conservación de espermatozoides de animales de 18 y 26 meses de edad, ya fuera durante el fotoperiodo positivo como el negativo, mejoró los valores de viabilidad y resistencia osmótica de la membrana plasmática, de actividad mitocondrial e integridad del acrosoma, así como los parámetros de velocidad, tanto tras la refrigeración como tras la congelación y descongelación. Sin embargo, cabe destacar que la inclusión de BHT como antioxidante en los diluyentes de conservación en espermatozoides de animales de 14 meses de edad y durante fotoperiodo negativo, solo mejoró los valores de los parámetros cinéticos de motilidad total, velocidad media y de progresión tras la refrigeración de los espermatozoides, así como la velocidad rectilínea, de progresión y frecuencia de batido de los espermatozoides descongelados. Una posible explicación a estos resultados podría ser que los moruecos de menor edad producen generalmente semen de peor calidad con espermatozoides posiblemente más sensibles a la acción y a la cantidad de ROS presentes, lo que hace insuficiente el presumible efecto beneficioso del BHT observado en

espermatozoides procedentes de individuos de mayor edad (Killian y col., 1989; Lymberopoulos y col., 2010).

Por otra parte, cuando se estudió la adición de melatonina (1mM) como antioxidante en los medios de conservación de espermatozoides procedentes de animales de 30 meses fuera de la época reproductiva, ésta solo mejoró ligeramente la viabilidad tras la refrigeración en el caso de espermatozoides procedentes de animales a los que se les había aplicado también implantes de meltonina. Esta ausencia de efecto de la melatonina como antioxidante en el presente trabajo es opuesta a lo descrito por otros autores como Succu y col., (2010), quienes obtuvieron una mejor viabilidad, motilidad e integridad de ADN de espermatozoides de morueco o como Ashrafi y col., (2013) en espermatozoides de toro, donde la inclusión de melatonina fue de 3mM en los diluyentes y supuso una mejora de la motilidad y viabilidad espermática post-descongelación. Estos resultados contradictorios podrían deberse a diferencias en la concentración de melatonina usada o la composición del diluyente y tiempo de refrigeración (Hardeland, 2005; Dominguez-Rebolledo y col., 2010).

De todas formas, en lo que no parece existir discrepancias es en el hecho de que la edad de los donantes es un factor determinante en la calidad del semen fresco, siendo en animales jóvenes superior conforme aumenta la edad, tal y como observamos en el último capítulo. De hecho, Folch (1984) ya reportó en ovinos de la raza Rasa Aragonesa que la concentración espermática en machos de 9 meses era entre el 50 al 75 % de la que presentan los moruecos adultos. También Martínez y col., (1998), al comparar moruecos de 3-4 años de edad respecto a los de 1 año en las razas Coriedale, Merino Rambouillet y Romney Marsh, observaron que la concentración seminal se incrementaba en un 15.78 % y la viabilidad en un 11,58 % en los animales adultos respecto a los datos obtenidos en animales jóvenes.

Esta tendencia a mejorar la calidad seminal con la edad se apreció también en el presente trabajo tras la refrigeración y criopreservación de los espermatozoides con valores superiores de viabilidad e integridad funcional de la membrana, actividad mitocondrial e integridad acrosomal en todos los tratamientos estudiados cuando los donantes eran

mayores de 18 meses de edad. Resultados similares en integridad funcional de membrana, actividad mitocondrial y estructura de cromatina compacta reportaron Lymberopoulos y col. (2010) en espermatozoides descongelados de moruecos de 4-5 años de edad al comparar con animales de 1-2 años, con un incremento de la fertilidad de más del 15% y de la prolificidad de más del 0.56%). Así mismo, Rodríguez-Almeida y col., (2008) también en espermatozoides ovinos congelados con yema de huevo al 20 % en las razas Pelibuey y Blackbelly encontraron valores superiores de reacción acrosómica (*criocapacitación*) en espermatozoides de animales jóvenes (1 año), aunque sin diferencias significativas en la viabilidad respecto a moruecos adultos.

Estos resultados se deben posiblemente a que el tamaño y el peso del parénquima testicular son parámetros altamente correlacionados con la producción y calidad seminal y también con la fertilidad. En moruecos, el volumen de los testículos aumenta paralelamente al crecimiento corporal, hasta que éste alcance el pleno estado adulto (Folch, 2000; Beltrán de Heredia, 2009; Lymberopoulos y col., 2010), por lo que moruecos de mayor edad producirían mayor cantidad y calidad de semen que los jóvenes, muchos de los cuales no habrían completado su crecimiento corporal y madurez sexual a la edad de 14 meses como se observa en nuestro resultados. De igual manera, la edad parece influir en los parámetros cinéticos analizados durante la conservación espermática. Concretamente se observó una superioridad debida a la edad en la mayoría de parámetros cinéticos de velocidad y linealidad de las trayectorias espermáticas, lo que sugiere que la edad podría favorecer la capacidad de resistencia de los espermatozoides a la criopreservación, como ya ha sido reportado en ovinos (Wiemer y Ruttle, 1987; Osinowo y col., 1988).

Desgraciadamente, el análisis del posible efecto del fotoperiodo sobre la calidad seminal inicial y post-conservación espermática es difícil de determinar en el presente trabajo, ya que no existió la posibilidad de analizar el efecto de fotoperiodos distintos con donantes de la misma edad o viceversa. No obstante, tras el análisis del semen fresco los resultados parecen indicar que el fotoperiodo, una vez alcanzada la edad de 18 meses de los donantes, no influyó excesivamente en la viabilidad, integridad acrosomal, ni concentración espermática, pero sí en la capacidad de resistencia al shock hipoosmótico. De hecho,

mientras que se observó una tendencia a presentar una mayor resistencia al shock hiposomótico de los espermatozoides frescos a medida que aumentaba la edad de los donantes, en el caso de colectar el semen durante el fotoperiodo positivo esta tendencia no solo desapareció, sino que además retrocedió. Sin embargo, cuando analizamos los resultados obtenidos tras la refrigeración, la capacidad de resistencia al shock hipoosmótico fue similar en espermatozoides procedentes de individuos de 26 meses recolectados en otoño que la registrada en espermatozoides de individuos de 30 meses recolectados en fotoperiodo positivo. De hecho, entre estos dos grupos de espermatozoides, el fotoperiodo, teniendo en cuenta la diferencia de edad de los donantes, no parece provocar grandes diferencias en los parámetros estudiados, solamente en algunos de los parámetros descriptores del movimiento como el índice de rectitud, ALH y BCF tras la refrigeración y los parámetros de velocidad tras la congelación. Así, los resultados obtenidos, donde la influencia del fotoperiodo es poca, fueron similares a los descritos en otras razas ovinas como la Leccese (D`Alessandro y col., 2001), la Churra y Assaf (Mazariego y col., 2010) y en razas caprinas como la Murciano-Granadina (Roca y col., 1992) o la Florida (Dorado y col., 2003).

En general, no se observaron diferencias significativas en la mayoría de parámetros de calidad seminal evaluados en los dos fotoperiodos y edades en estudio. Tampoco Aguado y col., (1994), en ovinos de la raza Manchega, observaron diferencias significativas en la motilidad ni integridad de las membranas acrosomal y plasmática de espermatozoides descongelados, ni D`Alessandro y col., (2003), en ovinos de la raza Leccesa, fueron capaces de encontrar diferencias en la motilidad y porcentaje de espermatozoides con acrosomas dañados, aunque sí obtuvieron los valores más altos de viabilidad en fotoperiodo negativo. Estos escasos cambios debidos al fotoperiodo encontrados en la calidad espermática de los moruecos de razas autóctonas de la península ibérica se deben a que son poco estacionales (Chagas y Silva, 1992; Jordana y Jordana 1995), como la mayoría de razas en la región mediterránea, las cuales están sujetas a un clima moderado y pequeñas diferencias entre días cortos (9 a 10 horas) y días largos (14 a 15 horas), lo que condiciona una cierta flexibilidad de la época reproductiva (Forcada y col., 2000). Sin embargo, existen estudios que indican menor capacidad fecundante del semen obtenido en primavera

que del recolectado en otoño (Colas, 1981; Guerin, 1990), aunque hay otros autores que reportan tasas de fertilidad similares, cuando se utilizó semen colectado a lo largo de todo el año (Hill y col., 1998).

Simultáneamente al análisis de las posibles diferencias ocasionadas por el efecto de la edad del donante y fotoperiodo, en este último capítulo se estudió además la posibilidad de mejorar la calidad del semen fresco, así como tras su conservación, de los donantes mediante la aplicación de implantes subcutáneos de melatonina en primavera, es decir, fuera de la época reproductiva de los pequeños rumiantes, con el objetivo de poder recolectar semen para crioconservar adecuadamente, independientemente de la época del año. Así, observamos que con la aplicación de estos implantes se mejoró la calidad inicial del semen fresco, en concreto, la concentración espermática en las dos edades testadas (18 y 30 meses de edad) y la resistencia al shock hipoosmótico sólo en espermatozoides de los animales de mayor edad. En cambio, ni el volumen de eyaculado, ni la motilidad masal, ni la integridad acrosomal, así como tampoco la morfología de las células espermáticas se vieron afectados por la aplicación de los implantes. En trabajos previos de Bravo y Roy (2003), donde se utilizaron implantes de melatonina en 12 machos de las razas Ile France y Merino Precoz, con muestreo semanal durante 4 meses en estación no reproductiva, tampoco se encontraron diferencias en volumen del eyaculado, pero sí en la concentración espermática a favor del tratamiento de melatonina. De hecho, existen varios estudios en diferentes razas donde revelan que la melatonina administrada en estación no reproductiva puede mejorar dicha calidad del semen (Chemineau y col., 1992; Garde y col., 1996; Kaya y col., 2000).

Sin embargo, en el presente trabajo, la aplicación de los implantes de melatonina no parece mejorar la calidad espermática del semen una vez refrigerado o descongelado de machos de 18 y 30 meses de edad. De la misma manera, Romao y col., (2003) en moruecos de la razas Merina Preta y Campanica a los 66 días después del implante de melatonina tras evaluar el semen descongelado no observaron ninguna diferencia en los parámetros de calidad seminal, así como tampoco influyó en la tasa de fertilidad, cuando se compararon espermatozoides de animales tratados con no tratados en las dos razas, mientras que Casao

y col., (2007) y Kaya y col., (2000) en moruecos de diferentes razas, la aplicación del implante de melatonina mejoró la motilidad e integridad acrosomal tras la descongelación. De nuevo, estos resultados tan dispares, probablemente se deban a que la mayoría de razas mediterráneas son poco estacionales (Pelletier y col., 2000; Forcada y col., 2000; Azcona y col., 2001). Por esta razón la mayoría de tratamientos con implantes de melatonina en fotoperiodo positivo no alteran significativamente la calidad del semen en estas localizaciones geográficas. En cambio, en latitudes más elevadas, tratando los donantes con melatonina ha sido posible mejorar la calidad del semen descongelado (Fiser y Barra, 1984, Fiser y Fairfull, 1983, 1986, Zheltobryuk y col., 1990, citados por Salamon y Maxwell, 1995; Kaya y col., 2001), su fertilidad y prolificidad (Palacín y col., 2008).

Finalmente, al analizar la calidad del semen fresco de cada uno de nuestros donantes a la edad aproximada de 2 años observamos que no existía diferencias significativas en los parámetros evaluados entre los moruecos de la raza Xisqueta y de la Aranesa, teniendo en cuenta que tan solo contábamos con 4 individuos de cada raza. Por otra parte, encontramos ligeras variaciones individuales, independientemente de la raza, en el volumen eyaculado y concentración seminal. Mayores fueron las diferencias entre individuos respecto al porcentaje de anomalías espermáticas, pero ninguna diferencia significativa se pudo detectar en cuanto a la motilidad masal, viabilidad, integridad acrosomal y capacidad de resistencia al shock hiposomótico. Referente a este posible efecto individual ejercido por el donante, ya Garde, (1993) y Aguado y col., (1998) en ovinos e incluso por Barrio y col., (1995) en moruecos de la raza Gallega fueron capaces de describir diferencias individuales en el volumen, morfología espermática y concentración seminal, y, a diferencia de nuestros resultados, también en viabilidad, integridad funcional de sus membranas tras la prueba de HOST, producción espermática e integridad acrosomal. Estas variaciones existentes entre machos en relación a las características seminales puede atribuirse a variaciones individuales en el desarrollo y funcionalidad del testículo, así como su endocrinología (Beltrán de Heredia, 2009) puesto que la producción y calidad seminal está estrechamente relacionado con el tamaño testicular, o más concretamente con el peso testicular que ha sido ampliamente documentada en pequeños rumiantes (Vijil y col., 1986; Lincoln, 1989; Ritar y col., 1992; Delgadillo y col., 1995). No obstante, es preciso destacar que el número

de sementales que nosotros disponíamos para realizar este estudio era claramente insuficiente para poder obtener rotundas conclusiones.

Sin embargo, la susceptibilidad de los espermatozoides a la crioconservación no fue igual para todos nuestros moruecos, debido a que los espermatozoides de algunos de los donantes sobrevivieron mejor al proceso de la congelación-descongelación con menos daño que otros, independientemente de la calidad inicial, tal y como ha sido reportado en moruecos (Evan, 1991; Thurston y col., 2001), en caballos (Amann y Pickett, 1987), en cerdos (Holt y col., 2005) o en toros (Eyestone y First, 1989).

En el presente trabajo y basándose en las diferencias de calidad seminal después de la descongelación de los espermatozoides, los moruecos han sido clasificados como “buenos congeladores”, caracterizándose por presentar valores superiores en los parámetros de viabilidad e integridad de las membranas plasmática y acrosomal, actividad mitocondrial, parámetros cinéticos de velocidad, de progresión, dirección de la cabeza, “regulares congeladores”, con valores medios en dichos parámetros de calidad seminal, y por último “malos congeladores”, con los valores más bajos de calidad seminal observados. Sin embargo, muchos más estudios, con especial atención al análisis de fertilidad *in vivo* e *in vitro*, así como con un mayor número de individuos testados, deberían llevarse a cabo para poder confirmar la existencia de estas tres supuestas categorías de machos donantes.

