

**OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE
CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN CAPRINO DE LA RAZA
AUTÓCTONA EN PELIGRO DE EXTINCIÓN BLANCA DE
RASQUERA**

ABIGAIL TABAREZ ROJAS

TESIS DOCTORAL

Programa: Medicina i Sanitat Animals

Facultat de Veterinària

Universitat Autònoma de Barcelona

2014



Universitat Autònoma de Barcelona

**Optimizació del protocol de crioconservació de semen
caprino de la raza autóctona en peligro de extinció
Blanca de Rasquera**

Abigail Tabarez Rojas

Tesis doctoral

Directora: María Jesús Palomo Peiró



Facultat de Veterinària

Departament de Medicina i Cirurgia Animals

Barcelona, 2014



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Medicina i Cirurgia Animals

Dra. María Jesús Palomo Peiró, Profesora Titular del Departament de Medicina i Cirurgia Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona

Certifica:

Que la tesis titulada “Optimización del protocolo de crioconservación de semen caprino de la raza autóctona en peligro de extinción Blanca de Rasquera”, presentada por **Abigail Tabarez Rojas** 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), Septiembre de 2014.

Dra. María Jesús Palomo Peiró

Directora

Dedicado

A mis padres y hermanos

AGRADECIMIENTOS

A María Jesús Palomo Peiró, gracias Xus por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto de investigación y por la orientación que me has brindado en estos años.

A Wilber, mi compañero de batalla en este mundo de la investigación.

A los profesores de la Unidad de Reproducción, que de alguna manera han contribuido en mi formación doctoral.

A los becarios que han estado en Repro, gracias por la convivencia.

Al jefe del Laboratorio de Reproducción... Alex, gracias por tu ayuda, conversaciones, etc.

A Manuela Costa, jefa de la Unidad de Citometría, gracias Manu por todas las facilidades otorgadas y por transmitirme tus conocimientos. Mi paso por la unidad fue estresante pero con mucho aprendizaje... lo disfrute enormemente.

Al personal del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), por colaborar en la medida de lo posible en el desarrollo de este proyecto y por cuidar a los sementales.

A mis amigas más cercanas Carolina C, Carolina Paz, Kifa y Sondes, por las conversaciones, los viajes, etc, etc.

A Montse y su familia, gracias por la convivencia tan cercana... me hicieron sentir como un miembro más de la familia.

Al Comisionado para Universidades e Investigación (CUR) del Departamento de Innovación, Universidades y Empresas (DIUE) de la Generalitat de Catalunya y del Fondo Social Europeo por el financiamiento otorgado para mi contratación como personal investigador novel (FI-DGR).

Al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología agraria y Alimentaria (INIA) por el financiamiento otorgado para desarrollar el proyecto RZ2009-00008-00-00.

Mientras los hombres sean libres para preguntar lo que deben; libres para decir lo que piensan; libres para pensar lo que quieran; la libertad nunca se perderá y la ciencia nunca retrocederá.

Robert Oppenheimer (1904-1967)

CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| CAPÍTULO II. OBJETIVOS | 9 |
| CAPÍTULO III. REVISIÓN DE LITERATURA | 13 |
| 3.1 Descripción de la cabra Blanca de Rasquera | 15 |
| 3.2 Características del semen de caprino | 16 |
| 3.2.1 Estructura del espermatozoide | 17 |
| 3.2.2 Plasma seminal | 17 |
| 3.3 Pruebas de valoración de la calidad espermática | 19 |
| 3.3.1 Concentración espermática | 20 |
| 3.3.2 Motilidad espermática | 20 |
| 3.3.3 Morfología espermática | 23 |
| 3.3.4 Integridad de la membrana plasmática del espermatozoide | 25 |
| 3.3.5 Integridad del acrosoma | 27 |
| 3.3.6 Marcaje de la vaina mitocondrial | 29 |
| 3.3.7 Detección de cambios relacionados con el proceso de apoptosis | 30 |
| 3.3.8 Estrés oxidativo y especies reactivas al oxígeno (ROS) | 32 |
| 3.3.9 Valoración de la capacitación | 33 |
| 3.4 Conservación de espermatozoides de caprino | 35 |
| 3.4.1 Medios de conservación espermática | 35 |
| 3.4.2 Refrigeración de semen de caprino | 48 |
| 3.4.3 Congelación de semen de caprino | 48 |
| CAPÍTULO IV. MATERIAL Y MÉTODOS | 53 |
| 4.1 Ubicación del área de estudio | 55 |
| 4.2 Adiestramiento de los sementales | 55 |
| 4.3 Tipo de sementales | 55 |
| 4.4 Diluyente base o control | 55 |

| | | |
|--|---|-----|
| 4.5 | Eliminación del plasma seminal o lavado | 56 |
| 4.6 | Protocolo de congelación y descongelación | 56 |
| 4.7 | Análisis de la viabilidad y funcionalidad espermática | 56 |
| 4.8 | Análisis computarizado de la motilidad espermática | 57 |
| 4.9 | Análisis computarizado de la morfometría espermática | 58 |
| 4.10 | Análisis seminal por citometría de flujo | 59 |
| 4.11 | Análisis estadístico | 61 |
| CAPÍTULO V. RESULTADOS | | 63 |
| Estudio 1. | Efecto del tipo de yema de huevo, eliminación del plasma seminal y edad del donante en la conservación de espermatozoides de caprino. | 65 |
| Estudio 2. | Estudio de la substitución del crioprotector de origen animal y optimización del protocolo de crioconservación | 99 |
| Estudio 3. | Determinación del crioprotector no penetrante y valoración del antioxidante BHT | 133 |
| Estudio 4. | Valoración de la evolución de la calidad seminal y uso de antioxidantes e implantes subcutáneos de melatonina | 159 |
| CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN GENERAL | | 202 |
| CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES | | 216 |
| CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | | 220 |

RESUMEN

El objetivo principal de la presente tesis doctoral fue optimizar la crioconservación de semen caprino de la raza Blanca de Rasquera. Para ello, se diseñaron 4 estudios. En el primer estudio se evaluó la sustitución de la yema de huevo fresco por yema de huevo en polvo (YHP), para reducir el riesgo de contaminación microbiológica del diluyente, así como el efecto de la yema de huevo fresco clarificado obtenida por centrifugación ultrarrápida. Simultáneamente, se evaluó la presencia de plasma seminal en la congelabilidad espermática de donantes de uno y dos años de edad. En el segundo, se estudió la sustitución de los crioprotectores penetrante (glicerol *vs* trehalosa) y no penetrante (YHP *vs* lecitina de soja (LS)), así como la inclusión del antioxidante BHT y el tampón zwitteriónico Test, en lugar del Tris, en los diluyentes. En el tercer trabajo, se analizó la lecitina de soja como alternativa viable en la conservación de espermatozoides caprinos en presencia de plasma seminal, así como la concentración óptima del antioxidante BHT en los diluyentes a base de YHP o LS. Por último, en el cuarto estudio se valoró la calidad espermática a lo largo de todo el año, la adición de antioxidantes (BHT o melatonina) en los diluyentes y la aplicación de implantes de melatonina en los sementales en primavera, además de valorar el efecto de la edad y del individuo en la congelabilidad de los espermatozoides caprinos.

Tras un complejo análisis de la calidad de los espermatozoides durante su conservación, podemos concluir que la yema de huevo en polvo puede sustituir a la yema de huevo fresco en la congelación de semen caprino, ya que, independientemente de la edad del donante, no se observó superioridad alguna en ningún tipo de yema de huevo analizadas, aunque permaneciendo la necesidad de eliminar el plasma seminal cuando está presente al 15%. Tampoco la yema de huevo clarificada supuso ninguna mejora, pero sí desventajas a la hora de elaborar los diluyentes. Respecto al uso de la lecitina de soja como crioprotector, ésta podría ser una alternativa viable a incorporar en los medios de refrigeración sin la necesidad de eliminar el plasma seminal. No obstante, tras la crioconservación de espermatozoides lavados y no lavados, en diluyentes a base de LS, la viabilidad espermática fue inferior, observándose una población espermática con membranas intactas

pero sin función mitocondrial mayor respecto a los espermatozoides conservados con YHP. En cuanto a la sustitución del crioprotector penetrante y del sistema tampón, el glicerol y el tampón Tris continúan siendo las mejores alternativas en la conservación espermática caprina. La inclusión de BHT como antioxidante en los diluyentes apenas mostró efecto alguno, así como tampoco se observaron diferencias significativas al utilizar diferentes concentraciones de BHT (0.6, 2.0 y 5.0 mM) tras la conservación, tanto en los medios a base de YHP como de LS, aunque en éstos últimos, de nuevo, se observó un notable incremento de espermatozoides con membrana plasmática y acrosomal intactas pero sin función mitocondrial. Finalmente, tras recopilar los resultados obtenidos a lo largo de dos años de experimental, observamos que la viabilidad de los espermatozoides frescos fue superior a los 18 y 30 meses de edad en fotoperiodo positivo (final de la primavera) respecto a los 14 y 25 meses de edad en fotoperiodo negativo (final del otoño). El uso de implantes de melatonina en primavera afectó negativamente la viabilidad y resistencia al shock hipoosmótico del semen fresco y refrigerado, así como la motilidad total en los refrigerados. Por último, existen diferencias entre individuos tanto en el semen fresco como refrigerado y descongelado, identificando tres tipos de individuos: buenos, moderados y malos congeladores.

ABSTRACT

The main objective of present doctoral thesis was to optimize the semen cryopreservation of goat from Blanca de Rasquera breed. For this, four studies were designed. In the first study we assessed the replacement of fresh egg yolk by powdered egg yolk (PEY), to reduce the risk of microbiological contamination of extender, and the effect of the clarified fresh egg yolk obtained by centrifugation. Simultaneously, we also assessed the effect of the presence of seminal plasma on sperm freezability from males of one and two years old. In the second study, the aim was to substitute the penetrating cryoprotectants (glycerol *vs* trehalosa) and non-penetrating (PEY *vs* soybean lecithin (SL)), and the inclusion of the antioxidant BHT and Test zwitterionic-buffer, instead of Tris, in the extenders. The aims of third study were to determine whether SL-based media is a viable alternative in the preservation of goat sperm in the presence of seminal plasma and to determine the optimal concentration of the antioxidant BHT in PEY or SL-based media. Finally, the fourth study was conducted to assess sperm quality throughout the year, the addition of antioxidants (BHT or melatonin) in the extenders, and the application of melatonin implants in males in spring. In addition, we assessed the effect of donor age and the individual in the freezability of goat sperm.

After a complex analysis of sperm quality during preservation, we can conclude that the PEY can be used in place of fresh egg yolk in the extenders for cryopreservation goat semen, since, regardless of donor age, there was not superiority in any of the egg yolk types, remaining the need to remove seminal plasma when the medium containing 15% egg yolk. The use of clarified egg yolk did not confer any benefit to the fresh egg yolk, complicated the process of drawing up preservation media. Regarding the use of SL as a cryoprotectant, this could be a viable alternative to incorporate in preservation at 5°C media, without the need to remove seminal plasma. However, after cryopreservation of washed and unwashed sperm, in LS-based media, sperm viability was low and the population of sperm with intact plasma and acrosomal membranes, but without mitochondrial function was high compared with sperm preserved PEY. Related to the replacement of penetrating cryoprotectant and the buffer, Tris-buffer system and glycerol

were still the best alternative in preserving goat sperm. The inclusion of BHT as an antioxidant in extenders showed hardly any effect, nor when using different concentrations of BHT (0.6, 2.0 and 5.0 mM) after preservation, in PEY or SL-based media, although in the latter, again were observed a significant increase of spermatozoa with intact plasma and acrosomal membranes, but without mitochondrial function. Finally, after compiling the results throughout two years of experimental period, we observed that the viability and resistance to hypoosmotic shock of fresh spermatozoa was higher at 18 and 30 months old males during positive photoperiod (late spring) compared to the 14 and 25 months old males during negative photoperiod (late autumn). The use of melatonin implants in spring negatively affected the viability and hypoosmotic shock resistance of fresh and cooled semen, and the total motility in cooled semen. Finally, individual effect exists on buck sperm cryopreservation, identifying 3 types of males: good, average and bad freezers.

Capítulo I.
INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas es una constante el vertiginoso ritmo de extinción que están sufriendo numerosas razas de animales domésticos, aproximadamente el 20 por ciento se encuentra en peligro de extinción, desapareciendo una raza al mes. De las 7600 razas registradas en la base de datos de la FAO sobre recursos genéticos de animales domésticos, se han extinguido al menos 190 en los últimos 15 años y otras 1500 se consideran al borde de la extinción (Buerkle, 2008). Las especies más afectadas son aquellas bajo un sistema de producción intensivo o muy intensificado como aves, cerdos y/o bovinos de leche. Sin embargo, las razas locales o autóctonas no escapan a esta situación, de hecho en Cataluña ya se han extinguido diversas razas de animales domésticos entre las que se encuentran el aballo catalán, conejo del Penedès, cerdo catalán, abra catalana y las vacas catalana, italiana, ardana y entirón de l'Aura (Parés *et al.*, 2006).

Actualmente, la cabra Blanca de Rasquera se encuentra en peligro de extinción. De acuerdo con el último censo poblacional tan solo hay 6000 ejemplares de los 30000 que se llegaron a contabilizar en la década de los cincuenta. El futuro de la Cabra Blanca de Rasquera es complicado, pues la mayoría de las explotaciones pertenecen a ganaderos que no pueden garantizar la continuidad del rebaño, debido al desinterés de las nuevas generaciones por este modo de vida (Jordana *et al.*, 2010). Sin embargo, el rescate de la cabra Blanca de Rasquera es importante porque, por lo general las razas autóctonas pertenecen a troncos genéticos muy alejados de las razas industriales y, por tanto, son el depósito de una diversidad genética que merece la pena conservar (Parés *et al.*, 2006; Torres, 2007). Además, las razas autóctonas representan la mejor opción para el aprovechamiento económico de recursos de baja calidad o terrenos de menor productividad, al ser explotadas mayoritariamente en régimen extensivo. En pastoreo constituyen el elemento ideal para el establecimiento y preservación de sistemas sostenibles de producción ganadera, contribuyendo destacadamente al mantenimiento de ecosistemas de gran valor paisajístico y medioambiental (Torres, 2007).

Con el objetivo de conservar esta raza en peligro de extinción y de acuerdo con lo dispuesto por la FAO (1992) se ha establecido un programa de conservación y mantenimiento que

consta de una serie de fases: descripción general de la población, caracterización racial, conservación “*in situ*”, conservación “*ex situ*” y finalmente el programa de mejora genética. El presente estudio, se encuadra dentro del proyecto “Creación de un banco de semen de razas autóctonas en peligro de extinción de ovino y caprino: Xisqueta, Aranosa y Blanca de Rasquera a partir de la selección genética temprana de los reproductores”, propone iniciar el programa de conservación “*ex situ*”, mediante el almacenamiento criogénico de semen de machos seleccionados por su capacidad de aportación de variabilidad genética a la raza.

Sin embargo, la calidad seminal varía en función de diversos factores tales como el tamaño testicular, gonadotropinas circulantes, raza, edad, individuo, medio ambiente (longitud de la luz del día, temperatura y humedad) y manejo (Iritani *et al.*, 1964; Chemineau, 1986; Ritar y Salamon, 1991; Karagiannidis *et al.*, 2000; Barkawi *et al.*, 2006). Así, los machos cabríos de raza Alpina, en su hábitat natural producen semen de buena calidad hacia los 6 meses de vida (Roca *et al.*, 1991), mientras que en las razas Damasco (Al-Ghalban *et al.*, 2004) o Murciano-Granadina (Roca *et al.*, 1991) esta situación no se observa hasta edades superiores. Aunque, la longitud del día parece ser el factor principal que afecta la calidad del semen en los machos cabríos (Barkawi *et al.*, 2006), para contrarrestar los efectos negativos del fotoperiodo creciente es habitual el uso de implantes de melatonina, porque se incrementa el diámetro testicular (García-Pastor *et al.*, 2004) y la capacidad fecundante (Palacín *et al.*, 2006), además de mejorar la congelabilidad del semen (Kaya *et al.*, 2001).

También se ha evidenciado que, en especies como el bovino (Parkinson y Whitfield, 1987), equino (Loomis y Graham, 2008) y porcino (Thurston *et al.*, 2002a), la susceptibilidad de los espermatozoides a los daños por la congelación varía entre individuos, independientemente de la calidad de los espermatozoides antes del proceso de congelación, el semen de ciertos individuos congelará mal, lo que resulta en mala motilidad, daño de las membranas plasmática y acrosomal y, por tanto reducida capacidad fecundante (Thurston *et al.*, 2002b).

Por otro lado, la crioconservación de espermatozoides en la especie caprina, no se ha logrado realizar de forma del todo satisfactoria, debido a la presencia de las secreciones de las glándulas bulbouretrales, las cuales interaccionan con la yema de huevo o leche presentes en la mayoría de los medios de crioconservación, produciendo sustancias tóxicas para el espermatozoide (Iritani *et al.*, 1964) y por tanto, reduciendo el éxito de la congelación (Leboeuf *et al.*, 2000). Así, todos los esfuerzos destinados a optimizar el protocolo de congelación espermática en esta especie, valorando mediante un análisis integral la viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides conservados, podría contribuir destacadamente en garantizar, en un futuro, la pervivencia exitosa de la cabra Blanca de Rasquera.

Con este fin, se ha planteado la eliminación y sustitución de componentes de origen animal de los medios de conservación espermática. En concreto, la posibilidad de sustituir la yema de huevo fresco resulta muy deseable, dada la composición heterogénea entre lotes de huevos junto con el potencial riesgo de contaminación bacteriana. Para tratar de minimizar estos efectos existen diferentes alternativas como el uso de yema de huevo en polvo pasteurizada (Marco-Jiménez *et al.*, 2004), lecitinas de origen vegetal como la lecitina de soja (Vidal *et al.*, 2012) o componentes como el hidroxitolueno butilado (BHT; Khalifa *et al.*, 2008). No obstante, dado que el efecto crioprotector de la yema de huevo está determinado básicamente por las lipoproteínas de baja densidad (LDL), el uso de yema de huevo fresco clarificado (obtenida por centrifugación ultrarrápida) donde se concentra la mayor parte de LDL, beneficiaría la viabilidad espermática post-descongelación, siendo demostrado su uso efectivo como crioprotector no penetrante en caballos (Pillet *et al.*, 2011), cerdos (Jiang *et al.*, 2007), toros (Moussa *et al.*, 2002) y moruecos (Tonieto *et al.*, 2010). Todas las alternativas mencionadas parecen presentar prometedoras cualidades para sustituir la yema de huevo fresco, lo que podría suponer una mejora sustancial en la optimización del protocolo de crioconservación de los espermatozoides.

La sustitución del crioprotector penetrante también resulta interesante, ya que tradicionalmente se ha utilizado glicerol en los diluyentes para congelación espermática;

sin embargo, es potencialmente citotóxico (Salamon y Maxwell, 1995a). Por tanto, se deben buscar crioprotectores que mejoren esta condición. Algunos estudios demuestran que, la trehalosa puede ser utilizada como crioprotector al promover la deshidratación celular, reduciendo los efectos negativos del flujo de agua durante la congelación y de la formación de cristales de hielo. También interactúa con los fosfolípidos y proteínas de la membrana proporcionándole mayor flexibilidad contra el daño celular provocado por la congelación (Aboagla y Terada, 2003).

Otro aspecto crucial en la crioconservación del semen es la solución tampón y la interacción de ésta con los azúcares presentes en el medio. Una solución tampón ideal para los diluyentes debería tener una gran capacidad tamponadora independientemente de la temperatura, en el rango de pH del espermatozoide funcional, ser atóxico y neutral para las células y no reaccionar con otros componentes del diluyente (Yániz *et al.*, 2011). Generalmente los tampones Tris o citrato de sodio son incluidos como componentes básicos de los diluyentes de crioconservación espermática (Purdy, 2006). Sin embargo, recientemente se ha sugerido que la inclusión de tampones zwitterionic mejora la calidad *in vitro* de los espermatozoides de ovino tras la descongelación y que la fertilidad es comparable a la obtenida cuando se utiliza Tris como sistema tampón (Yániz *et al.*, 2011). En semen refrigerado de caprino también se confirma que tampones como Tes, Hepes o Mops pueden ser una buena alternativa para ser incluidos en la composición de los diluyentes (Purdy, 2006).

La suplementación del medio de crioconservación con enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, citocromo *c* y glutatión peroxidasa) o antioxidantes propiamente dichos (glutatión, ditiotreitól, vitamina E, melatonina e hidroxitolueno butilado) se ha estudiado ampliamente durante los últimos años, ya que el proceso de crioconservación espermática produce daño oxidativo, reduciendo la calidad del semen post-descongelación (Salamon y Maxwell, 1995a; Holt, 2000; Cebrián *et al.*, 2010; Memon *et al.*, 2011), con lo cual la inclusión de estas enzimas o antioxidantes en el medio puede ayudar en la protección de las células espermáticas frente al daño inducido por los radicales libres que se producen durante el proceso de congelación-descongelación.

Por otro lado, la determinación de los indicadores de calidad espermática mediante la integración de técnicas de análisis rutinario tales como motilidad masal, vitalidad y morfología con métodos más recientes de análisis seminal como el sistema computarizado CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*) para motilidad y morfometría espermática, el test hipoosmótico (*hypoosmotic swelling test Host*) como prueba de funcionalidad de la membrana plasmática combinado con citometría de flujo para determinar la integridad de las membranas plasmática y acrosomal o la función mitocondrial, entre otros parámetros, nos permitiría indicar la viabilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides tras la descongelación y dar la pauta para predecir la fertilidad potencial del semen.

En definitiva, aquí proponemos que el estudio de diversas estrategias de crioconservación junto a la integración de diferentes análisis laboratoriales nos ayudará a la creación de un banco de semen potencialmente fértil que aseguraría la pervivencia de la cabra Blanca de Rasquera.

Capítulo II.
OBJETIVOS

General:

Optimizar el protocolo de congelación de semen de caprino y valorar mediante un análisis integral la viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides para asegurar su supervivencia tras la descongelación y, en última instancia, la conservación exitosa de la cabra Blanca de Rasquera.

Específicos:

1. Estudiar la sustitución del crioprotector de origen animal por otros crioprotectores, con el fin de reducir la heterogeneidad y posible contaminación bacteriana del medio de conservación espermática.
2. Valorar la necesidad de eliminar el plasma seminal en el semen caprino previamente a la conservación.
3. Optimizar los protocolos de congelación de semen de macho cabrío mediante la adición de antioxidantes y la inclusión de tampones Zwitterionic en el medio de conservación espermática.
4. Estudiar el efecto de la edad y época del año sobre la calidad espermática en fresco y tras su conservación.
5. Evaluar la calidad espermática en animales con y sin implantes de melatonina durante el fotoperiodo positivo.
6. Establecer un método laboratorial de valoración de la viabilidad e integridad funcional de los espermatozoides.

Capítulo III.
REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 DESCRIPCIÓN DE LA CABRA BLANCA DE RASQUERA

La cabra Blanca de Rasquera, cabra de Rasquera o cabra Blanca debe su nombre al color del pelaje, ya que inicialmente el blanco predominaba sobre otras tonalidades, aunque en la actualidad, la capa predominante es el negro sobre fondo blanco (Francesch *et al.*, 2002; Vidilla, 2008).

Todavía considerada como una agrupación racial al no estar reconocida oficialmente como raza, es la única población caprina autóctona de Cataluña, por lo que constituye el último reducto de patrimonio genético caprino en esta comunidad autónoma. De aptitud cárnica, es destinada principalmente a la producción de cabritos, destacando por su gran rusticidad, lo que ha permitido su adaptación a las condiciones orográficas y climatológicas de las comarcas del sur de Cataluña (Tierras del Ebro; Jordana *et al.*, 2009; Jordana *et al.*, 2010).

El origen de esta agrupación racial es confuso, sin embargo, los habitantes confirman la presencia de estos animales, de capa policromada en negro sobre fondo blanco o totalmente blanco, desde principios de siglo XX (Carné *et al.*, 2007; Jordana *et al.*, 2009). Su origen filogenético también es incierto, posiblemente proviene del ancestro prehistórico *Capra prisca* con influencia de la *Capra aegagrus*, especialmente de la forma pirenaica (Jordana *et al.*, 2010).

La cabra Blanca de Rasquera integra el grupo de las “cabras serranas”, destacando por su rusticidad y adaptación al medio montañoso en que viven. La mayor parte del año se explotan en régimen extensivo y la base de su alimentación la constituye el sotobosque y el matorral (Torres, 2007; Jordana *et al.*, 2009).

La producción de cabritos de excelente calidad es la principal actividad económica de los ganaderos. La edad límite para el sacrificio es a los dos meses de edad, con peso vivo entre 7 y 10 kg, adecuándose así a la demanda generalizada del mercado de canales ligeras y carne blanca y tierna. En los últimos años ha vuelto a resurgir un producto de elaboración artesanal, antigua y muy tradicional en las comarcas meridionales de Cataluña, llamado

“ restó de abra Blanca”, se trata de un plato escabechado de macho castrado de tres años de edad que potencia la gastronomía turística (Jordana *et al.*, 2009).

Esta agrupación racial, tanto en sus orígenes como en su expansión, ha ocupado siempre las cinco comarcas más meridionales de Catalunya, conocidas con el nombre genérico de Tierras del Ebro, se trata de Ribera d’Ebre, Baix amp, Baix Ebre, Terra Alta, y ont sià, habiéndose extinguido en esta última y en las cuatro restantes permanece con una distribución muy desigual (Francesch *et al.*, 2002; Torres, 2007; Jordana *et al.*, 2009, Jordana *et al.*, 2010).

La década de los 50 representó la época de mayor esplendor, ya que su censo superaba los 30000 ejemplares en las comarcas Tarraconenses. Actualmente, su número se ha reducido notablemente y no sobrepasa los 6000 ejemplares (Jordana *et al.*, 2010). La situación es crítica y el futuro poco esperanzador. Lo más preocupante es el reducido número de ganaderos (12), la elevada media de edad de los mismos (53 años) y el escaso relevo generacional (16.7%) que sitúa a esta agrupación racial en grave peligro de extinción. Por otro lado, la baja rentabilidad que caracteriza a estas explotaciones, los reducidos niveles de inversión y lo poco atractivo que resulta este tipo de trabajo dificulta la contratación de trabajadores, con lo cual la gestión de la raza y su conservación se complica. En el año 2003 se inició un Programa de Conservación, financiado por el DARP (Generalitat de Catalunya) en colaboración con la Facultad de Veterinaria de Barcelona para analizar y caracterizar racialmente esta agrupación y se ha elaborado una propuesta de estándar racial como base para iniciar los trabajos de publicación del Libro Genealógico (Carné *et al.*, 2005; Torres, 2007; Jordana *et al.*, 2009).

3.2 CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE CAPRINO

El semen de macho cabrío es de color blanco grisáceo o amarillento, pudiendo variar de un eyaculado a otro, aún en el mismo semental. El volumen de eyaculado en promedio es 1.2 mL, pero éste depende de la edad, condición del animal, frecuencia y método de recogida. La concentración espermática va desde 3.5 hasta 6 mil millones de espermatozoides por

mililitro y la consistencia varía desde clara-acuosa hasta cremosa espesa, dependiendo de la relación de contenido entre sus dos constituyentes, espermatozoides y plasma seminal (Evans y Maxwell, 1990, Arrebola, 2012).

3.2.1 Estructura del espermatozoide

El espermatozoide es la célula germinal masculina, altamente especializada, que ha evolucionado para cumplir una función biológica compleja, fecundar al ovocito. Se trata de una célula haploide, producto final del proceso de la gametogénesis en el macho, portadora de la información genética paterna (Evans y Maxwell, 1990; Hidalgo, 2004; Blanco y García, 2004).

En el espermatozoide se distinguen tres partes: la cabeza que contiene los cromosomas responsables de portar la información genética, la pieza de conexión o cuello y la cola que es el órgano locomotor del espermatozoide (Evans y Maxwell, 1990).

La estructura general es muy similar en la mayoría de las especies animales; sin embargo, su morfología externa es específica para cada especie. La longitud de los espermatozoides va desde 60 μm en cerdos y caballos hasta 75 μm en rumiantes (Blanco y García, 2004; Wrobel y Bergmann, 2006; Reece, 2010). Particularmente, el espermatozoide de macho cabrío tiene una longitud de 60 μm y la cabeza mide de 8 a 10 μm de largo, 4 μm de ancho y 1 μm de grosor (Evans y Maxwell, 1990).

La **cabeza del espermatozoide** difiere en su forma según la especie, en el macho cabrío, morueco, toro, cerdo y caballo es plana y ovoide; en el humano es aplastada y elipsoide; en la rata es falciforme y en el gallo es delgada y alargada (Bonet *et al.*, 2000; Hafez y Hafez, 2002; Blanco y García, 2004; Hidalgo, 2004; Wrobel y Bergmann, 2006).

3.2.2 Plasma seminal

El plasma seminal de los mamíferos es una secreción fisiológica de múltiples glándulas del tracto reproductor masculino que juega un papel importante en la maduración final de los espermatozoides (Muiño-Blanco *et al.*, 2008).

Es un líquido isotónico y neutro, compuesto principalmente por agua (75%), sustancias orgánicas (fructosa, sorbitol, inositol, ácido cítrico, glicerilfosforilcolina, fosfolípidos, prostaglandinas y proteínas) e inorgánicas (sodio, potasio y cloro) que sirven de protectores y nutrientes de los espermatozoides (Evans y Maxwell, 1990; Reece, 2010). Curiosamente, los componentes orgánicos tienen un papel fundamental en el mantenimiento de la presión osmótica del semen, más que los iones inorgánicos, aunque se encuentren cantidades considerables de estos últimos en el plasma seminal (Evans y Maxwell, 1990). Los componentes orgánicos también son esenciales para mantener el metabolismo espermático y el pH, siendo las proteínas los contribuyentes más importantes de la función de los espermatozoides en los mamíferos (Muiño-Blanco *et al.*, 2008).

La mayoría de las proteínas del plasma seminal son productos de secreción de la vesícula seminal, una glándula reproductiva accesoria en algunos mamíferos machos (Rodríguez-Martínez, 2003). Algunas proteínas del plasma seminal son relativamente específicas para la regulación de la función espermática y fertilidad. Existe una familia de proteínas designadas BSP-A1, BSP-A2, A3 y BSP-BSP-30-kDa, colectivamente llamadas BSP (proteínas del plasma seminal de bovino) que constituyen la mayor fracción proteica en el plasma seminal de toro. Las proteínas homólogas en el macho cabrío son la GSP-14, GSP-15, GSP-20 y GSP-22 kDa (proteínas del plasma seminal de caprino; Villemure *et al.*, 2003).

Se ha determinado que la función biológica de estas proteínas consiste en interactuar con los fosfolípidos de colina de la superficie de los espermatozoides y estimular el primer eflujo de colesterol y fosfolípidos de la membrana de los espermatozoides en la eyaculación. En el tracto reproductivo de la hembra, las proteínas BSP unidas a los espermatozoides interactúan con los componentes del fluido oviductal/folicular (tales como las lipoproteínas de alta densidad) y estimulan un segundo eflujo de colesterol, lo que resulta en la capacitación (Manjunath y Thérien, 2002; Villemure *et al.*, 2003). Contrariamente a este papel positivo en la fertilidad, las proteínas BSP pueden ser perjudiciales para el espermatozoide en el contexto de su conservación, ya que el eflujo de colesterol inducido por las proteínas BSP depende del tiempo y concentración, por tanto, si

el semen no se diluye, los espermatozoides están continuamente expuestos a una alta concentración de BSP y la eliminación de lípidos continúa, resultando en decremento de la resistencia de los espermatozoides al shock por frío y congelación (Bergeron *et al.*, 2004; Bergeron y Manjunath, 2006).

El plasma seminal normalmente es de color blanco pero en el macho cabrío puede ser de color amarillo por su contenido en riboflavina procedente de las glándulas vesiculares (Evans y Maxwell, 1990; Hafez y Hafez, 2002). El pH del plasma seminal se mantiene muy próximo a 7.0 por un complejo sistema amortiguador, protegiendo a los espermatozoides de los cambios bruscos de pH que deteriorarían la supervivencia de las células espermáticas (Evans y Maxwell, 1990). Además, el plasma seminal del macho cabrío tiene como peculiaridad un contenido enzimático proveniente de las glándulas bulbouretrales, formado por la denominada enzima coaguladora de la yema de huevo (EYCE). Esta enzima es una fosfolipasa A, que hidroliza la lecitina de la yema de huevo contenida en el diluyente en ácidos grasos y lisolecitina, afectando ésta última a la viabilidad espermática (Evans y Maxwell, 1990; Arrebola, 2012; Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012).

Otro factor es una fracción glicoproteica del plasma seminal (SBUIII), cuyo origen son las glándulas bulbouretrales, que interacciona con el diluyente a base de leche provocando inhibición de la movilidad, ruptura del acrosoma y muerte celular espermática. Se cree que estas dos moléculas, la SBUIII y EYCE podrían ser la misma (Arrebola, 2012; Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012).

3.3 PRUEBAS DE VALORACIÓN DE CALIDAD ESPERMÁTICA

La primera evaluación del semen, inmediatamente después de la extracción, corresponde a la valoración macroscópica, donde se determinan cuidadosamente el volumen, color, olor, viscosidad y densidad (Evans y Maxwell, 1990).

Después de la valoración macroscópica, se deben evaluar las características microscópicas que tradicionalmente incluyen la concentración, motilidad, morfología, integridad de

membrana y tolerancia osmótica (Bonet *et al.*, 2006; Cebrián *et al.*, 2010). Además de estos parámetros, si se pretende predecir la capacidad fecundante parecería necesario complementar el análisis seminal con la determinación de parámetros que miden cambios estructurales, fisiológicos y el estatus metabólico de las células espermáticas, entre los que se encuentran integridad de acrosoma, integridad nuclear, porcentaje de apoptosis espermática, estatus de la vaina mitocondrial, estatus de capacitación, fluidez de membrana, niveles de especies reactivas al oxígeno y la actividad de metabolitos y enzimas (Petrunkina y Harrison, 2011; Petrunkina y Harrison, 2013; Sancho y Vilagran, 2013).

3.3.1 Concentración espermática

La determinación de la concentración espermática es una de las valoraciones rutinarias de contrastación seminal más importantes, ya que la tasa de dilución depende de ella y por ende el número de dosis por eyaculado (Bonet *et al.*, 2006; Cebrián *et al.*, 2010). Como es sabido, la fertilidad aumenta a medida que se incrementa la concentración de espermatozoides por dosis, si bien a partir de un determinado nivel ya no obtenemos una mejora en la fertilidad (Bonet *et al.*, 2006). A este respecto, se han realizado diversas investigaciones para determinar la concentración adecuada para la inseminación artificial, dicha concentración va desde 200×10^6 /mL hasta 400×10^6 /mL (Salamon y Maxwell, 1995a; Leboeuf *et al.*, 2000; Cseh *et al.*, 2012; Faigl *et al.*, 2012).

Existen varias formas para realizar este cálculo, siendo las más utilizadas las cámaras de recuento celular (Burker, Thoma y Makler) y en menor medida se utilizan los contadores celulares electrónicos y los programas informáticos de análisis seminal (Bonet *et al.*, 2006; Cebrián *et al.*, 2010; Sancho y Vilagran, 2013).

3.3.2 Motilidad espermática

Un hecho característico del espermatozoide es su movilidad o motilidad, con lo que su determinación nos puede proporcionar un medio relativamente sencillo para conocer la calidad de semen. A pesar de que presenta una pobre correlación con la fertilidad *in vivo* es el parámetro más utilizado junto con la concentración espermática (Bonet *et al.*, 2006; Furstoss *et al.*, 2010; Sancho y Vilagran, 2013).

Existen varias formas para su estudio y aunque cada vez tienen más presencia los sistemas de análisis computarizado, que realizan una evaluación de ciertos parámetros cinéticos, todavía se sigue utilizando la valoración visual con microscopía óptica prácticamente como único método (Bonet *et al.*, 2006; Dorado *et al.*, 2009; Contri *et al.*, 2013).

Motilidad por el sistema computarizado CASA. El sistema CASA del inglés *Computer Assisted Sperm Analysis* (análisis computarizado de la motilidad espermática), utiliza una cámara adaptada al microscopio para capturar una secuencia de video en un ordenador dotado de un sistema de análisis de imagen. El software permite calcular el porcentaje de espermatozoides móviles y emite un informe donde se describen las particularidades de su movimiento (Tabla 1) (Bonet *et al.*, 2006; Cebrián *et al.*, 2010; Petrunkina y Harrison, 2011).

La motilidad determinada por el sistema CASA es más rápida y más “objetiva” que una evaluación visual y puede proporcionar mucho más datos con tal grado de exactitud que se pueden revelar diferencias sutiles no perceptibles por el ojo humano (Verstegen *et al.*, 2002; Bonet *et al.*, 2006; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2008). Además, el análisis mediante el sistema CASA hace posible la determinación de la presencia de subpoblaciones espermáticas que coexisten en un eyaculado (Tejerina *et al.*, 2008).

Diferentes informes en toro (Muiño *et al.*, 2008), macho cabrío (Dorado *et al.*, 2010), caballo (Quintero-Moreno *et al.*, 2003; Ortega-Ferrusola *et al.*, 2009), cerdo (Abaigar *et al.*, 1999; Quintero-Moreno *et al.*, 2004; Becerril *et al.*, 2013) y perro (Núñez *et al.*, 2006) han estudiado la estructura del eyaculado mediante el análisis de las subpoblaciones de espermatozoides. En estos estudios, el análisis por conglomerados de los parámetros de motilidad espermática tiene un papel básico y manifiestan la existencia de grupos de espermatozoides con diferente comportamiento dentro del eyaculado. Aunque, la motilidad espermática presenta una pobre correlación con la fecundidad *in vivo*, se ha observado que las estructuras específicas de las subpoblaciones móviles pueden estar relacionadas con la capacidad fecundante de los espermatozoides (Suzuki *et al.*, 2003; Bonet *et al.*, 2006;

Quintero-Moreno *et al.*, 2007; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2008; Martínez-Pastor *et al.*, 2011).

Sin embargo, los sistemas CASA no se utilizan ampliamente en la práctica. Existen diversas razones para esto. En primer lugar, se requiere un cierto grado de calibración y validación (Holt *et al.*, 1994), la programación de los ajustes específicos para cada especie (Tejerina *et al.*, 2008) y es costoso (Verstegen *et al.*, 2002). Además, pueden presentar errores de medición, causados por demasiados espermatozoides en una muestra o el cruce de trayectorias, los cuales producen variación en los resultados (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001).

Tabla 1. Definición de parámetros cinéticos analizados por el sistema CASA

| Parámetro | Siglas | Unidad | Definición |
|--|--------|-----------------|--|
| Espermatozoides motiles totales | MT | % | Porcentaje de espermatozoides que se mueven |
| Espermatozoides motiles progresivos | MP | % | Porcentaje de espermatozoides que presentan un desplazamiento apreciable |
| Velocidad curvilínea | VCL | $\mu\text{m/s}$ | Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo |
| Velocidad rectilínea | VSL | $\mu\text{m/s}$ | Distancia recorrida por el espermatozoide en línea recta entre el primer punto y el último analizados en función del tiempo |
| Velocidad media | VAP | $\mu\text{m/s}$ | Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media en función del tiempo |
| Índice de linealidad | LIN | % | Relación porcentual entre la VSL y la VCL |
| Índice de rectitud | STR | % | Relación porcentual entre la VSL y la VAP |
| Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza | ALH | μm | Desplazamiento medio efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria real de un lado a otro de la trayectoria media |
| Frecuencia de batido de la cabeza | BCF | Hz | Frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa la lineal en función del tiempo |

Cebrián *et al.*, 2010

3.3.3 Morfología espermática

El estudio de la morfología espermática es otra prueba importante de la contrastación rutinaria del semen. Se ha demostrado que es un indicador importante del descenso de la fertilidad en humanos (Gunalp *et al.*, 2001) y en un gran número de especies animales (Gravance *et al.*, 1998; García-Herreros *et al.*, 2006; Maroto-Morales *et al.*, 2010). Las anomalías de la cabeza del espermatozoide han sido asociadas con la reducción de la capacidad para unirse al óvulo y la pérdida embrionaria temprana, disminución en la fertilidad y calidad del embrión (Hidalgo *et al.*, 2002; Hidalgo *et al.*, 2007; Maroto-Morales *et al.*, 2010; Yániz *et al.*, 2012).

Además de aportar una referencia sobre la fertilidad del eyaculado, la morfología espermática permite la posibilidad de detectar alteraciones en la espermatogénesis y en la maduración epididimaria (Bonet *et al.*, 2006; Petrunkina y Harrison, 2011).

La morfología espermática puede ser evaluada de dos maneras: 1) por definición de la proporción relativa de células dentro de una categoría morfológica predefinida mediante la observación con un microscopio óptico y la evaluación del impacto de las formas anormales en la capacidad fecundante de la muestra de semen ó 2) mediante el cálculo morfométrico de los parámetros espermáticos básicos (cabeza, acrosoma, pieza intermedia, etc.) mediante sistemas informatizados y la definición de los biotipos celulares básicos utilizando técnicas de estadística que permitan determinar el potencial fecundante de las muestras analizadas (Bonet *et al.*, 2006; De paz *et al.*, 2011).

Para poder observar las células se utilizan diferentes tinciones espermáticas, como azul de metileno, rosa de bengala, etc., 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; en cambio hay otras como la Eosina-nigrosina, Giemsa, William, Papanicolaou, que buscan visualizar partes específicas del espermatozoide o resaltar el resto de las estructuras (Hafez y Hafez, 2002; Bonet *et al.*, 2006).

El análisis tradicional es un método subjetivo, lo que predispone a que existan variaciones importantes entre técnicos y laboratorios que hacen difícil la interpretación exacta y comparación de resultados. Actualmente existen en el mercado equipos que permiten el análisis automático de la morfología espermática (ASMA). Con estos programas podemos evaluar de forma objetiva, precisa, exacta y repetible la forma y dimensiones de la cabeza de los espermatozoides, revelando sutiles diferencias que no son detectadas visualmente (Hidalgo *et al.*, 2002; Bravo, 2010; De paz *et al.*, 2011). Sin embargo, los sistemas ASMA requieren para su correcto funcionamiento una estandarización previa propia de cada especie, que consiste en una adecuada preparación y tinción de las muestras, así como el calibrado del equipo (Hidalgo *et al.*, 2002).

La elección de las condiciones en las que se realiza el análisis puede determinar cambios significativos en la morfología observada; así que se deben elegir cuidadosamente las técnicas de tinción, el tamaño de muestra, el sistema óptico, los aumentos, la cámara de video y el procesado de las imágenes (Bravo, 2010).

Entre las tinciones usadas para la evaluación de la morfometría se encuentran Diff-Quick recomendada por la OMS (De paz *et al.*, 2011) y en caprinos es la que proporciona mejores resultados (Hidalgo *et al.*, 2007), Hematoxilina de Harris (Bonet *et al.*, 2006), Hemacolor (González *et al.*, 2008) y más recientemente se ha desarrollado la tinción SpermBlue tanto para humanos como animales (De paz *et al.*, 2011).

Los parámetros obtenidos para tamaño de la cabeza son: rea A (en μm^2 , como la suma de las reas pixel contenidas dentro de los límites), perímetro (en μm , como la suma de los límites externos), longitud L y anchura W (en μm , el diámetro mayor y menor respectivamente y que necesariamente no tienen que ser ortogonales; Hidalgo *et al.*, 2002; Marco-Jiménez *et al.*, 2006; Hidalgo *et al.*, 2007) y para la forma de la cabeza: elipticidad F1 (L/W), rugosidad F2 ($4\pi A / L^2$), elongación F3 (L-W/L+W) y regularidad F4: $\pi LW/4A$ (Marco-Jiménez *et al.*, 2006; Bravo, 2010).

3.3.4 Integridad de la membrana plasmática del espermatozoide

Como toda célula, el espermatozoide está rodeado por una membrana que mantiene juntos sus organelos y componentes intracelulares y permite entre otras actividades fisiológicas, el intercambio de sustancias entre el interior y el exterior de la célula, siempre y cuando ésta presente una integridad funcional y estructural. La vitalidad espermática hace referencia a la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide, ya que la pérdida de permeabilidad selectiva en esta membrana hace que el espermatozoide sea incapaz de mantener las concentraciones necesarias de iones y solutos, perdiéndose importantes metabolitos y coenzimas, lo que conducirá a la supresión de la motilidad y de todas las funciones vitales (Vázquez *et al.*, 1997; Bonet *et al.*, 2006; Silva y Gadella, 2006).

Se pueden utilizar varios métodos para la evaluación de la integridad del plasmalema; generalmente, se agrupan en función del punto de vista que se adopte: integridad funcional o estructural.

Evaluación de la integridad funcional. Se realiza mediante el Test de Endosmosis (*Hypoosmotic Swelling test*, Host); se trata de una técnica muy sencilla, que nos va a proporcionar una referencia clara sobre la integridad funcional de la membrana plasmática. Se basa en la reacción de las células a los cambios en la presión osmótica. Al incubar a 37°C durante 30-120 minutos una muestra de semen en un medio con una presión osmótica comprendida entre 50 y 150 mOsm/kg, inferior a la fisiológica (300mOsm/kg). La entrada de agua en la célula provoca, en aquellas con la membrana plasmática íntegra, un hinchamiento y enrollamiento del flagelo mientras que aquellas que presentan un daño en la misma no experimentarán estos cambios. En relación con el periodo de incubación, cabe mencionar que se ha diseñado una variante corta del test que lo reduce a cinco minutos por lo que se podría adaptar a las valoraciones rutinarias (Vázquez, *et al.*, 1997; Bonet *et al.*, 2006; Forouzanfar *et al.*, 2010).

Evaluación de la integridad estructural. Entre los métodos utilizados están las valoraciones mediante el uso de microscopios electrónicos (de transmisión o de barrido) y a través de determinaciones de ATP y otras enzimas intracelulares. Aunque para realizar

valoraciones rutinarias resultan más útiles las técnicas de tinción que se pueden dividir en tinciones fluorescentes y no fluorescentes (Bonet *et al.*, 2006).

Tinciones no fluorescentes: las más utilizadas probablemente sean la técnica de eosina-nigrosina y la de Tripan azul. Ambas son tinciones de membrana impermeable, en las que aquellos espermatozoides que presenten una integridad estructural en su membrana no van a permitir la penetración del colorante; por lo tanto, los que aparezcan teñidos se considerarían muertos (Bonet *et al.*, 2006).

Tinciones fluorescentes: estas técnicas están ampliamente difundidas, ya que, a pesar de requerir un equipamiento más sofisticado, no presentan ciertos inconvenientes de las tinciones clásicas, como son la dificultad para diferenciar entre vivos y muertos en caso de espermatozoides parcialmente teñidos o la toxicidad de colorantes como la eosina a altas concentraciones. Además, en las últimas décadas el uso de tecnologías de fluorescencia ha florecido con el desarrollo de instrumentación muy poderosa como la microscopía confocal y citómetros de flujo de cada vez mayores capacidades junto con una amplia gama de fluorocromos (Petrunkina y Harrison, 2013).

Se ha descrito una gran variedad de fluorocromos para evaluar la integridad de la membrana plasmática tales como el diacetato de carboxifluoresceína (Cardozo *et al.*, 2006), Hoechst 33258, Ioduro de propidio (IP), homodímero de ethidio (HE; Bonet *et al.*, 2006, Martínez-Pastor *et al.*, 2010), Yo-Pro 1 (Peña *et al.*, 2005), 7-amino-actinomicina D (7-AAD; Petrunkina y Harrison, 2013). Sin embargo, el método más extendido hoy día es la combinación de SYBR-14 e IP (Garner *et al.*, 1994, Garner y Johnson, 1995; Yániz *et al.*, 2013). Todas ellas son sondas con afinidad por el ADN, con lo cual nos aseguramos que solo tiñen espermatozoides o alguna otra célula extraña, pero no componentes del diluyente o el plasma seminal (Bonet *et al.*, 2006). Estas sondas presentan diferente capacidad para penetrar la membrana espermática. El SYBR-14 es una sonda permeable capaz de atravesar membranas intactas (espermatozoides viables) mientras que la 7-AAD, el IP y el HE solo atraviesan la membrana del espermatozoide si está dañada (son impermeables; Yániz *et al.*, 2013).

3.3.5 Integridad del acrosoma

El acrosoma juega un papel relevante en la fecundación, por lo que conviene realizar una valoración específica del mismo. En la reacción acrosómica, tras la capacitación, se encarga, por medio de su contenido enzimático, de disolver las envolturas ovocitarias para que tenga lugar la fecundación (Bonet *et al.*, 2006; Petrunkina y Harrison, 2013). Ahora bien, esto solo ocurre en aquellos espermatozoides con el acrosoma íntegro, de ahí que muestras con un elevado porcentaje de acrosomas alterados suelen presentar fertilidades bajas (Silva y Gadella, 2006). La apreciación de las diferentes estructuras se ha de realizar bajo microscopía de contraste de fases o de contraste diferencial de interferencia (DIC) o bien mediante la realización de tinciones ya sean fluorescentes o no (Bonet *et al.*, 2006).

Tinciones no fluorescentes: destacan la tinción de Giemsa, tinciones comerciales como Spermac e incluso eosina-nigrosina que, aunque comúnmente se utiliza para la valoración de la vitalidad, puede utilizarse también para la valoración acrosómica. Posiblemente, la tinción más utilizada dentro de las clásicas es la de Giemsa (Bonet *et al.*, 2006).

Tinciones fluorescentes: básicamente, se utiliza la clortetraciclina, anticuerpos y lectinas. La clortetraciclina se utiliza sobre todo para el estudio de la capacitación espermática, pero es un método muy interesante ya que este antibiótico fluorescente nos puede proporcionar diversos patrones de marcado en función del estado del acrosoma (Bonet *et al.*, 2006; Cebrián *et al.*, 2010).

La técnica con anticuerpos se trata básicamente de una inmunofluorescencia indirecta por anticuerpos monoclonales o policlonales conjugados con colorantes fluorescentes, en la que éstos se unen a antígenos de la membrana o de la matriz acrosómica. Es un método muy preciso para la valoración del estado de la membrana plasmática y del acrosoma (Bonet *et al.*, 2006). En humanos se ha utilizado el anticuerpo anti-CD46 que se une a la matriz acrosomal (Martínez-Pastor *et al.*, 2010).

Habitualmente, el marcaje del acrosoma se realiza con lectinas unidas a fluorocromos. Se utilizan las lectinas PSA (*Pisum sativum agglutinin*), PNA (*Arachis hipogea*), Con-A

(*Aglutinina de la concavalina ensiformis*) y SBTI (*Trysin inhibitor from Soybean*), de estas las más utilizadas son la PNA y la PSA (Aitken, 2006; Bonet *et al.*, 2006)

La PNA se adhiere a residuos de β -galactosa de la membrana acrosómica externa, al estar marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) proporciona una fluorescencia verde en aquellos espermatozoides que presentan alterada la membrana. La PNA parece mostrar menos tendencia a presentar uniones inespecíficas, por lo que suele ser más utilizada. Habitualmente se utiliza junto a colorantes vitales, como el IP o HE para realizar una valoración combinada de membrana plasmática y acrosomal (Bonet *et al.*, 2006; Martínez-Pastor *et al.*, 2010).

La PNA es específica de los glicoconjugados, se une a los residuos de α -manosa y α -galactosa de la matriz acrosómica. Es una de las más utilizadas, sobre todo marcada con FITC proporcionando diferentes patrones en función del estado del acrosoma. Esta tinción se ha combinado con Hoechst o IP para realizar una valoración conjunta de la vitalidad y del acrosoma (Bonet *et al.*, 2006; Martínez-Pastor *et al.*, 2010).

Estas lectinas no son capaces de penetrar la membrana, por lo tanto solo se fijan a espermatozoides con acrosoma reaccionado o dañado (Petrunkina y Harrison, 2013). Existe cierta confusión en la literatura pues hay otra técnica alternativa en la cual primero se permeabiliza a los espermatozoides para permitir el paso de la lectina, en esta técnica se considera como espermatozoides con acrosoma intacto a aquellos teñidos (Bonet *et al.*, 2006).

El uso de lectinas no está libre de inconvenientes ya que tienen cierta toxicidad para los espermatozoides (Bonet *et al.*, 2006). Además, los sitios de unión pueden desaparecer después de un extenso daño acrosomal produciendo falsos negativos (Martínez-Pastor *et al.*, 2010). También se asume que si un espermatozoide presenta la membrana plasmática completamente intacta, también lo estará el acrosoma (Petrunkina y Harrison, 2013). Las sondas basadas en el estado fisiológico del acrosoma como las lisosomales podrían ser más sensibles. Desafortunadamente, algunos estudios han dado resultados negativos sobre el uso de estas sondas en los organelos ácidos ya sea por causa de un marcaje heterogéneo

(LysoTracker; Martínez-Pastor *et al.*, 2010) o inespecífico de los espermatozoides (LysoSensor Green DND-189; Martínez-Pastor *et al.*, 2010).

3.3.6 Marcaje de la vaina mitocondrial

El estudio de las mitocondrias presenta gran interés, tanto desde la perspectiva de la investigación básica como de la aplicada en reproducción. Desde este último punto de vista, las mitocondrias en la pieza media del espermatozoide parecen ser la estructura espermática con mayor sensibilidad a los procesos de congelación y descongelación y tal vez en el futuro se conviertan en el bioindicador más adecuado del proceso de crioconservación (Bonet *et al.*, 2006).

Para teñir la vaina mitocondrial pueden utilizarse distintos fluorocromos como la Rodamina 123, todo el grupo de los *MitoTracker* (*MitoTracker Green, Red, Deep Red, Orange*), el yoduro 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1; Garner *et al.*, 1997; Petrunkina y Harrison, 2013) o la clorometil-X-rosamina (CMX-Ros; Silva y Gadella, 2006). Todos ellos se caracterizan por ser catiónicos y lipofílicos por lo que difunden de forma pasiva a través de la membrana plasmática y se acumulan en la matriz mitocondrial, la cual presenta carga negativa; la acumulación de moléculas del fluorocromo depende directamente del potencial de membrana de la mitocondria (Gillan *et al.*, 2005). Existen importantes diferencias entre los fluorocromos en su especificidad y su fotoestabilidad. La rodamina es muy estable aunque de baja especificidad, mientras que el CMX-Ros permite la detección específica de mitocondrias intactas pero requiere de un análisis inmediato de las muestras después de su marcaje (Bonet *et al.*, 2006). Las moléculas de *MitoTracker* se difunden a través de la membrana plasmática y se unen específicamente a los lípidos de membrana de las mitocondrias funcionales, pero no son retenidas por las mitocondrias que presentan un potencial de membrana alterado (Hallap *et al.*, 2005; Silva y Gadella, 2006). Las principales ventajas de este grupo de fluorocromos son su gran especificidad y fotoestabilidad, su elevada funcionalidad al ser incorporados en distintos protocolos de doble y triple marcaje, ya que están disponibles en un amplio rango de fluorescencia y se pueden utilizar en experimentos que requieran células tratadas con

fijadores u otros agentes que afecten el estado energético de la mitocondria (Martínez-Pastor *et al.*, 2010).

El fluorocromo JC-1 atraviesa de forma selectiva las membranas mitocondriales en su forma monomérica; si el potencial de membrana es bajo mantiene su estructura monomérica y emite fluorescencia verde, pero si el potencial de membrana es elevado se agrega y emite fluorescencia roja. Por ello, cuando se observa una muestra de semen teñida con JC-1, se observan dos grandes poblaciones: una constituida por los espermatozoides que presentan el segmento intermedio con fluorescencia rojo-naranja y por tanto mitocondrias con alto potencial de membrana y otra población de espermatozoides con fluorescencia verde debido a la presencia de mitocondrias con bajo potencial de membrana (Gillan *et al.*, 2005; Ramalho-Santos *et al.*, 2007; Martínez-Pastor *et al.*, 2010). Sin embargo, entre estas dos poblaciones existe todo un rango de situaciones intermedias. Esto no solo complica el recuento al microscopio, sino que representa un grave problema a la hora de interpretar los resultados del citómetro de flujo, ya que en ocasiones es difícil delimitar las poblaciones de espermatozoides, que aparecen como grandes masas de puntos (Bonet *et al.*, 2006).

3.3.7 Detección de cambios relacionados con el proceso de apoptosis

La apoptosis a diferencia de la necrosis, es un tipo de muerte celular controlada que termina con la autodestrucción de la célula sin producir respuesta inflamatoria (Jordan, 2003; Cebrián *et al.*, 2010). Está claro que existe apoptosis durante la espermatogénesis y que cumpliría dos funciones, la primera limitar la población de células germinales a la capacidad de las células de Sertoli y la segunda, eliminar los espermatozoides anormales (Cebrián *et al.*, 2010).

Uno de los indicadores de apoptosis celular es el incremento en la permeabilidad de la membrana. Estos cambios tempranos de permeabilidad pueden ser detectados con ciertas sondas como el yoduro de YoPro 1 que tiene afinidad por el ADN y que solo es permeable en células que están empezando a sufrir apoptosis celular sin interferir con la viabilidad celular (Marie *et al.*, 1996; Peña *et al.*, 2005; Martínez-Pastor *et al.*, 2010).

Uno de los primeros pasos de la apoptosis celular es la translocación de la fosfatidilserina (PS) desde el interior a la cara externa de la membrana celular (Martínez-Pastor *et al.*, 2010). La PS es un fosfolípido que en condiciones normales está presente en la cara interna de la membrana plasmática. Sin embargo, en determinadas ocasiones tanto fisiológicas (capacitación espermática) como patológicas (shock por frío), la PS aparece también en la cara externa (Cebrián *et al.*, 2010; Petrunkina y Harrison, 2013). En el primer caso la transposición tiene lugar en el borde apical del espermatozoide mientras que en el shock por frío, la transposición de PS es pancelular (Bonet *et al.*, 2006; Cebrián *et al.*, 2010). La transposición de la PS se evalúa usando la Anexina, que es una proteína que se une específicamente a ella y que puede obtenerse de forma comercial unida a una gran diversidad de fluorocromos (Cebrián *et al.*, 2010). Aunque tiene la desventaja de que el estrés podría causar la exposición de PS como parte de un proceso necrótico no relacionado con la apoptosis (Petrunkina y Harrison, 2013).

Para detectar alteraciones en el ADN, la prueba más ampliamente utilizada es el SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*) en el que la cromatina espermática es parcialmente desnaturalizada *in situ* y luego teñida con el fluorocromo naranja de acridina que se intercala con el ADN (Januskauskas *et al.*, 2003; Bonet *et al.*, 2006; Petrunkina y Harrison, 2013).

Una manifestación más tardía del proceso de apoptosis es la fragmentación del ADN debido a la acción de unas endonucleasas específicas. Esta fragmentación se puede evaluar mediante la técnica conocida como TUNEL (marcado del extremo libre por dUTP mediante la desoxi-transferasa terminal). Este método está basado en la utilización de una enzima, la desoxi-transferasa terminal o TdT, que añade nucleótidos, concretamente dUTP, unidos a un fluorocromo a los extremos 3' libres del ADN fragmentado (Muratori *et al.*, 2008; Cebrián *et al.*, 2010; Petrunkina y Harrison, 2011). Una técnica más simple para la detección de la fragmentación de ADN es el SCDA (*Sperm Chromatin Dispersion Assay*) prueba de la dispersión de cromatina que supone el lisado de los espermatozoides y la realización de una electroforesis en un gel de agarosa y su posterior revelado con una sonda

con afinidad por el ADN. Cuanto mayor sea el grado de fragmentación, mayor será la cola que se observe en el gel (Martínez-Pastor *et al.*, 2010; Petrunkina y Harrison, 2011).

Una vez iniciado el proceso de apoptosis se lleva a cabo un desmantelamiento de toda la estructura celular. En esta acción están implicadas las caspasas (Cebrián *et al.*, 2010). La detección de caspasas activas en espermatozoides va a ser un marcador relacionado con la apoptosis. En general, los métodos de detección se basan en la utilización de péptidos con una secuencia que es reconocida específicamente por la caspasa a evaluar. Muchos de estos sustratos son permeables y están unidos a una molécula que al liberarse por acción de la caspasa emite fluorescencia, por lo que sirven de marcadores *in situ* de apoptosis (Cebrián *et al.*, 2010). El FAM-VAD-FMK es el sustrato policaspasa más utilizado para detectar caspasas activas en el espermatozoide por citómetro de flujo (Martínez-Pastor *et al.*, 2010).

3.3.8 Estrés oxidativo y Especies reactivas al oxígeno (ROS)

Los espermatozoides espontáneamente producen una variedad de especies reactivas al oxígeno, incluyendo el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico (Aitken *et al.*, 2010). Producidas en pequeñas cantidades, las especies oxidantes tienen un papel importante en el impulso de las cascadas de fosforilación de la tirosina asociadas con la capacitación espermática. Sin embargo, cuando la producción de ROS excede las defensas antioxidantes limitadas de los espermatozoides, pueden poner en peligro la capacidad fecundante de estas células (Aitken *et al.*, 2010; Martínez-Pastor *et al.*, 2010; Kaur y Bilaspuri *et al.*, 2011). Por lo tanto, la detección y evaluación del estrés oxidativo son importantes, tanto para estudios fisiológicos como patológicos (Martínez-Pastor *et al.*, 2010). La detección de ROS y otras especies oxidativas puede llevarse a cabo mediante métodos de detección directos e indirectos. Sin embargo, la determinación directa *in vivo* es difícil, ya que los reactivos oxidantes son muy inestables y generalmente tienen una vida media muy corta. La determinación directa *in vivo* de ROS puede ser analizada con espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica, pero debido a las limitaciones de temperatura y tiempo se prefieren los métodos indirectos como la quimioluminiscencia o citometría de flujo. En el mercado existen diferentes reactivos que se acumulan intracelularmente y emiten fluorescencia tras la oxidación tales como el 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) que penetra la membrana plasmática y es

retenido después de que las esterasas intracelulares dividen los grupos acetato y emiten fluorescencia verde después de la oxidación (Hossain *et al.*, 2011). El (5-(6-) clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (CM- H₂DCFDA) aunque se retiene mejor en las células vivas no es una sonda específica. Para detectar especies oxidantes específicos se ha utilizado el Dihidroetidio (DHE) que reacciona con el anión superóxido (Martínez-Pastor *et al.*, 2010). El MitoSOX Red también puede ser una buena opción para detectar selectivamente el O₂⁻. El óxido nítrico (NO) es un importante mensajero de corta duración y un potencial generador de peroxinitritos que ha sido evaluado con DAF-2 DA (Martínez-Pastor *et al.*, 2010).

El ataque oxidativo sobre las membranas resulta en peroxidación lipídica afectando negativamente la calidad espermática. La peroxidación ha sido valorada durante muchos años mediante el análisis de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), sin embargo, esta prueba es muy compleja y los resultados son poco confiables (Brouwers y Gadella, 2003). Actualmente, se dispone de la sonda fluorescente BODIPY 581/591 C11, la cual emite fluorescencia de color naranja en su estado no oxidado y cambia a verde cuando está peroxidado (Martínez-Pastor *et al.*, 2010).

3.3.9 Valoración de la capacitación

La capacitación es un fenómeno al que se somete un espermatozoide antes de poder fecundar el ovocito. Se lleva a cabo principalmente en el oviducto cuando ocurren de manera concertada varios cambios celulares como desestabilización de la membrana plasmática del espermatozoide con eliminación o alteración de sustancias absorbidas en la misma, lo que va a ocasionar un incremento en el flujo de calcio (Ca⁺⁺) al interior del espermatozoide. Además, de la expresión del movimiento de hiperactivación que permite a los espermatozoides desplazarse en el fluido viscoso del oviducto. La capacitación también va a preparar al espermatozoide para experimentar la reacción acrosómica y penetrar a través de la zona pelúcida del ovocito (Yanagimachi, 1969; Yanagimachi, 1970; Abou-haila *et al.*, 2009). La valoración de la capacitación espermática tiene interés sobre todo por el acelerado envejecimiento celular que sufren las células espermáticas en los procesos de

congelación-descongelación y que en algunos aspectos recuerda a la capacitación (Bonet *et al.*, 2006; Peña *et al.*, 2009).

Para determinar si un espermatozoide está o no capacitado existen varias pruebas, una de las más utilizadas para asignar estas diferencias es la clortetraciclina (CTC; Martínez-Pastor *et al.*, 2010; Hossain *et al.*, 2011). La CTC es un antibiótico fluorescente que monitoriza los cambios en la concentración de Ca^{++} intracelular, asociado al proceso. La CTC atraviesa la membrana plasmática, una vez dentro se une al Ca^{++} presente, incrementando la emisión de fluorescencia. De esta forma, se originan los patrones típicos de fluorescencia: no capacitado, capacitado y reacción acrosómica. Las desventajas de esta técnica es el grado de subjetividad y que tanto la tinción como la lectura son bastante laboriosas (Bonet *et al.*, 2006; Cebrián *et al.*, 2010).

Como alternativa se pueden utilizar diferentes marcadores para medir el incremento de la concentración de Ca^{++} intracelular con sondas fluorescentes como el fluo-3 acetometoxi éster, Fluo-4 AM, Fura 3, quin-2 o indo 1, que penetran en el interior de la célula y cambian su espectro de emisión o la cantidad de fluorescencia emitida cuando se unen al calcio. Estas variaciones en fluorescencia se miden usando citómetro de flujo o espectrofluorímetro (Bonet *et al.*, 2006; Cebrián *et al.*, 2010; Martínez-Pastor *et al.*, 2010; Petrunkina y Harrison, 2011).

En espermatozoides capacitados tiene lugar un aumento de la fluidez de membrana que se relaciona con una desorganización de los lípidos del exterior de la bicapa, por lo que otra posibilidad es monitorizar dichos cambios con el colorante de lípidos Merocianina 540 (M540). La M540 es una sonda lipofílica que se une a la membrana plasmática y su fluorescencia incrementa en aquellos estados en que tanto la fluidez como el desorden en los lípidos de membrana aumenta (Bonet *et al.*, 2006; Cebrián *et al.*, 2010; Martínez-Pastor *et al.*, 2010; Hossain *et al.*, 2011). Estos cambios ocurren mucho antes del incremento de la concentración de Ca^{++} intracelular por lo que es un método adecuado para monitorizar eventos tempranos en el proceso de capacitación (Bonet *et al.*, 2006). Sin embargo, su

utilidad ha sido cuestionada porque puede detectar células con degeneración de membrana (Martínez-Pastor *et al.*, 2010).

3.4 CONSERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CAPRINO

El fundamento de conservar el semen es prolongar la capacidad fecundante de los espermatozoides, al reducir o detener su movilidad y reacciones metabólicas (Evans y Maxwell, 1990). El semen de macho cabrío al igual que el de morueco y toro, se puede conservar en estado líquido o congelado. Para su uso a corto plazo, el semen puede conservarse en estado líquido, a temperatura ambiente (33°C, semen fresco) o a bajas temperaturas (5 y 15 °C, semen refrigerado). Para largos periodos de conservación, se recurre a la congelación de las dosis seminales y su mantenimiento en nitrógeno líquido (-196°C, semen congelado). En cualquier caso es necesario utilizar un medio/diluyente que proteja a los espermatozoides durante este proceso de conservación (Evans y Maxwell, 1990; Cebrián *et al.*, 2010).

Cuando el semen se congela y conserva a muy baja temperatura, esto es en nitrógeno líquido a -196°C, las reacciones metabólicas de los espermatozoides quedan detenidas. Esto hace que el semen pueda conservar genes para futuro uso y se asegure la disponibilidad de un semental en particular. También de esta forma el semen se puede conservar en épocas distintas a la reproductiva. En consecuencia, la utilización de los sementales se amplía considerablemente al congelar y conservar el semen (Evans y Maxwell, 1990; Gorchach, 1999).

3.4.1 MEDIOS DE CONSERVACIÓN ESPERMÁTICA

Un dilutor es aquel compuesto que proporciona a las células espermáticas una fuente de energía, protege a las células del daño relacionado con la temperatura y mantiene un pH (capacidad amortiguadora) y osmolaridad adecuados para que los espermatozoides puedan sobrevivir por periodos cortos o largos de tiempo (Salamon y Maxwell, 1995a; Purdy, 2006).

Los medios para la conservación espermática deben cumplir las siguientes características:

- a) Contener una o más **sustancias de tipo iónico** que mantengan una adecuada presión osmótica y que protejan de los cambios bruscos de pH. Tales sustancias pueden ser: Tris, Tes, ácido cítrico, citrato de sodio y carbonato de sodio, entre otros.
- b) Contener una **fuentes de LDL** (lipoproteínas de baja densidad) que proteja contra el shock por frío. En este grupo encontramos a la yema de huevo y a la leche.
- c) Contener un **agente crioprotector** como glicerol, etilenglicol, propilenglicol o dimetilsulfóxido. También se pueden utilizar otros elementos como disacáridos o trisacáridos de alto peso molecular para brindar al medio características de hipertonidad.
- d) Contener una **fuentes de energía**, por lo regular monosacáridos como la glucosa o fructosa.
- e) Contener otros aditivos como **antibióticos** que protegen contra la proliferación de agentes patógenos como bacterias y hongos. Habitualmente se utiliza la combinación penicilina-estreptomicina. Se recomienda añadir 1000 UI de penicilina sódica y 1 mg de sulfato de estreptomicina por mL de diluyente (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Maxwell, 2000; Barbas y Mascarenhas, 2009; Cebrián *et al.*, 2010).

Sustancias tampón

Los diluyentes deben incluir compuestos con capacidad tamponante ya que grandes cambios en el pH del semen pueden causar daños en los espermatozoides, mortalidad espermática o infertilidad (Rasul *et al.*, 2000; Purdy, 2006). Por lo tanto, a fin de mantener la viabilidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides es necesario mantener un ambiente adecuado mediante el control de las fluctuaciones de pH en los medios de crioconservación. Una de las funciones del plasma seminal consiste precisamente en amortiguar los cambios de pH en condiciones *in vivo*, pero no bajo condiciones *in vitro*. Por esta razón, las sustancias que amortiguan los cambios de pH se incluyen de manera rutinaria en la crioconservación, para reducir al mínimo los cambios. En general, una solución de amortiguación para los espermatozoides de caprino debe tener un pK_a de 7.0

(pH 6.0-8.0), ser soluble en agua e impermeable a la membrana, tener interacciones mínimas con las sales, verse mínimamente afectada por la concentración del tampón, la temperatura y los contenidos iónicos de la disociación del tampón, así como ser capaz de soportar la degradación enzimática y no enzimática (Purdy, 2006).

El pH de los diluyentes a base de yema de huevo y leche normalmente oscila entre 6.75 y 6.8. Se ha observado que el pH del diluyente es muy importante para maximizar la respiración espermática y motilidad (Jones y Bavister, 2000). El consumo de oxígeno de los espermatozoides de caprino es máximo entre pH 7.2-7.5 y la motilidad espermática es óptima entre pH 7.0-7.2, lo cual indica que un medio adecuado para la sobrevivencia espermática *in vitro* debería tener un pH de 7.2 (Purdy, 2006). Esto es lógico porque el semen de mamíferos normalmente tiene un pH entre 7.2 y 7.8 (Barbas y Mascarenhas, 2009).

Entre las sustancias tampón se encuentran el fosfato y citrato sódico y los tampones orgánicos que incluyen el Tris y los llamados zwitterionicos como Tes, Hepes, Mops, Bes, Mes, Pipes y Tricine (Watson y Martin, 1976; Holt, 2000; Rasul *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2009; Cebrián *et al.*, 2010). Los tampones orgánicos tienen mayor capacidad tamponante que el citrato o fosfato, pueden penetrar en el interior de la célula actuando como tampones intracelulares y pueden aumentar la tolerancia del espermatozoide frente a un aumento intracelular en cationes monovalentes por lo que suelen utilizarse con mayor frecuencia en los medios de conservación espermática (Cebrián *et al.*, 2010).

El Tris (Tris (hidroximetil) aminometano) es uno de los tampones orgánicos más ampliamente estudiados (Salamon y Maxwell, 1995a; Aboagla y Terada, 2004a; Cabrera *et al.*, 2005; Peterson *et al.*, 2007; Mocé *et al.*, 2010), siendo el tampón de elección para su uso en espermatozoides de caprino.

Por otra parte, se ha observado que la concentración del tampón afecta la viabilidad espermática y que la capacidad de resistencia a las concentraciones del tampón varía en función de la especie. Así, los espermatozoides de caprino pueden sobrevivir a

concentraciones de Tris en un amplio rango (300-600 mM), mientras que los de morueco tienen un margen más reducido (250 a 400 mM; Purdy, 2006).

Los tampones zwitterionic se utilizan en menor grado por que la calidad espermática y los niveles de fertilidad son poco satisfactorios (Tuli y Holtz, 1992; Salamon y Maxwell, 2000; Santiago-Moreno *et al.*, 2009). Sin embargo, recientemente se ha reportado que los tampones zwitterionic son una buena alternativa y que pueden ser incluidos en la composición del diluyente para el semen refrigerado de ovino (Yániz *et al.*, 2011) y gacela (Garde *et al.*, 2003).

El mecanismo por el cual los sistemas tampón protegen a la célula espermática sigue siendo una incógnita, pero en general se acepta que los tampones ayudan al proceso de deshidratación celular por la creación de una fuerza osmótica (Molinia *et al.*, 1994b), aumentando así la estabilidad de la membrana plasmática y neutralizando los ácidos generados durante el almacenamiento (Ijaz *et al.*, 1989).

Sustancias crioprotectoras

Para mejorar la viabilidad celular es necesario alterar el comportamiento fisico-químico de las soluciones acuosas en las cuales tiene lugar la crioconservación, para ello se añaden al medio de congelación los agentes crioprotectores (Salamon y Maxwell, 1995a; Fernández *et al.*, 2009). Los agentes crioprotectores son sustancias muy hidrosolubles y de baja citotoxicidad que disminuyen el punto eutéctico de una solución determinada (temperatura mínima a la que una solución se encuentra en estado líquido). El descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más hidratada y el gradiente osmótico al que estará sometida será menor en el momento en que el espacio extracelular se congela (Ávila-Portillo *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2009).

Bioquímicamente es posible distinguir tres tipos de crioprotectores, los **alcoholes** (metanol, etanol, propanol, 1-2 propanediol y glicerol), **azúcares** (glucosa, lactosa, sacarosa, trehalosa) y el **dimetil sulfóxido** (Ávila-Portillo *et al.*, 2006). De acuerdo a su sitio de acción y/o permeabilidad celular las sustancias crioprotectoras pueden clasificarse en:

penetrantes y no penetrantes (Holt, 2000; Ávila-Portillo *et al.*, 2006; Purdy, 2006; Barbas y Mascarenhas, 2009).

Crioprotectores penetrantes

Los crioprotectores penetrantes son de bajo peso molecular, permeables a la membrana celular, capaces de llegar al interior del citoplasma celular, actúan intra y extracelularmente protegiendo a la célula de las lesiones producidas por la congelación a velocidad lenta (Ávila-Portillo *et al.*, 2006; Purdy, 2006; Fernández *et al.*, 2009). Los crioprotectores penetrantes son solutos que causan la deshidratación de los espermatozoides debido al flujo de agua impulsado osmóticamente, que varía de acuerdo a los componentes del medio. Después de un periodo corto de tiempo el crioprotector y el agua se equilibran dando como resultado concentraciones similares intra y extracelularmente (Purdy, 2006). Como la célula espermática ahora tiene menos agua intracelular, el punto de congelación de la célula se reduce y por lo tanto, hay menos formación de hielo intracelular, lo que es muy beneficioso, porque el hielo celular resulta en muerte de la célula y en consecuencia reducción de la fertilidad de la muestra de semen. Los crioprotectores penetrantes también causan reordenamiento de lípidos y proteínas, lo que resulta en aumento de la fluidez de la membrana, mayor deshidratación a temperaturas bajas y por tanto una mayor capacidad para sobrevivir la crioconservación. Además los crioprotectores penetrantes son solventes que disuelven azúcares y sales en el medio de crioconservación (Purdy, 2006; Sieme *et al.*, 2008).