De todas maneras, estas posibles diferencias en la congelabilidad entre machos podría deberse a una defectuosa espermatogénesis o fallas en la maduración en el epidídimo, principalmente en machos malos congeladores (Calvin y Bedford, 1971). Esto llevaría a la aparición de diferencias entre eyaculados de malos congeladores y buenos congeladores en parámetros como la longitud de las cadenas de ácidos grasos poli-insaturados de la membrana citoplasmática o los niveles de colesterol de dicha membrana (Waterhouse y col., 2006). Otra causa podría ser diferencias en los niveles intracelulares de proteínas de importancia en la resistencia ambiental del espermatozoide (Holt y col., 2005; Hernández y col., 2007). En este sentido, se ha reportado en verracos una mayor presencia

de la proteína HSP90 en el semen de buenos congeladores cuando se comparan con los malos congeladores (Casas y col., 2010). De esta forma, los buenos congeladores tendrán una mayor protección contra el enfriamiento y choque osmótico producidos durante la congelación-descongelación. Varios estudios indican que la variabilidad en la congelación de eyaculados está relacionada con la línea genética de la que proceden los verracos (Thurston y col., 2001), si bien la heredabilidad genética para esta característica de congelabilidad es baja (Safranski y col., 2011). También en toros, Killian y col. (1993) encontraron una asociación entre los buenos congeladores y malos congeladores y la composición de sus proteínas del plasma seminal. En ese estudio, se observó como dos proteínas (26 kDa/6'2 pI y 55 kDa/4,5 pI) predominaban en los buenos congeladores, mientras que otras dos proteínas (16 kDa/4'1 pI y 16 kDa/6'7 pI) prevalecían en los malos congeladores. En moruecos, la presencia de proteínas RSVP14 y RSVP20 en el plasma seminal parece afectar también la calidad del semen tras la criopreservación (Barrios y col., 2005).

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La yema de huevo en polvo puede utilizarse de forma satisfactoria en la refrigeración y congelación de espermatozoides ovinos, substituyendo el uso tradicional de la yema de huevo fresco y aportando una mayor homogeneidad y seguridad sanitaria en la elaboración de los diluyentes de conservación, independientemente de la edad del donante (1 vs 2 años), mientras que la adición de yema de huevo clarificada no supone una ventaja en la supervivencia tras la conservación.
2. La eliminación del plasma seminal mediante centrifugación previa a la conservación del semen ovino mejora la calidad de los espermatozoides tras el proceso de refrigeración y congelación-descongelación. Esta mejora parece no deberse a la ausencia del plasma seminal, ya que la suplementación con un 13 % de plasma seminal en los medios de crioconservación de los espermatozoides lavados no tuvo efecto en los parámetros de calidad seminal.
3. La yema de huevo en polvo y la lecitina de soja muestran una similar capacidad crioprotectora, tanto en la refrigeración y como en la crioconservación espermática, siendo esta capacidad mayor cuando se complementan con glicerol en un sistema tampón TRIS que respecto al uso de la trehalosa y/o TEST.
4. La inclusión del butil hidroxitolueno (0.6 mM) como crioprotector en sustitución a la yema de huevo fresco convencional no es adecuada para la criopreservación de espermatozoides de morueco, ya que tanto junto al glicerol como a la trehalosa, se obtuvieron los valores más bajos en todos los parámetros de calidad seminal evaluados tras la refrigeración y descongelación.
5. Se recomienda la suplementación con butil hidroxitolueno como antioxidante en los medios de conservación, ya que mejora la calidad seminal tras la conservación,

independientemente del crioprotector utilizado, edad del donante/fotoperiodo o de la presencia o no de plasma seminal en el diluyente, especialmente en el caso de usar el sistema tampón TRIS y siendo la concentración óptima de 5.0 mM.

6. La adición de melatonina como antioxidante a una concentración de 1mM en el medio de congelación no mejora la calidad seminal tras la conservación del semen de animales de 30 meses de edad durante el fotoperiodo positivo, aunque mejora ligeramente la resistencia osmótica de los espermatozoides descongelados sometidos de nuevo a un shock hiposmótico.
7. La aplicación de implantes subcutáneos de melatonina en nuestros machos durante la primavera mejoró la concentración espermática y la resistencia al shock hiposmótico del semen fresco procedente de donantes de 18 y 30 meses de edad, aunque no mejoró la calidad espermática de los espermatozoides una vez refrigerados o descongelados.
8. Los moruecos de 26 meses de edad presentan una mejor calidad seminal inicial en cuanto a una mayor concentración y resistencia al shock osmótico que animales más jóvenes. Asimismo, los machos de 18 meses de edad presentan mejor calidad inicial del semen fresco, refrigerado y descongelado que los animales de 14 meses de edad. No obstante, la supuesta inferioridad de los espermatozoides procedentes de donantes más jóvenes, en concreto de 18 meses, respecto a la de los 26 meses puede ser fácilmente contrarrestada con la adición de BHT en los medios de conservación, mejorando sustancialmente la calidad de los espermatozoides refrigerados o incluso descongelados, en fotoperiodo positivo.
9. La susceptibilidad de los espermatozoides a la congelación-descongelación de manera individualizada no fue igual para todo los moruecos, lo que parece mostrar la existencia de individuos malos congeladores, buenos congeladores y también machos “regulares” congeladores, aunque muchos más estudios, con especial atención al análisis de fertilidad *in vivo* e *in vitro*, así como con un mayor número

de individuos testados, deberían llevarse a cabo para poder confirmar la existencia de estas tres supuestas categorías de machos donantes.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Abd Elhakeam, A.A. (2001) - Studies on preservation of goat semen: A cold dilution method for improving storageability. Proceedings of the Egyptian Society of Animal Reproduction and Fertility, 13th Annual Congress, Giza, Egypt, 147–157.

Abecia, J.A.; Valares, J.A.; Forcada, F.; Palacín, I.; Martin, S.; Martino, A. (2007) - The effect of melatonin on the reproductive performance of three sheep breeds in Spain. *Small Ruminant Research*, 69: 10- 16.

Abecia, J.A.; Forcada, F.; Casao, A.; Palacín, I. (2008) - Effect of exogenous melatonin on the ovary, the embryo and the establishment of pregnancy in ewes. *Animal.*, 2: 399-404.

Aboagla, E.M.E.; Terada, T. (2003) - Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol Reprod.*, 69(4): 1245-1250.

Aboagla E.M.E.; Terada T. (2004) - Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology.*, 62(6): 1160-1172.

Agarwal, A.; Saleh, R.A.; Bedaiwy, M.A.(2003) - Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.*, 79: 829-843.

Aguado, M.J.; Garde, J.; Perez-Guzman, M.D.; Montoro, V.; Vázquez, I. (1994) - Variaciones estacionales de la crioresistencia del semen de morueco Manchego. Producción ovina y caprina. N° XIX-SEOC. Burgos, España. pp: 507-509

Aguado, M.J.; Garcia-Cervigon, M.; Manso, A.; Perez-Guzman, M.D.; Garde, J.; Montoro, V. (1998) – Estudio preliminar del poder fecundante del semen de ovino manchego. N° XXIII-SEOC. pp: 521-524.

Aires, V.A.; Hinsch, K.D.; Mueller-Schloesser, F.; Bogner, K.; Mueller-Schloesser, S.; Hinsch, E. (2003) - In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology.*, 60: 269–279.

Aisen, E.G.; Medina, V.H.; Venturino, A. (2002) - Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trealose concentrations. *Theriogenology.*, 57: 1801-1808.

Aisen, E. G.; Veturino, A. (2004) – Recolección y evaluación del semen. En Reproduccion ovina y caprina. Ed. Aisen, E. Inter-Medica. Buenos Aires, argentina. pp. 55-69.

Aisen, E.; Quintana, M.; Medina, V.; Morello, H.; Venturino, A. (2005) - Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology.*, 50: 239–249

Aitken, R.J.; Clarkson, J.S. (1987) - Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 81: 459–469.

Aitken, R.J.; Clarkson, J.S. (1988) - Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl.*, 9: 367-376.

Aitken, R.J.; Harkiss, D.; Buckingham, D. (1993) - Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J Reprod Fertil.* 98: 257–65.

Aitken, R. J. (1995) - Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7:659-668.

Akhter, S.; Ansari, M.S.; Rakha, B.A.; Andrabi, S.M.; Iqbal, S.; Ullah, N. (2010) - Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell® extender. *Theriogenology.*, 74: 951–955.

Alcaide, V.; Manso, A.; Moyano, J.C.; García-Cervigón, M.; Palomares, M.D.; Montoro, V. (2001) – Influencia de los implantes de melatonina sobre la calidad seminal en los moruecos del esquema de selección de la raza ovina Manchega. Producción ovina y caprina. N° XXVI-SEOC. Sevilla, España. pp: 959-963.

Alghamdi, A.S.; Foster, D.N.; Troedsson, M.H.T.(2004) - Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils and improves fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. *Reproduction.*, 127: 593–600.

Ali, A.B.T.; Bomboi, G.; Floris, B. (2013) - Replacing chicken yolk with yolks from other sources in ram semen diluents and their effects on fertility *in vitro*. *Small Ruminant Research.*, 113: 405–410.

Almlid, T. y Johnson, L.A. (1988) - Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J AnimSci.*, 66: 2899-2905.

Alonso de Miguel, M.; Cognié, Y. (1980) - Variaciones de la actividad sexual de la oveja «Rasa Aragonesa» durante el período del anoestro estacionario. Efecto de la edad, de las condiciones climáticas y, de la presencia de machos. IX Congreso Intern. de Reprod. Anim. e IA, Madrid, 16-20 de junio, Vol. IV: 387-392

Alvarez, J.G.; Storey, B.T. (1982) - Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biology of Reproduction.*, 1102-1108.

Alvarez, J.G.; Storey, B.T. (1984) - Assessment of cell damage caused by spontaneous lipid peroxidation in rabbit spermatozoa. *Biology of Reproduction.*, 30: 323-331.

Alvarez, J. G.; Touchstone, J.C.; Blasco, L.; Storey, B.T. (1987) - Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: Superoxide dismutase as a major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.* 23: 338-348.

Alvarez, J.G.; Storey, B.T.(1992) - Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl.*, 13: 232-241.

Álvarez, M.; Kaabi, M.; Boixo, J.C.; Anel, E.; Chamorro, C.A.; Martínez, S.; Anel, L. (2000) - Características seminales de las razas ovinas Churra y Assaf. SEOC, Teruel, España. pp: 567-569.

Amann, R.P.; Hammerstedt, R.H. (1980) - Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biol. Reprod.*, 23: 647-656.

Amann, R.P.; Pickett, B.W. (1987) - Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science.*, 7: 145-176.

Anderson, S.W.; Harkness, Y.; Akin, M.; Kaproth, G. (1994) - Categorical data analysis of the effect on bull fertility of butylated hydroxytoluene addition to semen extenders prior to freezing. *J. Dairy. Sci.*, 77: 2302-2307.

Anel, L.; de Paz, P.; Álvarez, M.; Chamorro, C.A.; Boixo, J.C.; Manso, A.; González, M.; Kaabi, M.; Anel, E.; (2003) - Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology.*, 60: 1293-1308.

Anel, L.; Kaabi, M.; Abroug, B.; Alvarez, M.; Anel, E.; Boixo, J. (2005) - Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology*, 63: 1235–1247

Anel, L.; Alvarez, M.; Martinez-Pastor, F.; Garcia-Macias, V.; Anel, E.; de Paz, P. (2006) - Improvement Strategies in Ovine Artificial Insemination. *Reprod Dom Anim.*, 41 (Suppl. 2), 30–42.

Anger, J.; Ronot, X.; Dadoune, J.P. (1989) - Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. *J. Androl.*, 10: 439- 448.

Anton, M.; Martinet, V.; Dalgalarrrondo, M.; Beaumal, V.; David-Briand, E.; Rabesona, A, H. (2003) - Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chem.*, 83: 175–183.

Asadpour, R.; Tayefi-Nasrabadi, H. (2012) - The effect of butylated hydroxytoluene (BHT) on bull spermatozoa frozen in two different extenders. *Comp Clin Pathol.* 21: 577–581.

Ashraf, I.; Kohram, H.; Ardabili, F. (2013) - Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science.*, 139: 25– 30.

Ashworth, P.J.C.; Harrison, R.A.P.; Miller, N.G.A.; Plummer, J.M.; Watson, P.F. (1994) - Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reprod Fertil Dev.*, 173-180.

Aurich, C.; Seeber, P.; Müller-Schlösser, F. (2007) - Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5 degrees. *Reprod Domest Anim.*, 42(4): 445–448.

Avdi, M.; Banos, G.; Stefos, K.; Chemineau, P. (2004) - Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of chios and serres rams. *theriogenology*, 62: 275- 282.

Avellanet, R.; Arangune-Méndez, J.A.; Jordana, J. (2005) – La raza ovina Xisqueta en España: Caracterización estructural de las explotaciones. Boletín de información sobre Recursos Genéticos Animales., 37: 21-30.

Awad, H.; Halawa, F.; Mostafa, T.; Atta, H. (2006) - Melatonin hormone profile in infertile males. *J. Androl.*, 29: 409–413.

Axner, E.; Linde Forsberg, C. (2007) - Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility: a retrospective study. *Reprod Domest Anim.*, 42: 282- 91.

Azcona, V.A.; González, A.M.; Jurado, J.C.M.; García-Cervigón, M.; Pasamontes, M.D.P.; Ángulo, V.M. (2001) - influencia de los implantes de melatonina sobre la calidad seminal en los moruecos del esquema de selección de la raza ovina manchega. Nº XXVI-SEOC, Sevilla, España. pp: 997-982.

Babiak, I.; Glogowski, J.; Luczynski, M.J.; Luczynski, M.; Demianowicz, W. (1999) - The effect of egg yolk, lowdensity lipoproteins, methylxanthines and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of northern pike (*Esox lucius*) spermatozoa. *Theriogenology.*, 52: 473–479.