En este grupo encontramos al glicerol, metanol, etilenglicol, propilenglicol, 1,2-propanediol, butanediol, acetamida y dimetil sulfóxido (Holt, 2000; Ávila-Portillo *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2009).

Las sustancias crioprotectoras se pueden clasificar en dos grupos: en el primer grupo se incluyen las de rápida penetración al interior de la célula, como el dimetil sulfóxido, etilenglicol y propilenglicol, mientras que en el otro grupo se encuentran las sustancias de lenta penetración celular, las cuales presentan mayor peso molecular como el glicerol (Molina *et al.*, 1994; Watson, 2000).

El **glicerol** es la sustancia crioprotectora más comúnmente utilizada para adicionar a los diluyentes con la finalidad de conservar el semen refrigerado o congelado en la mayoría de las especies de interés zootécnico (Molina *et al.*, 1994; Salamon y Maxwell, 1995a; Salamon y Maxwell, 2000). El glicerol al igual que otras sustancias que son capaces de penetrar la barrera de la membrana celular, reduce los daños causados por la formación de cristales de hielo en el citoplasma celular del espermatozoide, actúa como un diluyente mediante la reducción del grado de disociación de las sales, disminuye la presión osmótica del medio de congelación y, además, tiene un efecto bacteriostático (Salamon y Maxwell, 1995a; Holt, 2000; Salamon y Maxwell, 2000).

La concentración óptima a utilizar se encuentra alrededor del 6 a 8% (v/v), sin embargo, varios investigadores mencionan que el glicerol puede ser tóxico para el espermatozoide, lo cual reduce su capacidad fecundante (Molina *et al.*, 1994; Salamon y Maxwell, 1995a; Royere *et al.*, 1996; Holt, 2000; Salamon y Maxwell, 2000; Watson, 2000).

El nivel de glicerol incluido en el medio de congelación es limitado por su toxicidad, que a su vez depende de la tasa de enfriamiento y congelación, la composición del diluyente y el método de adición del glicerol (Salamon y Maxwell, 1995a; Royere *et al.*, 1996; Salamon y Maxwell, 2000; Barbas y Mascarenhas, 2009). Se ha observado que a una velocidad alta de enfriamiento, la concentración óptima de glicerol es menor y las mejores tasas de supervivencia de los espermatozoides se observan a una velocidad de congelación de 10-100 °C/min (Byrne *et al.*, 2000; Salamon y Maxwell, 2000; Anel *et al.*, 2003; Woods *et al.*, 2004). Además de la velocidad de enfriamiento, la concentración óptima de glicerol depende de la composición del diluyente y en particular de la presión osmótica. Las concentraciones de glicerol también se ven influenciadas por los niveles de yema de huevo en el medio de congelación, ya que al incrementar la concentración de yema de huevo se puede reducir la concentración de glicerol (Salamon y Maxwell, 1995b; Watson, 1995; Salamon y Maxwell, 2000).

La utilización de otros agentes con funciones crioprotectoras tienden a ser utilizados en la congelación de semen, pero ninguno ha dado mejores resultados que el glicerol (Salamon y

Maxwell, 1995a). Los agentes potenciales a utilizar son el dimetil sulfóxido, etilenglicol, propilenglicol y el 1-2 propanediol que pertenecen al grupo de rápida penetración de la membrana, debido a su bajo peso molecular si se comparan con el glicerol (Molina *et al.*, 1994).

El **dimetil sulfóxido** (DMSO) es un solvente bipolar aprótico, miscible con agua, de bajo peso molecular. Su acción crioprotectora se atribuye principalmente a su habilidad de prevenir acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelación y la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana. Su bajo peso molecular permite la entrada rápida a través de la membrana celular, modula la estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolípidos, así como también afecta los procesos de solvatación de agua. El DMSO se utiliza sobre todo para la congelación de embriones (Molinia *et al.*, 1994a; Ávila-Portillo *et al.*, 2006).

El **1-2 propanediol** ha sido utilizado principalmente para congelación de blastocistos y embriones en estado de preimplantación de humanos y otras especies (Ávila-Portillo *et al.*, 2006). El **etilenglicol** también es utilizado en la congelación de embriones mediante vitrificación en varias especies. Finalmente, el **propilenglicol** se utiliza para minimizar la formación de cristales de hielo en diversos compuestos (Molinia *et al.*, 1994a).

Crioprotectores no penetrantes

Son sustancias que no pueden penetrar al interior del citoplasma celular, debido a su alto peso molecular y gran tamaño (Holt, 2000; Ávila-Portillo *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2009). Por lo tanto, no son crioprotectores propiamente dichos, ya que no penetran en la célula sino que ejercen su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes (Fernández *et al.*, 2009).

Un crioprotector no penetrante puede alterar la membrana plasmática o actuar como un soluto, bajar el punto de congelación del medio y disminuir la formación de hielo extracelular (Barbas y Mascarenhas, 2009). En este grupo se encuentran la sacarosa, glucosa, trehalosa, dextosa, polivinilpirrolidona (PVP), aminoácidos, dextrano y

polietilenglicol, además de la yema de huevo y la leche desnatada (Holt, 2000; Kundu *et al.*, 2001; Kundu *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2009; Barbas y Mascarenhas, 2009).

La mayoría de estos compuestos generalmente son polímeros que forman puentes hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad del agua a una magnitud mucho mayor que la que se predeciría por su concentración molar (no obedecen la ley de Raoult) (Ávila-Portillo *et al.*, 2006).

Los azúcares tienen varias funciones en el diluyente que incluyen el suministro de un sustrato energético para las células espermáticas durante la incubación, el mantenimiento de la presión osmótica del diluyente y la de actuar como crioprotector. Los efectos benéficos de la inclusión de **trehalosa** en el medio de crioconservación sobre la viabilidad de las células espermáticas ha sido reportada en diversos estudios en caprino (Aboagla y Terada, 2003; Aboagla y Terada, 2004a; Aboagla y Terada, 2004b), ovino (Aisen *et al.*, 2002; Aisen *et al.*, 2005; Jafaroghli *et al.*, 2010; Tonieto *et al.*, 2010) y toro (Woelders *et al.*, 1997).

El mecanismo exacto por el cual la trehalosa protege a las células durante el proceso de congelación-descongelación sigue siendo poco claro, parece que este azúcar puede hacer que la membrana sea menos vulnerable a los cambios físicos y morfológicos que se producen durante el flujo rápido de salida de agua (Aisen *et al.*, 2002; Aboagla y Terada, 2003).

La **sacarosa** y **rafinosa** se utilizan sobre todo para proteger la integridad del acrosoma del espermatozoide, ya que son azúcares de alto peso molecular que tienen la capacidad de proteger mejor al espermatozoide durante el congelamiento si se comparan con azúcares de bajo peso molecular como la glucosa o fructosa. El efecto protector puede ser mejor si se combinan diferentes tipos de azúcares en altas proporciones (Salamon y Maxwell, 2000).

Para incluir la **leche** en los medios de conservación espermática, ésta tiene que ser pasteurizada para inactivar la lactenina, que es una fracción proteica tóxica para los espermatozoides (Salamon y Maxwell, 2000). La leche puede utilizarse, tanto desnatada

como entera, pero desde que la leche desnatada es tan eficiente como la leche entera en la protección de los espermatozoides durante la refrigeración o congelación, los lípidos no parecen ser el componente responsable de la protección otorgada por la leche (Bergeron y Manjunath, 2006). Recientemente, se ha demostrado que el componente protector de la leche son las micelas de caseína, la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina, las principales proteínas de la leche. Estas micelas interactúan con una familia de lípidos unidos a proteínas (BSP) presentes en el plasma seminal. Curiosamente, el mecanismo de protección de la leche parece implicar una interacción proteína-proteína en lugar de una interacción proteína-lípido como se observa en la yema de huevo (Lusignan *et al.*, 2011).

La **yema de huevo** generalmente no se considera como un agente crioprotector, pero debido a sus características y el papel que juega en la protección de la célula espermática es posible considerarla como tal (Salamon y Maxwell, 1995a). La yema de huevo es un componente normal de los diluyentes que protege a los espermatozoides contra el shock por frío y a la membrana celular durante la congelación y descongelación (Salamon y Maxwell, 2000; Bergeron y Manjunath, 2006; Barbas y Mascarenhas, 2009). También mantiene la motilidad, integridad del acrosoma y, además, la integridad de la membrana de la mitocondria y del citoplasma del espermatozoide (Salamon y Maxwell, 1995a; Aboagla y Terada, 2004a; Kulaksiz *et al.*, 2010). Es considerada como un tampón natural, ya que en su presencia las células espermáticas son capaces de soportar dilutores tanto hipertónicos como hipotónicos (Salamon y Maxwell, 1995a). La cantidad de yema de huevo generalmente utilizada en el medio de congelación va de 2 al 20%, dependiendo de varios factores como la composición del diluyente, concentración de glicerol, así como la especie animal cuyo semen se va a congelar (Watson y Martin, 1976; Salamon y Maxwell, 2000; Vishwanath y Shannon, 2000; Cabrera *et al.*, 2005; Purdy, 2006; Santiago-Moreno *et al.*, 2006; Bispo *et al.*, 2011).

Los mecanismos de protección de la yema de huevo son atribuidos a los fosfolípidos (lecitina) y a las lipoproteínas de alta (LHD) y baja densidad (LDL; Pace y Graham, 1974; Watson, 1981; Salamon y Maxwell, 1995a; Barbas y Mascarenhas, 2009). Sin embargo, el mecanismo, por el cual se proporciona esta protección al espermatozoide, no está del todo

claro. Se especula que las LDL actúan uniéndose directamente a la membrana, modificando su permeabilidad y estabilizándola, además activan enzimas de la membrana (adenilato ciclasa, bombas iónicas, etc.) que mejorarían el comportamiento osmótico de las células y la respuesta a los crioprotectores penetrantes como el glicerol (Bergeron y Manjunath, 2006; Fernández *et al.*, 2009). Otra hipótesis sugiere que, los fosfolípidos presentes en las LDL protegen a los espermatozoides por la formación de una película protectora sobre la superficie de los espermatozoides o mediante la sustitución de los fosfolípidos de la membrana espermática que se pierden o dañan durante el proceso de crioconservación (Bergeron y Manjunath, 2006). Una tercera hipótesis, señala que las LDL compiten con los perjudiciales péptidos catiónicos del plasma seminal en la unión a la membrana del espermatozoide y así proteger a los espermatozoides (Vishwanath *et al.*, 1992). La familia de lípidos unidos a proteínas (BSP) presentes en el plasma seminal de toro interactúan con las LDL y esta interacción parece tener efectos significativos sobre la preservación de la integridad de los espermatozoides (Manjunath y Thérien, 2002). Cuando los eyaculados son diluidos con medios que contienen yema de huevo minutos después de la colección, las LDL secuestran la mayoría de las BSP presentes en el semen. Esto podría resultar en una modificación mínima de la membrana plasmática y permitir un mejor almacenamiento de los espermatozoides (Thérien *et al.*, 1999; Bergeron *et al.*, 2004). Sin embargo, cuando el plasma seminal es eliminado antes del proceso de congelación, las proteínas BSP ya no son capaces de unirse a los espermatozoides. A este respecto, se sugiere que la fijación de las BSP a los espermatozoides se produce antes de retirar el plasma seminal (Pillet *et al.*, 2011).

Por lo tanto, las LDL pueden ofrecer protección a los espermatozoides mediante la reducción del efecto nocivo de las proteínas del plasma seminal en la membrana del espermatozoide (Thérien *et al.*, 1999; Bergeron *et al.*, 2004; Bergeron y Manjunath, 2006). Como ya se ha señalado, el efecto crioprotector de la yema de huevo está determinado básicamente por las LDL, por lo que su uso en la crioconservación espermática durante la última década se ha estudiado ampliamente en especies como el bovino (Moussa *et al.*, 2002; Amirat *et al.*, 2004; Bergeron *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2010), ovino (Tonieto *et al.*, 2010; Moustacas *et al.*, 2011), equino (Pillet *et al.*, 2011) y porcino (Jiang *et al.*, 2007),

demostrando que efectivamente las LDL protegen a los espermatozoides tras la congelación-descongelación e incluso se ha observado que hay una proporción más alta de espermatozoides móviles, espermatozoides con membrana acrosomal y plasmática intacta tras la congelación-descongelación cuando se utilizan LDL en comparación con el medio estándar a base de yema de huevo (Hu *et al.*, 2010).

La yema de huevo fresco es un aditivo común en los diluyentes para la conservación espermática. Sin embargo, representa un riesgo potencial de contaminación microbiológica en el diluyente, debido a que es de origen animal (Marco-Jiménez *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta las necesidades actuales de control de enfermedades, se trata de evitar al máximo el uso de sustancias de origen biológico y/o animal en los medios de crioconservación, por lo que existe una necesidad urgente para encontrar un sustituto de la yema de huevo fresco (Holt, 2000).

La contaminación potencial se puede evitar usando la yema de huevo en polvo, ya que es pasteurizada. En ovino (Marco-Jiménez *et al.*, 2004) y bovino (Ansari *et al.*, 2010) se ha utilizado la yema de huevo en polvo, obteniendo buenos resultados tras la congelación-descongelación sobre todo en los parámetros de viabilidad y motilidad espermática.

En los últimos años también se ha extendido el uso de la lecitina de origen vegetal (soja) en los medios de crioconservación espermática de especies tales como el búfalo (Akhter *et al.*, 2012), bovino (Van Wagendonk y Haring, 2000; Aires *et al.*, 2003), caprino (Roof *et al.*, 2012; Vidal *et al.*, 2012), equino (Papa *et al.*, 2010; Papa *et al.*, 2011) y ovino (De Paz *et al.*, 2010; Forouzanfar *et al.*, 2010), ya que ha demostrado ser más seguro que la yema de huevo en términos de bioseguridad, además de que no se han reportado efectos citotóxicos (Bousseau *et al.*, 1998).

El mecanismo por el cual la lecitina protege a los espermatozoides durante la congelación-descongelación se desconoce, pero existen dos hipótesis sobre el fenómeno. Los fosfolípidos, siendo el componente principal de las membranas, desempeñan importantes funciones fisiológicas en la reducción del punto de congelación. De esta manera, evita la

formación de grandes cristales de hielo, así como minimiza la sustitución de plasmalogenos, reduciendo el posible daño mecánico a la membrana del espermatozoide. Por lo tanto, la primera hipótesis sugiere que los fosfolípidos de la lecitina de soja pueden sustituir algunos de los fosfolípidos de la membrana del espermatozoide para mantener la estructura y función de la membrana plasmática. Otra posibilidad, ampliamente aceptada es que los fosfolípidos de la lecitina de soja no entran en la membrana para alterar la concentración de fosfolípidos, pero pueden formar una película protectora alrededor de la célula para evitar la formación de cristales de hielo intracelular y para proteger la membrana del espermatozoide de daños mecánicos durante la congelación-descongelación (Vidal *et al.*, 2012).

Antioxidantes

En numerosos trabajos se ha señalado que los procedimientos relacionados con la congelación producen *shock* por frío y ataque oxidativo reduciendo la calidad del semen post-descongelación (Salamon y Maxwell, 1995a; Bucak *et al.*, 2009a y 2009b; Tatone *et al.*, 2010).

Un cierto nivel de ROS es esencial para las funciones del espermatozoide, tales como la capacitación, la reacción acrosómica y la fusión ovocito-espermatozoide. Sin embargo, es una cuestión preocupante que los altos niveles de ROS tengan un efecto adverso sobre la funcionalidad de los espermatozoides conduciendo a una alta tasa de infertilidad (Mahfouz *et al.*, 2008; Fingerova *et al.*, 2009; Hossain *et al.*, 2011).

La membrana plasmática del espermatozoide de los mamíferos presenta altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados, lo que la hace muy susceptible a la formación de radicales libres induciendo daño peroxidativo, especialmente después de la crioconservación con la subsecuente pérdida de las funciones espermáticas (Lenzi *et al.*, 2002; Tatone *et al.*, 2010). Se ha observado que la peroxidación de lípidos ocurre en la pieza intermedia y la cola, lo que sugiere una fuente de ROS endógeno en la mitocondria (Brouwers y Gadella, 2003). Estos organelos reportan los eventos más importantes de peroxidación y daño de la membrana con el subsecuente agotamiento de ATP, pérdida de

motilidad, reducción de la fusión espermatozoide-ovulo y daño de ADN (Brouwers y Gadella, 2003). Además, se ha informado que la criopreservación es la responsable del aumento significativo en el daño oxidativo del ADN y la fragmentación de éste. Estos efectos parecen ser debidos en su mayoría al estrés oxidativo más que a la activación de caspasas y apoptosis (Tatone *et al.*, 2010).

Los intentos por superar la peroxidación lipídica durante la criopreservación de semen han incluido desde la realización del proceso bajo condiciones anaeróbicas, el uso de sustancias quelantes (EDTA) hasta la inclusión de antioxidantes en el medio de criopreservación (Salamon y Maxwell, 1995a; Holt, 2000; Salamon y Maxwell, 2000; Fernández *et al.*, 2009).

Enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa, citocromo *c* y glutatión peroxidasa, así como antioxidantes (glutatión, ditiotreitól, vitamina E y el hidroxitolueno butilado (BHT)) se han utilizado en los medios de congelación espermática con efectos beneficiosos sobre la motilidad y la integridad del acrosoma de los espermatozoides durante el enfriamiento (Salamon y Maxwell, 1995a; Holt, 2000; Leboeuf *et al.*, 2000; Salamon y Maxwell, 2000; Fernández *et al.*, 2009; Cebrián *et al.*, 2010; Memon *et al.*, 2012; Estrada *et al.*, 2014).

En los últimos años se ha utilizado ampliamente el antioxidante BHT. Numerosos estudios sugieren que este antioxidante tiene efectos positivos y reduce al mínimo el shock por frío en el semen de las aves (Donoghue y Donoghue, 1997), porcinos (Roca *et al.*, 2004; Grobfeld *et al.*, 2008), equinos (Morillo-Rodríguez *et al.*, 2012), bovinos (Hammerstedt *et al.*, 1976; Shoaie y Zamiri, 2008), búfalo (Ijaz *et al.*, 2009), ovinos (Watson y Anderson *et al.*, 1983) pero sobre todo en caprinos (Memon *et al.*, 2011; Memon *et al.*, 2012; Naijian *et al.*, 2013) demostrando su capacidad para reducir el estrés oxidativo ocasionado por el proceso de criopreservación en los espermatozoides (Memon *et al.*, 2012).

El hidroxitolueno butilado es un antioxidante fenólico sintético y un aditivo común en los alimentos (Hammerstedt *et al.*, 1976; Babich, 1982). Es un análogo sintético de la vitamina

E que se encarga de la reacción auto-oxidación mediante la transformación de los peroxi-radicales a hidroperóxidos (Ijaz *et al.*, 2009; Memon *et al.*, 2011; Najjian *et al.*, 2013). Se dice que es un eliminador de radicales libres, conocido por interactuar con la membrana celular alterando su fluidez (Holt, 2000).

3.4.2 REFRIGERACIÓN DE SEMEN DE CAPRINO

El semen de los pequeños rumiantes puede mantenerse en estado líquido a baja temperatura, que puede ser entre 10 a 15°C o bien en torno a 5°C (0-5°C). El fundamento es prolongar su capacidad fecundante al reducir su motilidad y metabolismo de forma reversible (Fiser y Fairfull, 1986; Mara *et al.*, 2007; Cebrián *et al.*, 2010).

Los diluyentes para refrigeración, generalmente contienen agentes tamponantes, azúcares, lípidos (yema de huevo) y antibióticos. Otros diluyentes incluyen la leche entera o desnatada, generalmente de vaca, cuya fracción proteica también actúa como agente protector. También se puede utilizar la leche UHT, que es estéril (Evans y Maxwell, 1990; Paulenz *et al.*, 2002; Cebrián *et al.*, 2010).

Una vez diluido el semen hasta la concentración adecuada, se lleva a una temperatura de 15 °C o 5°C siguiendo una curva de enfriamiento a razón de -0.2 a -0.3 °C/minuto. Este proceso suele realizarse mediante un baño termostatzado programable, pero si no se dispone de él, la refrigeración hasta 5°C puede hacerse colocando las muestras diluidas en un frigorífico o en un recipiente con hielo. Una vez alcanzada la temperatura final, se envasa en pajuelas y se mantiene a esa temperatura hasta su uso, que se recomienda no supere las seis horas (Fiser *et al.*, 1987; Cebrián *et al.*, 2010; Ashrafi *et al.*, 2011).

3.4.3 CONGELACIÓN DE SEMEN DE CAPRINO

El proceso de congelación se realiza en dos etapas, la de enfriamiento y la de congelación propiamente dicha. Un factor importante a considerar antes de iniciar el proceso de congelación es el método de adición del crioprotector penetrante, ya que puede realizarse en uno o dos pasos. El glicerol puede añadirse directamente en el diluyente en una única etapa (método en un paso) o añadirse en una fracción separada del diluyente, cuando la

muestra diluida haya alcanzado los 5°C (método en dos pasos; Salamon y Maxwell, 1995a; Anel *et al.*, 2003; Cebrián *et al.*, 2010). Con el fin de valorar si existe alguna ventaja del método de dos pasos sobre el de un solo paso se han realizado varios estudios sin encontrarse diferencias; por ello, se prefiere el uso del método en un solo paso, por su simplicidad y menor manejo del semen antes de la congelación (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Maxwell, 1995a; Salamon y Maxwell, 2000).

La etapa de enfriamiento es un periodo de adaptación para los espermatozoides a un metabolismo reducido. El semen ya diluido se enfría hasta los 5°C, a una velocidad de unos -0.2 a 0.4 °C/minuto (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Maxwell, 1995a; Salamon y Maxwell, 2000; Cebrián *et al.*, 2010). Generalmente, en las primeras dos horas se da la disminución de la temperatura de la muestra hasta igualarse con su entorno (5°C; Salamon y Maxwell, 1995a). Una vez que el semen diluido alcanza los 5°C, es recomendable mantenerlo a esta temperatura durante 1.5 a 2 horas, este proceso es conocido como equilibrado. Durante este periodo los espermatozoides permanecen en contacto con el glicerol antes de la congelación, permitiendo que el glicerol penetre en las células espermáticas y que se establezca un equilibrio entre la concentración intra y extracelular, pero no solo de glicerol, sino también del resto de componentes osmóticamente activos (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Maxwell, 1995a; Salamon y Maxwell, 2000; Cebrián *et al.*, 2010).

La congelación se realiza en **vapores de nitrógeno líquido**, de forma manual o automatizada. En la congelación manual, la velocidad de congelación se regula por la distancia de las pajuelas o tubos al nivel del nitrógeno líquido (10 a 100 °C/minuto) (Cebrián *et al.*, 2010). Las pajuelas se colocan horizontalmente en una gradilla a una distancia de 3-4 cm por encima de la superficie del nitrógeno líquido dentro de una caja de poliestireno o de cualquier material aislante. Las pajuelas se exponen a los vapores de nitrógeno líquido (-80 a -100°C) durante 10 a 20 minutos y posteriormente son depositadas directamente en el nitrógeno líquido (-196 °C; Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Maxwell, 1995a; Salamon y Maxwell, 2000; Dorado *et al.*, 2007; Balcázar y Porras, 2008).

La congelación automatizada se realiza mediante un biocongelador programable controlado por un ordenador. Consiste en un arcón, en el cual va entrando de forma controlada el nitrógeno para ir disminuyendo progresivamente la temperatura, ajustándose a una rampa previamente fijada (Evans y Maxwell, 1990; Cebrián *et al.*, 2010). En la literatura podemos encontrar diferentes curvas de enfriamiento (Cambor *et al.*, 1994; Söderquist *et al.*, 1997; Anel *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2003; Purdy *et al.*, 2010).

Si se preparan pellets o pastillas, se congelan las gotas de semen refrigerado (0.1-0.5 mL) directamente sobre pequeños orificios realizados en una superficie de **hielo seco** o sobre un polímero que se mantenga a una temperatura de entre -80 y -95°C, dejándoles allí durante 2-3 minutos, para luego transferirlos a nitrógeno líquido (Evans y Maxwell, 1990; Balcázar y Porras, 2008; Cebrián *et al.*, 2010).

En cuanto a la velocidad de congelación, hay que tener en cuenta que si la velocidad es demasiado rápida, se forman cristales de hielo intracelulares que provocan serias lesiones y rotura de la membrana plasmática. Pero si por el contrario, esa velocidad es demasiado lenta, la formación de cristales de hielo comienza en el exterior celular, produciendo la salida de agua del interior de la célula, en un intento por compensar el aumento de la osmolaridad en el medio extracelular y la célula se deshidrata. Existe pues una velocidad óptima de congelación, que será variable para cada especie y para cada tipo de envase empleado. Dicha velocidad oscila entre -10 y -80 °C/min. Lo mismo ocurre para el proceso de descongelación (Cebrián *et al.*, 2010).

Proceso de descongelación

La descongelación del semen es un punto muy crítico, siendo esta fase tan importante como el proceso de congelación para la supervivencia espermática. Además de los daños ocasionados por la congelación, los espermatozoides se pueden deteriorar si el proceso de descongelación no se lleva a cabo de una forma apropiada. Como norma general, cuanto más rápidamente se congele el semen, más rápido se debe descongelar a fin de obtener una más rápida recuperación de los espermatozoides. El semen de macho cabrío, congelado por cualquiera de los métodos pellets o pajuelas, se debe descongelar a una temperatura no inferior a 37°C. Las muestras pueden descongelarse a velocidad rápida o lenta. El ritmo de

descongelación se incrementa con temperaturas elevadas (60-75 °C). Si se descongelan rápidamente, las células están menos tiempo en contacto con los solutos concentrados y con el crioprotector, por tanto, la restauración del equilibrio intra-extracelular es más rápida, pero al usar altas temperaturas durante poco tiempo, existe el peligro de una exposición a temperaturas por encima del nivel crítico que pueden ser fatales para las propias células. Lo más frecuente es descongelar las pajuelas de semen por inmersión en baño de agua a 37°C durante 30 segundos o bien a 50 °C durante 9 segundos (Evans y Maxwell, 1990; Cebrián *et al.*, 2010). La descongelación de los pellets puede realizarse a 37°C durante 10 a 15 segundos ya sea en tubos secos o en tubos conteniendo solución salina fisiológica (Balcázar y Porras, 2008; Cebrián *et al.*, 2010).

Capítulo IV.
MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del área de estudio

El presente trabajo se realizó en la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) y en el Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), en Torre Marimon. Este centro se localiza en el km 12.1 de la carretera de Palau de Plegamans a Caldes de Montbui (C-59) en Caldes de Montbui, situado en la comarca del Vallès Oriental, en la provincia de Barcelona. El término municipal de Caldes de Montbui comprende una extensión de 38 km², se encuentra a una altitud de 203 msnm a 41° 37'55.77" de latitud norte y 2° 10'3.12" de longitud este. La temperatura media anual es de 14.1°C con precipitación pluvial promedio de 678.9 mm. El campus de la UAB está situado en Bellaterra, en el término municipal de Cerdanyola del Vallès, a 20 kilómetros del centro de Barcelona (IDESCAT, 2013; METEOCAT, 2013).

4.2 Adiestramiento de sementales

El adiestramiento para la recogida de semen se realizó mediante el uso de una batería de hembras, a las que se les indujo el celo mediante la administración de progestágenos vía esponjas vaginales, para despertar la libido y favorecer el comportamiento sexual de los jóvenes reproductores. La extracción del semen se realizó con una vagina artificial. La temperatura del agua del interior del forro de la vagina estaba entre 40-44 °C en el momento de la recogida del semen. La extracción de semen se realizó rutinariamente a un ritmo de 2 extracciones por día y 1 ó 2 días por semana de todos los machos.

4.3 Tipo de sementales

Para la recogida de semen, se utilizaron entre 6 y 8 machos cabríos jóvenes de la raza Blanca de Rasquera, previamente seleccionados mediante análisis genéticos por su capacidad de aportación de variabilidad genética a la raza.

4.4 Diluyente base o control

La composición base del diluyente de congelación fue la recomendada por Purdy *et al.* (2010), consistente en 300 mM Tris[hidroximetil] aminometano, 28 mM glucosa, 95 mM ácido cítrico y antibióticos (1000 IU/mL de penicilina sódica y 1 mg/mL de

sulfato de estreptomicina) a un pH 7.2–7.3, al que se le añadió yema de huevo y glicerol (v/v) a una concentración final de 15% y 5%, respectivamente.

4.5 Eliminación del plasma seminal o lavado

Se realizó mediante la dilución (1:5) en la solución TGC (300 mM Tris, 28 mM glucosa, 95 mM ácido cítrico) a 37°C y la doble centrifugación a 600 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, el sobrenadante fue descartado y el sedimento final fue resuspendido en el diluyente de congelación correspondiente.

4.6 Protocolo de congelación y descongelación

El protocolo de congelación consistió en diluir (1:4) cada alícuota de la mezcla de eyaculados en el diluyente correspondiente, seguidamente la suspensión de espermatozoides fue colocada en una nevera portátil a 5°C durante 4 horas. Mientras tanto, la concentración espermática fue determinada mediante la cámara de recuento celular de Neubauer, ajustando la concentración a 400×10^6 espermatozoides/mL. Transcurrido el tiempo de equilibrado, las muestras seminales fueron envasadas en pajuelas de 0.25mL (IMVTechnologies, L'Aigle, edex, France), selladas y congeladas en vapores de nitrógeno, colocando las pajuelas a 5 cm por encima del nivel del nitrógeno líquido durante 10 minutos, antes de ser sumergidas en nitrógeno líquido para su conservación.

Las muestras seminales crioconservadas fueron descongeladas por inmersión en baño de agua a 37°C durante un mínimo de 30 segundos. Las pajuelas fueron secadas y cortadas por los extremos, depositando su contenido en tubos de plástico hasta su análisis.

4.7 Análisis de la viabilidad y funcionalidad espermática

Tras la recogida del semen se evaluó el volumen de cada eyaculado en un tubo graduado y la motilidad masal del semen en una escala del 0 al 5 (Evans y Maxwell, 1990) con la ayuda de un microscopio óptico conectado a una platina calentable.

La viabilidad de los espermatozoides en fresco y a las 4 horas del inicio de la refrigeración se estimó mediante la tinción vital eosina/nigrosina (Hancock, 1951), así como el análisis

de la funcionalidad de la membrana plasmática mediante el test hipoosmótico (*hyposmotic swelling test* HOS test; Jeyendran *et al.*, 1984). Este test consistió en la incubación de 20 μL de la suspensión de espermatozoides en 180 μL de una solución hipotónica (100 mOsm) a 37°C durante 30 min (Forouzanfar *et al.*, 2010). Tras la incubación se realizó un frotis colocando 10 μL de la muestra y 10 μL de eosina-nigrosina para su observación en el microscopio óptico con objetivo de inmersión a 1000x.

Además, en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria, tras la refrigeración y tras la congelación/descongelación de las distintas suspensiones espermáticas, se llevó a cabo el análisis de los diferentes parámetros de motilidad con la ayuda del sistema computarizado de análisis (CASA) ISAS® (PROISER SL., Valencia). Los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides frescos y congelados/descongelados también fueron analizados mediante este sistema CASA.

Una vez almacenadas las diferentes muestras seminales crioconservadas, se valoró la integridad de las membranas plasmática y acrosomal así como la función mitocondrial, mediante citometría de flujo utilizando sondas fluorescentes en medio isoosmótico e hipoosmótico.

4.8 Análisis computarizado de la motilidad espermática

Para valorar la motilidad espermática tras la refrigeración y la descongelación, se procedió a la dilución en medio PBS a una concentración final aproximada de 40×10^6 espermatozoides/mL. A continuación, se depositó una gota de 10 μL de la suspensión de espermatozoides en un portaobjetos precalentado sobre una platina calentable a 38° C y se cubrió con un cubreobjetos de 24x24mm. Se visualizó en un microscopio de contraste de fases Olympus BH-2 (Japón) con un objetivo 20x de contraste negativo, un filtro de luz amarillo (Olympus If 550, Tokio, Japón). El microscopio tenía incorporado una platina atemperada a 38 °C y una cámara de vídeo digital (Basler A312f, Germany). Se analizaron un mínimo de 3 campos microscópicos con la finalidad de obtener 200 espermatozoides por muestra aproximadamente. Las imágenes fueron procesadas mediante el software ISAS®

(Integrated Semen Analysis System v.1.2 (ProiSer, Projectes i Serveis R+D, Valencia, España).

Las especificaciones para espermatozoides de macho cabrío fueron: Número de imágenes (25/s), Óptica (Ph-), Escala (20xOlympus), Área de partículas (>3 a <70 micras²), Espermatozoides lentos (10-45 micras/s), Espermatozoides medios (45-75 micras/s), Espermatozoides rápidos (>75 micras/s), Progresivos (80% de su STR; Cox *et al.*, 2006; Berlinguer *et al.*, 2009).

Todos los campos fueron revisados para descartar trayectorias erróneas y/o artefactos, posteriormente el programa generó las variables de motilidad: VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH, BCF así como la motilidad total y progresiva.

4.9 Análisis computarizado de la morfometría espermática

Para valorar la morfometría espermática de las muestras de espermatozoides frescos y congelados/descongelados, se realizó la dilución de la suspensión espermática en medio PBS a una concentración aproximada de 40×10^6 espermatozoides/mL. Posteriormente, se realizó una extensión depositando una gota de 10 μ L de la suspensión de espermatozoides en un portaobjetos, se dejó secar al aire para luego ser teñidas con el kit de tinción Diff-Quick[®]. Mediante inmersiones consecutivas durante 20 segundos en las soluciones Diff-Quick[®], las muestras fueron fijadas y teñidas.

El análisis morfométrico de las preparaciones se realizó con el módulo de morfometría del programa ISAS[®]. El equipo se compone de un microscopio (Olympus BH-2; Japón) equipado con un objetivo de 60x y un ocular WHK 10X/20 L, sobre el que se encuentra montada una cámara de video (Basler A312f, Germany), que recoge la imagen microscópica y la transmite al programa ISAS[®]. El sistema computarizado ISAS[®], se compone de un monitor de alta resolución (HP Compaq LA1951g), en el que se proyecta la imagen microscópica recogida por la videocámara, y un PC (DELL Intel Core Duo, Windows 7) equipado con tarjeta digitalizadora (Unified 1394 Driver) y software de análisis (versión 1.2). La resolución de las imágenes fue de 0.137615 μ m por píxel en el eje

horizontal y vertical. Se utilizó un filtro verde (Olympus If 550, Tokio, Japón), para aumentar el contraste de las mismas.

Se capturaron 150 espermatozoides por preparación con objetivo de 60x, utilizando una ventana de captura en el software de 100 x 100 píxeles, en la que se encuadra la cabeza y parte de la pieza intermedia, evitando aquellos espermatozoides que estuvieran superpuestos sobre otros o que presentaran interferencias en sus límites por la inclusión de partículas. La segmentación de las células digitalizadas se realizó automáticamente con un valor prefijado por el factor de análisis dentro de un rango de niveles de gris. El software genera una máscara que se ajusta a la imagen original, delimitando la célula y diferenciando dentro de ella la cabeza y la pieza intermedia. Si la máscara no se ajustaba correctamente a la silueta de la imagen microscópica, ésta podía ser corregida modificando el factor de análisis. Las células incorrectamente analizadas fueron eliminadas. Con la información de los límites de los espermatozoides, se calcularon automáticamente cuatro parámetros morfométricos para el tamaño de la cabeza: área, perímetro, longitud y anchura y cuatro para la forma de la cabeza: elipticidad, rugosidad, elongación y regularidad.

4.10 Análisis seminal por citometría de flujo

Se valoraron la integridad de las membranas plasmática y acrosomal y la función mitocondrial mediante citometría de flujo usando una tinción cuádruple. El equipo utilizado fue el citómetro de flujo BD FACSCanto (BD Biosciences, CA) y las muestras se analizaron con el programa BD FACSDiva (BD Biosciencias, CA). En cuanto a las 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 el estatus funcional de la mitocondria se utilizó *Mitotracker deep red* (M22426, Invitrogen S.A).

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.

Se utilizó una concentración final de 1 nM de SYBR-14 (diluido en DMSO), 1.5 μ M de IP, 2.5 μ 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 también conteniendo 1 mM de iones $[Ca^{2+}]$ y $[Mn^{2+}]$) 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 entonces remezclados justo antes del análisis. La suspensión de espermatozoides teñidos subsecuentemente 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 laser azul de estado sólido a 488 nm, mientras que para la excitación del *Mitotracker deep red* se utilizó el laser 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: células con membrana plasmática intacta, acrosoma intacto y función mitocondrial; células con membrana plasmática intacta, acrosoma dañado y función mitocondrial; células con membrana plasmática intacta, acrosoma intacto sin función mitocondrial, células con membrana plasmática intacta, acrosoma dañado sin función mitocondrial, células con membrana plasmática dañada, acrosoma intacto y función mitocondrial, células con membrana plasmática dañada, acrosoma dañado y función mitocondrial, células con

membrana plasmática dañada, acrosoma intacto sin función mitocondrial y células con membrana plasmática dañada, acrosoma dañado sin función mitocondrial.

La tinción, al tratarse de cuatro fluorescencias simultáneas, tenía solapamiento parcial de los espectros de emisión de los fluorocromos y por ello se ajustó la compensación para los detectores de emisión usados, con los respectivos controles de compensación. Los eventos no espermáticos fueron discriminados del análisis por las propiedades de dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC) de la luz (análisis espermático de dispersión cerrada). Además, los eventos dispersos con características similares a células espermáticas pero sin contenido de ADN (tinción muy débil de SYBR-14 o IP) también quedaron fuera (análisis espermático doblemente cerrado).

El citómetro de flujo fue calibrado cada día con las bolitas de calibración Rainbown de 8 picos (Sphero™). El citómetro fue usado a tasa media de flujo (60 μ L/min). Se analizaron 20000 células espermáticas por replica. Las poblaciones espermáticas fueron divididas por regiones y cuadrantes.

4.11 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS 20 para Windows (IBM SPSS, 2011). Los datos son presentados como media \pm error estándar. Los datos obtenidos a partir de los análisis de todos los parámetros espermáticos fueron sometidos a las pruebas de normalidad y homocedasticidad mediante Shapiro-Wilk y Levene. Cuando fue necesario, los datos fueron transformados mediante la raíz cuadrada del arcoseno. Todos los parámetros fueron analizados mediante análisis de la varianza, utilizando el GLM univariante, a excepción de los parámetros de motilidad espermática y morfometría obtenidos mediante el sistema CASA, que fueron analizados mediante el GLM multivariante. Las diferencias entre las medias fueron analizadas mediante la prueba de Duncan.

Capítulo V.
RESULTADOS

Estudio 1:

EFECTO DEL TIPO DE YEMA DE HUEVO, ELIMINACIÓN DEL PLASMA
SEMINAL Y EDAD DEL DONANTE EN LA CONSERVACIÓN DE
ESPERMATOZOIDES DE CAPRINO

Abstract

The main objective was to reduce the potential risk of microbiological contamination of cryopreservation extender by replacement of fresh egg yolk by pasteurized powdered egg yolk. Simultaneously, we studied the effect of the clarified fresh egg yolk, obtained by centrifugation of fresh egg yolk twice at 10.000xg for 45' at 4°C. In addition, we also assessed the effect of the presence of seminal plasma on sperm freezability from males of one and two years old. Briefly, fresh ejaculates (n = 6) from 6-8 bucks were collected by artificial vagina in two consecutive negative photoperiods. After collection, the ejaculates were mixed and split into two samples. One sperm sample was washed twice by centrifugation at 600xg for 10'. Afterwards, the pellet was split into three equal aliquots and re-suspended in a extender containing 15% (v/v) of different type of egg yolk (powdered, fresh or fresh clarified) supplemented with 5% glycerol (v/v) in Tris-based medium. The other semen sample was directly split into three equal aliquots and re-suspended in the same extenders, but containing only 2% (v/v) of different type of egg yolk (powdered, fresh or clarified). All samples were chilled for 4 hours at 5°C and then frozen to -196°C. The results on the evaluation of the protective capacity of each type of egg yolk in the extender indicate that, regardless of donor age, there was not superiority in any of the egg yolk types, at 15 or 2%, on any of the quality parameters analyzed after post-cooling or post-thawing. Quality parameters were higher in sperm preserved in absence of seminal plasma in the medium based on egg yolk 15%, regardless of type, related to preserved spermatozoa in medium based with 2% of egg yolk and seminal plasma, in semen donors at one or two years old. The powdered egg yolk can replace the fresh egg yolk in the extenders for buck sperm preservation, which is greater health security, as this product undergoes a pasteurization process, and the lots have a more homogeneous composition. The use of clarified egg yolk did not confer any benefit to the fresh egg yolk, complicated the process of drawing up preservation media. The removal of seminal plasma was beneficial for sperm preservation in media based with 15% of egg yolk.

Introducción

La yema de huevo fresco es un componente habitual en los diluyentes para la conservación espermática. Desde que fue utilizada por Phillips y Lardy en 1940 (revisado por Marco-Jiménez *et al.*, 2004) es considerada como un buen crioprotector no penetrante, ya que protege a las células espermáticas del shock por frío, mantiene la motilidad espermática, la integridad del acrosoma y de la membrana de la mitocondria del espermatozoide (Salamon y Maxwell, 2000). Dicha protección básicamente está determinada por las lipoproteínas de baja densidad (LDL), aunque el mecanismo preciso por el cual las LDL protegen a los espermatozoides durante la congelación-descongelación no se ha establecido con claridad. No obstante, la adición de la fracción rica en LDL obtenida a partir de la yema de huevo fresco mediante un proceso de diálisis (Moussa *et al.*, 2002) o centrifugación ultrarrápida (Tonieto *et al.*, 2010), podría beneficiar la viabilidad espermática post-descongelación. Sin embargo, la yema de huevo fresco, al ser un producto de origen animal, representa un riesgo potencial porque puede contener agentes microbiológicos u otros contaminantes que comprometerían la calidad del espermatozoide. Por tanto, resulta muy deseable la posibilidad de sustituir la yema de huevo fresco por otro componente más inocuo, pero con características similares o incluso mejores a la hora de proteger a las células espermáticas del daño producido por la congelación. Una alternativa más segura es la yema de huevo en polvo, ya que es sometida a un proceso de pasteurización durante su obtención, eliminando la posible contaminación bacteriana (Marco-Jiménez *et al.*, 2004). Sin embargo, las altas temperaturas que se requieren durante la pasteurización pueden alterar la composición de la yema de huevo, pudiendo estas modificaciones reducir su capacidad protectora o incluso afectar la calidad de los espermatozoides después de la congelación-descongelación.

Por otro lado, la congelación de espermatozoides de macho cabrío sigue representando un desafío, ya que esta especie tiene la peculiaridad de contener lipasas en el semen procedentes de las secreciones de las glándulas bulbouretrales que interactúan con la yema de huevo, produciendo sustancias tóxicas para el espermatozoide (Iritani *et al.*, 1964) y reduciendo el éxito de la congelación (Leboeuf *et al.*, 2000). Para minimizar estos efectos, generalmente se realiza el lavado del semen mediante centrifugación, sin embargo, se ha demostrado que esta práctica produce efectos deletéreos sobre la calidad espermática

(Azeredo *et al.*, 2001). Por otra parte, en morueco se ha descrito la presencia de proteínas en el plasma seminal, las BSP, que pueden proteger del daño provocado por el choque térmico (Colás *et al.*, 2009) y que son importantes para la adecuada funcionalidad del espermatozoide (Cardozo *et al.*, 2006), por lo que su eliminación puede disminuir la exposición a estas proteínas protectoras y, por ende, a sus efectos beneficiosos.

También se ha evidenciado que la calidad seminal varía en función de factores como la edad, la situación geográfica, la estación del año y la raza (Bongso *et al.*, 1982; Chemineau, 1986). Así, los machos cabríos de raza Alpina, en su hábitat natural producen semen de buena calidad hacia los 6 meses de vida (Roca *et al.*, 1991), mientras que en las razas Damasco (Al-Ghalban *et al.*, 2004) o Murciano-Granadina (Roca *et al.*, 1991) esta situación no se observa hasta edades superiores.

Por lo anteriormente citado, el presente estudio pretende valorar el efecto del tipo de yema de huevo utilizado en el medio de conservación, así como su concentración en función de la presencia o ausencia de plasma seminal sobre la calidad espermática durante el primer y segundo año de vida de los donantes.

Material y Métodos

Diseño experimental

Se utilizaron entre 6 y 8 machos cabríos de la raza Blanca de Rasquera, a los que se les colectó semen mediante una vagina artificial, a un ritmo de 2 extracciones por día y 1 ó 2 días por semana durante el otoño y en dos años consecutivos, a la edad de 1 y 2 años, realizando 6 replicas por año.

Se analizaron 3 tipos de yema de huevo (yema de huevo fresco, yema de huevo en polvo y yema de huevo clarificada) a dos concentraciones (2 y 15%) y la eliminación o no del plasma seminal (lavado/no lavado), generando 6 tratamientos para la congelación de los espermatozoides, que se describen a continuación:

- a) Semen lavado + diluyente con 15% de yema de huevo fresco (L-YHF15)
- b) Semen lavado + diluyente con 15% de yema de huevo en polvo (L-YHP15)
- c) Semen lavado + diluyente con 15% de yema de huevo clarificada (L-YHC15)
- d) Semen no lavado + diluyente con 2% de yema de huevo fresco (YHF2)
- e) Semen no lavado + diluyente con 2% de yema de huevo en polvo (YHP2)
- f) Semen no lavado + diluyente con 2% de yema de huevo clarificada (YHC2).

La composición base del diluyente de congelación fue la recomendada por Purdy *et al.* (2010), consistente en 300 mM Tris[hidroximetil] aminometano, 28 mM glucosa, 95 mM ácido cítrico y antibióticos (1000 IU/mL de penicilina sódica y 1 mg/mL de sulfato de estreptomicina) a un pH 7.2–7.3, al que se le añadió yema de huevo y glicerol (v/v) a una concentración final de 15% y 5%, respectivamente.

Tras la recogida, los eyaculados de los machos fueron mezclados con el fin de eliminar el efecto individual del donante, posteriormente el semen fue dividido en dos alícuotas: 1) **lavado**, el semen fue diluido (1:5) en la solución TGC (300 mM Tris, 28 mM glucosa, 95 mM ácido cítrico) a 37°C y centrifugado dos veces a 600xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, el sobrenadante fue descartado y el sedimento final fue resuspendido (1:4) en el diluyente de congelación correspondiente en un solo paso. 2) **no lavado**, el semen fue diluido (1:4) directamente en el medio de congelación correspondiente en un solo paso, ajustando la concentración a 400×10^6 de espermatozoides/mL.

Después de la dilución, las distintas suspensiones espermáticas se colocaron en un recipiente con agua a 20°C y se mantuvieron a 5°C durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron envasadas en pajuelas de 0.25 mL y congeladas en vapores de nitrógeno a 5 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido durante 10 minutos, antes de ser sumergidas en el nitrógeno para su conservación.

Las muestras seminales crioconservadas fueron descongeladas por inmersión en baño de agua a 37°C durante un mínimo de 30 segundos. Las pajuelas fueron secadas y cortadas por los extremos, depositando su contenido en tubos de plástico hasta su análisis.

Preparación de la yema de huevo

La obtención y preparación de los distintos tipos de yema de huevo se realizó según se describe a continuación:

Yema de huevo fresco. Se utilizó el método tradicional que consiste en romper manualmente el huevo fresco de gallina y separar la yema de la clara cuidadosamente. A continuación, se hace rodar la yema de huevo sobre un papel de filtro para eliminar las chalazas y restos de la membrana vitelina de la yema, posteriormente se introduce una jeringa estéril para recoger la yema.

Yema de huevo clarificada. Se utilizó la metodología descrita por Toniato *et al.* (2010) que consiste en la obtención de la yema de huevo de la misma manera que en el caso anterior. A continuación la yema es diluida en agua bidestilada (1:3) y centrifugada dos veces en tubos estériles a 10.000 g durante 45 minutos a 4°C. Tras la centrifugación el sedimento (gránulos) en el fondo de los tubos es descartado y la fracción clara soluble en agua (plasma) es utilizada para la preparación del diluyente.

Yema de huevo en polvo. Para la preparación de la yema de huevo en polvo (Hen egg yolk powder 53150, B.V. NIVE) se resuspendió y homogeneizó en agua bidestilada a una dilución 1:1.25.

Análisis *in vitro* de las células espermáticas

Tras la recogida del semen se evaluó el volumen de cada eyaculado en un tubo graduado y la motilidad masal del semen en una escala del 0 al 5 (Evans y Maxwell, 1990) con la ayuda de un microscopio óptico conectado a una platina calentable.

La viabilidad de los espermatozoides en fresco y a las 4 horas del inicio de la refrigeración se estimó mediante la tinción vital eosina/nigrosina (Hancock, 1951), así como el análisis de la funcionalidad de la membrana plasmática mediante el test hipoosmótico (*hyposmotic swelling test* HOS test; Jeyendran *et al.*, 1984, Forouzanfar *et al.*, 2010) como se ha descrito en la sección de material y métodos general.

Además, tras la refrigeración y tras la congelación/descongelación de las distintas suspensiones espermáticas, se llevó a cabo el análisis de los diferentes parámetros de motilidad con la ayuda del sistema computarizado de análisis (CASA) ISAS® (PROISER SL., Valencia), así como también los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides frescos y congelados/descongelados fueron analizados mediante este mismo sistema CASA.

Una vez almacenadas las diferentes muestras seminales crioconservadas, se valoró tras su descongelación la integridad de las membranas plasmática y acrosomal, así como la función mitocondrial mediante citometría de flujo utilizando las sondas fluorescentes SYBR14, ioduro de propidio, Ficoeritrina unida a la lectina *Arachis hipogea* (PE-PNA) y *Mitotracker deep red*, en medio isoosmótico e hipoosmótico, tal y como se ha descrito en la sección de material y métodos general.

Resultados

En la valoración de la calidad inicial del semen después de realizar el análisis espermático de la mezcla de eyaculados frescos de los machos cabríos se obtuvo que la viabilidad espermática estimada por E/N fue similar ($P > 0.05$) entre los animales de uno ($76.8 \pm 4.3\%$) y dos años de edad ($81.1 \pm 4.4\%$), así como también el porcentaje de las formas anormales sin incluir los acrosomas dañados ($1.4 \pm 0.45\%$; $2.4 \pm 0.8\%$) en los animales de uno y dos años, respectivamente. Por el contrario, el porcentaje de integridad funcional de la membrana tras la prueba de Host fue significativamente ($P < 0.05$) superior en espermatozoides procedentes de animales de dos años (77.4 ± 2.5) respecto a los de un año (63.7 ± 5.0) de edad. De igual manera, el volumen (1.8 ± 0.1 ; 1.0 ± 0.1) y la motilidad masal (3.8 ± 0.2 ; 2.5 ± 0.2) fueron

significativamente superiores ($P < 0.0001$) en los animales de dos años en comparación a los de un año de edad, respectivamente.

Al evaluar el efecto de la capacidad crioprotectora de cada tipo de yema de huevo y su concentración en el medio de conservación en función de la presencia o no de plasma seminal sobre la viabilidad de las células espermáticas tras la refrigeración se observó que los mejores resultados se obtuvieron cuando se eliminó el plasma seminal y los espermatozoides fueron conservados con un 15% de yema de huevo, independientemente de su tipo, en el primer año. Esta misma tendencia también se observó cuando los donantes tenían dos años, aunque la viabilidad de los espermatozoides lavados y refrigerados en los medios a base de yema de huevo fresco o clarificado al 15% no se diferenciaron de los valores obtenidos en los espermatozoides no lavados y conservados en yema de huevo fresco al 2%. Solamente el tratamiento que consistió en lavar y conservar los espermatozoides en yema de huevo en polvo al 15% presentó valores significativamente superiores de viabilidad a todos los tratamientos donde se prescindió del lavado del semen, utilizando 2% de yema de huevo en el medio de conservación.

En cuanto al efecto de la edad se observó que la viabilidad de los espermatozoides refrigerados fue significativamente superior en individuos de dos años en todos los tratamientos, independientemente del tipo de yema de huevo utilizada, de su concentración, así como de la eliminación o no del plasma seminal, a excepción de los espermatozoides lavados y conservados en el medio a base de YHF al 15%, donde no se observaron diferencias entre las dos edades (Tabla 1).

Con respecto a la prueba de Host se observó que al primer año de edad de los donantes, los espermatozoides lavados y conservados con 15% de yema de huevo tenían significativamente mayor integridad funcional de la membrana que los espermatozoides sin lavar y conservados con 2% de yema de huevo, mientras que en el segundo año de edad de los donantes, a pesar de mantenerse esta tendencia, no se observaron diferencias significativas entre los espermatozoides lavados y conservados en YHF o YHC al 15% y los espermatozoides no lavados y conservados con yema de huevo al 2%, a excepción de

los conservados en YHC (2%), donde si hubo diferencias con lo observado en el caso de lavar los espermatozoides y conservarlos en un 15% de YHC. Solamente, los valores obtenidos en los espermatozoides lavados y conservados en el medio a base de YHP al 15% fueron significativamente superiores a los obtenidos en todos los medios a base de yema de huevo al 2%. También se observó que hay un efecto significativo ($P < 0.01$) de la edad en la capacidad de resistencia al shock hipoosmótico de los espermatozoides tras la refrigeración, siendo mayor en los animales de 2 años de edad, independientemente del tipo de yema de huevo utilizada, a excepción de los espermatozoides lavados y conservados en YHF y YHC al 15% donde no hubo diferencias entre las dos edades (Tabla 1).

Tras el análisis de la motilidad espermática post-refrigeración mediante el sistema ISAS®, se observó que la motilidad total de los espermatozoides conservados en los medios que contenían 15% de yema de huevo previa eliminación del plasma seminal fueron significativamente superiores a la observada en todos los medios con yema de huevo al 2%, tanto en el primero como en el segundo año, sin observarse diferencias entre los tipos de yema de huevo (Tabla 1). En lo que se refiere al efecto de la edad, la motilidad total de los espermatozoides conservados en los medios con 15% de yema de huevo fue similar en ambos años, mientras que en los conservados en medios con 2% de yema de huevo, el porcentaje de motilidad total fue superior en espermatozoides procedentes de machos de dos años de edad respecto a los de un año (Tabla 1).

En la motilidad progresiva, durante el primer año se observó que los espermatozoides lavados y conservados con 15% de yema de huevo independientemente de su tipo, tenían mayor progresividad que los conservados con 2% de yema de huevo. Esta misma tendencia se observó durante el segundo año en los medios a base de YHF (15%) y en YHC (15%), donde se obtuvo una mayor progresividad de los espermatozoides lavados que en los conservados en todos los medios a base de yema de huevo al 2% donde el plasma no había sido eliminado previamente. Únicamente, la motilidad progresiva observada en los espermatozoides lavados y refrigerados en el medio a base de YHP (15%), no difirió de la que presentaban los conservados tanto en YHF (2%) como en YHP (2%) en presencia de plasma seminal (Tabla 1). Por otro lado, hubo efecto de la edad en todos los tratamientos, a

excepción de los tratamientos en que se utilizaron los medios YHF y YHP al 15%, observando que la motilidad progresiva fue significativamente superior en los espermatozoides procedentes de animales de dos años respecto a los de un año de edad (Tabla 1).

En cuanto a la calidad de movimiento, en el primer año de edad de los donantes no se apreció un efecto del tipo de tratamiento utilizado en la mayoría de los parámetros cinéticos tras la refrigeración, solo se observaron algunas diferencias en los parámetros que hacen referencia a la velocidad espermática. De hecho, no se observaron diferencias en la velocidad curvilínea (VCL) de los espermatozoides en la mayoría de los tratamientos, a excepción de la menor VCL presentada por los conservados en el medio YHC (2%) con plasma seminal respecto a la observada en los espermatozoides que habían sido lavados previamente, y de la VCL de los espermatozoides lavados y conservados en YHC (15%), la cual fue mayor respecto a la observada en espermatozoides no lavados y conservados en el mismo medio y en YHF, en ambos casos al 2%. Tampoco en la velocidad rectilínea (VSL) se observaron grandes diferencias, únicamente los espermatozoides conservados en el medio YHF (15%) presentaron una VSL significativamente superior a la observada en todos los medios a base de yema de huevo al 2%, así como también, la VLS fue superior en los tratamientos donde se eliminó el plasma seminal en los medios a base de YHP y YHC al 15% respecto al tratamiento sin lavado de los espermatozoides y en un medio a base de YHC al 2%. La VAP fue superior en los espermatozoides lavados y refrigerados en todos los medios a base de yema de huevo al 15% respecto de los no lavados y conservados en yema de huevo al 2%, a excepción de los espermatozoides lavados y conservados en YHC (15%) y no lavados y conservados en YHF (2%) donde no se observaron diferencias significativas (Tabla 1).

Tampoco el tratamiento utilizado en la conservación de espermatozoides procedentes de animales de dos años produjo grandes diferencias en los distintos descriptores del movimiento espermático, no observándose ninguna diferencia significativa en la linealidad (LIN) ni en la frecuencia de batido (BCF) entre tratamientos. Tampoco se apreciaron diferencias en los parámetros espermáticos de velocidad (VCL, VSL y VAP) y rectitud

(STR) entre tratamientos, salvo alguna excepción en los resultados obtenidos en el tratamiento a base de YHC en espermatozoides sin lavar que difirió de alguno de los tratamientos donde el plasma había sido eliminado previamente. Así, la VCL en los espermatozoides lavados y conservados en los medios a base de yema de huevo al 15% solo fue significativamente superior a la observada en los espermatozoides no lavados y conservados en YHC al 2%, siendo también la VSL de este último tratamiento significativamente inferior respecto a la observada en los espermatozoides conservados en YHF y YHC al 15%. Además la VAP observada en estos espermatozoides conservados en el tratamiento a base de 2% de YHC también fue significativamente inferior respecto al tratamiento sin plasma seminal y a base del medio YHC (15%) y la STR, respecto a la del medio YHF (15%). La amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) fue significativamente inferior en espermatozoides no lavados y conservados tanto en YHF como en YHC al 2% respecto a la obtenida por los espermatozoides lavados y conservados en el medio YHP (15%) sin diferenciarse estadísticamente de los espermatozoides lavados y conservados en YHF y YHC al 15% ni de los espermatozoides no lavados y conservados en YHP (2%) (Tabla 1).

En cuanto al efecto de la edad, éste no fue significativo ni en todos los distintos parámetros descriptores de movimiento espermático ni tampoco en los distintos tratamientos de conservación. Así, se observó que la VCL fue similar en ambos años en todos los medios de conservación a excepción de los espermatozoides sin lavar y conservados en los medios YHF y YHP al 2%, observando que la VCL obtenida en espermatozoides de animales de dos años fue superior respecto a los de un año de edad en ambos medios. En cambio, la VSL fue significativamente superior en todos los medios de conservación espermática durante el segundo año de edad respecto del primero. Con respecto a la VAP y LIN fueron significativamente inferiores en los espermatozoides lavados y conservados en YHC (15%) así como en todos los medios a base de yema de huevo al 2% sin lavar en el primer año respecto del segundo. La STR fue significativamente superior en todos los medios a los dos años de edad de los donantes respecto del primero, a excepción de los espermatozoides conservados en YHC (2%) donde no se observaron diferencias estadísticas entre las dos

edades. En lo que se refiere a la ALH y la BCF, la edad de los donantes no determinó diferencias significativas en ningún tratamiento y medio de conservación (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la edad, tipo de yema de huevo utilizado como crioprotector y la eliminación o no del plasma seminal sobre la viabilidad y capacidad de resistencia al shock hipoosmótico (Host) y parámetros cinéticos de espermatozoides caprinos tras la refrigeración.

| Parámetro | EDAD | L-YHF-15 | L-YHP-15 | L-YHC-15 | YHF-2 | YHP-2 | YHC-2 |
|----------------|------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------|
| Viabilidad (%) | 1 | 75.1±4.5 ^a | 64.3±6.3 ^{a*} | 68.3±4.3 ^{a*} | 27.2±4.2 ^{b*} | 30.2±2.8 ^{b*} | 27.0±2.5 ^{b*} |
| | 2 | 85.7±2.7 ^{ab} | 88.7±2.0 ^{a*} | 85.1±2.3 ^{ab*} | 68.3±4.3 ^{bc*} | 61.7±6.4 ^{c*} | 57.3±5.0 ^{c*} |
| Host (%) | 1 | 66.4±7.3 ^a | 57.6±3.6 ^{a*} | 71.3±7.0 ^a | 28.6±2.6 ^{b*} | 26.7±3.9 ^{b*} | 27.4±3.1 ^{b*} |
| | 2 | 75.8±3.4 ^{abc} | 80.3±3.9 ^{a*} | 78.3±5.3 ^{ab} | 62.4±3.1 ^{bc*} | 61.6±5.3 ^{bc*} | 60.0±2.1 ^{c*} |
| MT (%) | 1 | 89.3±2.1 ^a | 91.6±1.7 ^a | 85.9±2.7 ^a | 36.0±4.9 ^{b*} | 34.1±3.2 ^{b*} | 23.6±2.9 ^{b*} |
| | 2 | 88.9±2.1 ^a | 89.8±1.6 ^a | 85.9±3.9 ^a | 66.4±3.4 ^{b*} | 64.3±6.1 ^{b*} | 61.5±3.8 ^{b*} |
| MP (%) | 1 | 39.8±3.9 ^a | 33.0±4.9 ^a | 35.7±6.0 ^{a*} | 12.9±1.5 ^{b*} | 10.1±1.9 ^{b*} | 9.0±1.0 ^{b*} |
| | 2 | 48.9±3.0 ^a | 37.8±3.3 ^{ab} | 47.4±4.0 ^{a*} | 30.3±3.9 ^{bc*} | 24.0±3.2 ^{bc*} | 22.9±2.8 ^{c*} |
| VCL (µm/s) | 1 | 115.1±2.3 ^{ab} | 114.7±3.2 ^{ab} | 116.9±3.7 ^a | 99.8±3.9 ^{bc*} | 100.7±5.4 ^{abc*} | 93.7±4.0 ^c |
| | 2 | 124.0±2.2 ^a | 124.7±5.0 ^a | 123.9±4.7 ^a | 114.1±2.9 ^{ab*} | 116.9±4.2 ^{ab*} | 105.2±4.4 ^b |
| VSL (µm/s) | 1 | 56.6±1.9 ^{a*} | 50.6±4.2 ^{ab*} | 50.8±3.4 ^{ab*} | 41.2±3.0 ^{bc*} | 38.6±2.1 ^{bc*} | 36.8±2.1 ^{c*} |
| | 2 | 70.5±5.0 ^{a*} | 64.9±2.6 ^{ab*} | 73.9±1.9 ^{a*} | 68.5±3.5 ^{ab*} | 59.0±4.2 ^{ab*} | 54.9±2.9 ^{b*} |
| VAP (µm/s) | 1 | 76.0±1.7 ^a | 72.1±3.7 ^a | 70.8±2.8 ^{ab*} | 58.8±3.0 ^{bc*} | 58.0±3.4 ^{c*} | 53.0±1.6 ^{c*} |
| | 2 | 84.8±4.5 ^{ab} | 81.3±2.2 ^{ab} | 89.2±2.5 ^{a*} | 84.5±2.3 ^{ab*} | 78.3±3.5 ^{ab*} | 73.4±3.2 ^{b*} |
| LIN (%) | 1 | 50.2±2.0 | 45.0±3.3 | 44.9±3.5 [*] | 42.5±2.0 [*] | 40.0±1.7 [*] | 41.4±1.7 [*] |
| | 2 | 57.8±4.2 | 52.3±3.2 | 60.2±2.2 [*] | 60.6±3.7 [*] | 52.9±3.5 [*] | 54.5±2.9 [*] |
| STR (%) | 1 | 72.3±1.4 [*] | 68.5±3.0 [*] | 69.7±3.3 [*] | 68.5±1.6 [*] | 65.2±2.8 [*] | 68.7±2.0 |
| | 2 | 81.0±1.6 ^{a*} | 77.2±1.5 ^{ab*} | 80.7±1.4 ^{ab*} | 78.6±2.2 ^{ab*} | 73.4±2.7 ^{ab*} | 72.7±1.7 ^b |
| ALH (µm) | 1 | 4.4±0.2 | 4.6±0.2 | 4.6±0.3 | 4.1±0.2 | 4.3±0.2 | 4.0±0.2 |
| | 2 | 4.3±0.2 ^{ab} | 4.6±0.2 ^a | 4.2±0.2 ^{ab} | 3.7±0.3 ^b | 4.1±0.2 ^{ab} | 3.7±0.2 ^b |
| BCF (Hz) | 1 | 8.5±0.1 | 8.1±0.5 | 8.7±0.8 | 8.0±0.4 | 7.4±0.7 | 7.7±0.8 |
| | 2 | 9.8±0.5 | 8.8±0.4 | 10.1±0.7 | 9.0±0.6 | 9.0±0.6 | 8.5±0.5 |

Diferente letra en la fila indica diferencia estadística (P<0.01)

* En la columna para un mismo parámetro indica diferencia estadística (P<0.01)

YHF: yema de huevo fresco; YHP: yema de huevo en polvo; YHC: yema de huevo clarificado; L: Lavado; 2, 15: concentración de yema de huevo; 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 batido.

En el análisis de la motilidad espermática post-descongelación, la motilidad total y progresiva de los espermatozoides congelados sin presencia de plasma seminal en medios a base de yema de huevo al 15%, independientemente de su tipo, fueron significativamente superiores a las observadas en los conservados en todos los medios a base de yema de huevo al 2% sin previo lavado de los espermatozoides, tanto en el primero como en el segundo año de edad. Respecto al posible efecto de la edad del donante, no se observó ninguna diferencia significativa en ningún medio de conservación espermática, a excepción de la motilidad progresiva observada en espermatozoides lavados y congelados en el medio a base de YHF (15%), siendo superior a los dos años respecto de la obtenida en animales de un año de edad (Tabla 2).

Por lo que hace referencia a la calidad de movimiento tras la descongelación, no se observaron diferencias para ninguna variable en ninguno de los métodos de conservación de espermatozoides de animales de un año de edad, mientras que en el segundo año sí se apreciaron diferencias en todos los parámetros cinéticos. Así, se observó que la VCL y la VAP de los espermatozoides lavados y congelados en los medios a base de yema de huevo al 15%, independientemente de su tipo, fueron superiores a las observadas en los espermatozoides sin lavar y conservados en todos los medios con 2% de yema de huevo, aunque la VCL obtenida en el caso de los espermatozoides lavados y congelados en un medio a base de YHC fue también significativamente inferior a la observada en espermatozoides también lavados pero conservados en YHP. La VSL obtenida en todos los medios con 15% de yema de huevo también fue superior a la presentada por los espermatozoides congelados en los medios con 2% de yema de huevo, a excepción de la observada en espermatozoides lavados y conservados en los medios YHP y YHC al 15% que no se diferenció estadísticamente de la VSL registrada en los espermatozoides no lavados y conservados en el medio con YHF (2%). La linealidad de los espermatozoides lavados y conservados en el medio YHF (15%) fue significativamente superior a la de los espermatozoides no lavados y conservados en los medios a base de YHP y YHC al 2%, sin diferenciarse de los espermatozoides lavados y conservados en YHP y YHC al 15% ni de los espermatozoides no lavados y conservados en YHF (2%). El índice de rectitud también fue significativamente superior en los espermatozoides lavados y conservados en YHF

(15%) respecto al resto de tratamientos a excepción de los espermatozoides lavados y conservados en YHC (15%), del cual no se diferenció estadísticamente. Mencionar que el STR obtenido por los espermatozoides de este último medio aunque tampoco se diferenció estadísticamente de los medios YHP (15%) y YHF (2%), sí fue superior a los significativamente bajos valores obtenidos en YHP y YHC al 2%. En cuanto a la BCF, ésta fue significativamente superior en los espermatozoides lavados y conservados en YHF al 15% respecto al resto de medios y tratamientos. No obstante, la BCF obtenida en los espermatozoides lavados y conservados en YHP (15%) fue significativamente superior a la obtenida en los espermatozoides conservados en YHP y YHC al 2%, sin lograr diferenciarse de la YHF (2%) ni de la YHC (15%). La ALH obtenida en los espermatozoides lavados y conservados en YHP al 15% fue significativamente superior al resto de medios y tratamientos. Aunque cabe mencionar que la ALH fue significativamente inferior en los espermatozoides no lavados y conservados en el medio YHF (2%) sin diferenciarse de la observada en el medio YHC también al 2% (Tabla 2).

En cuanto al efecto de la edad de los donantes del semen, la VCL fue superior en espermatozoides procedentes de animales de dos años respecto al primer año de edad en todos los tratamientos de conservación, excepto en el medio YHP (2%) donde no se observaron diferencias estadísticas. La VSL y la VAP también fueron significativamente superiores en espermatozoides procedentes de machos de dos años respecto de las obtenidas en espermatozoides de animales un año más jóvenes en todos los medios a base de yema de huevo al 15%, así como también en el medio YHF (2%). También la ALH fue significativamente superior en todos los medios de conservación espermática a los dos años respecto del primer año, aunque solo hubo diferencias en los espermatozoides lavados y conservados en YHF y YHP al 15%. Resaltar que ni la LIN, ni la STR así como tampoco la BCF se vieron afectadas por la edad del donante en ninguno de los tratamientos estudiados (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la edad, del tipo de yema de huevo como crioprotector no penetrante y la eliminación o no del plasma seminal sobre los parámetros cinéticos de espermatozoides tras la descongelación en machos cabríos.

| Parámetro | Edad | L-YHF-15 | L-YHP-15 | L-YHC-15 | YHF-2 | YHP-2 | YHC-2 |
|---------------|------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|
| MT (%) | 1 | 39.6±5.5 ^a | 34.0±6.6 ^a | 34.3±7.6 ^a | 2.7±1.4 ^b | 1.5±0.7 ^b | 1.3±0.6 ^b |
| | 2 | 43.6±5.4 ^a | 46.8±9.1 ^a | 36.4±5.4 ^a | 8.6±1.3 ^b | 8.2±0.6 ^b | 5.8±1.2 ^b |
| MP (%) | 1 | 14.2±1.9 ^{a*} | 12.5±3.0 ^a | 13.8±2.8 ^a | 1.0±0.5 ^b | 0.3±0.2 ^b | 0.2±0.1 ^b |
| | 2 | 24.5±4.6 ^{a*} | 18.7±4.0 ^a | 18.2±4.2 ^a | 4.0±0.7 ^b | 2.2±0.4 ^b | 1.7±0.5 ^b |
| VCL (µm/s) | 1 | 83.9±4.4 [*] | 81.5±4.1 [*] | 82.5±6.3 [*] | 67.2±13.3 [*] | 77.1±4.8 | 68.9±7.1 [*] |
| | 2 | 112.7±3.7 ^{ab*} | 123.9±4.3 ^{a*} | 109.2±3.5 ^{b*} | 91.5±4.1 ^{c*} | 94.5±4.9 ^c | 91.0±4.1 ^{c*} |
| VSL (µm/s) | 1 | 31.7±1.6 [*] | 34.6±4.8 [*] | 34.2±3.1 [*] | 26.7±4.1 [*] | 25.0±6.0 | 23.7±1.4 |
| | 2 | 54.7±2.2 ^{a*} | 48.5±4.4 ^{ab*} | 49.4±5.9 ^{ab*} | 40.2±3.6 ^{bc*} | 31.6±3.4 ^c | 30.8±3.8 ^c |
| VAP (µm/s) | 1 | 46.0±2.1 [*] | 47.9±4.6 [*] | 46.7±2.5 [*] | 36.3±6.2 [*] | 39.5±4.6 | 38.5±2.9 |
| | 2 | 67.2±1.7 ^{a*} | 66.6±5.2 ^{a*} | 64.1±4.8 ^{a*} | 54.3±2.7 ^{b*} | 48.7±3.2 ^b | 48.8±3.7 ^b |
| LIN (%) | 1 | 39.7±2.4 | 42.9±5.3 | 42.6±4.7 | 48.4±5.9 | 35.0±7.5 | 38.4±3.4 |
| | 2 | 48.6±1.9 ^a | 39.7±2.3 ^{ab} | 44.6±5.0 ^{ab} | 44.5±3.3 ^{ab} | 34.4±3.3 ^b | 35.8±2.8 ^b |
| STR (%) | 1 | 68.3±2.5 | 68.5±5.0 | 69.2±5.7 | 76.4±6.4 | 63.5±8.6 | 64.1±4.2 |
| | 2 | 78.7±1.6 ^a | 70.6±2.2 ^{bc} | 71.1±4.7 ^{ab} | 68.9±3.6 ^{bc} | 62.1±3.7 ^c | 61.7±2.5 ^c |
| ALH (µm) | 1 | 3.6±0.2 [*] | 3.4±0.3 [*] | 3.4±0.4 | 3.0±0.6 | 3.9±0.4 | 3.2±0.4 |
| | 2 | 4.3±0.2 ^{a*} | 4.9±0.1 ^{b*} | 4.3±0.2 ^a | 3.6±0.2 ^c | 4.3±0.2 ^a | 4.1±0.3 ^{ac} |
| BCF (Hz) | 1 | 8.4±0.4 | 8.0±0.8 | 9.1±0.9 | 8.8±1.0 | 5.1±0.5 | 6.8±0.4 |
| | 2 | 10.6±0.5 ^a | 9.6±0.7 ^b | 8.6±0.6 ^{bc} | 8.7±0.7 ^{bc} | 6.7±0.5 ^d | 7.4±0.7 ^{cd} |

Diferente letra en la fila indica diferencia estadística ($P<0.05$)

* En la columna para un mismo parámetro indica diferencia estadística ($P<0.05$)

YHF: yema de huevo fresco; YHP: yema de huevo en polvo; YHC: yema de huevo clarificado; L: Lavado; 2, 15: concentración de yema de huevo; 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 batido.

Al analizar mediante citometría de flujo las características de los espermatozoides tras la descongelación e incubación en un medio isoosmótico, se detectó que la integridad de la membrana de los espermatozoides lavados y crioconservados en medios a base de yema de huevo al 15% independientemente de su tipo, fue significativamente superior a los conservados en yema de huevo al 2% tanto en donantes de un año como en donantes de dos años de edad. Con respecto a la edad, se observó que los valores obtenidos en el segundo

año fueron significativamente superiores respecto del primero solo en los espermatozoides lavados y conservados en YHC al 15% y en los no lavados y conservados en YHP al 2% (Tabla 3). En cuanto a la función mitocondrial de los espermatozoides con membranas intactas, se observó que el porcentaje de espermatozoides sin función mitocondrial fue similar entre los distintos tratamientos durante el primer año de edad, pero significativamente diferente durante el segundo año, siendo inferior en los lavados y conservados en YHF (15%) respecto de los lavados y conservados en YHP (15%), aunque sin diferenciarse de los otros tratamientos. Asimismo, solo hubo efecto de la edad en este parámetro en los espermatozoides lavados y conservados en YHF al 15%, siendo significativamente inferior a los dos años respecto de un año (Tabla 3).

Tras la descongelación, el porcentaje de acrosomas dañados fue significativamente superior en los espermatozoides no lavados y conservados en medios con un 2% de yema de huevo, respecto a los espermatozoides lavados y conservados en los medios con un 15% de yema de huevo, tanto en el primero como en el segundo año de edad de los donantes. Aunque, en el segundo año de edad de los donantes, se observó que los espermatozoides no lavados y conservados en YHC al 2% presentaron los peores resultados. En cuanto al efecto de la edad, se observó que el porcentaje de acrosomas dañados fue inferior en los espermatozoides procedentes de animales de dos años respecto a los de un año de edad, independientemente de haber retirado o no el plasma seminal y el tipo de yema de huevo utilizada en los medios de conservación así como su concentración, aunque no se observaron diferencias estadísticas cuando los espermatozoides fueron lavados y conservados en yema de huevo fresco o yema de huevo en polvo al 15% (Tabla 3).