Bains, H.K.; Pabst, M.A.; Bawa, S.R. (1993) - Changes in the lecithin binding sites of the testicular, epididymal, vas, and ejaculated spermatozoon surface of dog. *Andrologia.*, 25: 19-24.

Ball, B. A.; Medina, V.; Gravance, C.G.; Bumber, J. (2001) - Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology.*, 56: 577-589.

Barbas y Mascarenhas. (2009) - Cryopreservation of domestic animal sperm cells *Cell Tissue Bank*. 10: 49–62.

Barrio, F.; Peña, A.I.; Quíntela, L.A.; Herradóm, P.G. (1995) - Influencia del factor individual sobre las características espermáticas de la raza ovina Gallega. *Producción ovina y caprina*. Nº XX-SEOC. Madrid, España.127-130.

Barrios, B.; Pérez-Pé, R.; Gallego, M.; Tato, A.; Osada, J.; Muino-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A. (2000) - Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod.*, 1531-1537.

Barrios, B.; Fernandez-Juan, M.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A. (2005) - Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *J Androl.*, 26: 539-549.

Bathgate, R., Maxwell, W.M.; Evans, G. (2006) - Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals.*, 41: 68-73.

Baumber, J.; Ball, B.A.; Gravance, C.; Medina, V.; Davies-Morel, M. (2000) -The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J Androl.*, 21: 895-902.

Baumber, J.; Ball, B.A.; Linfor, J.J.; Meyers, S.A. (2002) - Reactive oxygen species and cryopreservation promote deoxyribonucleic acid (DNA) damage in equine sperm. *Theriogenology* 58: 301-302.

Baumber, J.; Ball, B.A.; Linfor, J.J.; Meyers, S.A. (2003) - Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl.*, 24: 621-628.

Beletti, M.E.; Costa, F.; Viana, M.P. (2005) - A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. *Anim. Reprod. Sci.*, 85: 105-116.

Beltrán de Heredia, I. (1995) – Estudio de la producción y calidad del semen de moruecos de la raza Latxa. Resultados obtenidos con distintas técnicas de congelación e inseminación (Tesis). 326

Beltrán de Heredia, I. (2009) – Reproducción y control reproductivo en el macho. En Ovinotecnia (Produccion y Economia de la Especie). Eds: Sañudo, C.; Cepero Briz, R. Prensas Universitarias de Zaragoza. Zaragoza, España. pp: 105-114.

Bellvé, A.R.; O'Brien, D.A. (1983) - The mammalian spermatozoon: structure and temporal assembly. In: Mechanism and control of animal fertilization. Ed JF Hartman. Academic Press, 55-137.

Bergeron, A.; Crete, M.; Brindle, Y.; Manjunath, P. (2004) - Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod.*, 70: 708–717.

Bergeron, A.; Villemuere, M.; Lazure, C.; Manjunath, P. (2005) - Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol Reprod Dev.*, 71: 461–470.

Bergeron, A.; Manjunath, P. (2006) - Newinsights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol. Reprod. Dev.*, 73: 1338–1344.

Bilodeau, J.F.; Blanchette, S.; Gagnon, C.; Sirard, M.A. (2001) - Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology.*, 56: 275-286.

Bilodeau, J.F.; Blanchette, S.; Cormier, N.; Sirard, M.A. (2002) - Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: Protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology.*, 57: 1105-1122.

Bispo, C.A.S.; Pugliesi, G.; Galvão, P.; Rodrigues, M.T.; Ker, P.; Filgueiras, B. (2011) - Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 100: 54– 58.

Bittman, E.L.; Kaynard, A.H.; Olster, D.H.; Robinson, J.E.; Yellon, S.M.; Karsch, F.J. (1985) - Pineal melatonin mediates photoperiodic control of pulsatile luteinizing-hormone secretion in the ewe. *Neuroendocrinology.*, 40: 409-418

Blanco, O.M. (1998) - Análisis objetivo de la motilidad espermática: evaluación de los espermatozoides de verraco y su relación con la fertilidad. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria de Murcia, España.

Blobel, C.P. (2000) - Functional processing of fertilin: evidence for a critical role of proteolysis in sperm maturation and activation. *Rev Reprod.*, 5: 75-83.

Boland, M.P.; Al-Kamali, A.A.; Crosby, T.F.; Haynes, N.B.; Howles, C.M. (1985) - The influence of breed, season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido and plasma hormone concentration in rams. *Anim Reprod Sci.*, 9: 241-252

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

Boyers, S.P.; Davis R.; Katz D.F. (1989) - Automated semen analysis. *Curr. Probl. Obstet. Gynecol. Fertil.*, 12: 172-200.

Bravo, J.A.; Roy, T.J. (2003) - Influencia de los implantes de melatonina sobre las características espermáticas y actividad sexual del morueco en estación no sexual. N° XXVIII-SEOC. Badajoz, España. pp: 152-159.

Bravo, J. (2010) - Estudio de la influencia de la estación sobre los parámetros seminales y morfométricos del espermatozoide del morueco de la raza Ile de France. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura, España.

Bucak, M. N.; Atessahin, A.; Varışlı, O.; Yüce, A.; Tekin, N.; Akçay, A. (2007) - The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. *Theriogenology*, 67: 1060–1067.

Bucak, M.N.; Atessahin, A.; Yüce, A. (2008) - Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. *Small Ruminant Research*, 75: 128–134

Bucak, M.N.; Sarıozkan, S.; Tuncer, P.B.; Uluta, P.A.; Akçadag. (2009) - Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 81: 90–95.

Buendía, P.; Soler, C.; Paolicchi, F.; Gago, G.; Urquieta, B.; Pérez-Sánchez, F.; Bustos-Obregón, E. (2002) - Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using Sperm-Class Analyzer computer-assisted system. *Theriogenology*, 57: 1207-1218.

Buffoni, A. (2013) - Efecto de los implantes de melatonina sobre los rendimientos en la obtención de embriones in vivo, la calidad seminal y la actividad reproductiva de ovinos en la región patagónica argentina. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, España. 163.

Bwanga, C.O.; De Braganca, M.M.; Einarsson, S.; Rodríguez-Martínez, H. (1990) - Cryopreservation of boar semen in mini- and maxi- straws. *J. Vet. Med. A.*, 37: 65-658.

Caballero, I.; Vázquez, J.M.; Centurión, F.; Rodríguez-Martínez, H.; Parrilla, I.; Cuello, C.; Martínez, E.A. (2004) - Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 39: 370-75.

Cabrera, F.; González, F.; Batista, M.; Forga, J.; Calero, P.; Gracia, A. (1998) - Influencia de la edad y los factores ambientales sobre la producción seminal del macho de la agrupación caprina canaria (variedad Majorera) a lo largo del todo el año. En: Producción Ovina y Caprina. XXIII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. pp: 525-528

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 Dom Anim.*, 40: 191–195.

Calvin, H.I.; Bedford, J.M. (1971) - Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil*, 13: 65–75.

Cárdenas, R.N.; Pedraza, C.J. (2006) - Especies reactivas de oxígeno y sistema antioxidante: aspectos básicos. *Educación química*. 17: 164-165.

Casao, A.; Vega, S.; Pérez-Pe, R.; Cebrián-Pérez, J.A.; Muiño-Blanco, T.; Abecia., J.A.; Forcada, F.; Palacín, I. (2007) - Efecto de los implantes de melatonina en la motilidad del semen de morueco de raza aragonesa en época de anestro. ITEA, Zaragoza, España. pp:6-8.

Casao, A.; Cebrian, I.; Asumpcao, M.E.; Perez-pe, R.; Abecia, J.A.; Focada, F.; Cebrian-Perez, J.A.; Muiño-Blanco, T. (2010a) - Seasonal variations of melatonin in ram seminal

plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reproductive Biology and Endocrinology.*, 8: 1477-1485.

Casao, A.; Mendoza, N.; Perez-pe, R.; Grasa, P.; Abecia, J.A.; Focada, F.; Cebrian-Perez, J.A.; Muiño-Blanco, T. (2010b) – Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *Journal of Pineal Research*, Vol.48, No.1, (Jan),39- 46: 3742-3098

Casas, I.; Sancho, S.; Ballester, J.; Briz, M.; Pinart, E.; Bussalleu, E. (2010) - The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. *Theriogenology.*, 74: 940–950.

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. Dom. Anim.* 32: 251-258.

Cebrián, J.; Muiño-Blanco, T.; Pérez-Pé, R.; Casao, A. (2010) – Manejo y conservación del semen. En: Manejo reproductivo en ganado ovino. Cordinadores: Abecia, A; Focada, F. Edt.Servet. Zaragoza, España. pp: 127-135.

Chagas, J; Silva, J.N. (1992) - Inseminación artificial en ovinos. Editorial. S.P.O.C., 3 (1): 61-80

Chatterjee, S.; Gagnon, C. (2001) - Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev.*, 59: 451-458.

Chemineau, P. (1986) - Sexual behaviour and gonadal activity during the year in the tropical Creole meat goat. 2. Male mating behaviour, testis diameter, ejaculate characteristics and fertility. *Reprod. Nutr. Develop.*, 26: 453-460.

Chemineau, P.; Malpoux, B.; Pelletier, J.; Leboeru, B.; Deletang, F.; Pobel, P.; Brice, G. (1988) - Emploi des implants de mélatonine et des traitements photoperiodiques pour maîtriser la reproduction chez les ovins et les caprins. *INRA Prod. Anim.*, 91 (1): 45-60

Chemineau, P. (1992) - Medio ambiente y reproducción animal. In: Conferencia de clausura de las VI Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, Salamanca, España.

Chemineau, P.; Daveau, A.; Maurice, F.; Delgadillo, F.A. (1992) - Seasonality of estrus and ovulation in not modified by subjecting female alpine goats to a tropical photoperiod. *Small Rumin.*, 8: 299–312.

Chen, Y.; Foote, R.H.; Brockett, C.C. (1993) - Effect of source, trehalose, hypotaurine, taurine and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology.*, 30: 423–431.

Cheryl, A.T.; Garner, D.L.; Dejarnette, J.M.; Clifton, E.M. (1997) – Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 56: 991-998.

Choe, C.Y.; Kim, J.G.; Cho, S.R.; Son, D.S.; Kim, Y.K.; Balasubramanian, S.; Choe, S.Y.; Rho, G.J.; (2006) - Influence of Seasons, Extenders, Slow and Rapid Freezing on Seminal Characters in Korean Native Bucks. *Reprod Dom Anim.*, 41: 55–60.

Christensen, P.; Stenvang, J.P.; Godfrey, W. (2004) - A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian semen. *J. Androl.*, 25 (2): 255-64.

Coetzee, K.; Kruger, T.F.; Lombard, C.J. (1999) - Repeatability and variance analysis on multiple computer assisted (IVOS) sperm morphology readings. *Andrologia*, 31: 163-168.

Coetzee, K.; Menkveld, R. (2001b) - Validation of a new disposable counting chamber. *Arch. Androl.*, 47: 153-156.

Colas, G.; Zinsner, F. (1975) – Production spermatique et croissance testiculaire chez l'agneau de race Ile de France et Prealpes. Journées de Recherche Ovine et Caprine en France. Paris. Ed. ITOVIC (Paris).

Colas, G. (1980) - Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le belier Ile-de-France. 1. Etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. *Reprod. Nutr. Develop.*, 20(6): 1789-1799.

Colas, G. (1981) - Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier île-de-France. ii. Fécondance: relation avec les enteres qualitatifs observés *in vitro*. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 21(3): 399-407.

Colas, G., Guerin, Y.; Lemaire, Y.; Montassier, Y.; Despierres, J. (1986) - Seasonal variations in the testicular diameter and sperm morphology of Vendean and Texel rams. *Reproduction Nutrition Development.*, 26: 863-875.

Cooper, T.G. (1986) - The epididymis, sperm maturation and fertilisation. Springer verlag, Heidelberg, Alemania.

Cormier, N.; Sirard, M.A.; Bailey, J.L. (1997) - Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J. Androl.*, 18: 461-468.

Corteel, J.M, (1980) - Effets du plasma séminal sur la survie et la fertilité des spermatozoides conservés *in vitro*. *Reprod Nutr Develop.*, 20: 1111–1123.

Corteel, J.M. (1981) - Goat Production: Collection, Processing and Artificial Insemination of Goat semen. Ed. Academic Press, London, 171-191

Dacheux, J.L.; Pisselet, C.; Blanc, M.R.; Hochereau-de Reviers, M.T.; Courot, M. (1981) - Seasonal variations in rete testis fluid secretion and sperm production in different breeds of ram. *J. Reprod Fert.*, 61: 363-371.

D'Alessandro, A.G.; Colonna, M.A.; Bellitti, A.; Martemucci, G. (2001) - Variazioni durante l'anno delle caratteristiche quantitative e qualitative del seme in arieti di razza Leccese (Variations during the year in quantitative and qualitative semen characteristics in Leccese rams). *Zoot. Nutr. Anim.*, 27: 221–230.

D'Alessandro, A.G.; Martemucci, G. (2003) - Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. *Animal Reproduction Science.*, 79: 93–102.

Dalimata, A.M.; Graham, J.K. (1997) - Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology.*, 48: 831–841.

Darin-Bennett, A.; Poulos, A.; White, I.G. (1974) - The phospholipids and phospholipidbound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa. *J Reprod Fert.*, 41: 471-474.

Darin-Bennett, A.; White, I.G. (1977) - Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, 14: 466-70.

Dauphas, S.; Beaumal, B.; Riaublanc, A.; Anton, M. (2006) - Hen Egg Yolk Low-Density Lipoproteins Film Spreading at the Air-Water and Oil-Water Interfaces. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 3733-3737.

Davis, R.O.; Bain, D.E.; Siemers, R.J.; Thal, D.M.; Andrew, J.B.; Gravance, C.G. (1992) - Accuracy and precision of the CellForm-Human automated sperm morphometry instrument. *Fertil. Steril.*, 58: 763-769.