Tras la incubación en el medio hipoosmótico, los espermatozoides lavados y crioconservados en medios a base de yema de huevo al 15%, volvieron a presentar una integridad de membrana significativamente superior a los crioconservados en yema de huevo al 2%, tanto en el primero como en el segundo año, sin observarse efecto de la edad ($P > 0.05$). En cuanto al porcentaje de espermatozoides con integridad de la membrana plasmática sin función mitocondrial tampoco difirió entre los medios de conservación espermática durante el primer año, pero sí durante el segundo año, siendo inferior de nuevo

en los espermatozoides lavados y conservados en YHF (15%) y superior en los lavados y conservados en YHP (15%), sin diferenciarse de los otros tratamientos y sin observar efecto de la edad (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la edad, del tipo de yema de huevo como crioprotector no penetrante y la eliminación o no del plasma seminal en la integridad de las membranas plasmática y acrosomal y función mitocondrial de las células espermáticas tras la descongelación.

| Población | Edad | L- YHF-15 | L- YHP-15 | L- YHC-15 | YHF-2 | YHP-2 | YHC-2 |
|--|------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| SYBR14 ⁺ /IP ⁻ SI (%) | 1 | 36.6±2.3 ^a | 36.8±3.5 ^a | 27.1±4.8 ^{a*} | 1.9±0.6 ^b | 2.0±0.8 ^{b*} | 0.7±0.1 ^b |
| | 2 | 41.9±2.3 ^a | 41.0±3.8 ^a | 39.0±2.3 ^{a*} | 9.1±1.4 ^b | 11.7±0.9 ^{b*} | 4.5±1.0 ^b |
| SYBR14 ⁺ /IP ⁻ /PE-PNA ⁻ /MT ⁻ SI (%) | 1 | 3.7±1.6 [*] | 2.0±0.6 | 2.0±1.4 | 0.3±0.1 | 0.5±0.2 | 0.2±0.1 |
| | 2 | 0.5±0.2 ^{a*} | 4.7±1.6 ^b | 1.9±0.8 ^{ab} | 1.7±0.9 ^{ab} | 2.5±1.3 ^{ab} | 0.5±0.1 ^{ab} |
| PE-PNA ⁺ (%) | 1 | 39.7±2.5 ^a | 38.9±1.6 ^a | 51.1±9.2 ^{a*} | 82.3±2.7 ^{b*} | 89.1±3.6 ^{b*} | 94.9±0.9 ^{b*} |
| | 2 | 30.8±3.0 ^a | 29.8±2.1 ^a | 36.4±2.6 ^{a*} | 71.6±2.6 ^{b*} | 70.2±2.1 ^{b*} | 85.6±0.9 ^{c*} |
| SYBR14 ⁺ /IP ⁻ SH (%) | 1 | 25.7±3.1 ^a | 24.0±4.1 ^a | 23.0±5.7 ^a | 1.7±0.5 ^b | 2.5±1.3 ^b | 0.3±0.1 ^b |
| | 2 | 27.8±2.3 ^a | 29.3±3.4 ^a | 27.9±4.1 ^a | 8.3±0.9 ^b | 10.4±1.4 ^b | 5.5±0.9 ^b |
| SYBR14 ⁺ /IP ⁻ /PE-PNA ⁻ /MT ⁻ SH (%) | 1 | 1.6±0.9 | 4.5±2.9 | 4.2±2.2 | 0.3±0.1 | 0.5±0.3 | 0.1±0.0 |
| | 2 | 0.4±0.1 ^a | 2.6±1.1 ^b | 1.0±0.4 ^{ab} | 0.7±0.2 ^{ab} | 1.1±0.4 ^{ab} | 0.6±0.3 ^{ab} |

Diferente letra en la fila indica diferencia estadística (P<0.05)

* En la columna para un mismo parámetro indica diferencia estadística (P<0.05)

YHF: yema de huevo fresco; YHP: yema de huevo en polvo; YHC: yema de huevo clarificado; L: Lavado; 2, 15: concentración de yema de huevo; SYBR14⁺/IP⁻: Membrana plasmática intacta; SYBR14⁺/IP⁻/PNA⁻/MT⁻: Membrana plasmática intacta, acrosoma intacto sin función mitocondrial; PE-PNA⁺: Acrosomas dañados; SI: incubación en solución isoosmótica; SH: incubación en solución hipoosmótica

En la figura 1 podemos observar la población espermática después de haber sido sometida al proceso de tinción cuádruple, utilizando las sondas fluorescentes SYBR14/IP/PE-PNA/Mitotracker deep red como ya ha sido descrito en material y métodos. En primer lugar, se aprecia el comportamiento de la población espermática global de la especie caprina (A). A continuación, esta tinción y el análisis espermático de dispersión cerrada nos permite eliminar las partículas de yema de huevo y otros detritus como se observa en el

gráfico (B), así como eliminar, por su forma y complejidad, las células espermáticas que se encuentran formando agregados, (ver gráfico C). Seguidamente, en el gráfico (D) podemos visualizar los eventos espermáticos con membrana plasmática intacta (SYBR14⁺/IP⁻) y eventos espermáticos con membrana plasmática dañada (SYBR14⁻/IP⁺). Además, en el gráfico (E), esta técnica nos permite mostrar los eventos espermáticos con membrana plasmática intacta, acrosoma intacto y función mitocondrial (SYBR14⁺/IP⁻/PE-PNA⁻/Mitotracker⁺), eventos espermáticos con membrana plasmática intacta, acrosoma dañado y función mitocondrial (SYBR14⁺/IP⁻/PE-PNA⁺/Mitotracker⁺), eventos espermáticos con membrana plasmática dañada, acrosoma intacto sin función mitocondrial (SYBR14⁻/IP⁺/PE-PNA⁻/Mitotracker⁻) y eventos espermáticos con membrana plasmática dañada, acrosoma dañado sin función mitocondrial (SYBR14⁻/IP⁺/PE-PNA⁺/Mitotracker⁻).

Tras realizar el análisis morfométrico de la cabeza del espermatozoide en fresco y de las distintas suspensiones espermáticas post-descongelación, todos los parámetros de dimensión y forma fueron similares ($P>0.05$) en espermatozoides de animales de un año de edad (Tabla 4), independientemente de ser frescos o congelados en distintos medios. De igual manera, todos los parámetros de dimensión y la rugosidad de los espermatozoides fueron similares ($P>0.05$) a los dos años de edad de los donantes. Sin embargo, la elipticidad y elongación fueron significativamente superiores en los espermatozoides después del proceso de congelación-descongelación, independientemente del medio utilizado, respecto de los espermatozoides en fresco a diferencia de la regularidad que fue inferior en los espermatozoides crioconservados que en frescos (Tabla 4).

Por otro lado, se observó que hubo efecto de la edad en los espermatozoides frescos en todos los parámetros, a excepción de la regularidad donde no se observaron diferencias entre las edades. En cuanto a los parámetros de anchura y rugosidad, éstos fueron superiores en los espermatozoides frescos de animales de dos años respecto de los de un año, mientras que los parámetros de longitud, área, perímetro, elipticidad y elongación fueron inferiores en los procedentes de dos años (Tabla 4). En cuanto a los espermatozoides congelados-descongelados también hubo efecto de la edad en todos los parámetros a excepción del área, rugosidad y regularidad, donde no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Los valores obtenidos en la longitud, elipticidad y

elongación de los espermatozoides congelados en todos los medios de conservación espermática fueron mayores en el primer año respecto al segundo, así como también el perímetro obtenido en los espermatozoides conservados en los medios a base de yema de huevo al 2% independientemente de su tipo. Solamente la anchura obtenida en todos los medios de conservación espermática a los dos años fue significativamente superior al primer año de edad (Tabla 4).

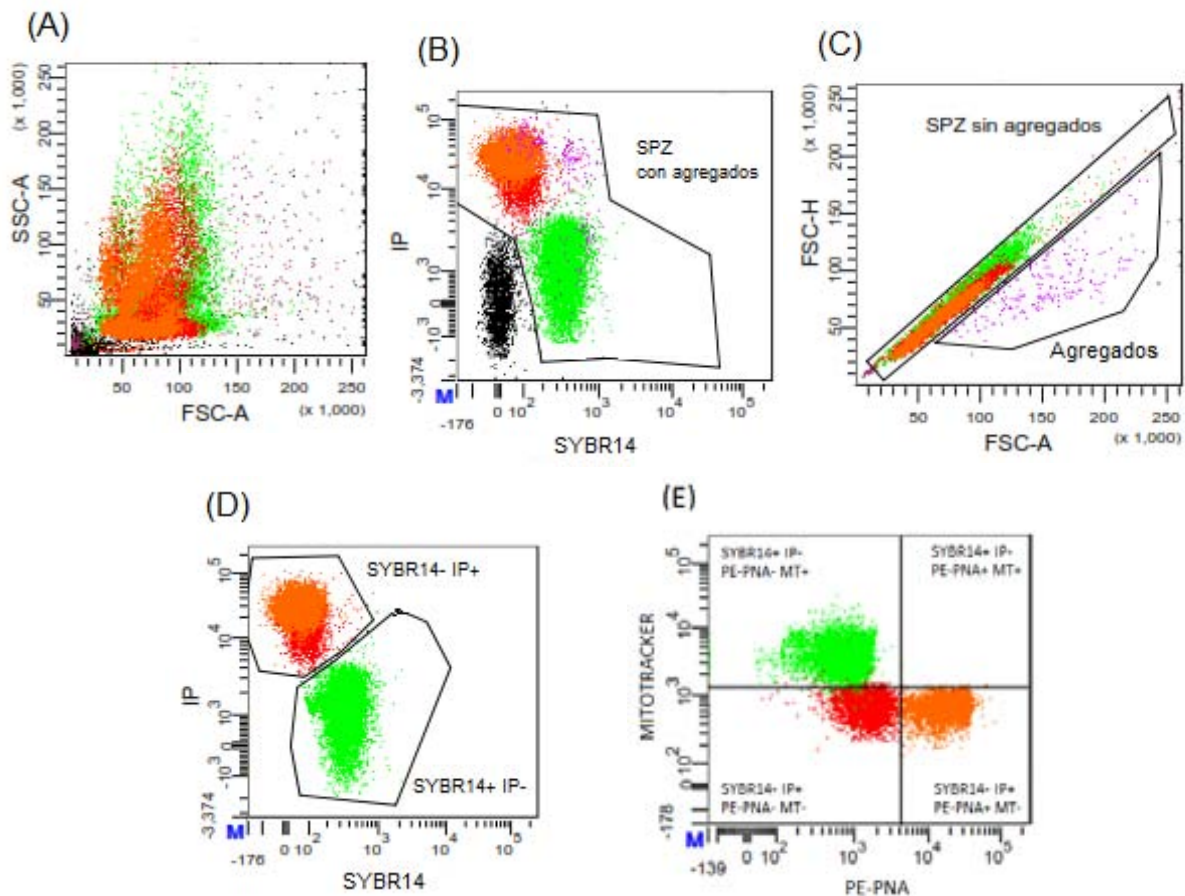


Figura 1. Citometría de flujo, eliminando las partículas de la yema de huevo en base a las propiedades de dispersión después de la tinción cuádruple. Los espermatozoides fueron teñidos con SYBR14/IP/PE-PNA/*Mitotracker deep red* como se ha descrito en material y métodos. (A) Población espermática global, (B) Células espermáticas sin partículas de yema de huevo con agregados, (C) Eventos específicos de espermatozoides sin agregados, (D) Espermatozoides con membrana plasmática intacta (SYBR14⁺/IP⁺) y espermatozoides con membrana plasmática dañada (SYBR14⁺/IP⁻), (E) Células con membrana plasmática intacta, acrosoma intacto y función mitocondrial (SYBR14⁺/IP⁺/PE-PNA⁺/Mitotracker⁺), células con membrana plasmática intacta, acrosoma dañado y función mitocondrial (SYBR14⁺/IP⁺/PE-PNA⁺/Mitotracker⁻), células con membrana plasmática dañada, acrosoma intacto sin función mitocondrial (SYBR14⁺/IP⁺/PE-PNA⁻/Mitotracker⁻) y células con membrana plasmática dañada, acrosoma dañado sin función mitocondrial (SYBR14⁺/IP⁺/PE-PNA⁻/Mitotracker⁻).

Tabla 4. Efecto de la edad, del tipo de yema de huevo como crioprotector no penetrante y la eliminación o no del plasma seminal sobre los parámetros morfométricos de las células espermáticas tras la descongelación en machos cabríos.

| Parámetro | Edad | FRESCO | L-YHF-15 | L-YHP-15 | L-YHC-15 | YHF-2 | YHP-2 | YHC-2 |
|-------------------------|------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Longitud (µm) | 1 | 8.18±0.10* | 8.17±0.04* | 8.12±0.04* | 8.09±0.07* | 8.18±0.04* | 8.10±0.10* | 8.15±0.13* |
| | 2 | 7.72±0.04* | 7.84±0.06* | 7.84±0.03* | 7.85±0.03* | 7.82±0.02* | 7.78±0.03* | 7.81±0.03* |
| Anchura (µm) | 1 | 4.32±0.02* | 4.20±0.03* | 4.18±0.03* | 4.20±0.05* | 4.20±0.02* | 4.22±0.03* | 4.23±0.02* |
| | 2 | 4.45±0.02* | 4.39±0.02* | 4.40±0.03* | 4.36±0.02* | 4.37±0.02* | 4.36±0.01* | 4.38±0.02* |
| Área (µm ²) | 1 | 29.92±0.35* | 29.07±0.28 | 28.76±0.15 | 28.77±0.20 | 29.13±0.23 | 28.83±0.47 | 29.18±0.52 |
| | 2 | 28.92±0.25* | 29.23±0.18 | 29.31±0.21 | 29.15±0.15 | 28.93±0.17 | 28.81±0.19 | 29.02±0.24 |
| Perímetro (µm) | 1 | 22.38±0.2* | 22.36±0.10 | 22.22±0.08 | 22.07±0.11 | 22.38±0.10* | 22.19±0.25* | 22.31±0.28* |
| | 2 | 21.70±0.08* | 21.87±0.12 | 21.88±0.07 | 21.80±0.06 | 21.70±0.06* | 21.59±0.10* | 21.73±0.10* |
| Elipticidad | 1 | 1.90±0.03* | 1.95±0.02* | 1.95±0.02* | 1.93±0.04* | 1.95±0.01* | 1.93±0.03* | 1.93±0.03* |
| | 2 | 1.74±0.00 ^a * | 1.79±0.02 ^b * | 1.79±0.01 ^b * | 1.80±0.01 ^b * | 1.79±0.01 ^b * | 1.79±0.00 ^b * | 1.79±0.01 ^b * |
| Rugosidad | 1 | 0.74±0.00* | 0.73±0.00 | 0.73±0.00 | 0.74±0.01 | 0.73±0.00 | 0.74±0.01 | 1.41±0.57 |
| | 2 | 0.77±0.00* | 0.77±0.00 | 0.77±0.00 | 0.77±0.00 | 0.77±0.00 | 0.77±0.00 | 0.77±0.00 |
| Elongación | 1 | 0.31±0.01* | 0.32±0.00* | 0.32±0.01* | 0.32±0.01* | 0.32±0.00* | 0.31±0.01* | 0.31±0.01* |
| | 2 | 0.26±0.00 ^a * | 0.28±0.00 ^b * | 0.28±0.00 ^b * | 0.28±0.00 ^b * | 0.28±0.00 ^b * | 0.28±0.00 ^b * | 0.28±0.00 ^b * |
| Regularidad | 1 | 0.93±0.00 | 0.93±0.00 | 0.93±0.00 | 0.93±0.00 | 0.93±0.00 | 0.93±0.00 | 0.93±0.00 |
| | 2 | 0.93±0.00 ^a | 0.92±0.00 ^b | 0.92±0.00 ^b | 0.92±0.00 ^b | 0.92±0.00 ^b | 0.92±0.00 ^b | 0.92±0.00 ^b |

Diferente letra en la fila indica diferencia estadística (P<0.05)

* En la columna para un mismo parámetro indica diferencia estadística (P<0.05)

YHF: yema de huevo fresco; YHP: yema de huevo en polvo; YHC: yema de huevo clarificado; L: Lavado; 2, 15: concentración de yema de huevo

Discusión

La calidad inicial del semen de los machos cabríos de la raza Blanca de Rasquera fue superior en eyaculados procedentes de animales de dos años respecto a la de los de un año de edad en lo que se refiere a la integridad funcional de la membrana tras la prueba de Host, volumen de eyaculado y motilidad masal, coincidiendo con lo reportado por Roca *et al.* (1991) quienes observaron que la motilidad masal e individual del semen fresco de la raza caprina Murciano-Granadina fue mayor en animales de 21-22 meses respecto a los animales de 9-10 meses de edad. También la motilidad masal observada por Al-Ghalban *et*

al. (2004) en el semen fresco de machos cabríos de la raza Damascus fue superior en animales maduros (2-4 años) respecto de los animales jóvenes (10-12 meses). El efecto de la edad sobre la calidad del semen fresco también ha sido observado en el ovino. Osinowo *et al.* (1988) señalaron que los donantes con edad entre 2.4 y 3.4 años tienen mayor volumen de eyaculado y mayor concentración espermática que los donantes de 1.4 años de edad. También Joshi *et al.* (2003) mencionan que la edad tiene influencia sobre los parámetros de calidad de movimiento en el semen fresco de la raza ovina Garole, señalando que en animales con una edad superior a los 4 años, la linealidad y rectitud disminuye significativamente. En nuestro laboratorio, recientemente García (2014), también ha demostrado que la edad influye significativamente sobre los parámetros de calidad del semen fresco, refrigerado y congelado-descongelado, observando mejores resultados en ovinos de dos años respecto a los de un año de edad. En bovinos también se ha observado que la calidad espermática varía en función de la edad de los donantes. En espermatozoides frescos de toros de la raza Sahiwal, Bhakat *et al.* (2011) observaron que la mejor calidad seminal fue obtenida en el grupo de 4-5 años de edad, tal y como señalan Brito *et al.* (2012) acerca de que la calidad de los espermatozoides frescos de bovino mejora gradualmente con la edad, debido al incremento en el peso y tamaño testicular que están asociados a la eficiencia de la espermatogénesis (Toe *et al.*, 1994; Al-Ghalban *et al.*, 2004).

En cuanto a los parámetros morfométricos del semen fresco, nuestros resultados son muy próximos, tanto a los observados por Marco-Jiménez *et al.* (2006) en espermatozoides de machos cabríos de la raza Murciano-Granadina como a los obtenidos por Hidalgo *et al.* (2007) en la raza caprina Florida. Sin embargo, tras el proceso de congelación-descongelación, las células espermáticas no mostraron grandes cambios respecto de los espermatozoides frescos a diferencia de la reducción en el tamaño observada por otros autores en macho cabrío (Marco-Jiménez *et al.*, 2006; Hidalgo *et al.*, 2007), morueco (Martí *et al.*, 2011), toro (Gravance *et al.*, 1998) o caballo (Arruda *et al.*, 2002). Por el contrario, nuestros resultados coinciden con Gravance *et al.* (1997), quienes tampoco encontraron diferencias entre los espermatozoides frescos y descongelados de caprino. Las variaciones en los resultados pueden deberse a los diferentes protocolos utilizados en la crioconservación o a los procesos de fijación y tinción. Generalmente, las muestras se

colocan en un portaobjetos y se secan al aire antes de su fijación, pero es posible que al secarlas al aire el tamaño puede reducirse o colapsarse bajo estas condiciones (Marco-Jiménez *et al.*, 2006). A este respecto, Ball y Mohammed, (1995) en espermatozoides de equino, reportaron que el secado y la fijación causan reducciones del 13 y 20% en la anchura y longitud, respectivamente.

La edad también afectó los parámetros morfométricos, observando una reducción en el tamaño de los espermatozoides de animales de dos años respecto a los de un año, tal y como observaron en ovino Martí *et al.* (2011). Concretamente, estos autores observaron que las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides en animales de 12 meses son superiores a las obtenidas por animales de 30 y 96 meses, señalando que los animales jóvenes pueden tener un periodo de transición después de la pubertad y que es crucial para completar la estabilización morfológica de la cabeza del espermatozoide en cuanto a su dimensión y forma.

Tras la descongelación de las células espermáticas, se observó que su calidad también es mejor en los donantes de dos años respecto a los de un año de edad, coincidiendo con Lymberopoulos *et al.* (2010), quienes observaron que los espermatozoides de ovino después de la congelación-descongelación, tenían mayor porcentaje de membrana plasmática intacta y mitocondrias funcionales en animales maduros (4-5 años) que en jóvenes (1-2 años).

Si bien hay una importante influencia de la edad sobre la calidad espermática, de acuerdo a Roca *et al.* (1991) esto no constituye una limitante para que los machos cabríos jóvenes (9-10 meses), en condiciones óptimas de manejo, puedan ser utilizados con éxito en los programas de reproducción. Sin embargo, en la creación de un banco de células espermáticas podría ser más prudente el uso de animales con edad superior a dos años ya que la calidad espermática después del proceso de congelación-descongelación también se ve influenciada por la edad.

Nuestros resultados sobre la valoración de la capacidad protectora de cada tipo de yema de huevo (fresco, clarificado y en polvo) en el medio de conservación, indican que independientemente de la edad, no existe superioridad alguna en ningún tipo de yema de huevo al utilizarse tanto al 15 como al 2% para ninguno de los parámetros de calidad evaluados, ya sea en espermatozoides analizados post-refrigeración o post-descongelación. Estos resultados difieren de lo observado por Ansari *et al.* (2010), quienes reportan que la viabilidad y motilidad de los espermatozoides de bovino tras la descongelación fue significativamente superior en las células conservadas en el medio a base de yema de huevo en polvo respecto de la yema de huevo fresco. De igual manera, en espermatozoides de morueco, Marco-Jiménez *et al.* (2004) observó un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides móviles totales cuando el medio contenía yema de huevo en polvo respecto de aquellos conservados en yema de huevo fresco. Sin embargo, el porcentaje de acrosomas intactos fue similar entre ambas fuentes de yema de huevo, coincidiendo con nuestros resultados. Si bien nosotros no hemos detectado mejores resultados en la motilidad espermática al utilizar yema de huevo en polvo, tampoco hemos observado un descenso en dicho parámetro. No obstante, es importante mencionar que los resultados obtenidos podrían deberse a la pasteurización de la yema de huevo, ya que las altas temperaturas necesarias en dicho proceso producen la desnaturalización de las proteínas, provocando un comportamiento del medio tipo gel cuando la yema de huevo es reconstituida (Miranda *et al.*, 2000), lo que podría interferir en el tipo de movimiento de los espermatozoides en un medio a base de yema de huevo en polvo.

En cuanto al uso de LDL en los medios de conservación espermática, los resultados son muy variables. En espermatozoides de toro, al incorporar LDL extraídas mediante diálisis del plasma de huevo fresco al 8%, Moussa *et al.* (2002) obtuvieron un alto porcentaje de células móviles y mejor calidad de movimiento respecto de los diluyentes comerciales a base de yema de huevo (Triladyl®) y a base de lecitina de soja (Biociphos®). También en toro, Amirat *et al.* (2004) obtuvieron un mayor porcentaje de espermatozoides móviles después de la congelación, así como mayor tasa de división después de la fecundación *in Vitro* con espermatozoides congelados en LDL, a pesar de no observar diferencias en la integridad de las membranas plasmática y acrosomal de los espermatozoides ni en la tasa de

blastocistos después del cultivo *in Vitro* respecto a los obtenidos en el medio comercial a base de yema de huevo (Optidyl®).

Concretamente, en espermatozoides de caprino, Al-Ahmad *et al.* (2008) también observaron que la motilidad espermática y el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática y acrosomal intactas son mayores al incluir 8% de LDL (extraídas mediante diálisis) y 25 mM de glutamina en el medio de crioconservación respecto al medio comercial (Triladyl®). Por el contrario, Moustacas *et al.* (2011) en espermatozoides de ovino, no observaron diferencias en la calidad de los espermatozoides congelados en medios a base de yema de huevo fresco o en los que utilizaron las LDL extraídas también a partir del plasma de la yema de huevo fresco mediante diálisis y utilizadas en diferentes concentraciones, coincidiendo con nuestros resultados, a pesar de que el proceso de extracción en nuestro caso fue mediante centrifugación ultrarrápida. Asimismo, Tonieto *et al.* (2010) al utilizar el proceso de centrifugación ultrarrápida de la yema de huevo fresco para extraer las LDL e incluir el 8% de éstas en el medio, tampoco observaron grandes diferencias respecto del medio a base de yema de huevo, únicamente la motilidad espermática post-descongelación fue superior al utilizar LDL. Las variaciones en los resultados pueden ser debidas posiblemente a la concentración de LDL utilizada en el medio de crioconservación o al porcentaje de pureza de las LDL, desafortunadamente solo Moussa *et al.* (2002) señalan que el porcentaje de pureza de las LDL utilizadas en su medio fue del 97%.

A pesar de que nuestros resultados al utilizar yema de huevo en polvo y yema de huevo clarificado en el medio de conservación espermática no superaron a la yema de huevo fresco, tampoco se observó un efecto detrimental, lo cual sugiere que tanto la yema de huevo en polvo como la yema de huevo clarificado pueden sustituir a la yema de huevo fresco, con la ventaja de que el uso de la yema de huevo en polvo supone mayor seguridad sanitaria porque es sometida a un proceso de pasteurización para destruir las bacterias, así como también los lotes tienen una composición más homogénea. De hecho, en nuestro laboratorio en espermatozoides de ovino, tampoco hemos podido observar diferencias al usar la yema de huevo fresco, clarificado o en polvo en el análisis *in vitro* de la calidad

seminal de las muestras descongeladas (García, 2014), por lo que sugerimos el uso de la yema de huevo en polvo como crioprotector no penetrante de elección en los medios de congelación espermática, hasta que las pruebas de fertilidad de las distintas dosis crioconservadas indiquen lo contrario.

En cambio, los resultados más sobresalientes fueron los obtenidos en lo referente a la necesidad o no de retirar el plasma seminal del semen y como consecuencia el porcentaje de yema de huevo (15 y 2 %) utilizada en el medio de conservación. Hemos observado que la eliminación del plasma seminal resultó beneficiosa para la conservación espermática, tanto en el primero como en el segundo año de vida de los donantes. Aunque en el segundo año, la presencia de plasma seminal no fue tan perjudicial como en el primer año de edad de los donantes, sobre todo en el semen refrigerado. Las diferencias en la composición del plasma seminal podrían explicar estos resultados. Se ha encontrado que varias proteínas como la β -lactoglobulina, transferrina y albúmina tienen efecto positivo sobre la actividad de las lipasas (Pellicer-Rubio y Combarous, 1998). Por tanto, se puede argumentar que éstas u otras proteínas similares, varían su concentración de acuerdo a la época del año o la edad, modulando la actividad de la enzima en el plasma seminal. De hecho, Cabrera *et al.* (2005) plantearon la hipótesis de que los espermatozoides de machos cabríos de la raza Canaria podrían no ser susceptibles a la alta concentración de yema de huevo en el diluyente de congelación, debido ya sea a la composición de su plasma seminal o a que las lipasas del plasma seminal se desactivan, tras observar que la motilidad progresiva e integridad de las membranas plasmática y acrosomal de los espermatozoides conservados en el medio a base de yema de huevo al 12% fueron significativamente superiores a los conservados en el medio a base de yema de huevo al 1.5% independientemente del retiro o no del plasma seminal.

Sin embargo, en nuestro caso, los distintos parámetros espermáticos analizados, tanto en espermatozoides refrigerados como descongelados, fueron superiores en espermatozoides lavados y conservados en el medio a base de yema de huevo al 15% independientemente de su tipo, respecto de los espermatozoides conservados en los medios con yema de huevo al 2% y en presencia de plasma seminal. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por

Ritar y Salamon, (1982), en espermatozoides de caprino de la raza Angora, quienes reportaron que la inclusión de yema de huevo hasta un 12% en el medio de crioconservación mejoró la sobrevivencia de los espermatozoides lavados, pero en espermatozoides no lavados disminuyó cuando el porcentaje de yema de huevo superaba el 1.5%. También Memon *et al.* (1985) reportaron que la eliminación del plasma seminal en eyaculados de macho cabrío es beneficiosa en la preservación de la integridad de los espermatozoides después de la congelación. No obstante, cabe la duda de que la mejor calidad observada en los espermatozoides lavados y descongelados se deba a la ausencia del plasma seminal en el medio de conservación o al hecho de que durante la eliminación del plasma seminal mediante centrifugación se lleve a cabo una selección de los espermatozoides, tal y como ha sido sugerido por Cebrián *et al.* (2010) en espermatozoides de ovino.

Por el contrario, Bispo *et al.* (2011) recomiendan utilizar baja concentración de yema de huevo (2.5%) para la congelación de espermatozoides de caprino con plasma seminal en el medio a base de glucosa-EDTA, tras obtener mayores porcentajes de fertilidad que al utilizar espermatozoides lavados y conservados en yema de huevo al 20%.

Generalmente, el lavado afecta positivamente la sobrevivencia espermática, sin embargo, también se tiene que tener en cuenta que, la eliminación del plasma seminal mediante la centrifugación puede producir pérdida o daño de los espermatozoides, además de eliminar algunos componentes del plasma seminal importantes para proteger la membrana de los espermatozoides contra la congelación-descongelación como señalan Tuli y Holtz, (1994) y Azeredo *et al.* (2001).

Finalmente, podemos concluir que la yema de huevo en polvo puede sustituir a la yema de huevo fresco, lo que supone mayor seguridad sanitaria, ya que es sometida a un proceso de pasteurización, así como también una mayor composición homogénea de los medios de conservación. No obstante, desconocemos la capacidad fecundante de los espermatozoides conservados en este tipo de yema de huevo, por tanto, en un futuro la valoración a través de fecundación *in Vitro* o *in Vivo* es recomendable. En cuanto al uso de la yema de huevo clarificado, ésta no supuso ninguna ventaja a la yema de huevo fresco, complicando todavía

más el proceso de elaboración de los medios de conservación. En tanto que la eliminación del plasma seminal resultó beneficiosa para la conservación espermática en los medios a base de 15% de yema de huevo, por ende, recomendamos la centrifugación del semen previa a su congelación. Por otro lado, tras observar que la edad influye sobre la calidad inicial del semen, así como en los espermatozoides refrigerados y congelados-descongelados de machos cabríos de la raza Blanca de Rasquera, en la creación de un banco de células espermáticas sería más prudente el uso de animales con edad superior a dos años.

Referencias

Al Ahmad A, Chatagnon G, Amirat-Briand L, Moussa M, Tainturier D, Anton M, Fieni F. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. *Reproduction in domestic animals* 2008; 43: 429-436

Al-Ghalban AM, Tabbaa MJ, Kridli RT. Factors affecting semen characteristics and scrotal circumference in Damascus bucks. *Small ruminant research* 2004; 53: 141-149

Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gérard O, Courtens JL, Anton M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 2004; 61: 895-907

Ansari MS, Rakha BA, andrabi SM, Akhter S. Usefulness of powdered and fresh egg yolk for cryopreservation of Zebu bull spermatozoa. *Reproductive biology* 2010; 10: 235-240

Arruda RP, Ball BA, Gravance CG, Garcia AR, Liu IKM. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. *Theriogenology* 2002; 58: 253-256

Azeredo GA, Esper CR, Resende KT. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small ruminant research* 2001; 41: 257-263

Bergeron A, Crete MH, Brindle Y, Manjunath P. 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. *Biology of reproduction* 2004; 70:708-717

Bhakat M, Mohanty TK, Raina VS, Gupta AK, Khan HM, Mahapatra RK, Sarkar M. Effect of age and season on semen quality parameters in Sahiwal bulls. *Trop Anim Health Prod* 2011; 43:1161–1168

Bispo CAS, Pugliesi G, Galvão P, Rodrigues MT, Ker PG, Filgueiras B, Carvalho GR. Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. *Small ruminant research* 2011; 100: 54-58

Bongso TA, Hassan MD, Nordin W. Relationship of scrotal circumference and testicular volume to age and body weight in the swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 1982; 22: 127-134

Brito LFC, Barth AD, Wilde RE, Kastelic JP. Effect of growth rate from 6 to 16 months of age on sexual development and reproductive function in beef bulls. *Theriogenology* 2012; 77: 1398-1405

Cabrera F, Gonzalez F, Batista M, Calero P, Medrano A, Gracia A. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (*Capra hircus*). *Reproduction domestic and animal* 2005; 40: 191-195

Cardozo JA, Fernández-Juan M, Forcada F, Abecia A, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology* 2006; 66: 841–850

Cebrián PJA, Muiño-Blanco MT, Pérez-Pé R, Casao GA, Palacios RC. Capítulo 8: Manejo del semen e inseminación artificial. En: Abecia MA, Forcada MF. Manejo reproductivo en ganado ovino. España: Servet. 2010. Pag: 113-144

Chemineau P. Sexual behaviour and gonadal activity during the year in the tropical Creole meat goat. II. Male mating behaviour, testis diameter, ejaculate characteristics and fertility. *Reprod Nutr Develop* 1986; 26: 453-460

Colás C, Junquera C, Pérez-Pé, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock. *Microscopy research and technique* 2009; 72: 566–572

Evans G, Maxwell WMC. *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. España: Acribia, 1990

Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini SM, Ostdadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, Abedi P, Nili N, Rahmani HR, Nasr-Esfahani MH. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* 2010; 73: 480-487

García VWC. Optimización de los protocolos de crioconservación de semen ovino de las razas autóctonas en peligro de extinción Xisqueta y Aranesa. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona 2014

Gravance CG, Champion ZJ, Casey PJ. Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of Cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology* 1998; 49: 1219-1230

Gravance CG, White C, Robertson KR, Champion ZJ, Casey PJ. The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of caprine sperm heads. *Animal Reproduction Science* 1997; 49: 37-43

Hancock JL. A staining technique for the study of temperature shock in semen. *Nature* 1951; 167: 323-324.

Hidalgo M, Rodríguez I, Dorado JM. The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Animal reproduction science* 2007; 100: 61-72

Iritani, A., Y. Nishikawa & S. Nagasawa. Studies on the egg-yolk coagulating enzyme in goat semen. VII. Variations in the enzyme activity of the semen between breeding season and non-breeding season, and in each ejaculate collected three times successively. *Jap. Journal Animal Reproduction* 1964; 10: 52-56

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assays to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984; 70:219-228.

Joshi A, Naqvi SMK, Bag S, Dang AK, Sharma RC, Rawat PS, Mittal JP. Sperm motion characteristic of Garole rams raised for a prolonged period in a semi-arid tropical environment. *Tropical animal health and production* 2003; 35: 249-257

Leboeuf B, Restall B, Salamon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal reproduction science* 2000; 62: 113-141

Lymberopoulos AG, Tsakmakidis IA, Khalifa TAA. Effect of Ram Age on Structural and Functional Competence of Frozen–Thawed Spermatozoa in Dairy Sheep. *Reproduction in domestic animals* 2010; 45: 572-578

Manjunath P, Thérien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology* 2002; 53: 109–119

Marco-Jiménez F, Puchades S, Mocé E, Viudes-de-Castro MP, Vicente JS, Rodriguez M. Use of powdered egg yolk vs fresh egg yolk for the cryopreservation of ovine semen *Reprod Dom Anim* 2004; 39: 438–441

Marco-Jiménez F, Viudes-de-Castro MP, Balasch S, Mocé E, Silvestre MA, Gomez EA, Vicente JS. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology* 2006; 52: 295-304

Martí JI, Aparicio IM, García-Herreros M. Head morphometric changes in cryopreserved ram spermatozoa are related to sexual maturity. *Theriogenology* 2011; 75: 473-481

Memon MA, Bretzlaff KN, Ott RS. Effect of washing on motility and acrosoma morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. *American journal of veterinary research* 1985; 46: 473-475

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

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

Moustacas VS, Zaffalon FG, Lagares MA, Loaiza-Eccheverri AM, Varago FC, Neves MM, Heneine LGD, Arruda RP, Henry M. Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* 2011; 75: 300-307

Osinowo OA, Ahmed MS, Ekpe GA. Semen quality and sperm output of Yankasa Rams at different ages. *Theriogenology* 1988; 29: 381-386

Pellicer-Rubio MT, Combarous Y. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *Journal of reproduction and fertility* 1998; 122: 95-105

Purdy PH, Mocé E, Stobart R, Murdoch WJ, Moss GE, Larson B, Ramsey S, Graham JK, Blackburn HD. The fertility of ram sperm held for 24 h at 5 °C prior to cryopreservation. *Animal reproduction science* 2010; 118: 231-235

Ritar AJ, Salamon S. 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. *Australian journal of biological science* 1982; 35: 305-312

Roca J, Martínez E, Vázquez JM, Ruíz S, Coy P. Influencia de la edad sobre los parámetros reproductivos de machos cabríos de raza Murciano-Granadina. *Archivos de zootecnia* 1991; 40: 173-179

Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Animal reproduction science* 2000; 62: 77-111

Tonieto RA, Goularte KL, Gastal GDA, Schiavon RS, Deschamps JC, Lucia Jr. T. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Ruminant Research* 2010; 93: 206–209

Tuli RK, Holtz W. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and motility of Boer goat spermatozoa. *Theriogenology* 1994; 42:547-555

Estudio 2:

ESTUDIO DE LA SUBSTITUCIÓN DEL CRIOPROTECTOR DE ORIGEN ANIMAL Y
OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE CRIOCONSERVACIÓN

Abstract

The aim was to evaluate the possibility of replacing the traditional cryoprotectants penetrating (glycerol *vs* trehalose) and non-penetrating (powdered egg yolk *vs* soybean lecithin) and to optimize cryopreservation medium by including the antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) and Test zwitterionic-buffer system, instead of Tris. Therefore, two experiments were performed, where sperm were collected ($n = 6$) from 6 bucks in each of them. After collection by artificial vagina, semen was mixed and washed twice by centrifugation at 600xg for 10'. In experiment 1, washed sperm was split into 6 aliquots and re-suspended in a Tris-based medium, with glucose and citric acid (TGC) and powdered egg yolk 15% (v/v) or soybean lecithin 1% (w/v) or BHT 0.6 mM supplemented with 5% glycerol (v/v) or 100 mM trehalose. In experiment 2, the washed sperm were also split into six aliquots, and re-suspended in a medium based on powdered egg yolk 15% (v/v) or soybean lecithin 1% (w/v) with Tris or Test buffer system and with the inclusion or not of 5 mM of the antioxidant BHT, all supplemented with 5% glycerol (v/v). All samples were chilled for 4 hours at 5°C and subsequently frozen to -196°C. The results indicate that soybean lecithin may be a viable alternative for the replacement of powdered egg yolk since no differences were found on functional and structural integrity of sperm membranes, neither on the total motility after cooling, nor on structural membrane integrity after thawing. On the other hand, glycerol appears to provide better protection of sperm against thermal shock than trehalose, since sperm parameters analyzed after cooling and thawing were significantly worse in the trehalose-based media. Related to buffer system, Tris buffer remains as the better choice to use in buck sperm preservation. The inclusion of BHT as an antioxidant in the extenders has no beneficial effect, as the replacement of powdered egg yolk by BHT does not improve the cryopreservation of buck sperm, meanwhile soybean lecithin could be used as alternative in preservation media at 5 °C.