Davis, R.O.; Katz, D.F. (1993) - Operational standards for CASA instruments. *J. Androl.*, 14: 385-394.

Davis, R.O., Siemers, R.J. (1995) - Derivation and reliability of kinematics measures of

sperm motion. *Reprod. Fertil Dev.*, 7: 857-869.

David, I.; Bodin, L.; Lagriffoul, G.; Leymarie, C.; Manfredi, E.; Robert-Granié, C. (2007) - Genetic analysis of male and female fertility after artificial insemination in sheep: comparison of single-trait and joint models. *J Dairy Sci.*, 90: 3917-23.

Decuadro, H.; Camus, A.; Guy, D. (2002) - Assessment of bull semen characteristics by flow cytometry and their relation with non return rates: a preliminary study in France. 14th Meeting European A. IVETS. pp: 105-108.

De Leeuw, F.E.; Colenbrander, B.; Verkleij, A.J. (1990) - The role membrane plays in cold shock and freezing injury. *Reprod Dom Anim.*, 1: 95-104.

Delgadillo, J.A.; Leboeuf, B.; Chemineau, P. (1991) - Decrease in the seasonality of sexual behavior and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. *Theriogenology.*, 36(5): 755-770.

Delgadillo, J.A.; Hochereau-De Reviers, M.T.; Daveau, A.; Chemineau, P. (1995) - Effect of short photoperiodic cycles on male genital tract and testicular parameters in male goats (*Capra hircus*). *Reprod. Nutr. Dev.*, 35 (5): 549-558.

Delgadillo, J.A.; Canedo, G.A.; Chemineau, P.; Guillaume, D. (1999) - Evidence for an annual reproductive rhythm independent of food availability in male Creole goats in subtropical northern Mexico. *Theriogenology.*, 52: 727-737.

Delgadillo, J. A. (2004) – Características anatómicas y funcionales del sistema reproductor del macho. En: Reproduccion Ovina y Caprina. Ed. Aisen, E. Inter-Medica. Buenos Aires, Argentina. pp: 1-9.

De Paz, P.; Estes, M.; Alvarez, M.; Mata, M.; Chamorro, C.; Anel, L. (2010) - Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. *Theriogenology*, 74(4): 663–671.

Del Valle, I.; Gómez-Dura, A.; Holt, W.V.; Muiño-Blanco, T.; Cebria-Perez, J.A. (2012) - Soy Lecithin Interferes With Mitochondrial Function in Frozen-Thawed Ram Spermatozoa. *Journal of Andrology*, 33, (4): 717-725.

Demaniowicz, W.; Strzezek, J. (1996) - The effect of lipoprotein fraction from egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state, *Reprod. Domest. Anim.*, 31: 279–280.

Desnoyers, L.; Manjunath, P. (1992) - Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem.*, 267: 10149–10155.

Dominguez, M.P.; Falcinelli, A.; Hozbor, F.; Sanchez, E.; Cesari, A.; Alberio, R.H. (2008) - Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology*, 69: 564–573.

Dominguez-Revolledo, A.E.; Fernandez-Santos, M.R.; Bisbal, A.; Ros-Santaella, J.L.; Ramon, M.; Carmona, M.; Martinez-Pastor, F. (2001) – Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. *Reprod Fertil. Dev.*, 22: 856-870.

Donoghue, A. N.; Donoghue, D.J. (1997) - Effects of water and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. *Poult. Sci.* 76:1440-1445.

Dorado, J.; Rodriguez, I.; Hidalgo, M.; Perez, C.C.; Corral, S.; Sanz, J.; Sanchez, M. (2003) - Estudio del efecto de la estación sobre la calidad del esperma del macho cabrío de raza Florida. N°. XXVIII Jornadas Científicas de la SEOC, Cáceres España. pp: 205-210.

Drobnis, E.Z.; Crowe, L.M.; Berger, T.; Anchordoguy, T.J.; Overstreet, J.W.; Crowe, J.H. (1993) - Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *The Journal Exp Zool.*, 265: 432-437.

England, G.C. (1993) - Cryopreservation of dog semen: a review. *J. Reprod. Fertil.*, 47: 243-255.

Ericsson, S.A.; Garner, D.L.; Redelman, D.; Ahmad, K. (1989) - Assessment of the viability and fertilizing potential of cryopreserved bovine spermatozoa using dual fluorescent staining and two-flow cytometric systems. *Gamete Res.*, 22: 355-368.

ESHRE andrology special interest group. European society for human reproduction and embryology. (1998) - Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 13: 142-145.

Esteba, C. (2003) – Razas ganaderas españolas ovinas. Feagas, editor. MAPA.

Evans, G.; Maxwell, W.M.C. (1987) - Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths, Sydney, 194.

Evans, G. (1988) - Current topics in artificial insemination of sheep. *Aust. J. Biol. Sci.*, 41: 103-116.

Evans, G.; Maxwell, W.M.C. (1990) – Inseminación artificial de ovejas y cabras. (Acribia). Zaragoza. Pp. 160.

Evenson, D.P.; Darzynkiewicz, Z.; Melamed, M.R. (1982) - Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J. Histochem. Cytochem.*, 30: 279-280.

Eyestone, W.H.; First, N.L. (1989) - Variation in bovine embryo development in vitro due to bulls. *Theriogenology.*, 31: 191-200.

Fahy, G.M.; Lilley, T.H.; Linsdell, H.; John Douglas, M.S.T.; Meryman, H.T. (1990) - Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology.*, 27: 247-268.

Farlin, F.M.; Jasko, D.J.; Graham, J.K.; Squires, E.L. (1992) - Assessment of *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, 32: 23-27.

Farrell, P.B.; Trouern-Trend, V.; Foote, R.H.; Douglas Hamilton, D. (1995) - Repeatability of measurements on human, rabbit, and bull sperm by computer-assisted sperm analysis when comparing individual fields and means of 12 fields. *Fertil. Steril.*, 64(1): 208-210.

Farrell, P.B.; Foote, R.H.; McArdle, M.M.; Trouern-Trend, V.L.; Tardiff, A.L. (1996) - Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). *J. Androl.*, 17: 293-300.

Farshad, A.; Khalili, B.; Jafaroghlil, M. (2010) - Effects of Butylated Hydroxytoluene on Freezability of Ram Spermatozoa. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol. 23, No. 10: 1276 - 1281

Fernandez-Juan, M.; Gallego, M.; Barrios, B.; Osada, J.; Cebrián-Pérez, J.A.; Muñio-Blanco, T. (2006) - Immunohistochemical localization of sperm-preserving proteins in the ram reproductive tract. *J Androl.*, 27: 588-595.

Fernández-Santos, M.R.; Estesó, M.C.; Montoro, V.; Soler, A.J.; Garde, J.J. (2006) - Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: Effects of egg yolk, glycerol and cooling rate. *Theriogenology.*, 66: 1931–1942.

Fiser, P.S.; Fairfull, R.W. (1984) - The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology*, 21: 542-551.

Fiser, P. S.; Fairful, R. W. (1989) - The effect of glycerol related osmotic changes on post thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 26: 64-69.

Fitzgerald, J.A.; Stellflug, J.N. (1991) - Effects of melatonin on seasonal changes in reproduction of rams. *J Anim Sci.*, 69: 264-275.

Fiume, Z. (2001) - Final report on the safety assessment of lecithin and hydrogenated lecithin. *Int J Toxicol.*, 20: 21-45.

Flesch, F.M.; Voorhout, W.F.; Colenbrander, B.; van Golde, L.M.; Gadella, B.M. (1998) - Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa: a novel technique for monitoring membrane purity and quantity. *Biol. Reprod.*, 59: 1530-1539.

Folch, J. (1984) - influence of age, photoperiodism and temperature on semen production of rams. En: Courot, M, editor. *The Male in Farm Animal Reproduction*. The Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers. pp: 141-159.

Folch, J. (2000) - Manejo del morueco. XXV Jornadas Científicas SEOC, Producción ovina y caprina. pp: 61-64.

Foote, R.H. (1978) - Factors influencing the quantity and quality of semen harvested from bulls, rams, boars and stallions. *J. Anim. Sci.*, 47(2): 1-11.

Foote, R.H.; Chen, Y.; Brockett, C.C.; Kaproth, M.T. (1993) - Fertility of bull spermatozoa frozen in whole milk extender with trehalose, taurine, or blood serum. *DJ Dairy Sci.*, 76: 1908-1913.

Foote, R.H. (2003) - Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Anim Reprod Sci*, 75: 119–139.

Forcada, F.; Abecia, J.A.; Zarazaga, L.A.; Lozano, M. (2000) - Importancia del fotoperiodo en la regulación de la actividad reproductora. *Ovis*, 71:13-32.

Forouzanfar, M.; Sharafi, M.; Hosseini, S.; Ostadhosseini, S.; Hajian, M.; Hosseini, L.; Abedi, P.; Nili, N.; Rahmani, H.; Nasr-Esfahani, M.(2010) - In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology.*, 73: 480–487

Foulkes, J. (1977) - The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *Reprod Fertil.*, 49: 277–284.

Foulkes, J.; Sweasey, D.; Goodey, R. (1980) - Fertility of bull spermatozoa in egg-yolk diluents of varied lipid fatty acid composition. *Reprod Fertil.* 60: 165–169.

Franca, L.R.; Becker-Silva, S.C.; Chiarini-García, H. (1999) - The length of the cycle of seminiferous epithelium in goats (*Capra hircus*). *Tissue and Cell.*, 31(3): 274-280.

Fraser, L.R.; Harrison, R.A.; Herod, J.E. (1990) - Characterization of a decapacitation factor associated with epididymal mouse spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 89: 135-140.

Fraser, L.; Gorszczaruk, K.; Strzezek, J. (2001) – Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reprod Dom Anim.*, 36: 325-329.

Freeman, M.R.; Archibong, A.E.; Mrotek, J.J.; Whitworth, C.M.; Weitzman, G.A.; Hill, G.A. (2001) - Male partner screening before in vitro fertilization: preselecting patients who

require intracytoplasmic sperm injection with the sperm penetration assay. *Fertil Steril.*, 76(6): 1113-1118

Fuller, S.J. y Whittingham, D.G. (1996) - Effect of cooling mouse spermatozoa to 4 °C on fertilization and embryonic development. *J. Reprod. Fertil.*, 108: 139-145.

Gadea, J. (2003) - Semen extenders used in the artificial insemination of swine. A review. *Span. J. Agric. Res.*, 1: 17-27.

Gadea, J.; Sellés, E.; Marco, M.A.; Coy, P.; Matás, C.; Romar, R.; Ruiz, S. (2004) - Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders *Theriogenology.*, 62: 690-701

Gadea, J. (2005) - Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology.*, 63: 431-444.

Gagnon, C. (1995) - Regulation of sperm motility at the axonemal level. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7: 847-855.

Garner, D.L.; Pinkel, D.; Johnson, L.A.; Pace, M.M. (1986) - Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol. Reprod.*, 34, 127-138.

Garner, D.L.; Hafez, E.S.E. (1993) - Spermatozoa and seminal plasma. En: *Reproduction in Farm Animals, 6th edition. Hafez ESE (ed). Lea and Febiger.* (Philadelphia. USA).165-187.

Gao, D.; Mazur, P.; Criser, J.K. (1997) - Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. En:*Reproductive tissue banking: scientific principles.* Eds: Karow, A.M. y Critser, J.K. Academic press, San Diego, EEUU. pp: 263-328.

Garde, J. (1993) – Congelación del semen en la especie ovina: características biológicas de las dosis descongeladas. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, España.

Garde, J.; Pérez-Guzmán, M.D.; Pérez, S.S.; Garzón, A.; Montoro, V. (1996) Características seminales de corderos de raza Manchega tratados con implantes de melatonina. *Arch. Zootec.*, 45: 395-401.

Garde, J.J.; Soler, A.J.; Cassinello, J.; Crespo, C.; Malo, A.F.; Espeso, G. Gomendio, M.; Roldan, R. S. (2003) - Sperm Cryopreservation in Three Species of Endangered Gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorh*, and *G. dorcas neglecta*). *Biology of Reproduction.*, 69: 602–611.

Garde, J.J.; del Olmo, A.; Soler, A.J.; Espeso, G.; Gomendio, M.; Roldan, E.R.S. (2008) - Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*). *Animal Reproduction Science.*, 108: 384–401.

García-Artiga, C.; Fontanillas, J.C.; Pérez, J.; García-Cuenca, I.; Martín-Rillo, S.; Pérez-García, T. (1994) - Técnicas de tinción espermática. *Porci*, 21: 11-18.

García M.A.; Graham, E.F. (1987a) - Dialysis of bovine semen and its effect on fresh and freeze-thawed spermatozoa. *Cryobiology.*, 24: 446–454.

García, M.A.; Graham, E.F. (1987b) - Effects of low-molecular weight fractions (LMWF) from milk, egg yolk and seminal plasma on freezability of bovine spermatozoa. *Criobiology.* 24: 429–436.

García-Herreros, M.; Aparicio, I.M.; Baron, F.J.; García-Marín, L.J.; Gil, M.C. (2006) - Standardization of sample preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. *Int. J. Androl.*, 29: 553-563.

Gatti, J.L.; Castella, S.; Dacheux, F.; Ecroyd, H.; Métayer, S.; Thimon, V.; Dacheux, J.L. (2004) - Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal of Reproduction Science.*, 82: 321-39.

Gavella, M.; Lipovac, V. (2000) - Antioxidative effect of melatonin on human spermatozoa. *Arch Androl.*, 44: 23-27.

Ghaoui, R.E.H.; Gillan, L.; Thomson, P.C.; Evans, G.; Maxwell, W.M.C. (2007) - Effect of seminal plasma fractions from entire and vasectomized rams on the motility characteristics, membrane status, and in vitro fertility of ram spermatozoa. *J Androl.*, 28:109-122.

Gil, J.; Lundeheim, N.; Soderquist, L.; Rodriguez-Martinez, H. (2003a) - Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology.*, 59: 1241–1255.