Introducción

Muchos componentes de origen animal como el suero sanguíneo, la leche y la yema de huevo han sido utilizados en la congelación espermática (revisado por Yoshida, 2000). Sin embargo, en las últimas décadas ha habido un creciente interés en el desarrollo y empleo de diluyentes de constitución química definida, particularmente diluyentes libres de aditivos de origen animal. La lecitina de soja o el hidroxitolueno butilado (BHT) pueden ser alternativas viables en la sustitución de los componentes de origen animal, principalmente por su capacidad para mantener la fluidez de la membrana del espermatozoide durante los procesos de congelación y descongelación (Hammerstedt *et al.*, 1976; Bamba y Cran, 1988; Aires *et al.*, 2003; Gil *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2009; Vidal *et al.*, 2012). Además, el BHT también tiene propiedades antioxidantes, con lo cual su adición al medio de conservación podría reducir el estrés oxidativo ocasionado por el proceso de crioconservación de los espermatozoides, mejorando la calidad espermática después de la descongelación (Memon *et al.*, 2011; 2012).

La sustitución del crioprotector penetrante también resulta atractiva, ya que habitualmente se utiliza glicerol, el cual puede ser tóxico para los espermatozoides, limitando la inclusión de altos niveles en el medio (Salamon y Maxwell, 1995). Por tanto, la búsqueda de sustancias crioprotectoras alternativas y de composición definida es más que justificada. Los azúcares además de ser un sustrato energético para el espermatozoide pueden actuar como crioprotectores, ya que contribuyen a la estabilidad de la membrana. Diversos estudios señalan que la trehalosa puede utilizarse como crioprotector, posiblemente gracias a que es capaz de insertarse en los fosfolípidos de la membrana pudiendo modular su fluidez, haciendo que la membrana de los espermatozoides sea capaz de soportar mejor los daños ocasionados por la congelación-descongelación (Aisen, 2002; Aboagla y Terada, 2003).

Otro aspecto crucial en la conservación espermática es el mantenimiento del pH del medio, la adición de agentes tamponadores a los diluyentes de conservación pueden ayudar a controlar el pH, pero entre estos agentes hay una importante variación de rangos y

capacidades (Yániz *et al.*, 2011). Generalmente, se incluye Tris en los medios de crioconservación espermática de caprino (Purdy, 2006), aunque, recientemente en ovino (Yániz *et al.*, 2011) y gacela (Garde *et al.*, 2003), se ha reportado que los compuestos zwitteriónicos como el Test tienen mayor capacidad estabilizadora.

Por lo antes expuesto, el presente estudio tiene por objetivo valorar la posibilidad de sustituir los crioprotectores penetrante y no penetrante tradicionales, así como la optimización del medio de crioconservación mediante la inclusión del antioxidante BHT y el tampón zwitteriónico Test.

Material y Métodos

Diseño experimental

La extracción del semen se realizó con una vagina artificial, a un ritmo de 2 extracciones por día y 1 ó 2 días por semana de todos los machos. Para la recogida de semen, se utilizaron 6 machos cabríos de la raza Blanca de Rasquera de 13 a 14 meses de edad.

Experimento 1. Efecto de diferentes crioprotectores sobre la conservación de espermatozoides de macho cabrío.

En este experimento se analizó la eficacia de 3 tipos de crioprotector no penetrante (yema de huevo en polvo (YHP); lecitina de soja (LS) e Hidroxitolueno butilado (BHT)) y 2 tipos de crioprotector (Glicerol y Trehalosa). Los eyaculados de los machos fueron mezclados a fin de eliminar el efecto individual, y sometidos a 6 tratamientos para la congelación de los espermatozoides. Cada tratamiento fue repetido 6 veces. Los tratamientos se describen continuación:

- a) Diluyente con 15% de YHP y 5% de glicerol (YHP+Glicerol)
- b) Diluyente con 1% de lecitina de soja y 5% de glicerol (LS+Glicerol)
- c) Diluyente con 0.6 mM de BHT y 5% de glicerol (BHT+Glicerol)
- d) Diluyente con 15% de YHP y 100 mM de trehalosa (YHP+Trehalosa)

- e) Diluyente con 1% de lecitina de soja y 100mM de trehalosa (LS+Trehalosa)
- f) Diluyente con 0.6 mM de BHT y 100mM de trehalosa (BHT+Trehalosa)

La composición base del diluyente de congelación fue la recomendada por Purdy *et al.* (2010), consistente en 300 mM Tris[hidroximetil] aminometano, 28 mM glucosa, 95 mM ácido cítrico y antibióticos (1000 IU/mL de penicilina sódica y 1 mg/mL de sulfato de estreptomicina) a un pH 7.2–7.3, al que se le añadió yema de huevo en polvo y glicerol (v/v) a una concentración final de 15% y 5%, respectivamente.

Tras la recogida, el semen fue mezclado y diluido (1:5) en la solución TGC (300 mM Tris, 28 mM glucosa, 95 mM ácido cítrico) a 37°C y centrifugado dos veces a 600xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, el sobrenadante fue descartado y el sedimento final fue resuspendido (1:4) en el diluyente de congelación correspondiente en un solo paso, ajustando la concentración de espermatozoides a 400×10^6 /mL. Posteriormente, las distintas suspensiones espermáticas se colocaron en un recipiente con agua a 20°C y se mantuvieron a 5°C durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron envasadas en pajuelas de 0.25 mL y congeladas en vapores de nitrógeno a 5 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido durante 10 minutos, antes de ser sumergidas en el nitrógeno para su conservación.

Las muestras seminales crioconservadas fueron descongeladas por inmersión en baño de agua a 37°C durante un mínimo de 30 segundos. Las pajuelas fueron secadas y cortadas por los extremos, depositando su contenido en tubos de plástico hasta su análisis.

Preparación de los distintos componentes

Yema de huevo en polvo. Para la preparación de la yema de huevo en polvo (Hen egg yolk powder 53150, B.V. NIVE) se resuspendió en agua bidestilada a una dilución 1:1.25.

Lecitina de soja (Sigma 11145). La concentración utilizada fue del 1% tal y como describe Forouzanfar *et al.* (2010) en espermatozoides de morueco, sustituyendo a la yema de huevo.

Hidroxitolueno butilado (BHT) como sustituto de la yema de huevo. Se utilizó una concentración final de 0.6 mM de BHT (Sigma W218405) disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO; Sigma D2650). La concentración final de DMSO en el medio de conservación espermática fue 0.25% (v/v, 35.2 mM), como describe Khalifa *et al.* (2008).

Trehalosa. Para sustituir el glicerol (5%) como crioprotector se estudió la inclusión de Trehalosa (Sigma T0167) a una concentración 100 mM como sugiere Bucak *et al.* (2007).

Experimento 2. Efecto del sistema tampón, crioprotector no penetrante y presencia del antioxidante BHT sobre la conservación espermática.

En este experimento se analizó la eficacia de los 2 diluyentes seleccionados en las actividades previas (diluyente a base de yema de huevo en polvo al 15% (YHP) y el diluyente a base de lecitina de soja al 1% (LS)), la adición o no de BHT como antioxidante y dos sistemas tampón Tris y Test sobre la crioconservación espermática.

Los eyaculados de los machos fueron mezclados a fin de eliminar el efecto individual, y sometidos a 8 tratamientos para la congelación de los espermatozoides. Cada tratamiento fue repetido 6 veces, siendo los distintos tratamientos los que a continuación se describen:

- a) Diluyente YHP con Tris y sin antioxidante (YHP+Tris)
- b) Diluyente LS con Tris y sin antioxidante (LS+Tris)
- c) Diluyente YHP con Tris y 5mM de BHT (YHP+Tris+BHT)
- d) Diluyente LS con Tris y 5mM de BHT (LS+Tris+BHT)
- e) Diluyente YHP con Test y sin antioxidante (YHP+Test)
- f) Diluyente LS con Test y sin antioxidante (LS+Test)
- g) Diluyente YHP con Test y 5mM de BHT (YHP+Test+BHT)
- h) Diluyente LS con Test y 5mM de BHT (LS+Test+BHT)

En este experimento se utilizaron dos diluyentes de congelación base; el primero, consistente en la solución TGC (300 mM Tris[hidroximetil] aminometano, 28 mM glucosa, 95 mM ácido cítrico) como sugieren Purdy *et al.* (2010) y el segundo, consistente en la

solución TTG (209 mM Tes, 99 mM Tris, 28 mM glucosa) como sugieren Garde *et al.* (2003) y Santiago-Moreno *et al.* (2009). Ambos diluyentes contenían antibióticos (1000 IU/mL de penicilina sódica y 1 mg/mL de sulfato de estreptomicina) y se les añadió yema de huevo en polvo y glicerol (v/v) a una concentración final de 15% y 5%, respectivamente.

Tras la recogida, el semen fue mezclado y dividido en dos alícuotas, la primera fue diluida (1:5) en la solución TGC y la segunda fue diluida (1:5) en la solución TTG a 37°C. Seguidamente, el semen diluido fue centrifugado dos veces a 600xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, el sobrenadante fue descartado y el sedimento final fue resuspendido (1:4) en el diluyente de congelación correspondiente en un solo paso, ajustando la concentración de espermatozoides a 400×10^6 /mL. Posteriormente, las distintas suspensiones espermáticas se colocaron en un recipiente con agua a 20°C y se mantuvieron a 5°C durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron envasadas en pajuelas de 0.25 ml y congeladas en vapores de nitrógeno a 5 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido durante 10 minutos, antes de ser sumergidas en el nitrógeno para su conservación.

Las muestras seminales crioconservadas fueron descongeladas por inmersión en baño de agua a 37°C durante un mínimo de 30 segundos. Las pajuelas fueron secadas y cortadas por los extremos, depositando su contenido en tubos de plástico hasta su análisis.

Preparación de los distintos componentes

La *yema de huevo en polvo* y la *lecitina de soja* fueron preparadas como se ha descrito en el experimento 1 de este capítulo.

Hidroxitolueno butilado (BHT) como antioxidante. Se utilizó una concentración final de 5 mM de BHT disuelto en DMSO. La concentración final de DMSO en el medio de conservación espermática fue 0.25% (v/v, 35.2 mM), como describe Khalifa *et al.* (2008).

Tampón zwitteriónico Test. Se utilizó una concentración de 4.8% (w/v, 209 mM) de Tes (Sigma T1375) y 1.2% (w/v, 99 mM) de Tris (Sigma T1503), como describen Garde *et al.* (2003) y Santiago-Moreno *et al.* (2009).

Análisis *in vitro* de las células espermáticas

Tras la recogida del semen se evaluó el volumen de cada eyaculado en un tubo graduado y la motilidad masal del semen en una escala del 0 al 5 (Evans y Maxwell, 1990) con la ayuda de un microscopio óptico conectado a una platina calentable.

La viabilidad de los espermatozoides en fresco, tras la refrigeración y descongelación se estimó mediante la tinción vital eosina/nigrosina (Hancock, 1951). En los espermatozoides frescos y después de su refrigeración, también se realizó el análisis de la funcionalidad de la membrana plasmática mediante el test hipoosmótico (*hyposmotic swelling test* HOS test; Jeyendran *et al.*, 1984, Forouzanfar *et al.*, 2010) como se ha descrito en la sección de material y métodos general.

Además, después de la refrigeración y congelación/descongelación de las distintas suspensiones espermáticas, se llevó a cabo el análisis de los diferentes parámetros de motilidad con la ayuda del sistema computarizado de análisis (CASA) ISAS® (PROISER SL., Valencia), así como también se analizaron los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides frescos y congelados/descongelados.

RESULTADOS

Experimento 1. Efecto de diferentes crioprotectores sobre la conservación de espermatozoides de macho cabrío.

Respecto a la calidad inicial del semen utilizado (media \pm error estándar) para la realización del presente estudio, tras el análisis seminal de la mezcla de eyaculados frescos de las 6 replicas realizadas se obtuvo un volumen de 1.2 ± 0.0 mL, con una motilidad masal de 2.8 ± 0.2 ; el porcentaje de viabilidad estimada por E/N y de integridad funcional de sus membranas tras la prueba de Host fue de 76.8 ± 2.8 y 71.1 ± 3.0 , respectivamente, y finalmente, el porcentaje de formas anormales sin incluir los acrosomas dañados fue de 6.8 ± 3.0 .

Al comparar los valores de viabilidad estimada mediante E/N de los diferentes tratamientos utilizados tras la refrigeración, no se observaron diferencias significativas en cuanto al efecto crioprotector de la yema de huevo en polvo (YHP) y de la lecitina de soja (LS) cuando el medio de conservación contenía glicerol o trehalosa como su sustituto. Tampoco se observaron diferencias significativas entre la viabilidad obtenida cuando se utilizó Hidroxitolueno butilado (BHT) en comparación al resto de tratamientos que contenían glicerol, ni respecto al medio a base de lecitina de soja combinado con Trehalosa. Por el contrario, la viabilidad obtenida en los medios a base de BHT combinado ya sea con Glicerol o Trehalosa, fueron significativamente inferiores a los valores obtenidos en el medio que contenía YHP+Trehalosa (Tabla 1.1). Respecto a la capacidad de resistencia al shock hiposmótico valorado mediante el test Host, tampoco se apreciaron grandes diferencias significativas entre tratamientos, solamente la menor integridad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides refrigerados en BHT y trehalosa respecto a la observada en el resto de tratamientos (Tabla 1.1).

Tras el análisis de la motilidad espermática post-refrigeración mediante el sistema ISAS®, se observó que en los medios que contienen glicerol la motilidad total no se ve afectada significativamente por el tipo de crioprotector no penetrante utilizado, ya sea LS, BHT o YHP. En el caso de la YHP con trehalosa, la motilidad total tampoco se diferenció de la obtenida en los medios con glicerol. En cambio, cuando se utilizó trehalosa como crioprotector, tanto con LS (31.1 ± 11.7) o con BHT (4.9 ± 2.2), la motilidad total fue significativamente inferior. En lo referente a la motilidad progresiva, se observó un significativo efecto beneficioso del uso de la YHP respecto al BHT y a la LS, tanto con glicerol como con trehalosa, aunque en este último caso (YHP+Trehalosa) el porcentaje de espermatozoides que se movían progresivamente no se diferenció de los observados con los otros medios a base de glicerol. Además, en el caso de espermatozoides conservados con trehalosa, los valores de motilidad progresiva fueron todavía más bajos, a pesar de no existir diferencias significativas con los valores observados en los medios que no contenían YHP (Tabla 1.1).

El análisis de los distintos parámetros de calidad de movimiento obtenidos mediante el sistema ISAS® de las distintas suspensiones espermáticas sometidas a estudio parece indicar que el medio a base de YHP y glicerol proporciona valores ligeramente superiores en todos los parámetros cinéticos a los obtenidos con el resto de tratamientos, excepto en la rectitud (STR) donde no se apreciaron diferencias significativas entre los distintos medios usados. No obstante, los resultados obtenidos en este medio a base de YHP y glicerol sólo fueron significativamente superiores a los presentados por los espermatozoides refrigerados en los medios a base de trehalosa con lecitina de soja o con BHT en cuanto a la velocidad curvilínea (VCL) y la frecuencia de batido (BCF). Además, la velocidad rectilínea (VSL) y la velocidad media (VAP) también fueron superiores en los espermatozoides conservados en YHP y glicerol no solo respecto a los medios a base de trehalosa con BHT o lecitina de soja sino también respecto a los conservados en BHT y glicerol. Asimismo, tampoco se observaron diferencias en estas mismas características del movimiento (VCL, VSL, VAP y BCF) entre las suspensiones espermáticas refrigeradas en medios a base de glicerol con lecitina de soja o BHT y los medios a base de trehalosa con YHP o lecitina de soja. Respecto a la linealidad de las trayectorias de los espermatozoides en los distintos medios sólo se observó superioridad significativa entre la presentada por los espermatozoides refrigerados en YHP sobre la observada en los espermatozoides conservados en el medio a base de BHT, en ambos casos junto al glicerol. En cuanto a la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, los valores fueron menores en todos los medios donde se incluyó la trehalosa en lugar de glicerol, aunque solo se diferenciaron de manera significativa los espermatozoides conservados en YHP o BHT con trehalosa de los conservados en BHT con glicerol, mencionar que el valor obtenido en el medio BHT con Trehalosa se diferenció de todos a excepción del medio YHP con Trehalosa (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Efecto de diferentes crioprotectores en la viabilidad, capacidad de resistencia al shock hipoosmótico (Host) y parámetros cinéticos (media \pm error estándar) en espermatozoides refrigerados de caprino.

| Parámetro | YHP-G | LS-G | BHT-G | YHP-T | LS-T | BHT-T |
|------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Viabilidad (%) | 58.8 \pm 6.9 ^{abc} | 55.4 \pm 4.7 ^{abc} | 46.1 \pm 6.7 ^{bc} | 68.0 \pm 5.9 ^a | 62.1 \pm 3.5 ^{ab} | 40.8 \pm 7.0 ^c |
| Host (%) | 52.2 \pm 8.2 ^a | 55.2 \pm 0.4 ^a | 50.9 \pm 0.3 ^a | 50.1 \pm 4.9 ^a | 51.4 \pm 2.6 ^a | 31.6 \pm 5.6 ^b |
| MT (%) | 90.0 \pm 2.8 ^a | 76.4 \pm 5.4 ^a | 78.4 \pm 5.3 ^a | 75.0 \pm 13.1 ^a | 31.1 \pm 11.7 ^b | 4.9 \pm 2.2 ^b |
| MP (%) | 29.5 \pm 6.3 ^a | 11.9 \pm 1.9 ^{bc} | 9.7 \pm 1.2 ^{bc} | 21.6 \pm 4.8 ^{ab} | 5.0 \pm 2.3 ^c | 0.2 \pm 0.2 ^c |
| VCL (μ m/s) | 100.4 \pm 4.0 ^a | 89.3 \pm 8.5 ^{ab} | 89.0 \pm 9.8 ^{ab} | 75.9 \pm 7.2 ^{ab} | 67.8 \pm 5.2 ^b | 34.5 \pm 3.6 ^c |
| VSL (μ m/s) | 52.8 \pm 6.9 ^a | 33.6 \pm 4.6 ^{abc} | 29.8 \pm 3.2 ^{bc} | 38.8 \pm 5.6 ^{ab} | 26.5 \pm 4.4 ^{bc} | 13.3 \pm 2.8 ^c |
| VAP (μ m/s) | 72.0 \pm 6.0 ^a | 52.6 \pm 5.1 ^{ab} | 48.2 \pm 4.9 ^b | 52.6 \pm 6.3 ^{ab} | 40.8 \pm 5.0 ^{bc} | 22.3 \pm 2.6 ^c |
| LIN (%) | 53.1 \pm 5.3 ^a | 37.6 \pm 2.7 ^{ab} | 34.9 \pm 1.1 ^b | 49.8 \pm 4.0 ^{ab} | 39.2 \pm 3.2 ^{ab} | 43.4 \pm 4.7 ^{ab} |
| STR (%) | 70.8 \pm 4.8 | 59.9 \pm 2.9 | 60.5 \pm 0.9 | 68.8 \pm 4.1 | 60.0 \pm 2.3 | 59.4 \pm 3.9 |
| ALH (μ m) | 3.7 \pm 0.2 ^{ab} | 4.0 \pm 0.3 ^{ab} | 4.2 \pm 0.4 ^a | 3.0 \pm 0.2 ^{bc} | 3.3 \pm 0.2 ^{ab} | 2.2 \pm 0.2 ^c |
| BCF (Hz) | 8.2 \pm 0.9 ^a | 6.1 \pm 0.7 ^{ab} | 5.8 \pm 0.6 ^{ab} | 7.0 \pm 0.8 ^{ab} | 5.2 \pm 0.6 ^{bc} | 2.2 \pm 0.5 ^c |

Diferente letra en la fila indica diferencia estadística ($P < 0.05$)

YHP: Yema de huevo en polvo, LS: Lecitina de soja, BHT: Hidroxitolueno butilado, G: Glicerol, T: 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 batido.

Tras la descongelación de los espermatozoides se observó que la viabilidad fue similar en los medios a base de glicerol cuando contenían yema de huevo en polvo o lecitina de soja, aunque se reducía significativamente cuando el medio contenía BHT. Un comportamiento similar también se observó en el caso de los espermatozoides conservados en medios a base de trehalosa, con valores superiores de viabilidad en el caso de usar yema de huevo en polvo o lecitina de soja respecto al uso de BHT, aunque la diferencia no fue significativa. También parece observarse un efecto perjudicial en este parámetro cuando los espermatozoides son congelados en medio a base de trehalosa en lugar del glicerol, pero las diferencias solo fueron significativas entre los medios a base de glicerol y YHP o lecitina de soja y los resultados obtenidos con los medios a base de BHT, ya fuera con trehalosa o glicerol (Tabla 1.2).

En el análisis de la motilidad espermática post-descongelación, se observó que tanto la motilidad total como la progresiva fueron significativamente superiores en aquellos espermatozoides conservados en el medio a base de YHP y glicerol respecto al resto de tratamientos, no mostrando diferencias en la motilidad total entre los medios a base de glicerol con BHT o lecitina de soja, pero sí entre este último y lo observado en los medios a base de trehalosa. Respecto a la motilidad progresiva no hubo diferencias entre los medios BHT y lecitina de soja a base de glicerol, ni de éstos con lo observado en los congelados en medios a base de trehalosa, a excepción de la motilidad progresiva observada en el medio a base de BHT y trehalosa y la del medio de lecitina de soja y glicerol (Tabla 1.2).

A diferencia de lo observado en las muestras espermáticas post-refrigeración, no se obtuvieron datos sobre calidad de movimiento en el medio BHT a base de trehalosa debido a que los espermatozoides permanecían estáticos tras la descongelación. También se observó que la velocidad curvilínea (VCL) y la frecuencia de batido (BCF) de los espermatozoides descongelados fue similar en los distintos medios de conservación (Tabla 2.1). No obstante, los valores de velocidad rectilínea (VSL) y velocidad media (VAP) obtenidos en el medio a base de YHP y glicerol fueron significativamente superiores a los presentados en ambos medios a base de lecitina y a los obtenidos en el medio con BHT y glicerol, pero similares a los obtenidos en el medio a base de YHP y trehalosa. En cuanto a los valores obtenidos de linealidad (LIN) y rectitud (STR) solo fueron significativamente inferiores en los espermatozoides conservados en lecitina de soja y glicerol respecto al resto de tratamientos, a excepción de la LIN observada en el medio a base de BHT y glicerol que no difirió de ningún tratamiento. En cuanto al desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), los valores obtenidos fueron menores en los medios donde se incluyó la trehalosa, a pesar de no diferenciarse de los mostrados en los medios a base de glicerol con YHP o BHT. En cambio, donde este parámetro fue significativamente superior al resto, a excepción del obtenido con la YHP y glicerol, fue en el medio a base de lecitina de soja también con glicerol (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Efecto de diferentes crioprotectores en la viabilidad y parámetros cinéticos (media \pm error estándar) en espermatozoides de caprino post-descongelación.

| Parámetro | YHP-G | LS-G | BHT-G | YHP-T | LS-T | BHT-T |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Viabilidad (%) | 42.4 \pm 6.8 ^a | 41.3 \pm 4.6 ^a | 21.1 \pm 4.3 ^b | 29.1 \pm 5.4 ^{ab} | 24.8 \pm 5.4 ^{ab} | 18.7 \pm 7.3 ^b |
| MT (%) | 70.1 \pm 5.5 ^a | 35.4 \pm 7.3 ^b | 20.4 \pm 6.8 ^{bc} | 8.3 \pm 3.1 ^c | 2.1 \pm 0.8 ^c | 0.1 \pm 0.1 ^c |
| MP (%) | 29.4 \pm 3.7 ^a | 6.7 \pm 1.9 ^b | 5.4 \pm 2.2 ^{bc} | 1.8 \pm 1.0 ^{bc} | 0.7 \pm 0.3 ^{bc} | 0.0 \pm 0.0 ^c |
| VCL (μ m/s) | 87.8 \pm 2.2 | 77.5 \pm 2.4 | 56.7 \pm 7.3 | 63.0 \pm 9.6 | 59.3 \pm 22.8 | - |
| VSL (μ m/s) | 51.2 \pm 3.7 ^a | 26.5 \pm 4.7 ^b | 28.1 \pm 4.4 ^b | 38.0 \pm 8.9 ^{ab} | 26.3 \pm 5.2 ^b | - |
| VAP (μ m/s) | 63.9 \pm 4.1 ^a | 40.7 \pm 4.1 ^b | 34.9 \pm 5.0 ^b | 46.8 \pm 11.2 ^{ab} | 35.2 \pm 8.8 ^b | - |
| LIN (%) | 58.9 \pm 2.8 ^a | 33.4 \pm 5.3 ^b | 51.7 \pm 8.8 ^{ab} | 59.1 \pm 4.0 ^a | 53.4 \pm 8.1 ^a | - |
| STR (%) | 78.5 \pm 1.5 ^a | 57.2 \pm 5.6 ^b | 76.1 \pm 4.9 ^a | 79.4 \pm 2.7 ^a | 74.2 \pm 9.8 ^a | - |
| ALH (μ m) | 3.0 \pm 0.1 ^{ab} | 3.3 \pm 0.1 ^a | 2.2 \pm 0.4 ^b | 2.2 \pm 0.2 ^b | 2.3 \pm 0.9 ^b | - |
| BCF (Hz) | 9.4 \pm 0.6 | 6.9 \pm 0.7 | 8.1 \pm 1.2 | 8.6 \pm 0.9 | 6.8 \pm 0.4 | - |

Diferente letra en la fila indica diferencia estadística ($P < 0.05$)

YHP: Yema de huevo en polvo, LS: Lecitina de soja, BHT: Hidroxitolueno butilado, G: Glicerol, T: 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 batido.

En el análisis morfométrico de la cabeza del espermatozoide mediante el sistema ISAS® de las distintas suspensiones espermáticas se observaron diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los espermatozoides frescos y descongelados en todos los parámetros, a excepción de la rugosidad y regularidad, observando que la anchura, área y perímetro fueron significativamente inferiores en todos los espermatozoides congelados, independientemente del medio de conservación, respecto a los espermatozoides frescos, mientras que la longitud fue significativamente superior en los espermatozoides congelados, excepto en el medio a base de BHT+Glicerol, la cual no difirió de los espermatozoides frescos. En cuanto a los parámetros de forma, la elipticidad y elongación de los espermatozoides en fresco fue significativamente inferior a la obtenida en los espermatozoides descongelados, independientemente del medio de conservación utilizado.

Respecto a los espermatozoides conservados en los distintos medios, se observaron diferencias ($P < 0.01$) en todos los parámetros de dimensión, mostrando que la longitud fue significativamente superior en los medios a base de trehalosa respecto a los medios a base

de glicerol a excepción del medio BHT+Trehalosa que no se diferenció estadísticamente de los medios YHP y LS a base de glicerol. La anchura de los espermatozoides conservados en YHP+Glicerol fue significativamente superior a la observada en los medios a base de LS o BHT con glicerol sin diferir estadísticamente de los medios a base de trehalosa. El área fue similar en todos los medios a base de trehalosa así como en el medio a base de YHP+Glicerol, siendo significativamente superiores a los espermatozoides conservados en LS o BHT con glicerol. El perímetro fue similar en todos los tratamientos, excepto en los congelados en BHT+Glicerol que fue significativamente inferior pero sin diferenciarse del de lecitina también con glicerol. En cuanto a los parámetros de forma, no hubo diferencias entre los tratamientos ($P>0.05$; Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Parámetros morfométricos de las células espermáticas frescas y congeladas-descongeladas en diferentes crioprotectores en la raza caprina Blanca de Rasquera (media \pm error estándar).

| Parámetro | FRESCO | YHP-G | LS-G | BHT-G | YHP-T | LS-T | BHT-T |
|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Longitud (μm) | 7.90 \pm 0.04 ^a | 8.14 \pm 0.02 ^{cd} | 8.02 \pm 0.05 ^{bc} | 7.98 \pm 0.04 ^{ab} | 8.23 \pm 0.03 ^d | 8.21 \pm 0.03 ^d | 8.12 \pm 0.03 ^{cd} |
| Anchura (μm) | 4.41 \pm 0.03 ^a | 4.18 \pm 0.02 ^b | 4.11 \pm 0.02 ^{cd} | 4.10 \pm 0.01 ^d | 4.16 \pm 0.01 ^{bc} | 4.15 \pm 0.01 ^{bcd} | 4.15 \pm 0.01 ^{bcd} |
| Área (μm^2) | 29.55 \pm 0.18 ^a | 28.91 \pm 0.14 ^b | 27.96 \pm 0.27 ^c | 27.69 \pm 0.15 ^d | 29.01 \pm 0.18 ^b | 28.74 \pm 0.12 ^b | 28.54 \pm 0.13 ^b |
| Perímetro (μm) | 22.78 \pm 0.24 ^a | 22.19 \pm 0.08 ^b | 21.75 \pm 0.15 ^{bc} | 21.66 \pm 0.09 ^c | 22.25 \pm 0.10 ^b | 22.17 \pm 0.05 ^b | 21.96 \pm 0.09 ^b |
| Elipticidad | 1.80 \pm 0.02 ^a | 1.95 \pm 0.01 ^b | 1.96 \pm 0.01 ^b | 1.95 \pm 0.01 ^b | 1.98 \pm 0.00 ^b | 1.98 \pm 0.01 ^b | 1.96 \pm 0.01 ^b |
| Rugosidad | 0.72 \pm 0.01 | 0.74 \pm 0.00 | 0.74 \pm 0.00 | 0.74 \pm 0.00 | 1.29 \pm 0.56 | 0.74 \pm 0.00 | 0.74 \pm 0.00 |
| Elongación | 0.28 \pm 0.01 ^a | 0.32 \pm 0.00 ^b | 0.32 \pm 0.00 ^b | 0.32 \pm 0.00 ^b | 0.33 \pm 0.00 ^b | 0.33 \pm 0.00 ^b | 0.32 \pm 0.00 ^b |
| Regularidad | 0.93 \pm 0.00 | 0.92 \pm 0.00 | 0.93 \pm 0.00 | 0.93 \pm 0.00 | 0.93 \pm 0.00 | 0.93 \pm 0.00 | 0.93 \pm 0.00 |

Diferente letra en la fila indica diferencia estadística ($P<0.01$)

YHP: Yema de huevo en polvo, LS: Lecitina de soja, BHT: Hidroxitolueno butilado, G: Glicerol, T: Trehalosa

Experimento 2. Efecto del sistema tampón, crioprotector no penetrante y presencia del antioxidante BHT sobre la conservación espermática.

Los resultados obtenidos tras el análisis inicial de la mezcla de los eyaculados frescos de las 6 replicas realizadas, fueron para el volumen 1.3 \pm 0.1 mL, motilidad masal de 2.8 \pm 0.2,

viabilidad estimada por E/N del $77.0 \pm 3.2\%$, integridad funcional de sus membranas tras la prueba de Host del $57.2 \pm 4.9\%$ y formas anormales sin contar acrosomas dañados de $5.8 \pm 2.2\%$.

Al analizar los valores de viabilidad espermática post-refrigeración no se encontraron diferencias en los medios con el sistema tampón Tris, independientemente del crioprotector utilizado (YHP o LS) o de la adición o no del antioxidante, así como tampoco se observaron diferencias entre los medios con el sistema tampón Test, a excepción de las diferencias significativas observadas entre los resultados obtenidos en los espermatozoides conservados en los medios a base de yema de huevo en polvo con Tris y los de lecitina de soja con Test, tanto en presencia como en ausencia de BHT, registrándose los valores más bajos en los medios a base de lecitina de soja (Tabla 2.1).

Al comparar la capacidad de resistencia al shock hipoosmótico valorado mediante la prueba de Host no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos a base del sistema tampón Tris, tanto en yema de huevo en polvo como en lecitina de soja con o sin la inclusión del antioxidante BHT. Asimismo, no se observaron diferencias entre los medios con el sistema tampón Test a base de yema de huevo en polvo o lecitina de soja suplementados o no con BHT, aunque el tratamiento a base de lecitina de soja con BHT y en presencia del sistema tampón Test fue significativamente inferior a los tratamientos a base de yema de huevo en polvo o lecitina de soja con el tampón Tris y BHT (Tabla 2.1).

En el análisis de la motilidad espermática post-refrigeración mediante el sistema ISAS®, solo hubo diferencias ($P < 0.05$) entre la motilidad total observada en el medio a base de lecitina de soja en ausencia de BHT, independientemente del sistema tampón usado, y la observada en el tratamiento a base de yema de huevo en polvo con el tampón Test, siendo en este último medio donde se registró el valor más alto de motilidad (95.1 ± 1.2). Respecto a la motilidad progresiva tras la refrigeración, ésta fue similar en los espermatozoides conservados en medios a base de yema de huevo en polvo independientemente del tampón utilizado o de la presencia o no del antioxidante. Tampoco se observaron diferencias entre sí en la motilidad progresiva de los espermatozoides refrigerados en medios a base de

lecitina de soja, independientemente del tampón utilizado o de la presencia o no de BHT. Sin embargo, los valores presentados en todos los medios a base de lecitina de soja fueron significativamente inferiores a los observados en todos los medios a base de yema de huevo en polvo en presencia del tampón Tris y Test, aunque los resultados obtenidos en el medio a base de lecitina de soja sin BHT no se diferenciaron de lo observado en los medios a base de yema de huevo en polvo con o sin BHT cuando se utilizó el sistema tampón Test (Tabla 2.1).

Al valorar la calidad del movimiento en las diferentes muestras espermáticas tras la refrigeración se encontraron diferencias en todos los parámetros cinéticos, a excepción de la VCL y la VAP. Donde tampoco se observaron grandes diferencias entre tratamientos fue en la velocidad rectilínea (VSL), siendo únicamente significativas entre espermatozoides conservados en un medio a base de YHP y los conservados en lecitina, en ambos casos con Tris como tampón y en ausencia de antioxidante. Respecto a la LIN, STR y BCF, cuando los espermatozoides eran conservados con el sistema tampón Tris, los valores observados en los medios a base de YHP fueron significativamente superiores a cuando el crioprotector era la lecitina de soja, ya sea con o sin BHT. Una tendencia similar se observó también en el caso de usar el Test como tampón, pero no siempre las diferencias fueron significativas. Por el contrario, cuando los medios contenían lecitina de soja como crioprotector, los espermatozoides presentaron mayor desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), siendo significativamente superior el valor obtenido en el medio LS+BHT+Tris respecto a todos los medios a base de yema de huevo en polvo a excepción del medio YHP+Test. De hecho, la ALH observada en el medio a base de YHP en Test y con BHT fue significativamente inferior a la observada en todos los medios de lecitina de soja, independientemente del tampón y de la presencia del antioxidante, a excepción del valor encontrado en el medio de LS+Test. Destacar que a igual composición del medio (crioprotector+tampón) el hecho de suplementar el medio con el antioxidante BHT, no produjo un efecto significativo en ninguno de los parámetros analizados, ni de viabilidad ni de movimiento de los espermatozoides refrigerados (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Efecto del sistema tampón, crioprotector no penetrante y presencia de antioxidante en la viabilidad, capacidad de resistencia al shock hipoosmótico y parámetros cinéticos (media \pm error estándar) en espermatozoides refrigerados de caprino.

| Parámetro | YHP+ TRIS | LS+ TRIS | YHP+BHT+ TRIS | LS+BHT+ TRIS | YHP+ TEST | LS+ TEST | YHP+BHT+ TEST | LS+BHT+ TEST |
|------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Viabilidad (%) | 76.8 \pm 2.6 ^a | 74.3 \pm 2.7 ^{ab} | 81.1 \pm 2.8 ^a | 74.6 \pm 2.2 ^{ab} | 70.1 \pm 3.0 ^{abc} | 60.1 \pm 5.1 ^{bc} | 72.0 \pm 4.2 ^{ab} | 56.5 \pm 2.9 ^c |
| Host (%) | 67.9 \pm 3.3 ^{abc} | 66.2 \pm 5.1 ^{abc} | 70.7 \pm 1.4 ^{bc} | 72.5 \pm 3.8 ^c | 58.4 \pm 3.4 ^{ab} | 59.6 \pm 3.6 ^{ab} | 62.3 \pm 2.5 ^{abc} | 56.4 \pm 8.9 ^a |
| MT (%) | 89.3 \pm 2.1 ^{ab} | 81.7 \pm 4.9 ^b | 90.3 \pm 2.1 ^{ab} | 85.2 \pm 1.2 ^{ab} | 95.1 \pm 1.2 ^a | 81.7 \pm 2.3 ^b | 85.5 \pm 4.2 ^{ab} | 83.6 \pm 2.5 ^{ab} |
| MP (%) | 33.1 \pm 3.9 ^a | 8.8 \pm 1.2 ^d | 30.7 \pm 3.0 ^a | 11.0 \pm 2.6 ^{cd} | 23.1 \pm 2.5 ^{abc} | 15.3 \pm 3.9 ^{bcd} | 27.8 \pm 3.0 ^{ab} | 11.5 \pm 1.8 ^{cd} |
| VCL (μ m/s) | 101.4 \pm 3.5 | 106.8 \pm 8.9 | 99.5 \pm 5.8 | 113.2 \pm 5.8 | 105.0 \pm 5.6 | 103.5 \pm 6.6 | 88.5 \pm 2.5 | 103.4 \pm 6.1 |
| VSL (μ m/s) | 55.5 \pm 2.8 ^a | 37.9 \pm 3.3 ^b | 51.7 \pm 3.0 ^{ab} | 40.1 \pm 2.3 ^{ab} | 53.1 \pm 1.9 ^{ab} | 45.2 \pm 5.5 ^{ab} | 51.0 \pm 3.3 ^{ab} | 43.6 \pm 4.8 ^{ab} |
| VAP (μ m/s) | 74.3 \pm 3.9 | 62.4 \pm 4.6 | 71.8 \pm 5.4 | 66.7 \pm 3.1 | 78.3 \pm 3.6 | 66.3 \pm 5.8 | 68.3 \pm 3.6 | 67.4 \pm 5.2 |
| LIN (%) | 55.3 \pm 2.3 ^a | 35.4 \pm 2.8 ^c | 52.7 \pm 1.3 ^{ab} | 36.2 \pm 2.4 ^c | 51.6 \pm 2.2 ^{ab} | 42.1 \pm 4.0 ^{bc} | 58.0 \pm 2.5 ^a | 41.9 \pm 3.2 ^{bc} |
| STR (%) | 73.1 \pm 3.0 ^{bc} | 57.4 \pm 3.1 ^a | 71.0 \pm 2.3 ^{bc} | 59.0 \pm 2.1 ^a | 66.9 \pm 1.8 ^{abc} | 63.7 \pm 2.3 ^{abc} | 73.4 \pm 1.8 ^c | 62.1 \pm 3.0 ^{ab} |
| ALH (μ m) | 3.5 \pm 0.2 ^{ab} | 4.8 \pm 0.5 ^{bc} | 3.6 \pm 0.2 ^{ab} | 5.1 \pm 0.3 ^c | 3.9 \pm 0.3 ^{abc} | 4.3 \pm 0.4 ^{abc} | 3.0 \pm 0.1 ^a | 4.4 \pm 0.2 ^{bc} |
| BCF (Hz) | 9.0 \pm 0.7 ^a | 5.9 \pm 0.5 ^c | 8.2 \pm 0.7 ^{ab} | 5.7 \pm 0.3 ^c | 6.9 \pm 0.3 ^{abc} | 6.5 \pm 0.6 ^{bc} | 7.8 \pm 0.4 ^{abc} | 5.8 \pm 0.3 ^c |

Diferente letra en la fila indica diferencia estadística (P<0.05)

YHP: Yema de huevo en polvo, LS: Lecitina de soja, BHT: Hidroxitolueno butilado, 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 batido.

A diferencia de lo observado en el semen refrigerado, al analizar la viabilidad tras descongelar las distintas suspensiones espermáticas no se observaron diferencias significativas entre los distintos medios de conservación, así como tampoco en la motilidad total. Respecto a la motilidad progresiva, solo se observaron diferencias significativas cuando se utilizó el medio a base de YHP con el antioxidante BHT y en presencia del tampón Test, el cual presentó el valor más alto, comparado con los medios a base de lecitina de soja en presencia de Tris, con y sin BHT, y en presencia de Test y el antioxidante. No obstante, a pesar de no existir diferencias significativas se observa una tendencia a presentar valores superiores de motilidad progresiva cuando son congelados en un medio a base de YHP (Tabla 2.2).

Tal y como se ha observado en el análisis de la calidad del movimiento tras la refrigeración, tampoco se encontraron diferencias entre los parámetros cinéticos de VCL y VAP tras la descongelación de las diferentes muestras espermáticas, así como tampoco se observaron grandes diferencias en la velocidad rectilínea (VSL), siendo solo significativamente inferior en los espermatozoides conservados en medios a base lecitina con Tris respecto a todos los conservados en medios que contenían Test como tampón, aunque sin llegar a diferenciarse de lo observado en el medio de LS+BHT+Test.

Respecto al comportamiento de los parámetros de linealidad y rectitud, éste fue similar al no mostrar grandes diferencias entre tratamientos, existiendo de nuevo diferencias significativas únicamente entre los espermatozoides conservados en medios a base de lecitina con Tris y la mayor parte del resto de tratamientos. En cuanto al desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), tampoco se apreció ningún efecto debido a la composición del medio de conservación, solo se observó una diferencia significativa entre el menor valor obtenido de este parámetro en el medio a base de YHP y Test (1.9 ± 0.1) con respecto al observado en los espermatozoides conservados en el medio a base de lecitina de soja con BHT y Tris (3.0 ± 0.2 ; Tabla 2.2). Cabe destacar, a pesar de no ser significativa, la tendencia a mostrar valores superiores de frecuencia de batido (BCF), aquellos espermatozoides congelados en medios a base de YHP, independientemente del sistema tampón utilizado o de la presencia o no del antioxidante, aunque solo difirió significativamente entre lo

observado en medios a base de YHP con antioxidante (con Tris o Test) y los valores registrados en el medio de lecitina de soja con Test y BHT (Tabla 2.2).

Tabla 2.2 Efecto del sistema tampón, crioprotector no penetrante y presencia de antioxidante en la viabilidad y parámetros cinéticos de espermatozoides congelados-descongelados de caprino (media \pm error estándar).

| Parámetro | YHP+ | LS+ | YHP+BHT | LS+BHT | YHP+ | LS+ | YHP+BHT | LS+BHT+ |
|------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| | TRIS | TRIS | TRIS | TRIS | TEST | TEST | TEST | TEST |
| Viabilidad (%) | 40.7 \pm 4.1 | 35.3 \pm 3.3 | 40.8 \pm 2.8 | 40.2 \pm 2.2 | 29.7 \pm 6.3 | 36.4 \pm 3.0 | 38.2 \pm 3.9 | 35.4 \pm 2.6 |
| MT (%) | 57.9 \pm 6.2 | 30.8 \pm 5.1 | 51.2 \pm 5.9 | 37.8 \pm 5.8 | 41.5 \pm 9.1 | 47.9 \pm 8.8 | 62.1 \pm 8.5 | 43.8 \pm 7.8 |
| MP (%) | 15.2 \pm 1.6 ^{ab} | 6.4 \pm 1.3 ^a | 15.2 \pm 1.7 ^{ab} | 6.2 \pm 1.1 ^a | 15.2 \pm 3.7 ^{ab} | 12.0 \pm 2.2 ^{ab} | 21.5 \pm 2.7 ^b | 8.0 \pm 1.3 ^a |
| VCL (μ m/s) | 68.0 \pm 3.9 | 72.1 \pm 3.3 | 70.3 \pm 3.4 | 72.5 \pm 2.9 | 66.3 \pm 4.9 | 71.4 \pm 3.1 | 70.1 \pm 4.9 | 63.3 \pm 4.1 |
| VSL (μ m/s) | 37.7 \pm 3.3 ^{ab} | 33.1 \pm 3.1 ^a | 42.2 \pm 2.8 ^{ab} | 31.0 \pm 3.1 ^a | 45.0 \pm 4.7 ^b | 44.9 \pm 4.4 ^b | 44.9 \pm 3.1 ^b | 35.9 \pm 3.5 ^{ab} |
| VAP (μ m/s) | 49.8 \pm 4.4 | 44.8 \pm 3.1 | 53.2 \pm 3.6 | 42.8 \pm 2.8 | 55.9 \pm 5.6 | 55.8 \pm 3.6 | 56.3 \pm 4.8 | 46.0 \pm 3.1 |
| LIN (%) | 56.2 \pm 2.0 ^{bc} | 45.4 \pm 2.4 ^{ab} | 60.3 \pm 2.6 ^c | 42.3 \pm 2.9 ^a | 66.1 \pm 2.6 ^c | 59.8 \pm 4.9 ^c | 63.9 \pm 1.4 ^c | 53.6 \pm 4.0 ^{abc} |
| STR (%) | 74.7 \pm 1.2 ^{abc} | 67.9 \pm 2.3 ^{ab} | 78.7 \pm 2.0 ^c | 66.0 \pm 1.9 ^a | 79.8 \pm 1.4 ^c | 76.7 \pm 3.1 ^{bc} | 79.5 \pm 1.9 ^c | 73.0 \pm 3.0 ^{abc} |
| ALH (μ m) | 2.5 \pm 0.1 ^{ab} | 2.8 \pm 0.1 ^{ab} | 2.4 \pm 0.1 ^{ab} | 3.0 \pm 0.2 ^a | 1.9 \pm 0.1 ^b | 2.4 \pm 0.3 ^{ab} | 2.3 \pm 0.1 ^{ab} | 2.4 \pm 0.3 ^{ab} |
| BCF (Hz) | 8.1 \pm 0.4 ^{ab} | 7.7 \pm 0.4 ^{ab} | 8.6 \pm 0.6 ^a | 7.1 \pm 0.2 ^{ab} | 8.4 \pm 0.4 ^{ab} | 7.2 \pm 0.2 ^{ab} | 8.7 \pm 0.4 ^a | 6.8 \pm 0.4 ^b |

Diferente letra en la fila indica diferencia estadística ($P < 0.05$)

YHP: Yema de huevo en polvo, LS: Lecitina de soja, BHT: Hidroxitolueno butilado, 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 batido.

Tras realizar el análisis morfométrico de la cabeza del espermatozoide, se observó que la anchura fue significativamente inferior tras la descongelación, independientemente del medio de conservación espermática utilizado, mientras que la elipticidad y elongación fueron superiores en los espermatozoides post-descongelación respecto al semen fresco. En cuanto a las distintas suspensiones espermáticas post-descongelación no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los medios de conservación ni en los parámetros de dimensión ni en los de forma a excepción de la regularidad, observando que ésta fue significativamente superior en el medio LS+BHT+Tris respecto de los medios YHP+Tris (con o sin BHT) y YHP+BHT+Test sin diferenciarse del resto de medios de conservación espermática (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Efecto del sistema tampón, crioprotector no penetrante y presencia de antioxidante en los parámetros morfométricos en espermatozoides de caprino frescos y tras la descongelación (media ± error estándar).

| Tratamiento | Longitud (µm) | Anchura (µm) | Área (µm ²) | Perímetro (µm) | Elípticidad | Rugosidad | Elongación | Regularidad |
|--------------|---------------|------------------------|-------------------------|----------------|------------------------|-----------|------------------------|---------------------------|
| Fresco | 7.75±0.01 | 4.43±0.02 ^a | 29.06±0.10 | 22.29± 0.10 | 1.75±0.01 ^a | 0.74±0.01 | 0.27±0.00 ^a | 0.93±0.00 ^a |
| YHP+TRIS | 8.01±0.03 | 4.19±0.02 ^b | 28.58±0.16 | 21.91±0.08 | 1.92±0.01 ^b | 0.75±0.00 | 0.31±0.00 ^b | 0.92±0.00 ^c |
| LS+TRIS | 7.93±0.05 | 4.14±0.03 ^b | 27.86±0.31 | 21.58±0.14 | 1.92±0.01 ^b | 0.75±0.00 | 0.31±0.00 ^b | 0.925±0.00 ^{abc} |
| YHP+BHT+TRIS | 7.99±0.05 | 4.18±0.01 ^b | 28.48±0.19 | 21.86±0.09 | 1.92±0.01 ^b | 0.75±0.00 | 0.31±0.00 ^b | 0.92±0.00 ^c |
| LS+BHT+TRIS | 7.94±0.03 | 4.14±0.02 ^b | 27.84±0.18 | 21.60±0.07 | 1.92±0.01 ^b | 0.75±0.00 | 0.31±0.00 ^b | 0.928±0.00 ^{ab} |
| YHP+TEST | 8.03±0.12 | 4.22±0.0 ^b | 28.91±0.77 | 22.06±0.31 | 1.91±0.01 ^b | 1.95±1.21 | 0.31±0.0 ^b | 0.92±0.00 ^{bc} |
| LS+TEST | 7.96±0.10 | 4.17±0.05 ^b | 28.32±0.66 | 21.76±0.26 | 1.91±0.00 ^b | 0.75±0.00 | 0.31±0.00 ^b | 0.92±0.00 ^{bc} |
| YHP+BHT+TEST | 8.04±0.12 | 4.22±0.06 ^b | 28.96±0.86 | 21.98±0.34 | 1.91±0.01 ^b | 0.75±0.00 | 0.31±0.00 ^b | 0.92±0.00 ^c |
| LS+BHT+TEST | 8.02±0.10 | 4.21±0.04 ^b | 28.68±0.65 | 21.88±0.25 | 1.91±0.01 ^b | 0.75±0.00 | 0.31±0.00 ^b | 0.925±0.00 ^{abc} |

Diferente letra en la columna indica diferencia estadística (P<0.05)

YHP: Yema de huevo en polvo, LS: Lecitina de soja, BHT: Hidroxitolueno butilado

Discusión

La sustitución de la yema de huevo en polvo por la lecitina de soja en los diluyentes de conservación espermática de caprino podría ser una alternativa viable si consideramos únicamente los resultados obtenidos a nivel de integridad funcional y estructural de las membranas de los espermatozoides tras la refrigeración y congelación-descongelación. Sin embargo, tanto la motilidad total y progresiva como la calidad del movimiento de los espermatozoides descongelados fueron significativamente peores en aquellos conservados en medios a base de lecitina de soja que en aquellos conservados a base de YHP.

De hecho, nuestros resultados coinciden con lo reportado por Del Valle *et al.* (2012) en espermatozoides de morueco, quienes mencionan que la lecitina de soja al 3.5% es capaz de proteger eficazmente la viabilidad espermática tras la descongelación, aunque induce pérdida del potencial de membrana mitocondrial que podría reflejarse en reducidos valores de motilidad total y progresiva. Esta reducción en la motilidad espermática en el medio con lecitina de soja también podría ser debida a su alta viscosidad y a la presencia de restos de partículas en el medio como señalaron Van Wagtendonk *et al.* (2000) en espermatozoides de bovino y Forouzanfar *et al.* (2010) en ovino.

En cambio, Vidal *et al.* (2012) no encontraron diferencias en la calidad de los espermatozoides de caprino conservados en el medio convencional a base de leche descremada y el medio a base de lecitina de soja, concluyendo que la lecitina de soja puede ser utilizada en los medios de crioconservación de espermatozoides de macho cabrío. De igual manera, Salmani *et al.* (2014), también en caprino, señalaron que la lecitina de soja puede sustituir con éxito a la yema de huevo en los medios de crioconservación, sin efectos adversos en la motilidad y viabilidad espermática post-descongelación, sugiriendo además que la concentración de lecitina de soja para la crioconservación de espermatozoides de macho cabrío puede ser óptima hasta el 1.5%. En nuestro laboratorio, García (2014) en espermatozoides de ovino tampoco observó efectos adversos de la lecitina de soja en la motilidad y viabilidad de los espermatozoides después de su refrigeración y descongelación. Respecto a la concentración, Forouzanfar *et al.* (2010) en espermatozoides

de morueco, observaron que la motilidad y viabilidad espermática fueron superiores al utilizar un 1% de lecitina de soja o un 20% de yema de huevo que un 2% de lecitina de soja o un 15% de yema de huevo, señalando que concentraciones superiores de lecitina de soja pueden ser tóxicas para el espermatozoide y que son necesarias cantidades superiores de yema de huevo para preservar la viabilidad y motilidad espermática.

A pesar de que en los estudios antes mencionados no se han reportado efectos dañinos sobre la motilidad espermática después de la congelación de los espermatozoides en medios a base de lecitina de soja, no significa que no existan daños sub-letales que pueden afectar la funcionalidad espermática, ya que no son detectados por el análisis clásico de la calidad espermática, como sugieren Del valle *et al.* (2012), tras observar alteraciones en la funcionalidad mitocondrial de espermatozoides congelados-descongelados de morueco, detectadas mediante citometría de flujo utilizando una tinción triple (YoPro1/IP/*Mitotracker deep red*).

Más evidente fue la pérdida de calidad de los espermatozoides conservados en el medio a base de BHT junto con trehalosa tras la refrigeración, así como tras la congelación-descongelación de los espermatozoides conservados en BHT, independientemente de la inclusión de glicerol o trehalosa. Por el contrario, Khalifa *et al.* (2008) obtuvieron que la viabilidad de los espermatozoides de macho cabrío se mantuvo tras la refrigeración, así como la motilidad y fertilidad en el semen descongelado, concluyendo que la sustitución de la yema de huevo por el BHT puede mejorar la capacidad de conservación de los espermatozoides de caprino. Sin embargo, Graham y Hammerstedt (1992) y Anderson *et al.* (1994) observaron un efecto benéfico y sinérgico en la motilidad e integridad acrosómica de los espermatozoides refrigerados de bovino solo cuando las concentraciones de BHT y yema de huevo fueron cuidadosamente controladas. Esto sugiere que la yema de huevo actúa sinérgicamente con el BHT para proteger a los espermatozoides del shock por frío, de tal manera que, en nuestro caso la ausencia de yema de huevo en el medio de conservación pudo afectar los resultados.

Tampoco la sustitución del glicerol por la trehalosa parece proporcionar una mejor protección de los espermatozoides frente al shock térmico, ya que en los medios donde se utilizó este azúcar como crioprotector, los distintos parámetros espermáticos analizados tras la refrigeración y descongelación de los espermatozoides fueron significativamente peores. Únicamente, la calidad espermática post-refrigeración no se vio afectada cuando se utilizó trehalosa en lugar de glicerol en el medio a base de yema de huevo en polvo. De nuevo, nuestros resultados contrastan con lo descrito por otros autores en espermatozoides de morueco como Bucak *et al.* (2007) quienes obtuvieron un alto porcentaje de células espermáticas móviles cuando el medio de congelación contenía 50 mM de trehalosa o Tonieto *et al.* (2010) con la inclusión de 100 mM de trehalosa en el medio, pudiendo preservar la movilidad e integridad de la membrana de los espermatozoides tras la descongelación. Por el contrario, en espermatozoides de toro, la trehalosa solo causó una mínima mejora en la sobrevivencia tras la descongelación (Chen *et al.*, 1993) o una ausencia de efectos beneficiosos de su uso en el medio de congelación de espermatozoides de bovino (Liu *et al.*, 1998). Posiblemente, las diferencias entre espermatozoides de distintas especies o bien las bajas concentraciones utilizadas en nuestro laboratorio pueden explicar los pobres resultados en la sobrevivencia espermática, ya que Aboagla y Terada, (2003) obtuvieron buenos resultados al incluir 0.375 M de trehalosa en el medio. Estos autores tenían como hipótesis que la alta concentración de trehalosa en el medio sería la responsable de la crioconservación exitosa en los espermatozoides de caprino. Asimismo, Naing *et al.* (2010), sostienen que la capacidad crioprotectora de la trehalosa varía dependiendo de la concentración utilizada en el medio de congelación, señalando que la inclusión de 198.24 mM de trehalosa en el medio con glucosa confirió la mayor mejora de la calidad espermática tras la congelación-descongelación de los espermatozoides de macho cabrío.

En la valoración del efecto del sistema tampón, del crioprotector no penetrante y de la presencia de BHT como antioxidante en la crioconservación del semen de caprino, se observó que la capacidad crioprotectora del sistema tampón a base de Test en los espermatozoides refrigerados no superó al tampón Tris e incluso algunos de los parámetros fueron inferiores, como la integridad de la membrana plasmática cuando fue utilizado junto

con lecitina de soja en el medio, respecto del sistema Tris combinado con yema de huevo en polvo con o sin BHT. Solo la motilidad total fue más alta en el medio a base de Test con yema de huevo en polvo respecto del medio a base de Tris con lecitina de soja, coincidiendo en cierta manera con Yániz *et al.* (2011) quienes observaron que los tampones zwitteriónicos registraron los mejores resultados para la mayoría de las variables de motilidad espermática así como también la integridad de la membrana de los espermatozoides refrigerados de morueco.

En cambio, tras la descongelación no se observaron diferencias entre los tampones utilizados ni en la viabilidad, ni en la motilidad total. Sin embargo, la motilidad progresiva fue ligeramente superior en los espermatozoides conservados en los medios a base del sistema tampón Test, aunque tal superioridad solo fuera estadísticamente significativa cuando el medio contenía yema de huevo en polvo y BHT frente a los medios a base de Tris cuando estos contenían lecitina de soja como crioprotector. Nuestros resultados coinciden parcialmente con los obtenidos por Molinia *et al.* (1994) y Abdelhakeam *et al.* (1991) quienes también observaron que la motilidad de los espermatozoides de morueco post-descongelación fue mayor en el medio a base del tampón zwitteriónico que en Tris. Garde *et al.* (2003) también indicaron que el Test protege mejor a los espermatozoides de Gacela que el sistema tampón Tris, mientras que Tuli y Holtz, (1992) observaron que la motilidad progresiva se reduce en los espermatozoides de caprino conservados en el medio a base de tampones zwitteriónicos.

En cuanto a la calidad del movimiento de los espermatozoides tras la refrigeración no se observaron grandes diferencias entre los tampones Tris y Test, pero tras la descongelación la utilización del sistema tampón Test parece proporcionar una mayor velocidad rectilínea e índice de linealidad y rectitud que el sistema tampón Tris, aunque sin llegar a diferenciarse nunca en el caso de usar la yema de huevo en polvo como crioprotector con o sin BHT como antioxidante. Contrariamente, Rasul *et al.* (2000) en espermatozoides de búfalo observaron que la ALH y VCL fueron superiores en el medio a base de Test respecto del medio a base de Tris, concluyendo que el sistema tampón Tris puede mejorar la calidad de los espermatozoides congelados/descongelados.

Lamentablemente, los resultados obtenidos en el presente trabajo no nos permiten afirmar la superioridad de un tampón frente al otro. Sin embargo, la mayoría de los parámetros analizados tendieron a ser ligeramente superiores en los espermatozoides conservados a base del tampón Tris, con lo cual, podemos sugerir que el Tris es el sistema tampón de elección para su uso en la conservación de los espermatozoides de caprino.

En cuanto al uso de BHT como antioxidante, no se observó ningún efecto beneficioso de su inclusión en los medios de conservación espermática, a diferencia de la influencia favorable en la motilidad post-descongelación de los espermatozoides de caprino observada por Khalifa *et al.* (2008) y de la protección de la funcionalidad de la membrana plasmática observada por García, (2014) en espermatozoides refrigerados y congelados-descongelados de morueco al utilizar la misma concentración (5 mM). Posiblemente, los efectos benéficos se puedan apreciar al utilizar una concentración inferior a la utilizada en el presente estudio, ya que Naijian *et al.* (2013) tras comparar diferentes concentraciones de BHT (0, 0.5, 1, 2 y 4 mM) observaron que la inclusión de 1 mM de BHT en el medio protege a los espermatozoides de caprino de la peroxidación lipídica y mejora la motilidad progresiva y la viabilidad después del proceso de congelación-descongelación, mientras que concentraciones superiores (4 mM) disminuyen la calidad de los espermatozoides.

Memon *et al.* (2011) también señalan que el efecto potencial del BHT en la protección de los espermatozoides de caprino frente al estrés inducido por el enfriamiento o congelación puede variar ampliamente con la concentración utilizada en el medio, destacando que la calidad del espermatozoide se deteriora cuando se utilizan concentraciones superiores a 3 mM. En espermatozoides de búfalo, Ijaz *et al.* (2009) también determinaron que concentraciones superiores a 3 mM reducen la integridad acrosómica, la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides. También, Bamba y Cran, (1992), en espermatozoides de cerdo, observaron que la motilidad e integridad acrosómica de los espermatozoides refrigerados a 5°C es mejor cuando se adiciona 0.05-0.1 mM de BHT al medio BTS.

No obstante, parece que el nivel óptimo de BHT puede depender de diferentes factores como la época del año en que se realiza la crioconservación, los componentes del medio e incluso el procedimiento de congelación (Naijian *et al.*, 2013). Con respecto a los componentes del medio Graham y Hammerstedt (1992) reportaron que al utilizar medios con análogos de BHT sin yema de huevo la motilidad espermática era reducida comparado con la presencia de yema de huevo, esto sugiere que la yema de huevo interactúa sinérgicamente con los análogos de BHT en la protección de los espermatozoides del shock por frío. En el estudio realizado por Memon *et al.* (2011), el medio contenía 18% de yema de huevo resultando evidente el deterioro de la calidad al incluir 3 mM comparado con 2 mM, mientras que Khalifa *et al.* (2008) utilizó 2.5% de yema de huevo y 5 mM de BHT obteniendo resultados favorables. Sin embargo, observaron efectos adversos de la alta concentración de BHT (5 y 8 mM) en la viabilidad de los espermatozoides refrigerados cuando el medio no contenía yema de huevo. Por tanto, se puede postular que la concentración de yema de huevo es importante cuando se añade BHT en los medios.

Al comparar los dos tipos de crioprotector no penetrante (yema de huevo en polvo vs lecitina de soja) en los medios de conservación se observó que la inclusión de 1% de lecitina de soja mantiene la gran mayoría de los parámetros de calidad espermática de manera similar a los medios a base de yema de huevo en polvo, excepto la motilidad progresiva que tanto en los espermatozoides refrigerados como en los congelados-descongelados fue inferior en los medios a base de lecitina de soja. De igual manera, Najafi *et al.* (2013), al utilizar lecitina de soja al 1% en un medio de crioconservación espermática en morueco, observaron bajo porcentaje de motilidad progresiva junto con una baja proporción de células viables y baja actividad mitocondrial en los espermatozoides post-descongelación. Asimismo, nuevamente coincidimos con lo reportado por Del Valle *et al.* (2012), en espermatozoides de morueco, al señalar que la lecitina de soja al 3.5% protege eficazmente la viabilidad espermática tras la descongelación pero induce pérdida del potencial de membrana mitocondrial, lo que podría reflejarse en reducidos valores de motilidad total y progresiva. De hecho, Bittencourt *et al.* (2008) reportan que el medio comercial Bioexcell® a base de lecitina de soja es ineficaz en la crioconservación de

espermatozoides de caprino, tras obtener bajos índices de viabilidad, motilidad total y progresiva tras la descongelación.

La reducción en la motilidad de los espermatozoides conservados en lecitina de soja no solo podría deberse a su alta viscosidad y a la presencia de restos de partículas en el medio (Van Wagendonk *et al.*, 2000; Forouzanfar *et al.*, 2010) como se ha señalado anteriormente, sino también a su composición, ya que básicamente está compuesta por fosfatidilcolinas (Scholfield, 1981; Le Grandois *et al.*, 2009), a diferencia de la yema de huevo que es una macromolécula más compleja y versátil y que no solo contiene fosfatidilcolina sino también lipoproteínas de baja densidad, con lo cual podría tener una mejor capacidad de protección (Del Valle *et al.*, 2012).

Desafortunadamente, en el presente estudio no pudimos realizar un análisis más profundo mediante citometría de flujo para detectar los daños a nivel de la mitocondria, por tanto, sería muy conveniente realizar dicho análisis espermático, así como también valorar el poder fecundante de las células espermáticas ya sea *in Vitro* o *in Vivo*.

En cuanto a la morfometría de las células espermáticas, en ambos experimentos se observó que el proceso de congelación-descongelación afecta algunos parámetros de tamaño y forma. Así, en el experimento 2, la anchura de la cabeza se redujo mientras que los parámetros de forma, elipticidad y elongación, se incrementaron tras la descongelación de las células espermáticas. En el experimento 1 se observaron más cambios como que el área, anchura y perímetro disminuyeron, mientras que la longitud, elipticidad y elongación se incrementaron después de la congelación-descongelación, con lo cual los espermatozoides además de tener un menor tamaño, también vieron modificada la forma de su cabeza, volviéndose más alargada. Estos cambios también han sido reportados por Marco-Jiménez *et al.* (2006) e Hidalgo *et al.* (2007) en espermatozoides de caprino. En otras especies como el bovino (Gravance *et al.*, 1998) y equino (Arruda *et al.*, 2002), también se ha demostrado que la crioconservación afecta la morfometría de la cabeza del espermatozoide, observando menor longitud, área y perímetro.

Las causas de la reducción del tamaño de la cabeza del espermatozoide posiblemente sean a consecuencia de la progresiva deshidratación de la célula espermática durante el proceso de crioconservación (Hidalgo *et al.*, 2007), a la alta proporción de espermatozoides con acrosoma dañado y la posterior pérdida del contenido acrosomal (Gravance *et al.*, 1998), a los cambios en la estructura de la cromatina (Arruda *et al.*, 2002) o a la pérdida de la membrana plasmática (Marco-Jiménez *et al.*, 2006).

En base a los resultados obtenidos, podemos concluir que el componente Hidroxitolueno Butilado (BHT) a una concentración de 0.6 mM no es una buena alternativa para sustituir a la yema de huevo en polvo como crioprotector no penetrante en los medios de conservación espermática, mientras que la lecitina de soja al 1% podría ser una alternativa a incorporar en los medios de conservación a 5°C, sobre todo utilizando Glicerol como crioprotector no penetrante y el sistema tampón Tris. Por otro lado, la adición de 5 mM de BHT como antioxidante en los diluyentes a base de yema de huevo en polvo o de lecitina de soja no supuso ningún tipo de efecto beneficioso sobre los parámetros de calidad espermática evaluados.

Referencias

- Abdelhakeam AA, Graham EF, Vazquez IA, Chaloner KM. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen. Development of an Extender for Freezing: Effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars, and the method of dilution. *Cryobiology* 1991; 28: 43-49
- Aboagla EME, Terada T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of reproduction* 2003; 69:1245-1250
- Aires VA, Hinsch KD, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* 2003; 60: 269-279
- Aisen EG, Medina VH, Venturino A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 2002; 57: 1801-1808

Anderson S, Harkness W, Akin Y, Kaproth M, Killian G. Categorical data analysis of the effect on bull fertility of butylated hydroxytoluene addition to semen extenders prior to freezing. *Journal of Dairy Science* 1994; 77: 2302–2307

Arruda RP, Ball BA, Gravance CG, Garcia AR, Liu IKM. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. *Theriogenology* 2002; 58: 253-256

Bamba K, Cran DG. Effects of treatment with butylated hydroxytoluene on the susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution. *Journal of reproduction and fertility* 1992; 95: 69-77

Bamba K, Cran DG. Further studies on rapid dilution and warming of boar semen. *Journal of reproduction and fertility* 1988; 82: 509-518

Bittencourt RF, Ribeiro Filho AL, Chalhoub M, Alves SGG, Vasconcelos MF, Biscarde CE, Leal LS, Oba E, Efeito de um quelante de cálcio, um detergente e da lecitina de soja sobre a qualidade do sêmen caprino congelado-descongelado. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 2008; 45, 305–31

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

Chen Y, Foote RH, Brockett CC. Effect of sucrose, trehalosa, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen Bull sperm. *Cryobiology* 1993; 30: 423-431

Del Valle I, Gómez-Durán A, Holt WV, Muñoz-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Soy lecithin interferes with mitochondrial function in frozen-thawed ram spermatozoa. *Journal of andrology* 2012; 33: 717-725

Evans G, Maxwell WMC. *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. España: Acibia, 1990

Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini SM, Ostdadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, Abedi P, Nili N, Rahmani HR, Nasr-Esfahani MH. In vitro comparison of egg yolk–based and soybean lecithin–based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* 2010; 73: 480-487

García VWC. Optimización de los protocolos de crioconservación de semen ovino de las razas autóctonas en peligro de extinción Xisqueta y Aranasa. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona 2014

Garde JJ, Soler AJ, Cassinello J, Crespo C, Malo AF, Espeso G, Gomendio M, Roldan ERS. Sperm cryopreservation in three species of endangered gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorrr*, and *G. dorcas neglecta*). *Biology of reproduction* 2003; 69:602-611

Gil J, Rodríguez-Irazoqui M, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology* 2003; 59: 1157-1170

Graham JK, Hammerstedt RH. Differential Effects of butylated hydroxytoluene analogs on Bull sperm subjected to cold-induced membrane stress. *Cryobiology* 1992; 29: 106-117

Gravance CG, Vishwanath R, Pitt C, Garner DL, Casey PJ. Effects of cryopreservation on Bull sperm head morphometry. *Journal of Andrology* 1998; 19: 704-709

Hammerstedt RH, Amann RP, Rucinsky T, Morse PD, Lepock J, Snipes W, Keith AD. Use of spin labels and electron spin resonance spectroscopy to characterize membranes of bovine sperm: effect of butylated hydroxytoluene and cold shock. *Biology of reproduction* 1976; 14: 381-397

Hancock JL. A staining technique for the study of temperature shock in semen. *Nature* 1951; 167: 323-324

Hidalgo M, Rodríguez I, Dorado JM. The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Animal reproduction science* 2007; 100: 61-72

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

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assays to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984; 70:219-228

- Khalifa TAA, Lymberopoulos AG, El-Saidy BE. Testing usability of butylated hydroxytoluene in conservation of goat semen. *Reprod Dom Anim* 2008; 43: 525–530
- Le Grandois J, Marchioni E, Zhao M, Giuffrida F, Ennahar S, Françoise B. Investigation of natural phosphatidylcholine sources: separation and identification by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS) of molecular species. *Journal of agricultural and food chemistry* 2009; 57: 6014–6020
- Liu Z, Foote RH, Brockett CC. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. *Cryobiology* 1998; 37: 219-230
- Marco-Jiménez F, Viudes-de-Castro MP, Balasch S, Mocé E, Silvestre MA, Gomez EA, Vicente JS. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology* 2006; 52: 295-304
- Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M, Nadia FM, Audrey G. Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen in Tris egg yolk extender. *Animal reproduction science* 2011; 129: 44-49
- Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M, Nadia FM. Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in yolk glycerol extender. *Animal reproduction science* 2012; 136: 55-60
- Molinia FC, Evans G, Maxwell WMC. *In vitro* evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reproduction, nutrition, development* 1994b; 34: 491-500
- Naijian HR, Kohram H, Shahneh AZ, Sharafi M, Bucak MN. Effects of different concentrations of BHT on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze–thaw process. *Cryobiology* 2013; 66: 151-155
- Naing SW, Wahid H, Mohd Azam K, Rosnina Y, Zuki AB, Kazhal S, Bukar MM, Thein M, Kyaw T, San MM. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. *Animal reproduction science* 2010; 122: 23-28
- Najafi A, Zhandi M, Towhidi A, Sharafi M, Sharif AA, Motlagh MK, Martinez-Pastor F. Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology* 2013; 66: 275-282

Purdy PH, Mocé E, Stobart R, Murdoch WJ, Moss GE, Larson B, Ramsey S, Graham JK, Blackburn HD. The fertility of ram sperm held for 24 h at 5 °C prior to cryopreservation. *Animal reproduction science* 2010; 118: 231-235

Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. *Small ruminant research* 2006; 63: 215-225

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

Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal reproduction science* 1995a; 37: 185-249

Salmani H, Towhidi A, Zhandi M, Bahreini M, Sharafi M. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology* 2014; 68: 276-280

Santiago-Moreno J, Coloma MA, Dorado J, Pulido-Pastor A, Gómez-Guillamon F, Salas-Vega R, Gómez-Brunet A, López-Sebastián A. Cryopreservation of Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) sperm obtained by electroejaculation outside the rutting season. *Theriogenology* 2009; 71: 1253-1260

Scholfield R. Composition of soybean lecithin. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 1981; 58: 889-892

Tonieto RA, Goularte KL, Gastal GDA, Schiavon RS, Deschamps JC, Lucia Jr. T. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Ruminant Research* 2010; 93: 206–209

Tuli RK, Holt W. The effect of zwitterion buffers on the freezability of Boer goat semen. *Theriogenology* 1992; 37: 947-951

Van Wagendonk-de Leeuw AM, Haring RM. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology* 2000; 54: 57-67

Vidal AH, Batista AM, Cordeiro BDE, Arruda GW, Arruda PM, Valcácia SS, Pessoa GMM. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small ruminant research* 2012

Yániz JL, Mateos JA, Santolaria P. Zwitterionic buffers preserve ram semen quality more efficiently than Tris during storage at 15 °C. *Small ruminant research* 2011; 95: 54-60

Yoshida M. Conservation of sperms: current status and new trend. *Animal reproduction science* 2000; 60-61: 349-355

Zhang SS, Hu JH, Li QW, Jiang ZL, Zhang XY. The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *African Journal of Biotechnology* 2009; 8: 6476-6480

Estudio 3:

DETERMINACIÓN DEL CRIOPROTECTOR NO PENETRANTE Y VALORACIÓN
DEL ANTIOXIDANTE BHT

Abstract

The first aim was to determine if soybean lecithin as non-penetrating cryoprotectant is a viable alternative in buck sperm preservation in the presence of seminal plasma. The second aim was to determine the optimal concentration of the antioxidant BHT in the freezing media based on powdered egg yolk or on soybean lecithin. Therefore, fresh ejaculates (n = 6) from 6 bucks were collected by artificial vagina. After collection, the ejaculates were mixed and split into two aliquots: 1) washed, the semen was centrifuged twice at 600xg for 10' and 2) unwashed. In experiment 1, washed sperm was re-suspended in a medium based on powdered egg yolk or soybean lecithin and unwashed semen was only diluted in a soybean lecithin based medium. In experiment 2, washed sperm were diluted in a powdered egg yolk 15% (v/v) based media containing various concentrations of BHT (0.6 mM, 2.0 mM or 5.0 mM) and a control medium (without BHT), while unwashed sperm were diluted in a medium based on soybean lecithin 1% (w/v) containing various concentrations of BHT, as in the previous case. All media consisted of a solution based on Tris-Glucose-citric acid and 5% glycerol (v/v). The diluted semen samples were chilled for 4 hours at 5°C and subsequently frozen to -196°C. The results indicate that the medium with soybean lecithin was able to maintain the functional and structural integrity of unwashed sperm membranes after cooling relative to the other two treatments, where the seminal plasma was removed. By flow cytometry analysis after thawing, it was observed that the integrity of the sperm plasma membrane was preserved in a greater manner in powdered egg yolk than in soybean lecithin preserved sperm. Furthermore, the population of sperm cells with intact plasma and acrosomal membrane, but without mitochondrial function was higher in sperm preserved soybean lecithin based media, both washed and unwashed sperm. In the valuation of the optimal concentration of BHT in sperm preservation media, it was observed that functional and structural membranes as total and progressive motility after cooling were similar in both media, in powdered egg yolk as soybean lecithin based media with different BHT concentrations (0.6, 2.0 and 5.0 mM). After thawing, on soybean lecithin based media, regardless the BHT concentration used, a significant increase of spermatozoa with intact plasma and acrosomal membrane, but without mitochondrial function was observed. We conclude that the powdered egg yolk is

the most convenient non-penetrating cryoprotectant for goat sperm cryopreservation, meanwhile soybean lecithin may be a viable alternative to incorporate in preservation media at 5°C without removing seminal plasma. Related to BHT, very little beneficial effect were observed. Furthermore, it has been observed that soybean lecithin produces alterations in mitochondrial function.