Gil, J.; Rodriguez-Irazoqui, M.; Lundeheim, N.; Soderquist, L.; Roderiguez-Martinez, H. (2003b) - Fertility of ram semen in Bioxcell and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology.*, 59: 1157–1170.

Gillan, L.; Evans, G.; Maxwell, W.M.C. (1997) - Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod. Fertil., Dev.* 9: 481-487.

Gillan, L.; Evans, G.; Maxwell, W.M.C. (2005) - Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology.*, 63: 445-457.

Glover, F.A. (1968) - Physical method of measuring the mobility of bull sperm. *Nature.*, 219-225.

Glover, T.D.; Barrat, C.L.R.; Tyler, J.P.P; Hennessey, J.F. (1990) - Sperm production and its control, En: Human Male Fertility and Semen Analysis, *Academic Press, London.*

González-Recio, O.; Alenda, R.(2005) - Genetic parameters for female fertility traits and a fertility index in Spanish dairy cattle. *J Dairy Sci.*, 88: 3282-9.

González Urdiales, R.; Tejerina, F.; Domínguez, J.C.; Alegre, B.; Ferreras, A.; Peláez, J.; Bernal, S.; Cárdenas, S. (2006) - Técnicas de análisis rutinario de la calidad espermática: motilidad, vitalidad, concentración, resistencia osmótica y morfología espermática. En: “*Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino*”. Eds: Bonet, S.; Martínez, E.; Rodríguez, J.E.; Barrera, X. Universidad de Gerona y Red temática nacional de reproducción porcina, Gerona, España. pp: 19-38.

Goulart, A.R.; de Alencar Hausen, M.; Monteiro-Leal, L.H. (2003) - Comparison of three computer methods of sperm head analysis. *Fertil. Steril.*, 80: 625-630.

de Graaf, S.P.; Evans, G.; Gillan, L.; Guerra, M.M.P.; Maxwell, W.M.C.; O'Brien, J.K. (2007) - The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. *Theriogenology.*, 67: 217–227.

Graham, E.F.; Crabo, B.G.; Brown, K.I. (1972) - Effect of some zwitter ion buffers on the freezing and storage of spermatozoa. *Int. Bull. J. Dairy Sci.*, 55: 372–378.

Graham, E.F. (1978) - The integrity offrozen spermatozoa. *National Academy of Sciences.*,pp: 1-44.

Graham, J.; Foote, R. (1987) - Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology.*, 24: 42–52.

Graham, J.K.; Kunze, E.; Hammerstedt, R.H. (1990) - Analysis of Sperm Cell Viability, acrosomal Integrity, and Mitochondrial Function using flow cytometry. *Biol. Reprod.*, 43: 55-64.

Graham, J.K.; Hammerstedt, R.H. (1992) - Differential effects of butylated hydroxytoluene analogs on bull sperm subjected to cold-induced membrane stress. *Cryobiology.*, 29: 106–117.

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: 1151-62.

Graham, J.K. (2001) - Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim. Reprod. Sci.*, 68: 239-247.

Gravance, C.G.; Lewis, K.M.; Casey, P.J. (1995) - Computer automated sperm head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa. *Theriogenology.*, 44: 989-1002.

Gravance, G.C.; Vishwanath, R.; Pitt, C.; Casey, P.J. (1996) - Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. *Theriogenology*, 46: 1205-1215.

Gravance, C.G.; Champion, Z.J.; Liu, I.K.; Casey, P.J. (1997) - Sperm head morphometry analysis of eyaculate and dismount stallion semen samples. *Anim. Reprod. Sci.*, 49: 71-76.

Gravance, C.G.; Champion, Z.J.; Casey, P.J. (1998) - Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology.*, 49: 1219-1230.

Green, C.E. y Watson, P.F. (2001) - Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, 122: 889-898.

Guerin, Y. (1990) - Méthodes de conservation de la semence ovine. *Élevage & Insemination.*, 236: 3-14.

Gwayi, N.; Bernard, R.T. (2002) - The effects of melatonin on sperm motility in vitro in Wistar rats. *Andrologia.*, 34: 391-396.

Hallap, T.; Haard, M.; Jaakma, U.; Larsson, B.; Rodriguez-Martinez, H. (2004) - Variations in quality of frozen-thawed semen from Swedish Red and White AI sires at 1 and 4 years of age. *Int J Androl.*, 27: 166-171.

Hammerstedt, R. H.; Amann, R.P.; Rucinsky, T.; Morsel, I.I.; Lepock, P.D. (1976) - Use of spin labels and electron spin resonance spectroscopy to characterize membrane of bovine sperm: the effect of butylated hydroxytoluene and cold shock. *Biol. Reprod.* 14: 381-397.

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

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

Hammerstedt, R.H.; Graham, J.K. (1992) - Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology.* 29: 26-38.

Hancock, J.L. (1957) - The morphology of boar spermatozoa. *J. R. microsc. Soc.*, 76: 84-97

Hardeland, R. (2005) – Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine.*, 27: 119-130.

Harrison, K.L.; Baker, N.J.; Harrison, M. (1989)- Sperm morphology evaluation using a rapid haematological stain. *Australian J. Med. Lab. Sci.*, 10: 75-76.

Hernández, M.; Roca, J.; Calvete, J.J.; Sanz, L.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A.; Vázquez, J.M.; Martínez, E.A. (2007) - Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity

postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *Journal of Andrology*, 28: 689-97.

Hidalgo, M.; Rodríguez, I.; Dorado, J.; Sanz, J.; Soler, C. (2005) - Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry. *Vet. Med. Czech.*, 50: 24-32

Hidalgo, M.; Rodríguez, I.; Dorado, J. (2006) -Influence of staining and sampling procedure a goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology.*, 66: 996-1003.

Hidalgo, M.; Rodríguez, I.; Dorado, J.; Soler, C. (2007a) - Morphometric classification of spanish thoroughbred stallion sperm heads. *Anim. Reprod. Sci.*, 99: 100–109.

Hidalgo, M.; Rodríguez, I.; Dorado, J.M. (2007b) - The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Anim. Reprod. Sci.*, 100: 61-72.

Hildebrandt, T.B.; Reid, C.; Krieg, R.; Ji, W.Z.; Fassbender, M.; Hermes, R. (2006) - The successful double cryopreservation of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) semen in large volume using the directional freezing technique with reduced concentration of cryoprotectant. *Theriogenology.*, 65: 788 –98.

Hill, J.R.; Thompson, J.A.; Perkins, N.R. (1998) - Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of Merino ewes under commercial conditions: la survey. *Theriogenology.*, 49: 697-709.

Hiwasa, M.; Kohno, H.; Togari, T.; Okabe, K.; Fukui, Y. (2009) - Fertility after different artificial insemination methods using a synthetic semen extender in sheep. *J Reprod Dev.*, 55: 50–54.

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

Holt, W.V y North, R.D. (1994a) - Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 51: 414-424.

Holt, W.V.; Watson, P.; Curry, M.; Holt, C. (1994b) - Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems used in practical workshop. *Fertil. Steril.*, 62: 1277-1282.

Holt, C.; Holt, W.V.; Moore, H.D. (1996) - Choice of operating conditions to minimize sperm subpopulation sampling bias in the assessment of boar semen by computer-assisted semen analysis. *J. Androl.* 17: 587-596.

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

Holt, W.V.; Medrano, A.; Thurston, L.M.; Watson, P.F. (2005) -The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology.*, 63: 370–382.

Hong, C.Y.; Shieh, C.C.; Wu, P.; Huang, J.J.; Chiang, B.N. (1986) - Effect of phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine, arachidonic acid and docosahexaenoic acid on the motility of human sperm. *Int J Androl.*, 9: 118–122.

Hu, J.H.; Li, Q.W.; Li, G.; Chen, X.Y.; Yang, H.; Zhang, S.S.; Wang, L.Q. (2006) - The cryoprotective effect on frozen–thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 19: 486–494.

Hu, J.H.; Li, Q.W.; Jiang, Z.L.; Li, W.Y. (2008) - Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing. *Cryobiology.*, 57: 257–262.

Hyun-Yong, J.; Sung-Gon, K.; Jong-Taek, K.; Choon-Keun, P.; Hee-Tae, Ch.; Hak-Kyu, L.; Boo-Keun, Y. (2006) - Effects of Antioxidants on Sperm Motility During *in Vitro* Storage of Boar Semen. *J. Gerontol.*, 16(6): 47-51.

Ijaz, A.; Hussain,A.; Aleem, M.; Yousaf, M. S.; Rehman, H. (2009) - Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology.*, 71: 1326-1329.

Irvineg, D.S. (1995) - Computer assisted semen analysis system: sperm motility assessment. *Hum. Reprod.*, 10: 53-59.

Jang, H.Y.; Kim, Y.H.; Kim, B.W.; Park, I.C.; Cheong, H.T.; Kim, J.T.; Park, C.K.; Kong, H.S.; Lee, H.K.; Yang, B.K. (2010) - Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. *Reprod. Domest. Anim.*, 45: 943–950.

Jennings, J.J.; Mcweeney, J. (1976) - Effect of frequent ejaculation on semen characteristics in rams. *Vet. Rec.*, 98: 230-233.

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

Jiang, Z-l.; Li, Q-W.; Hu, J-H.; Li, W-Y.; Zhao, H-W.; Zhangs-S.(2007) - Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. *Cryobiology.*, 54: 301–314.

Johnson, L.A.; Weitze, K.F.; Fiser, P.; Maxwell, W.M.C. (2000) - Storage of boar semen. *Animal of Reproduction Science*, 62: 143-172.

Jones, J.; Bavister, B. (2000) - Acidification of intracellular pH in bovine spermatozoa suppresses motility and extends viable life. *J. Androl.*, 21: 616–624.

Jordana, J.; Jordana, J. (1995) – La Raza ovina Xisqueta: descripción, situación actual y perspectivas. *Avances en alimentación y mejora animal.*, 35(2): 11-18.

Juyema, N.; Stelletta, C. (2012) - Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. *Journal of Andrology.*, 33 (4): 536-550.

Kampschmidt, R. F.; Mayer, D.T.; Heman, H.A. (1953) - Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *J Dairy Sci.*, 36:733– 42.

Kaneto, M.; Harayama, H.; Miyake, M.; Kato. (2002) - Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins. *Anim. Reprod. Sci.*, 73: 197-209.

Kankofer, M.; Kolm, G.; Aurich, J.; Aurich, C.(2005) - Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 °C. *Theriogenology*, 63: 1354-1365.

Karagiannidis, A.; Varsakelis, Alexopolulos, C.; Amarantidis, I. (2000) - Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesan rams in Greece. *Small Rum Res.*, 37: 125-130

Katz, D.F.; Dott, H.M. (1975) - Methods of measuring swimming speed of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 45: 263.

Katz, D.F.; Overstreet, J.W. (1981) - Sperm motility assessment by video-micrography.

Fertil. Steril., 35: 188.

Kawano, N.; Shimada, M.; Terada, T. (2003) - Motility and penetration competence of frozen-thawed miniature pig spermatozoa are substantially altered by exposure to seminal plasma before freezing. *Theriogenology*. 61: 351-364.

Kaya, A.; Baspınar, N.; Yildiz, C.; Kurtoglu, F.; Ataman, M.B.; Haliloglu, S. (2000) - Influence of melatonin implantation on sperm quality, biochemical composition of the seminal plasma and plasma testosterone levels in rams. *Rev Med Vet.*, 151: 1143–1146.

Kaya, A.; Aksoy, M.; Baspınar, N.; Yöldöz, C.; Ataman, N.B. (2001) - Effect of Melatonin Implantation to Sperm Donor Rams on Post-thaw Viability and Acrosomal Integrity of Sperm Cells in the Breeding and Non-breeding Season. *Reprod Dom Anim.*, 36: 211-215.

Kaya, A.; Aksoy, M.; Tekeli, T. (2002) - Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. *Small Ruminant Research.*, 44: 153-158.

Keeler, K.D.; Mackenzie, N.M.; Dresser, D.W. (1983) - Flow microfluorometric analysis of living spermatozoa stained with Hoechst 33342. *J. Reprod. Fert.*, 68: 205-212.

Keij, J. F.; Bell-Prince, C.; Steinkamp, J.A. (2000) – Staining of mitochondrial membranes with 10-nonil acridine orange, MitoFluor Green, and Mitotracker Green is affected by mitochondrial membrane potential altering drugs. *Cytometry.*, 41: 148.

Khalifa, T.; Lymberopoulos, A.; EL-Saidy, A. (2006) - Testing usability of butylated hydroxytoluene in conservation of goat semen. *Reprod. Domest. Anim.*, 43: 525-530.

Khalifa, T. A. A.; Lymberopoulos, A. G.; El-Saidy, B.E. (2008) - Testing usability of butylated hydroxytoluene in conservation of goat semen. *Reprod. Domest. Anim.*, 43: 525-530.

Khalifa, T.; Lymberopoulos, A.; Theodosiadou, E. (2013) - Association of soybean-based extenders with field fertility of stored ram (*Ovis aries*) semen: A randomized double-blind parallel group design. *Theriogenology.*, 79: 517–527

Killian,G.; Honadel, T.; McNutt, T.; Henault, M.; Wegner, C.; Dunlap, D. (1989) - Evaluation of butylated hydroxytoluene as a cryopreservative added to whole or skim milk diluent for bull semen. *J. Dairy Sci.*, 72: 1291-1295.

Killian, G.; Chapman, D.A.; Rogowski, L.A. (1993) - Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod.*, 49: 1202–1207.

Krause, W. (1995) - The significance of computer-assisted semen analysis (CASA) for diagnosis in andrology and fertility prognosis. *Hum. Reprod.*, 10: 60-66.

Krause, W. y Viethen, G. (1999) - Quality assessment of computer-assisted semen analysis (CASA) in the andrology laboratory. *Andrologia*, 31: 125-129.

Kruger, T.F.; Coetzee, K. (1999) - The role of sperm morphometry in assisted reproduction. *Human Reprod Update.*, 5: 172–78

Kuster, C.E.; Singer, R.S.; Althouse, G.C. (2004) - Determining sample size for the morphological assessment of sperm. *Theriogenology.*, 61: 691-703.

Lahlou-Kassi, A.; Marie, M. (1985) - Sexual and ovarian function of the D'Man ewe. En *Genetics of reproduction in sheep*. R.B. Land y D.W. Robinson, ed., Publ. Butterworths, Londres. 245-260.

de Lamirande E, Gagnon C, (1984) - Origin of a motility inhibitor within the male reproductive tract. *J Androl.*, 5: 269–276.

Lamia, A.; Daniel, T.; Laëtitia, J.; Chantal, T.; Olivier, G.; Jean, L.C.; Marc, A. (2004) - Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl1, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 61: 895–907.

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

Leboeuf, B.; Restall, B.; Salamon, S. (2000) - Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci.*, 62(1-3): 113-41.

Leibo, S.P.; Songsasen, N. (2002) - Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*, 57: 303-326.

Lincoln, G.A. (1989) - Seasonal aspects of testicular function. In: Burguer H. Krester D (eds). *The testis*. New York, pp: 329-385.

Lincoln, G.A.; Almeida, O.F.X.; Klandorf, H.; Cunningham, R.A. (1982) - Hourly fluctuations in the blood-levels of melatonin, prolactin, luteinizing-hormone, follicle-stimulating-hormone, testosterone, triiodothyronine, thyroxine and cortisol in rams under artificial photoperiods, and the effects of cranial sympathectomy. *Journal of Endocrinology*, 92: 237-250.

Lymberopoulos, A.G.; Tsakmakidis, I.A.; Khalifa, T.A.A. (2010) - Effect of ram age on structural and functional competence of frozen-thawed spermatozoa in dairy sheep. *Reprod Dom Anim.*, 45: 572–578.

Mac Donald, B.; Foulkes, J. (1981) - A spectrofluorometric investigation, using 1-anilinonaphthalen-8-sulphonate, of the interaction between washed bovine spermatozoa and seminal plasma or egg-yolk lipoprotein. *Reprod Fertil.*, 63: 407–414.

Manjunath, P.; Nauc, V.; Bergeron, A.; Menard, M. (2002) - Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol. Reprod.*, 67: 1250–1258.

Marco-Jiménez, F.; Puchades, S.; Rodríguez, M.; Vicente, J.S. (2003) – Estudio de la influencia de la estacionalidad sobre la calidad seminal de moruecos de la raza Guirra. Producción ovina y caprina. Nº XXVIII-SEOC. Badajoz, España. pp: 188-190.

Marco-Jimenez, F.; Puchades, S.; Moce, E.; Viudes-De-Cartro, M.; Vicente, J.; Rodriguez, M. (2004) - Use of Powdered Egg Yolk vs Fresh Egg Yolk for the Cryopreservation of Ovine Semen. *Reprod Dom Anim.*, 39: 438–441.

Marinov, P.; Dacheva, D. (1984) - Individual variation of ram semen freezability and its correlation to K, Na and citric acid levels in seminal plasma. 10th I.C.A.R.. Illinois, 3: 385-388.

Maroto-Morales, A. (2012) - Evaluación objetiva de la morfometría de los espermatozoides de ovino (*Ovis aries*). Relacionados con la fertilidad. Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Castilla-La Mancha, España.

Martí, J.I.; Martí, E.; Cebrián-Pérez, E.; Muiño-Blanco, T. (2003) - Survival rate and antioxidant enzyme activity of ram spermatozoa after dilution with different extenders or selection by a dextran swim-up procedure. *Theriogenology.*, 60: 1025–1037.

Martí, J.I.; Aparicio, I.M.; García-Herreros, M. (2011) - Head morphometric changes in cryopreserved ram spermatozoa are related to sexual maturity. *Theriogenology.*, 75: 473–481

Martin, J.C.; Klug, E.; Gunzel, A.R. (1979) - Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility.*, 27: 47-51.

Martínez, R.; Vásquez, R.; Cerquera, A.; Espinosa, E. (1998) – Caracterización de la respuesta a crioprecipitación y evaluación por prueba de reacción agrosómica *in vitro* de la fertilidad del semen ovino. *Rev. Corpica*. Colombia. 11: 90-97.

Matousek, J. (1985) - Biological and immunological roles of proteins in the sperm of domestic animals. *Anim Reprod Sci.*, 8: 1–40.

Matsuoka, T.; Imai, H.; Kohno, H.; Fukui, Y. (2006) - Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozenthawed ram spermatozoa. *J. Reprod., Dev.* 52: 675–683.

Maxwell, W.M.C. (1980) - Fertility of Ram Semen Frozen in Autumn and Spring. *Proc Austr Soc Reprod Biol.*, 12: 8-15.

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.; Welch, G.R.; Johnson, L.A. (1996) - Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev.*, 8: 1165–1178.

Maxwell, W.M.C.; Johnson, L.A. (1997a) - Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.*, 46: 408-418.

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. *Reprod. Fertil. Dev.*, 8: 1165-1178.

Maxwell, W.M.C.; Long, C.R.; Johnson, L.A.; Dobrinsky, J.R.; Welch, G.R. (1998) – The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow

cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev.* 10: 433–440.

Maxwell, W.M.C. y Jonhson. I.A. (1999) - Physiology of spermatozoa at high dilution rates: The influence of seminal plasma. *Theriogenology.*, 52: 1353-1362.

Maxwell, W.M.C.; de Graaf, S.P.; El-Hajj Ghaoui, R.; Evans, G. (2007) - Seminal plasma effects on sperm handling and fertility. En: *Juengel JJ, Murria JF and Smith MF* (ed). *Reproduction in Domestic Ruminants VI*. Nottingham UK: Nottingham University Press. Pp: 13-38.

Mazariengos, V.; Vazquez, J.M.; Garrido, C.; Salvador, S.; De la Fuente, D. (2010) - Influencia de la raza, época del año y ritmo de recogida sobre las características del semen fresco de ganado ovino. Nº XXXV-SEOC. Valladolid, España. pp: 150-157.

Mazur, P. (1984) - Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*, 247: 125-142.

Mazur, P. (1985) - Basic concepts in freezing cells. En: “*Deep freezing of boar semen*”. Eds: Johnson, L.A. y Larsson, K. Swedish university of agricultural sciences, Uppsala, Suecia. pp: 91-111.

Medeiros, C.M.O.; Forell, F.; Oliveira, AT.D.; Rodrigues, J.L. (2002) - Current status of cryopreservation: why isn't it better *Therio.*, 57: 327-344.

Medrano, A.; Holt, W.V. (1998) - Inter-individual boar sperm susceptibility to reezingthawing protocols. *Arch Zootec.*, 47: 319–327.

Miranda, J.; Guerrero, A.F.; Partal, P. (2000) - Reología de derivados de la yema de huevo deshidratada. *Grasas y Aceites.* 51: 244–250.

Molinia, F.C.; Evans, G.; Maxwell, W.M. (1994) - In vitro evaluation of zwitterions buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reprod. Nutr. Dev.*, 34: 491–500.

Moore, A.I.; Squires, E.L.; Graham, J.K. (2005) - Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology.*, 63: 2372–2381.

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.; Curtis, E.F.; Dravland, J.E. (1987) - Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *J. Reprod. Fertil.*, 81: 127-135.

Mortimer, S.T. (2000) - CASA practical aspects. *J. Androl.*, 21: 515-524.

Moura, A.A.; Deschamps, J.C.; Moraes, J.C.F. (1995) - Effect of the concentration and addition temperature of trehalose in extenders on freezing ram semen in straws. *Ciência Rural.*, 25: 105–109.

Moura, A.A.; Chapman, D.A.; Koc, H.; Killian, G.J.(2007) - A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Anim Reprod Sci.*, 98: 169–188.

Moustacas, V.; Zaffalon, F.; Lagares, M.; Loaiza-Eccheverri, a.; Varagoa.; Neves, M.; Heneine, A.; arruda, (2011) - Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen *Theriogenology.*, 75: 300–307.

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

Muiño, R.; Fernández, M.; Peña, A.I.(2007) - Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reprod Domest Anim.*, 42(3): 305-311.

Muiño-Blanco, T.; Pérez-Pé, R.; Cebrián-Pérez, J.A. (2008) - Seminal Plasma Proteins and Sperm Resistance to Stress. *Reprod Dom Anim.*, 43 (Suppl. 4), 18–31.

Mukasa-Mugerwa, E.; Ezaz, Z. (1992) - Relationship of testicular growth and size to age, body weight and onset of puberty in Menz ram lambs. *Theriogenology.*,38: 979-988.

Nagy, S.; Jansen, J.; Topper, E.K.; Gadella, B.M. (2003) - A Triple stain flow cytometric method to assess plasma-and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediatly after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol. Reprod.*, 68: 1828-1835.

Nagy, S.; Hallap, T.; Johannisson, A.; Rodríguez-Martínez, H. (2004) - Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. *Anim Reprod Sci.*, 80: 225-235.

Nair, S.J.; Brar, A.S.; Ahuja, C.S.; Sangha, S.P.; Chaudhary, K.C.(2006) - A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. *Anim Reprod Sci.*, 96: 21-29.

Neagu, V.R.; Macías, B.; Salazar, C.; Morillo, A.; Ortega, C.; González, L.; Tapia, J.A.; Peña, F.J. (2010) - Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. *Theriogenology*, 73: 645–650.

Nolan, J.P.; Magargee, S.F.; Posner, R.G.; Hammerstedt, R. (1995) - Flow cytometric analysis of transmembrane phospholipid movement in bull sperm. *Biochemistry*, 33: 9968-74.

Núñez-Martínez, I.; Morán, J.M.; Peña, F.J. (2006) - A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. *Reprod. Dom. Anim.*, 41: 408-415.

Nur, Z.; Zik, B.; Ustuner, B.; Sagirkaya, H.; Ozguden, C.G. (2010) - Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology.*, 73: 1267–1275.

O'Connor, M.T.; Amann, R.P.; Saacke, R.G. (1981) - Comparisons of computer evaluations of spermatozoal motility with Standard laboratory tests and their use for predicting fertility. *J. Anim. Sci.*, 53(5): 1368-1376.

O'Flaherty, C.; Beconi, M.; Beorlegui, N.(1997) - Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia*, 29: 269-275.

O'Hara, L.; Hanrahan, J.P.; Richardson, L.; Donovan, A.; Fair, S. (2010) - Effect of storage duration, storage temperature, and diluents on the viability and fertility of fresh ram semen. *Theriogenology.*, 73: 541–549.

O'Leary, S.; Jasper, M.J.; Warnes, G.M.; Armstrong, D.T.; Robertson, S.A. (2004) - Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. *Reproduction.*, 128: 237–247.

Ollero, M.; Pascual, M.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián, J.A.; López-Pérez, M.J. (1994) - Calidad y maduración espermática en ovino dependiente de la frecuencia de eyaculación. 7^{as}. Jornadas Internacionales de Reproducción Animal. Murcia, pp.126.

Ollero, M.; Gil-Guzmán, E.; López, M.C.; Sharma, R.K.; Agarwal, A.; Larson, K.; Evenson, D.; Thomas, J.A.; Álvarez, C.J. (2001) – Characterization of subsets of human

spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum. Reprod.* 16: 1912- 1921.

O' Meara, C.; Hanrahan, J.; Donovan, A.; Fair, S.; Rizos, D.; Wade, M.; Boland, M.; Evans, A.; Lonergan, P. (2005) - Relationship between in vitro fertilization of ewe oocytes and the fertility of ewes following cervical artificial insemination with frozen thawed semen. *Theriogenology.*, 64: 1797–1808.

O' Meara, C.; Hanrahan, J.P.; Prathalingam, N.S.; Owen, J.S.; Donovan, A.; Fair, S.; Ward, F.; Wade, M.; Evans, A.C.O.; Lonergan, P. (2008) - Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology.*, 69: 513–522.

Ortavant, R.; Pelletier, J.; Ravault, J.P.; Thimonier, J.; Volland-Nail, P. (1985) - Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm mammals. *Oxford Rev Reproduction Biology.*, 7: 305-354.

Osinowo, O.A.; Ahmed, M.S.; Ekpe, G.A. (1988) - Semen quality and sperm output of Yankasa rams at different ages. *Theriogenology.*, 29: 381–386.

Pace, M.; Graham, P. (1974) - Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J. Animal Science.*, 39 (6): 1144-1149.

Palacin, I.; Abecia, J.A.; Focada, F.; Casao, A.; Cebrian, J.A.; Muiño, T.; Palacios, C.; Pontes, J.M. (2008) - Effects of exogenous melatonin treatment on out-of-season ram fertility. *Italian Journal of Animal Science*, Vol.7, No.2.199-206.

Papa, F.O.; Felício, G.B.; Melo-Oña, C.M.; Alvarenga, M.A.; De Vita, B.; Trinque, C.; Puoli-Filho, J.N.; Dell'Aqua, J.A. (2011) - Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. *Anim Reprod Sci.*, 129(1-2): 73-77.

Paradies, G.; Petrosillo, G.; Paradies, V.; Reiter, R.J.; Ruggiero, F.M. (2010) - Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and disease. *J. Pineal Res.*, 48: 297–310.

Parés, P.M. (2008) - Caracterització estructural i racial de la raça ovina aranesa. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Parinaud, J.; Le Lannou, D.; Vieitez, G.; Griveau, J.F.; Milhet, P.; Richoilly, G. (1997) - Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit) following ejaculation. *Hum Reprod.*, 12: 2434-2436.

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

Parks, J.E. (1997) - Hypothermian and mammalian gametes. En: “*Reproductive tissue banking: scientific principles.*” Eds: Karow, A.M. y Critser, J.K. Academic Press, San Diego, EEUU. Pp: 229-261.

Paulenz, H.; Söderquist, L.; Pérez-Pé, R.; Berg, K.A. (2002) - Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology.*, 57: 823–836.

Paulenz, H.; Söderquist, L.; Adnøy, T.; Fossen, O.H.; Berg, K.A. (2003) – Effect of milk- and TRIS-based extenders on the fertility of sheep inseminated vaginally once or twice with liquid semen. *Theriogenology.*, 60: 759–766.

de Paz, P.; Estesó, M.; Alvarez, M.; Mata, M.; Chamorro, C.; Anel, L. (2010) - Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. *Theriogenology.*, 74(4): 663–671.

Pedigo, N.G.; Vernon, M.W.; Curry T.E. jr. (1989) - Characterization of a computerized semen analysis system. *Fertil. Steril.*, 52: 659-666.

Peláez, J. (2003). Criopreservación de semen porcino: aportaciones al estudio de la calidad seminal y la capacidad fecundante. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de León, España.

Peláez, J.; Breininger, E.; Alegre, B.; Peña, F.J.; Domínguez, J.C. (2006) - In vitro evaluation of the quality and fertilizing capacity of boar semen frozen in 0.25 ml straws. *Reprod. Dom. Anim.*, 41: 153-161.

Pelletier, J.; Chemineau, P.; Delgadillo, J.A. (1988) - Seasonality of sexual activity and its photoperiodic control in the adult ram and he-goat. Proc. 11th Int. Cong. Anim. Reprod. AI, Dublin, 5: 211-219.

Pelletier, J.; Bodin, L.; Hanocq, E.; Malpoux, B.; Teyssier, J.; Thimonier, J.; Chemineau, P. (2000) - Association between expression of reproductive seasonality and alleles of the gene for Melia receptor in the ewe. *Biology of Reproduction.*, 62:1096-1101.

Peña, F.J.; Johannisson, A.; Wallgren, M.; Rodríguez-Martínez, H. (2005) - A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. *Int. J. Androl.*, 28: 107-114.

Peña, F.J.; Rodríguez, H. (2006) - Citometría de flujo: aplicaciones en el estudio del espermatozoide porcino. En: Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcinos. Eds: Bonet, S.; Martínez, E.; Rodríguez, J.E.; Barrera, X. Universidad de Gerona y Red temática nacional de reproducción porcina, Gerona, España. Pp: 133-143.

Peréz-Llano, B.; González, J.L.; Clemente, M.J.; García-Casado, P. (1999) - El test de endósmosis (HOST) en semen de ganado porcino. *Albéitar*, 30: 16-17.

Perez, B.; Mateos, E. (1996) - Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malagueña breeds. *Small Ruminant Research* 23(1), 23-28.

Pérez-Sanchez, F.; de Monserrat, J.J.; Soler, C. (1994) - Morphometric analysis of human sperm morphology. *Int. J. Androl.*, 17: 248-255.

Pérez-Pé, R.; Barrios, B.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A. (2001a) – Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in anaqueous two-phase system. *J Chrom B.*, 760: 113–121.

Pérez-Pé, R.; Cebrián-Pérez, J.A.; Muiño-Blanco, T. (2001b) - Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology.*, 56: 425-434.

Peris, S.I.; Bilodeau, J.F.; Dufour, M.; Bailey, J.L.(2007) - Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol Reprod Dev.*, 74: 878-892.

Petrunkina, A.M.; Simon, K.; Gunzel-Apel, A.R., Topfer-Petersen, E. (2004) - Requirement for an intact cytoskeleton for volume regulation in boar spermatozoa. *Reproduction.*, 127: 105-115.

Phillips, P.H.; Lardy, H.A. (1940) - A yolk–buffer pabulum for preservation of bull sperm. *J. Dairy Sci.*, 23: 399–404.

Pillet, E.; Duchamp, G.; Batellier, F.; Beaumal, B.; Anton, M.; Desherces, S.; Schmitt, E.; Magistrini, M. (2011) - Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology.*, 75: 105–114.

Pintado, B.; De la Fuente, J.; Roldan, E.R.S. (2000) - Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258 or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *J. Reprod. Fertil.*, 118: 145-152.

Polge, C.; Smith, A.U.; Parkes, A.S. (1949) - Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.*, 164: 666.

Poot, M.; Zhang, Y. Z.; Kramer, J. A.; Wells, K. S.; Jones, L.; Hanzel, D. K.; Lugade, A. G.; Singer, V. L. (1996) – Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *J Histochem Cytochem.*, 44: 1363-1372.

Poulos, A.; Darin-Bennett, A.; White, I.G. (1973) - The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comp Biochem Physiol.* 46B: 541-549.

Pratap, N.; Reddy, V.N.V.; Sarma, P.A.; Honnappa, T.G. (2000) - Employment of the hypoosmotic swelling test (HOST) to evaluate sperm membrane integrity of fresh and frozen buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Buffalo J.*, 16: 207-213.

Pursel, V.G.; Johnson, L.A; Schulman, L.L. (1973) - Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J Anim Sci.*, 37: 528-531.

Quinn, P.J.; Chow, P.Y.W. (1980) - Evidence that phospholipids protects spermatozoa from cold shock at a plasmamembrane site. *J. Reprod. Fertil.*, 60: 403–407.

Quinn, P.J. (1989) - Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions. *J of Bioenergetics and Biomembranes.*, 21: 3-19.

Ramos, L.; Hendriks, J.C.; Peelen, P.; Braat, D.D.; Wetzels, A.M. (2002) - Use of computerized karyometric image analysis for evaluation of human spermatozoa. *J. Androl.*, 23: 882-888.

Ratto, M.H.; Huanca, W.; Singh, J.; Adams, G.P. (2005) - Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas. *Reprod Biol Endocrinol.* 3: 29–33.

Rasul, Z.; Anzar, M.; Jalali, S.; Ahmad, N. (2000) - Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science.*, 59: 31–41.

Rath, D.; Niemann, H. (1997) - In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculates or frozen-thawed epididimal semen obtained from identical boars. *Theriogenology.*, 47: 785-793.

Reiter, R.J. (2000) - Melatonin: Lowering the high price of free radicals. *News Physiol. Sci.*, 15: 246-250.

Rigau, T.; Piedrafita, J.; Reverter, J.; Canal, M.; Rodríguez-Gil, J.E. (1996) - The rate of l-lactate production: a feasible parameter for the fresh diluted boar semen quality analysis. *Anim. Reprod. Sci.*, 43: 161– 172.

Rijsselaere, T.; van Soom, A.; Maes, D.; de Kruif, A. (2003)- Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology*, 60: 1553-1568.

Rijsselaere, T.; van Soom, A.; Hoflack, G.; Maes, D.; de Kruif, A. (2004) - Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser. *Theriogenology.*, 62: 1292-1306.

Riker, V.; Linfor, J.; Delfino, W.J.; Kysar, P.; Scholtz, E.L.; Tablin, F.; Crowe, J.H.; Ball, B.A.; Meyers, S.A. (2006). Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid based cryoprotectants. *Biol. Reprod.*, 74: 359–365.

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

Ritar, A.J.; Salamon, S. (1991) - Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. *Small Ruminant Research*, 4(1), 29-37.

Ritar, A.J.; Mendoza, G.; Salamon, S.; White, I.G. (1992) - Frequent semen collection and sperm reserves of the male Angora goat (*Capra hircus*). *J. Reprod. Fertil.*, 95 (1): 97-102.

Robertson, S.A. (2005) - Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res.*, 322: 43-52.

Roca, J.; Martinez, E.; Vazquez, J.M.; Ruiz, S.; Coy, P. (1991) - Influencia de la edad sobre los parámetros reproductivos de machos cabríos de raza Murciano-Granadina. *Archivos de Zootecnia*, 40: 173-179.

Roca, J.; Martinez, E.; Vazquez, J.M.; Coy, P. (1992) - Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area. *Animal Reproduction Science.*, 29 (3-4): 255-262.

Roca, J.; Gil, M. G.; Hernandez, M.; Parrilla, I.; Vazquez, J.M.; Martinez, E. A. (2004) - Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *J. Androl.*, 25: 397-405.

Roca, J.; Rodriguez-Martinez, H.; Vazquez, J.M.; Bolarin, A.; Hernandez, M.; Saravia, F.; Wallgren, M.; Martinez, E.A. (2006) - Strategies to improve the fertility of frozen-thawed boar semen for artificial insemination. *Reprod Suppl.* 62: 261-275.

Rodero, A.; Rodero, E.; Herrera, M. (2009) – Conservación y sostenibilidad de las razas ovinas. Aplicación en diversas razas españolas. En *Ovinotecnia (Produccion y Economia de la Especie)*. Eds: Sañudo, C.; Cepero Briz, R. Prensas Universitarias de Zaragoza. Zaragoza, España. Pp: 105-114.

Rodríguez-Gíl, J.E.; Montserrat, A.; Rigau, T. (1994) - Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology*, 42: 815-829.

Rodríguez, I.; Dorado, J.; Hidalgo, M.; Pérez, C.C.; Corral, S.; Sanz, J. (2003) - Influencia de la circunferencia escrotal y de los factores ambientales sobre la producción seminal del macho de raza Florida. IV Congreso Ibérico de Reproducción Animal, LasPalmas de Gran Canaria, España. Pp: 67.

Rodríguez-Martínez, H. (2003) - Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod.Dom. Anim.*, 38: 312-318.

Rodríguez-Martínez, H. (2005) - Can We Increase the Estimative Value of Semen Assessment. *Reprod Dom Anim.*, 41(2): 2–10.

Rodríguez-Almeida, F.; Ávila, C.O.; Anchondo, A, Sánchez-Ramírez, B.; Jiménez, J.A. (2008) - Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. *Agrociencia-Mexico*. 42 (4): 399-406.

Romao, R.J.; Bettencourt, E.M.V.; Bettencourt, C.M.V.; Matos, C.A.P. (2003) -Efecto del tratamiento con implantes de melatonina en fertilidad de semen congelado de carneros de las razas ovinas Merina Preta y Campanica. N° XXVIII-SEOC. Badajoz, España. pp: 204-209.

Rovegno, M.; Beringui, W.; Monteiro, A.; Mota, C.; Visintin, J.A.; Ortiz, M.E. (2013) - Assessment of post-thawed ram sperm viability after incubation with seminal plasma. *Cell Tissue Bank.*, 14: 333–339.

Royère, S.; Hamamah, J.C.; Nicolle, C.; Barhelemy, J.; Lansac, J. (1988) - Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: fluorescence acridine orange staining and Feulgen-DNA cytophotometric studies. *Gamete Res.*, 21: 51-57.

Rozeboom, K.J.; Troedsson, M.H.; Hodson, H.H.; Shurson, G.C.; Crabo, B.G. (2000) - The importance of seminal plasma on the fertility of subsequent artificial inseminations in swine. *J Anim Sci.*, 78: 443–448.

Rubio-Guillén, J.; Gonzalez, D.; Garde, J.J.; Estes, M.C.; Fernández Santos, M.R.; Rodríguez-Gil, J.E.; Madrid-Bury, N.; Quintero-Moreno, A. (2007) - Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reprod. Dom. Anim.*, 42: 354-357.

Safranski, T.J.; Ford, J.J.; Rohrer, G.A.; Guthrie, H.D. (2011) - Plenary contribution to International Conference on Boar Semen Preservation. Genetic selection for freezability and its controversy with selection for performance. *Reprod Domest Anim.*, 46: 31–34.

Salamon, S.; Maxwell, W.M.C. (1995) - Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci.*, 38: 1-36.

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

Salmania, H.; Nabia, M.N.; Vaseghi-Dodarana, H.; Rahmanb, M.B.; Mohammadi-Sangcheshmehd, A.; Shakeria, M.; Towhidia, A.; Shahneha, A. Z.; Zhandia, M. (2013) - Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small Ruminant Research.*, 112: 123– 127.

Sánchez-Partida, L.G.; Setchell, B.P.; Maxwell, W.M.C. (1998) - Effect of compatible solutes and diluent composition on the post-thaw motility of ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, 10: 347–357.

Sancho, M.; Pérez-Sánchez, F.; Tablado, L.; de Monserrat, J.J.; Soler, C. (1998) - Computer assisted morphometric analysis of ram sperm heads: evaluation of different fixative techniques. *Theriogenology*, 50: 27-37.

Sañudo, C.; Folch, J. y Sierra, I. (1986) - Evolución del crecimiento testicular, tasa de L H y comportamiento sexual en los corderos prepúberes Rasa Aragonesa y cruzados Romanov x Rasa Aragonesa. ITEA. Zaragoza, España. 66: 53-61.

Schanbacher, B.B.; Lunstra, D.D. (1976) - Seasonal changes in sexual activity and serum levels of LH and testosterone in Finnish Landrace and Suffolk rams. *J Anim Sci.*, 43: 644-650.

Schembre, M.A.; Mayor, D.A.; Suttie, J.J.; Maxwell, W.M.; Evans, G. (2002) - Capacitation-like changes in equine spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, 14: 225-233.

Schmeh, M.K.; Anderson, S.P.; Vazquez, I.A.; Graham, E.F. (1986) - The effect of dialysis of extended ram semen prior to freezing on post-thaw survival and fertility. *Cryobiology*. 23: 406-414

Schroter, S.; Osterhoff, C.; McArdle, W.; Ivell, R. (1999) - The glycocalyx of the sperm surface. *Human Reproduction*, 5: 302-13.

Seaton, G.J.; Hall, L.; Jones, R. (2000) - Rat sperm 2B1 glycoprotein (PH20) contains a Cterminal sequence motif for attachment of a glycosyl phosphatidylinositol anchor. Effects of endoproteolytic cleavage on hyaluronidase activity. *Biol Reprod.*, 62: 1667-1676.

Sepúlveda, N.; Risopatrón, J.; Muller, C.; Herrera, M.; Rodero, E. (2002) - Características reproductivas y seminales de carneros Romney Marsh en latitud de 38°44' sur. N° XXVII-SEOC. Valencia, España. pp: 108-1112.

Sherins, R.J. (1991)- Clinical use and misuse of automated semen analysis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 637: 424-435.

Shoae, A. and Zamiri, M.J. (2008) - Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender. *Anim. Reprod.*, 104: 414-418.

Sikka, S.C. (2001) - Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem.*, 8: 851-862.

Silva, P.F.N.; Gadella, B.M. (2006) - Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65: 958-978.

Soler, C.; Pérez-Sánchez, F.; Schulze, V.; Bergmann, M.; Oberpenning, F.; Yeung C.H.; Cooper, T.G. (2000) - Objective evaluation of the morphology of human epididymal sperm heads. *Int. J. Androl.*, 23: 77-84.

Soler, C.; Gadea, B.; Soler, A.J.; Fernández-Santos, M.R.; Estes, M.C.; Núñez, J.; Moreira, P.N.; Núñez, M.; Gutiérrez, R.; Sancho, M.; Garde, J.J. (2005) - Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red deer sperm morphometry by computerized analysis with ISAS. *Theriogenology*, 64: 1236-1243.

Souza, C.E.; Moura, A.A.; Monaco, E.; Killian, G.J. (2008) - Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Anim Reprod Sci.* 105: 72-89.

Stradaoli, G.; Noro, T.; Sylla, L.; Monaci, M. (2007) - Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology.*, 67(7): 1249-1255.

Strzezek, J.; Hopfer, E.; Zaborniak, A. (1987) - Zinc-ion dependent protein in boar semen. II. Effects on sperm motility and antibacterial properties. *Animal Reproduction Science*, 13: 133-142.

Strzezek, J. (2002) - Secretory activity of boar seminal vesicle glands. *Biology of Reproduction*, 2:243-66.

Succu, S.; Berlinguer, F.; Pasciu, V.; Satta, V.; Leoni, G.G.; Naitana, S. (2011) - Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *J. Pineal*. 50(3): 310-318.

Sutovsky, P.; Ramalho-Santos, J.; Moreno, R. D.; Oko, R.; Hewitson, L.; Schatten, G. (1999) - On-stage selection of single round spermatids using a vital, mitochondrion-specific fluorescent probe Mito Tracker (TM) and his resolution differential interference contrast microscopy. *Hum Reprod.*, 14: 2301-2312.

Szasz, F.; Sirivaidyapong, S.; Cheng, F.P.; Voorhout, W.F.; Marks, A.; Colenbrander, B. (2000) - Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as simple method to predict the cryopreservability of dog semen. *Mol. Reprod. Dev.*, 55: 289-298.

Tan, D.X.; Manchester, L.C.; Terron, M.P. (2007) - One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res.*, 42: 28-42.

Tanyildizi, S.; Bozkurt, T.; Uftu, O.; Sakun, F. (2006) - In Vitro effects of melatonin on hyaluronidase activity and sperm motility in bull semen. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 30: 89-93.

Tejerina, F.; Domínguez, J.C.; González Urdiales, R.; Alegre, B.; Alegre, E.; Castejón, M.; Ferreras, A.; Cárdenas, S.; Bernal, S.; Campos, J. (2005) - Morphometric characterization

of the boar sperm head by using a Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) programme. *Reprod. Dom. Anim.*, 40: 368-369.

Tejerina, F. (2007) – Valoración mediante imágenes digitales del semen descongelado de verraco. Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de León. España. pp: 328.

Thérien, I.; Moreau, R.; Manjunath, P. (1999) - Bovine Seminal Plasma Phospholipid-Binding Proteins Stimulate Phospholipid Efflux from Epididymal Sperm. *Biology of Reproduction.*, 61: 590–598.

Thibier, M.; Guerin, B. (2000) - Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci*, 62: 233–251.

Thimonier J.; Mauleon P. (1969) - Variations saisonnières du comportement d'œstrus et des activités ovarienne et hypophysaire chez les ovins. *Ann. Biol. Anim Biochim. Biophys.*, 9: 233-250.

Thomas, C.A.; Garner, D.L.; DeJarnette, J.M.; Marshall, C.E. (1997) - Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod.*, 56: 991-8.

Thomas, A.D.; Meyers, S.A.; Ball, B.A. (2006) - Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology*, 65: 1531-1550.

Thurston, L.M.; Watson, P.F.; Mileham, A. J.; Holt, W. (2001) - Morphologically Distinct Sperm Subpopulations Defined by Fourier Shape Descriptors in Fresh Ejaculates Correlate With Variation in Boar Semen Quality Following Cryopreservation. *J. Andrology.*, 22: 382–394

Thurston, L.M.; Siggins, K.; Mileham, A.J.; Watson, P.F.; Holt, W.V. (2002) - Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to

genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biol Reprod.*, 66: 545–554.

Thuwanut, P.; Chatdarong, K.; Techakumphu, M.; Axner, E.(2008) -The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. *Theriogenology*, 70: 233-240.

Tonieto, R.A.; Goularte, K.L.; Gastal, G.D.A.; Schiavon, R.S.; Deschamps, J.C.; Lucia, J. (2010) - Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Ruminant Research.*, 93: 206–209.

Topfer-Petersen, E.; Januschke, E.; Schmoeckel, C.; Schill, W.B. (1984) - Ultrastructural localization of lectin binding sites of the acrosomal membrane system of boar spermatozoa. *Andrologia*, 16: 322-332.

Troedsson, M.H.T.; Desvousges, A.; Alghamdi, A.S.; Dahms, B.; Dow, C.A.; Hayna, J.; Valesco, R.; Collahan, P.T.; Macpherson, M.L.; Pozor, M.; Buhi, M.C. (2005) - Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Anim Reprod Sci.*, 89: 171–186.

Tuli, R.K.; Holtz, W. (1992) - The effect of zwitterions buffers on the freezability of Boer goat semen. *Theriogenology.*, 37: 947–51.

Vadnais, M.L.; Kirkwood, R.N.; Specher, D.J.; Chou, K. (2005) - Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. *Animal of Reproduction Science*, 90: 347-54.

Vazquez, L.; Martinez, F.; Alcaide, M.; Diazvubero, C. (1986) - Congelación del semen de morueco. *XI Jornadas Científicas de la S.E.O.C.*Madrid, España. pp: 169-176.

Vázquez, J.M.; Martínez, E.A.; Martínez, P.; García-Artiga, C.; Roca, J. (1997) - Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology*, 47: 913-922.

Verstegen, J.; Iguer-Ouada, M.; Onclin, K. (2002) - Computer assisted semen analyzer in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*., 57: 149-179.

Vidal, A.H.; Batista, A.M.; Bento da Silva, E.C.; Gomes, W.A.; Pelinca, M.A.; Silva, S.V.; Pessoa Guerra, M. (2013) - Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*., 109: 47– 51.

Vijil, E.; Gonzalo, C.; Ruiz-Poveda, J.; Ciudad, C. (1986) - Evolución estacional del diámetro testicular en el ovino Karakul: Repercusión sobre el comportamiento copulatorio y características seminales. CENSYRA de Valdepeñas, pp: 132-149.

Villemure, M.; Lazure, C.; Manjunath, P. (2003) - Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol.*, 1: 39–48.

Waberski, D. (2007) – Espermatrozoide y plasma seminal. En: Manual de inseminación artificial de los animales domésticos y de explotación zootécnica. Eds. Bush, W.; Waberski, D. Acribia, S.A. Zaragoza (España). pp: 91-97.

Walkden-Brown, S.W.; Restall, B.J.; Taylor, W.A. (1994) - Testicular and epididymal sperm content in grazing Cashmere bucks: seasonal variation and prediction from measurements in vivo. *Reprod. Fertil.*, 6(6): 727-736.

Wall, R.J.; Foote, R.H.; (1999) - Fertility of bull sperm frozen and stored in clarified egg yolk-Tris-glycerol extender. *J. Dairy Sci.*, 82: 817–821.

Wang, C.; Leung, A.; Tsoi, W.L.; Leung, J.; Ng, V.; Lee, K.F.; Chan, S.Y. (1991)- Computer-assisted assessment of human sperm morphology: comparison with visual assessment. *Fertil. Steril.*, 55: 983-988.

Waterhouse, K.E.; Hofmo, P.O.; Tverdal, A.; Miller, R.R. (2006) - Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction.*, 131: 887-894.

Watson, P.F.; Martin, I.C.(1975) - The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 degrees . *Aust J Biol Sci.*, 28: 145-52.

Watson, P.F. (1979) - The preservation of semen in mammals. In: Oxford Reviews of Reproductive Biology, Finn, C.A. (ed), Oxford University Press, Oxford, pp 283-350.

Watson, P.F. (1981) - The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Effects of Low Temperatures on Biological Membranes. G.J.Morris & A.Clark, eds. Academic Press, New York, pp: 189-218.

Watson, P. F.; Anderson, W. (1983) - Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. *J. Reprod. Fertil.* 69:229-235.

Watson, P.F. (1990) - Artificial insemination and the preservation of semen. En: "Marshall's physiology of reproduction. 4th edition. Vol. 2: Reproduction in the male". Ed: Lamming, G.E. Churchill Livingstone, New York, EEUU. pp: 747-869.

Watson, P.F. (1995) - Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fert Dev.*, 7: 871-891.

Watson, P.F. (1996) - Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod Dom Anim.*, 31: 135-140.

Watson, P.F. (2000) - The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.*, 60-61: 481-492.

Watson, P.F. (2001) - Towards an understanding of cryo-injury in spermatozoa and its influence on subsequent fertilizing ability. En: "5th Annual Conf. European Soc. Dom. Anim. Reprod." Viena, Austria. ESDAR newsletter., 6: 24-25.

Webster, J.R.; Suttie, J.M.; Veenvliet, B.A.; Manley, T.R.; Littlejohn, R.P. (1991) - Effect of melatonin implants on secretion of luteinizing-hormone in intact and castrated rams. *Journal of Reproduction and Fertility*, 92: 21-31.

Welzels, A.M.; Janssen, H.J.; Goverde, H.J.; Bastiaans, B.A.; Takahashi, K.; Rolland, R. (1993)- The influence of sperm density on the motility characteristics of washed human spermatozoa. *Int. J. Androl.*, 16: 15-19.

Wiemer, K.E.; Ruttle, J.L. (1987) - Semen characteristics, scrotal circumference and bacterial isolates of fine wool range rams. *Theriogenology.*, 28: 625-637.

Woelders, H. (1990) - Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. *Reprod. Dom. Anim.*, 145:164.

Woelders, H. (1997) - Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Vet. Quart.*, 19: 135-138.

World Health Organization (WHO). (1999) - WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Ed: World Health Organization. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra.

Yanagimachi, R. (1988) - Mammalian fertilization. In: The physiology of reproduction. Ed. E Knobil and JD Neill. Raven Press, New York., pp: 135-185.

Yanagimachi, R. (1994) - Mammalian fertilization. In: The physiology of reproduction. Second Edition. Ed. E Knobil and JD Neill. Raven Press Ltd, New York, 189-317.

Yániz, J.L.; Marti, J.I.; Silvestre, M.A.; Folch, J.; Santolaria, P.; Alabart, J.L.; Lopez-Gatius, F. (2005) Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15 degrees C on their survival and penetrating capacity. *Theriogenology*, 64: 1844–1851.

Yániz, J.L.; Santolaria, P.; Marco-Aguado, M.A.; López-Gatius, F. (2008) - Use of image analysis to assess the plasma membrane integrity of ram spermatozoa in different diluents. *Theriogenology*, 70: 192–198.

Yániz, J.L.; Mateos, J.A.; Santolaria, P. (2011) - Zwitterionic buffers preserve ram semen quality more efficiently than TRIS during storage at 15 °C. *Small Ruminant Research*, 95: 54–60.

Yildiz, C.; Kaya, A.; Aksoy, M.; Tekeli, T. (2000) - Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 54: 579–585.

Yildiz, C.; Bozkurt, Y.; Yavas, I. (2013) - An evaluation of soybean lecithin as an alternative to avian egg yolk in the cryopreservation of fish sperm. *Cryobiology*, 67: 91–94.

Zaneveld, L.J.D. y Jeyendran, R.S. (1990) - Hypoosmotic swelling test. En: “*Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility*”. Eds: Keel, B.A. y Webster, B.W. CRC press, Boca Ratón, Florida, EEUU. pp: 91-110.

Zarazaga, L.A.; Malpoux, B.; Bodin, L.; Chemineau, P. (1998) -The large variability in melatonin blood levels in ewes is under strong genetic influence. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 37: 607-610.

Zhang, S.S.; Hu, J.H.; Li, Q.W.; Jian, W.L.; Zhang, X.Y. (2009) - The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *African Journal of Biotechnology*., 8 (22): 6476-6480.

8. ANEXOS

8. ANEXOS

Tabla 1. Composición química de la yema de huevo en polvo

COMPOSICION QUIMICA	valor típico	Unidades
Humedad	4 %	
Energía	663	Kcal/100g
Proteínas	30	g/100g
Carbohidratos	0.7	g/100g
Lípidos	60	g/100g
Ác. Grasos saturados	20.3	g/100g
Ác. Grasos monoinsaturados	25.3	g/100g
Ác. Grasos poliinsaturados	7.3	g/100g
Colesterol	2.6	g/100g
Tiamina	0.29	mg/100g
Riboflavina	0.4	mg/100g
Equivalentes de Niacina	4.2	mg/100g
Vitamina B6	0.3	mg/100g
Vitamina B12	5	µg/100g
Vitamina C	0	mg/100g
Vitamina A (Eq. de Retinol)	2740	UI/100g
Vitamina D	285	UI/100g
Vitamina E (Eq. α- tocoferol)	9.1	mg/100g
Vitamina K	2	µg/100g
Biotina	53	µg/100g
Calcio	267	mg/100g
Fósforo	590	mg/100g
Hierro	7.2	mg/100g
Iodo	0.25	mg/100g
Zinc	7	mg/100g
Magnesio	0.19	mg/100g
Sodio	51	mg/100g
Potasio	243	mg/100g
Selenio	19	mg/100g
Bacteriológicas		
pH	5.5 - 7.0	
Recuento total aerobios/gr.	10.000 ucf/gr. Máximo	
Enterobacterias/gr.	10 máximo	
Salmonela/ 50 gr.	Ausencia	
Estafilococos aureus/gr.	Ausencia	
Organolépticas	Olor, color y sabor característicos	

NIVE: Nunspeet Hodland Eiproducten.