Introducción

La crioconservación del semen de caprino presenta especiales desafíos. Aparentemente esta especie es la única entre el ganado doméstico que tiene la peculiaridad de secretar lipasas en las glándulas bulbouretrales que interaccionan con algunos componentes de los medios de conservación, produciendo sustancias tóxicas para el espermatozoide y reduciendo el éxito de la congelación (revisado por Coloma *et al.*, 2010). Para tratar de minimizar estos efectos, se recomienda la eliminación del plasma seminal mediante la centrifugación (lavado) del semen (Leboeuf *et al.*, 2000; Purdy, 2006). Sin embargo, el lavado del semen es un paso engorroso, consume tiempo y puede dar lugar a pérdida o daño de los espermatozoides (Tuli y Holtz, 1994). De hecho, no todos los estudios reportan un efecto beneficioso y las opiniones difieren con respecto a la necesidad de retirar el plasma seminal (Leboeuf *et al.*, 2000; Azeredo *et al.*, 2001; Cabrera 2005; Purdy, 2006; Peterson *et al.*, 2007; Sariözkan *et al.*, 2010). Dado que la lecitina de soja y la yema de huevo difieren en la composición de lípidos y contenido de ácidos grasos (Scholfield, 1981; Palacios y Wang, 2005; Le Grandois *et al.*, 2009), la lecitina de soja podría interactuar de manera diferente con las enzimas contenidas en el plasma seminal. La limitación de las interacciones negativas entre el medio de conservación y las lipasas sería útil y permitiría simplificar el protocolo, ya que no se requeriría la etapa de lavado (Roof *et al.*, 2012).

Por otro lado, a pesar de que la suplementación del medio de congelación con antioxidantes representa una posibilidad de reducir los efectos detrimentales en la calidad espermática ocasionados por la congelación-descongelación, la concentración del antioxidante es un punto importante a tomar en cuenta a la hora de incluirlo en el medio de crioconservación, ya que puede afectar la efectividad y capacidad antioxidante (Memon *et al.*, 2012). Se ha

observado que altas concentraciones del antioxidante BHT pueden aumentar la fluidez de la membrana espermática por encima del punto deseado, haciendo más propensos a los espermatozoides al daño acrosomal (Ijaz *et al.*, 2009). Por tanto, los objetivos de este estudio fueron valorar la lecitina de soja como una alternativa viable para su uso en los medios de congelación de espermatozoides de macho cabrío en presencia de plasma seminal, así como determinar la concentración óptima del antioxidante BHT en el medio de congelación.

Material y Métodos

Diseño experimental

Se utilizaron 6 machos cabríos de la raza Blanca de Rasquera de 2 años de edad aproximadamente. La extracción del semen se realizó mediante una vagina artificial, a un ritmo de 2 extracciones por día y 1 ó 2 días por semana de todos los machos.

Experimento 1. Valoración del efecto de la sustitución de la yema de huevo en polvo por lecitina de soja en el medio de conservación espermática en presencia o ausencia de plasma seminal.

Se analizaron dos tipos de crioprotector no penetrante (yema de huevo en polvo al 15% y lecitina de soja al 1%) y la necesidad de eliminar o no el plasma seminal (lavado/no lavado).

Los eyaculados de los machos fueron mezclados a fin de eliminar el efecto individual y posteriormente divididos en 3 tratamientos para la conservación de los espermatozoides. Cada tratamiento fue repetido 6 veces, siendo los tratamientos los que a continuación se describen:

- a) Semen lavado y diluyente con 15% de yema de huevo en polvo
- b) Semen lavado y diluyente con 1% de lecitina de soja
- c) Semen no lavado y diluyente con 1% de lecitina de soja

Experimento 2. Determinación de la concentración óptima del antioxidante BHT en el medio de congelación.

En este experimento se evaluó el efecto del BHT como antioxidante utilizando 3 concentraciones (0.6, 2.0 y 5.0 mM) y dos diluyentes seleccionados de las actividades previas.

De la misma manera que en la actividad anterior, los eyaculados de los machos fueron mezclados a fin de eliminar el efecto individual y sometidos a 8 tratamientos para la conservación de los espermatozoides. Cada tratamiento fue repetido 6 veces, siendo los distintos tratamientos los que a continuación se describen:

- a) Semen lavado y diluyente con 15% de yema de huevo en polvo sin antioxidante
- b) Semen lavado y diluyente con 15% de yema de huevo en polvo con 0.6mM de BHT
- c) Semen lavado y diluyente con 15% de yema de huevo en polvo con 2.0mM de BHT
- d) Semen lavado y diluyente con 15% de yema de huevo en polvo con 5.0mM de BHT
- e) Semen no lavado y diluyente con 1% de lecitina de soja sin antioxidante
- f) Semen no lavado y diluyente con 1% de lecitina de soja con 0.6mM de BHT
- g) Semen no lavado y diluyente con 1% de lecitina de soja con 2.0mM de BHT
- h) Semen no lavado y diluyente con 1% de lecitina de soja con 5.0mM de BHT

Diluyente base

La composición base del diluyente de congelación fue la recomendada por Purdy *et al.* (2010), consistente en 300 mM Tris[hidroximetil] aminometano, 28 mM glucosa, 95 mM ácido cítrico y antibióticos (1000 IU/mL de penicilina sódica y 1 mg/mL de sulfato de estreptomicina) a un pH 7.2–7.3, al que se le añadió yema de huevo en polvo y glicerol (v/v) a una concentración final de 15% y 5%, respectivamente.

Eliminación de plasma seminal o lavado

Se realizó mediante la dilución en el diluyente TGC (300 mM Tris, 28 mM glucosa, 95 mM ácido cítrico) a 37°C y la doble centrifugación a 600 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, el sobrenadante fue descartado y el sedimento final fue resuspendido en el diluyente de congelación correspondiente.

Preparación de la yema de huevo en polvo, lecitina de soja e hidroxitolueno butilado

Para la preparación de la *yema de huevo en polvo* (Hen egg yolk powder 53150, B.V. NIVE), ésta se resuspendió en agua bidestilada a una dilución 1:1.25, mientras que para la preparación de la *lecitina de soja* (Sigma 11145), ésta se diluyó al 1%, tal y como describe Forouzanfar *et al.* (2010) en espermatozoides de morueco, sustituyendo a la yema de huevo. Respecto al *Hidroxitolueno butilado (BHT) como antioxidante*, se utilizaron varias concentraciones de BHT 0.6, 2.0 y 5.0 mM disueltas en DMSO. La concentración final de DMSO en el medio de conservación espermática fue 0.25% (v/v, 35.2 mM), como describe Khalifa *et al.* (2008).

Protocolo de congelación y descongelación

El protocolo de congelación consistió en diluir (1:4) cada alícuota de la mezcla de eyaculados en el diluyente correspondiente en un solo paso, ajustando la concentración de espermatozoides a 400×10^6 /mL. Seguidamente, las distintas suspensiones espermáticas se colocaron en un recipiente con agua a 20°C y se mantuvieron a 5°C durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron envasadas en pajuelas de 0.25 mL y congeladas en vapores de nitrógeno a 5 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido durante 10 minutos, antes de ser sumergidas en el nitrógeno para su conservación.

Las muestras seminales crioconservadas fueron descongeladas por inmersión en baño de agua a 37°C durante un mínimo de 30 segundos. Las pajuelas fueron secadas y cortadas por los extremos, depositando su contenido en tubos de plástico hasta su análisis.

Análisis *in vitro* de las células espermáticas

Tras la recogida del semen se evaluó el volumen de cada eyaculado en un tubo graduado y la motilidad masal del semen en una escala del 0 al 5 (Evans y Maxwell, 1990) con la ayuda de un microscopio óptico conectado a una platina calentable, así como la concentración espermática (espermatozoides/mL) mediante una cámara de recuento celular de Neubauer.

La viabilidad de los espermatozoides en fresco y a las 4 horas del inicio de la refrigeración se estimó mediante la tinción vital eosina/nigrosina (Hancock, 1951), así como el análisis de la funcionalidad de la membrana plasmática mediante el test hipoosmótico (*hyposmotic swelling test* HOS test; Jeyendran *et al.*, 1984, Forouzanfar *et al.*, 2010) como se ha descrito en la sección de material y métodos general.

Además, tras la refrigeración y tras la congelación/descongelación de las distintas suspensiones espermáticas, se llevó a cabo el análisis de los diferentes parámetros de motilidad con la ayuda del sistema computarizado de análisis (CASA) ISAS® (PROISER SL., Valencia). Los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides frescos y congelados/descongelados también fueron analizados mediante este sistema CASA.

Una vez almacenadas las diferentes muestras seminales crioconservadas, se valoró tras su descongelación la integridad de las membranas plasmática y acrosomal así como la función mitocondrial, mediante citometría de flujo utilizando las sondas fluorescentes SYBR14, yoduro de propidio, Ficoeritrina unida a la lectina *Arachis hipogea* (PE-PNA) y *Mitotracker deep red*, en medio isoosmótico e hipoosmótico, tal y como se describe en la sección de material y métodos general.

Resultados

Experimento 1. Valoración del efecto de la sustitución de la yema de huevo en polvo por lecitina de soja en el medio de conservación espermática en presencia o ausencia de plasma seminal.

Los resultados tras el análisis espermático inicial de la mezcla de eyaculados frescos de las 6 replicas realizadas mostraron un volumen de 1.8 ± 0.1 mL, una motilidad masal de 3.8 ± 0.2 , con una concentración seminal de $2.8 \pm 0.2 \times 10^9$ espermatozoides/mL, un porcentaje de formas anormales sin incluir los acrosomas dañados de 2.4 ± 0.8 , un porcentaje de viabilidad estimada por E/N de 86.4 ± 2.0 e integridad funcional de la membrana plasmática tras la prueba de Host de $80.7 \pm 1.0\%$.

Al analizar los valores porcentuales de viabilidad espermática tras la refrigeración no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) entre los obtenidos en medios a base de lecitina de soja, tanto en presencia (87.1 ± 3.2) como en ausencia de plasma seminal (82.5 ± 4.4) respecto del medio control a base de yema de huevo en polvo sin plasma seminal (88.7 ± 2.0). De igual manera, el porcentaje de integridad funcional tras el shock hipoosmótico (Host) de la membrana plasmática de los espermatozoides refrigerados en el medio control (80.3 ± 3.9) tampoco difirió de los conservados en lecitina de soja con (68.5 ± 4.5) o sin plasma seminal (71.6 ± 5.4). En cambio, en la motilidad espermática, la eliminación del plasma en el caso de usar lecitina como crioprotector sí produjo un claro y significativo descenso de la motilidad total y progresiva respecto al resto de tratamientos, así como también en los diferentes parámetros cinéticos presentando valores significativamente diferentes en todas las variables a excepción del desplazamiento lateral de la cabeza donde no hubieron diferencias entre tratamientos (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Efecto del crioprotector no penetrante y de la eliminación del plasma seminal en los parámetros cinéticos de espermatozoides refrigerados de caprino (media \pm error estándar).

| PARÁMETRO | L-YHP | L-LECITINA | LECITINA |
|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| MT (%) | 89.8 ± 1.6^a | 49.1 ± 12.8^b | 81.1 ± 6.3^a |
| MP (%) | 37.8 ± 3.3^a | 5.7 ± 1.9^b | 35.5 ± 4.9^a |
| VCL ($\mu\text{m/s}$) | 124.7 ± 5.0^a | 96.0 ± 6.8^b | 117.3 ± 2.7^a |
| VSL ($\mu\text{m/s}$) | 64.9 ± 2.6^a | 26.5 ± 5.7^b | 56.2 ± 4.3^a |
| VAP ($\mu\text{m/s}$) | 81.3 ± 2.2^a | 48.1 ± 7.4^b | 72.6 ± 3.5^a |
| LIN (%) | 52.3 ± 3.2^a | 28.6 ± 4.3^b | 48.5 ± 3.9^a |
| STR (%) | 77.2 ± 1.5^a | 50.3 ± 4.3^b | 73.9 ± 2.6^a |
| ALH (μm) | 4.6 ± 0.2 | 4.3 ± 0.2 | 4.4 ± 0.2 |
| BCF (Hz) | 8.8 ± 0.4^a | 6.3 ± 0.9^b | 9.9 ± 0.5^a |

Diferente letra en la fila indica diferencia estadística ($P < 0.05$)

YHP: yema de huevo en polvo, L: Lavado, 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 batido.

Este significativo efecto del lavado de los espermatozoides previo a su conservación en un medio a base de lecitina de soja, se volvió a observar tras la descongelación de las muestras seminales tanto en la motilidad total como en la progresiva, siendo bastante inferiores a las observadas en el medio control y en el medio a base de lecitina pero en presencia de plasma seminal, las cuales no se diferenciaron entre sí. De forma similar a lo ocurrido tras la refrigeración, se observaron también diferencias significativas en los valores de velocidad rectilínea, linealidad, rectitud y la frecuencia de batido entre los espermatozoides lavados y congelados en el medio a base de lecitina respecto a los otros dos tratamientos (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Efecto del crioprotector no penetrante y de la eliminación del plasma seminal en los parámetros de movimiento en las células espermáticas de caprino post-descongelación (media \pm error estándar).

| PARÁMETRO | L-YHP | L-LECITINA | LECITINA |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| MT (%) | 46.8 \pm 9.1 ^a | 8.3 \pm 2.6 ^b | 34.3 \pm 4.8 ^a |
| MP (%) | 18.7 \pm 4.0 ^a | 1.4 \pm 0.4 ^b | 15.3 \pm 2.1 ^a |
| VCL (μ m/s) | 123.9 \pm 4.3 | 108.1 \pm 8.2 | 110.5 \pm 4.9 |
| VSL (μ m/s) | 48.5 \pm 4.4 ^a | 29.5 \pm 6.9 ^b | 50.1 \pm 5.5 ^a |
| VAP (μ m/s) | 66.6 \pm 5.2 | 50.0 \pm 8.0 | 64.6 \pm 4.9 |
| LIN (%) | 39.7 \pm 2.3 ^a | 26.1 \pm 4.8 ^b | 44.7 \pm 4.7 ^a |
| STR (%) | 70.6 \pm 2.2 ^a | 51.3 \pm 3.8 ^b | 70.8 \pm 3.8 ^a |
| ALH (μ m) | 4.9 \pm 0.1 | 4.8 \pm 0.3 | 4.2 \pm 0.2 |
| BCF (Hz) | 9.6 \pm 0.7 ^a | 5.1 \pm 0.6 ^b | 9.4 \pm 0.3 ^a |

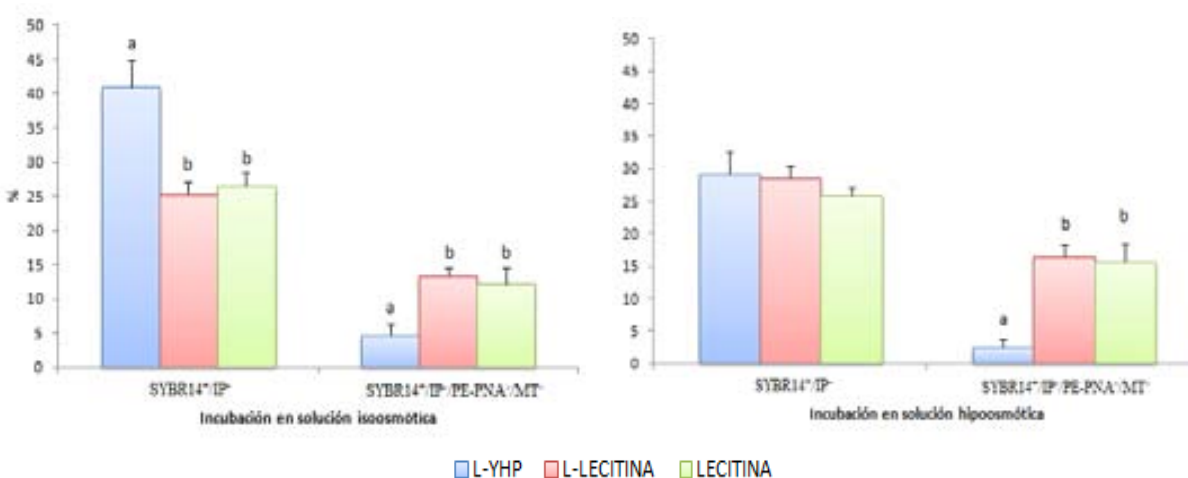
Diferente letra en la fila indica diferencia estadística ($P < 0.05$)

YHP: yema de huevo en polvo, L: Lavado, 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 batido.

Sin embargo, cuando se analizó mediante el citómetro de flujo, la integridad de la membrana plasmática y acrosomal junto con la actividad mitocondrial de los espermatozoides tras la descongelación, se observó que los espermatozoides lavados y crioconservados en el medio control a base de yema de huevo presentaban una integridad

de membranas significativamente superior, así como con un porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta sin función mitocondrial muy inferior a lo observado en los otros 2 tratamientos a base de lecitina de soja. Esta misma tendencia a presentar una mayor incidencia de espermatozoides viables sin función mitocondrial en los medios a base de lecitina de soja se observó también en los espermatozoides descongelados y analizados tras ser incubados en la solución hiposmótica. No obstante, no se observaron diferencias entre los tres tratamientos ($P>0.05$) en la integridad total de las membranas tras el shock, así como tampoco en ningún parámetro analizado entre los medios a base de lecitina con y sin plasma seminal, tanto en la solución isoosmótica como hiposmótica (Figura 1.1). En cuanto al porcentaje de acrosomas dañados en los espermatozoides incubados en la solución isoosmótica tampoco se encontraron diferencias ($P>0.05$) entre los medios a base de lecitina de soja conteniendo (20.8 ± 4.3) o no (27.6 ± 3.5) plasma seminal respecto al medio a base de yema de huevo en polvo sin plasma seminal (29.9 ± 2.1).

Figura 1.1. Integridad de membrana plasmática y acrosómica y función mitocondrial en espermatozoides descongelados de caprino en solución isoosmótica e hiposmótica (media \pm error estándar).



Diferente letra en cada parámetro indica diferencia estadística ($P<0.05$)

YHP: yema de huevo en polvo, L: Lavado, SYBR14⁺/IP: Membrana plasmática intacta, SYBR14⁺/IP/PE-PNA⁺/MT⁻: Membrana plasmática intacta, acrosoma intacto sin función mitocondrial.

En el análisis morfométrico de la cabeza del espermatozoide mediante el sistema ISAS® de las distintas suspensiones espermáticas no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) entre los espermatozoides frescos y descongelados en todos los parámetros ni en los de

dimensión ni en los de forma. Así como tampoco se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) tras la descongelación entre los medios de conservación en ningún parámetro, obteniendo que los valores medios de la cabeza fueron para longitud $7.85\pm 0.02 \mu\text{m}$, anchura $4.37\pm 0.01\mu\text{m}$, área de $29.12\pm 0.10 \mu\text{m}^2$ y perímetro de $21.78\pm 0.05\mu\text{m}$, mientras que en los parámetros de forma los valores medios fueron para elipticidad 1.80 ± 0.01 , rugosidad 0.77 ± 0.00 , elongación 0.28 ± 0.00 y regularidad 0.93 ± 0.00 .

Experimento 2. Determinación de la concentración óptima del antioxidante BHT en el medio de congelación.

La calidad inicial del semen tras el análisis seminal de la mezcla de eyaculados frescos de las 6 replicas realizadas consistió en un volumen de $1.2\pm 0.1 \text{ mL}$, una motilidad masal de 3.0 ± 0.2 , con una concentración seminal de $3.5\pm 0.2\times 10^9$ de espermatozoides/mL, un porcentaje de formas anormales sin acrosomas dañados de 8.0 ± 1.3 , un porcentaje de viabilidad estimada por E/N de 82.4 ± 4.2 e integridad funcional de sus membranas con la prueba de Host de $71.4\pm 3.3\%$.

Respecto a la inclusión del BHT como antioxidante en sus diferentes concentraciones en el medio de conservación espermática, tras la refrigeración no se observó ningún efecto ($P>0.05$) en la viabilidad analizada por E/N en la solución iso e hipoosmótica (Tabla 2.1), así como tampoco en la mayor parte de los parámetros cinéticos. Sin embargo, el índice de rectitud obtenido en el movimiento de los espermatozoides conservados en el medio a base de lecitina de soja con 0.6 mM de BHT fue significativamente inferior a los valores observados en todos los medios a base de yema de huevo en polvo (YHP), sin diferir de lo obtenido en el resto de medios a base de lecitina de soja (LS). También la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza de los espermatozoides fue similar en los tratamientos tanto a base de YHP como de LS, a excepción de los espermatozoides conservados en el medio a base de YHP con 5 mM de BHT o en el de LS con 2 mM de BHT donde se observó el valor más bajo y más alto de ALH, respectivamente. Además, se observó que la frecuencia de batido de los espermatozoides conservados en medios a base de LS disminuía en presencia de BHT, presentando valores significativamente inferiores en las

concentraciones más altas de BHT (2 y 5 mM) respecto a los valores observados en su ausencia, mientras que en los medios a base de YHP este parámetro aumentaba a medida que se incrementaba la concentración del antioxidante, siendo significativamente superior en el medio de mayor concentración de BHT (5 mM) respecto a lo observado en el resto de tratamientos, a excepción de lo obtenido con 2 mM de BHT del que no difirió (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Efecto de la inclusión de diferentes concentraciones de BHT en la viabilidad y capacidad de resistencia al shock hipoosmótico mediante host y en los parámetros de calidad y cantidad de movimiento de las células espermáticas de caprino tras la refrigeración.

| Parámetro | L-YHP- 0 BHT | L-YHP- 0.6 BHT | L-YHP- 2 BHT | L-YHP- 5 BHT | LS- 0 BHT | LS- 0.6 BHT | LS- 2 BHT | LS- 5 BHT |
|----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| Viabilidad (%) | 82.3±3.6 | 81.0±3.5 | 78.5±6.1 | 80.2±4.8 | 81.2±3.8 | 81.7±3.4 | 82.0±3.9 | 77.0±7.6 |
| Host (%) | 69.8±4.7 | 71.6±4.1 | 71.8±3.9 | 71.8±3.3 | 65.6±2.0 | 63.9±6.2 | 56.5±4.8 | 63.5±5.8 |
| MT (%) | 78.8±4.7 | 80.2±4.2 | 77.1±5.2 | 80.7±3.8 | 75.1±4.2 | 82.8±1.2 | 80.9±2.7 | 76.8±4.6 |
| MP (%) | 31.6±4.0 | 30.6±3.3 | 31.5±2.3 | 31.4±2.8 | 26.4±4.4 | 27.6±5.3 | 30.0±2.5 | 26.7±1.8 |
| VCL (µm/s) | 116.5±5.7 | 116.3±6.7 | 116.6±5.2 | 112.3±5.3 | 121.4±5.7 | 114.1±4.9 | 110.6±5.6 | 105.6±7.9 |
| VSL (µm/s) | 52.7±5.4 | 51.9±4.6 | 53.6±4.2 | 52.6±5.3 | 48.9±4.1 | 46.5±5.0 | 50.7±4.6 | 45.5±4.0 |
| VAP (µm/s) | 68.7±5.6 | 68.0±5.6 | 69.7±5.1 | 68.0±5.7 | 69.8±4.6 | 66.4±4.6 | 69.6±5.3 | 63.5±5.7 |
| LIN (%) | 45.4±3.1 | 45.2±2.8 | 46.4±2.4 | 47.0±3.1 | 40.6±3.0 | 40.9±4.1 | 45.0±2.3 | 42.4±2.5 |
| STR (%) | 74.0±2.6 ^a | 73.5±2.4 ^a | 74.6±1.9 ^a | 74.3±2.0 ^a | 66.9±2.7 ^{ab} | 65.4±4.2 ^b | 68.7±2.3 ^{ab} | 67.0±0.8 ^{ab} |
| ALH (µm) | 4.7±0.2 ^b | 4.4±0.1 ^b | 4.5±0.1 ^b | 3.7±0.1 ^a | 4.3±0.2 ^b | 4.6±0.1 ^b | 5.3±0.1 ^c | 4.7±0.4 ^b |
| BCF (Hz) | 8.4±0.6 ^{ab} | 8.4±0.2 ^{ab} | 9.3±0.2 ^{bc} | 10.2±0.3 ^c | 8.8±0.4 ^b | 8.4±0.1 ^{ab} | 7.6±0.3 ^a | 7.6±0.1 ^a |

Diferente letra en la fila indica diferencia estadística ($P < 0.05$)

YHP: yema de huevo en polvo; LS: Lecitina de soja; L: Lavado; 0, 0.6, 2, 5: concentración de hidroxitolueno butilado (BHT); 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 batido.

Tras el análisis de las muestras espermáticas post-descongelación, la ausencia de efecto de la inclusión del BHT como antioxidante sobre los parámetros de motilidad fue todavía más notable que tras la refrigeración, observándose únicamente una motilidad total significativamente superior en aquellos espermatozoides conservados en YHP en presencia de la mayor concentración de BHT (5 mM) respecto a la presentada en los conservados

también en YHP, pero en ausencia del antioxidante o con una concentración de 2 mM (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Efecto del crioprotector no penetrante e inclusión de BHT en los parámetros de movimiento en las células espermáticas de caprino post-descongelación.

| Parámetro | L-YHP- 0 BHT | L-YHP- 0.6 BHT | L-YHP- 2 BHT | L-YHP- 5 BHT | LS- 0 BHT | LS- 0.6 BHT | LS- 2 BHT | LS- 5 BHT |
|------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| MT (%) | 21.6±2.4 ^a | 31.8±3.7 ^{ab} | 20.8±3.0 ^a | 37.2±5.2 ^b | 22.9±2.7 ^{ab} | 32.6±2.5 ^{ab} | 31.9±2.5 ^{ab} | 31.5±4.3 ^{ab} |
| MP (%) | 4.9±0.8 | 7.7±2.0 | 4.5±0.6 | 12.6±3.1 | 3.5±1.4 | 6.3±2.3 | 8.2±2.4 | 7.7±2.4 |
| VCL (µm/s) | 100.2±3.3 | 101.7±5.5 | 99.3±4.8 | 97.9±4.5 | 95.7±3.5 | 93.1±5.5 | 89.3±4.7 | 92.9±5.2 |
| VSL (µm/s) | 28.8±2.1 | 33.6±4.4 | 29.3±1.0 | 38.3±4.2 | 25.9±4.1 | 28.2±5.0 | 30.8±4.1 | 30.3±4.3 |
| VAP (µm/s) | 49.7±1.6 | 53.1±3.4 | 49.1±2.5 | 55.2±3.7 | 49.6±2.6 | 50.8±2.4 | 50.6±3.5 | 51.1±3.3 |
| LIN (%) | 31.2±2.1 | 34.7±3.7 | 32.0±1.7 | 39.6±3.3 | 28.4±3.0 | 30.7±5.4 | 33.9±3.3 | 31.9±3.2 |
| STR (%) | 57.7±3.0 | 61.0±4.6 | 59.3±3.2 | 65.4±3.5 | 50.8±4.3 | 51.5±6.7 | 56.1±4.0 | 54.7±4.4 |
| ALH (µm) | 4.6±0.2 | 4.5±0.2 | 4.6±0.3 | 4.2±0.2 | 4.4±0.2 | 4.1±0.3 | 3.9±0.2 | 4.0±0.2 |
| BCF (Hz) | 6.9±0.6 | 7.0±0.6 | 6.2±0.5 | 7.7±0.3 | 5.9±0.6 | 6.4±0.8 | 6.5±0.5 | 6.9±0.4 |

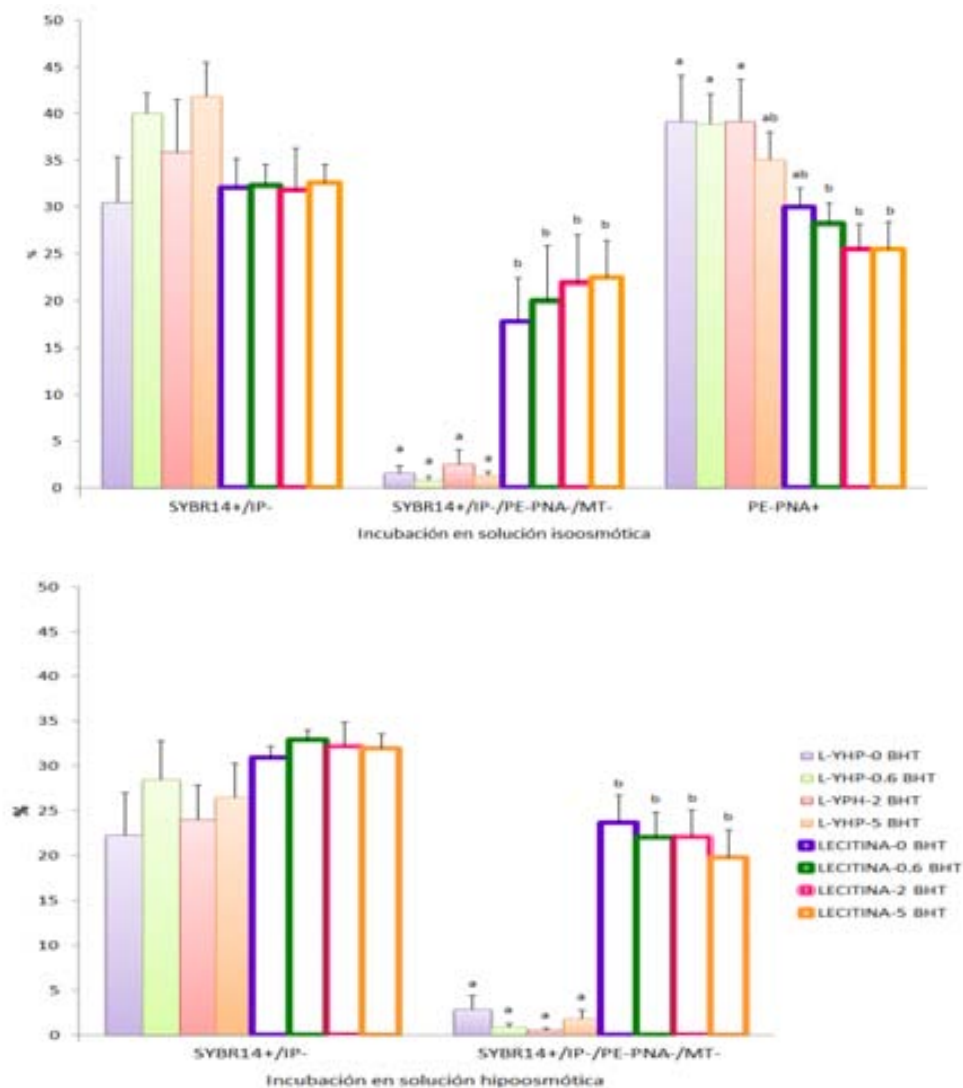
Diferente letra en la fila indica diferencia estadística ($P < 0.05$)

YHP: yema de huevo en polvo; LS: Lecitina de soja; L: Lavado; 0, 0.6, 2, 5: concentración de hidroxitolueno butilado (BHT); 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 batido.

En la integridad de las membranas de los espermatozoides descongelados tampoco se observaron diferencias entre tratamientos ($P > 0.05$), tanto en la solución isoosmótica como en la hipoosmótica, pero si hubo diferencias en la población espermática con integridad de las membranas plasmática y acrosomal pero sin función mitocondrial en ambas soluciones, siendo estos porcentajes significativamente superiores en el caso de conservar los espermatozoides en un medio a base de lecitina de soja, independientemente de la presencia y concentración del antioxidante. Por otro lado, el porcentaje de daño acrosómico en la solución isoosmótica fue superior en los espermatozoides lavados y crioconservados en medios a base de yema de huevo en polvo respecto a los espermatozoides no lavados y conservados en lecitina de soja, observando un efecto negativo del lavado del semen a pesar de no haber diferencias significativas entre los espermatozoides lavados y congelados en YHP+5mM de BHT y los espermatozoides no lavados y congelados en todos los medios

a base de lecitina de soja. Además, en los medios a base de lecitina de soja y también en los medios a base de YHP cuando la concentración de BHT fue de 5 mM, se observó un efecto beneficioso del BHT aunque éste no fue significativo (Figura 2.1).

Figura 2.1. Efecto del crioprotector no penetrante e inclusión de BHT en el medio de crioconservación sobre la integridad de membranas y función mitocondrial de espermatozoides de caprino post-descongelación en solución isoosmótica e hipoosmótica.



Diferente letra en cada parámetro indica diferencia estadística ($P < 0.05$)

YHP: yema de huevo en polvo; L: Lavado; 0, 0.6, 2, 5: concentración de hidroxitolueno butilado (BHT); SYBR14⁺/IP⁻: Membrana plasmática intacta, SYBR14⁺/IP⁻/PE-PNA⁻/MT⁻: Membrana plasmática intacta, acrosoma intacto sin función mitocondrial, PE-PNA⁺: Acrosomas dañados.

Tras realizar el análisis morfométrico de la cabeza del espermatozoide de las distintas suspensiones espermáticas post-descongelación, los parámetros tanto de dimensión como los de forma fueron similares en los diferentes medios de conservación. Sin embargo, respecto de los valores obtenidos en el semen fresco si hubo diferencias, observando que la longitud, elipticidad y elongación son significativamente inferiores en los espermatozoides en fresco, mientras que la anchura fue superior en fresco respecto de los espermatozoides descongelados independientemente del medio de conservación utilizado (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Efecto del crioprotector no penetrante y la inclusión de BHT en el medio de crioconservación sobre los parámetros morfométricos de las células espermáticas de caprino.

| | FRESCO | L-YHP 0 BHT | L-YHP 0.6 HT | L-YHP 2 BHT | L-YHP 5 BHT | LS 0 BHT | LS 0.6 BHT | LS 2 BHT | LS 5 BHT |
|---|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Longitud (μm) | 7.72 \pm 0.04 ^a | 7.8 \pm 0.0 ^b | 7.9 \pm 0.0 ^b | 7.8 \pm 0.0 ^b | 7.8 \pm 0.0 ^b | 7.8 \pm 0.0 ^b | 7.8 \pm 0.0 ^b | 7.8 \pm 0.0 ^b | 7.8 \pm 0.0 ^b |
| Anchura (μm) | 4.45 \pm 0.02 ^a | 4.4 \pm 0.0 ^b | 4.4 \pm 0.0 ^b | 4.3 \pm 0.0 ^b | 4.4 \pm 0.0 ^b | 4.3 \pm 0.0 ^b | 4.4 \pm 0.0 ^b | 4.4 \pm 0.0 ^b | 4.4 \pm 0.0 ^b |
| Área (μm^2) | 28.92 \pm 0.25 | 28.8 \pm 0.1 | 28.9 \pm 0.1 | 28.8 \pm 0.1 | 28.9 \pm 0.1 | 28.7 \pm 0.2 | 28.9 \pm 0.1 | 28.7 \pm 0.1 | 28.9 \pm 0.1 |
| Perímetro (μm) | 21.70 \pm 0.08 | 21.7 \pm 0.1 | 21.8 \pm 0.1 | 21.7 \pm 0.1 | 21.8 \pm 0.1 | 21.7 \pm 0.1 | 21.7 \pm 0.0 | 21.6 \pm 0.0 | 21.8 \pm 0.0 |
| Elipticidad | 1.74 \pm 0.00 ^a | 1.8 \pm 0.0 ^b | 1.8 \pm 0.0 ^b | 1.8 \pm 0.0 ^b | 1.8 \pm 0.0 ^b | 1.8 \pm 0.0 ^b | 1.8 \pm 0.0 ^b | 1.8 \pm 0.0 ^b | 1.8 \pm 0.0 ^b |
| Rugosidad | 0.77 \pm 0.00 | 2.3 \pm 1.4 | 0.8 \pm 0.0 | 0.8 \pm 0.0 | 2.2 \pm 1.4 | 1.4 \pm 0.6 | 0.8 \pm 0.0 | 0.8 \pm 0.0 | 2.2 \pm 1.4 |
| Elongación | 0.27 \pm 0.00 ^a | 0.3 \pm 0.0 ^b | 0.3 \pm 0.0 ^b | 0.3 \pm 0.0 ^b | 0.3 \pm 0.0 ^b | 0.3 \pm 0.0 ^b | 0.3 \pm 0.0 ^b | 0.3 \pm 0.0 ^b | 0.3 \pm 0.0 ^b |
| Regularidad | 0.93 \pm 0.00 | 0.9 \pm 0.0 | 0.9 \pm 0.0 | 0.9 \pm 0.0 | 0.9 \pm 0.0 | 0.9 \pm 0.0 | 0.9 \pm 0.0 | 0.9 \pm 0.0 | 0.9 \pm 0.0 |

Diferente letra en la columna indica diferencia estadística ($P < 0.05$)

YHP: yema de huevo en polvo; LS: Lecitina de soja; L: Lavado; 0, 0.6, 2, 5: concentración de hidroxitolueno butilado (BHT).

Discusión

Al sustituir la yema de huevo en polvo por la lecitina de soja en el medio de conservación espermática, en presencia o ausencia de plasma seminal, la lecitina de soja fue capaz de mantener la integridad funcional y estructural de la membrana plasmática de los

espermatozoides tras la refrigeración, sin la necesidad de eliminar el plasma seminal mediante el proceso de centrifugación. Además, los parámetros cinéticos de los espermatozoides no lavados y conservados en lecitina de soja fueron superiores a los presentados por los espermatozoides conservados en el mismo medio, pero habiendo retirado el plasma seminal, después tanto de la refrigeración como de la congelación-descongelación, aunque sin diferenciarse de los valores obtenidos por los espermatozoides lavados y conservados en yema de huevo en polvo. En cambio, Roof *et al.* (2012) observaron mayor porcentaje de motilidad total y progresiva antes y después de la congelación-descongelación en semen de caprino con plasma seminal y diluido en un medio a base de lecitina de soja respecto de los conservados en yema de huevo. También Sariözkan *et al.* (2010) observaron un efecto crioprotector más fuerte del medio a base de lecitina de soja cuando los espermatozoides de macho cabrío no fueron sometidos al proceso de lavado respecto de los espermatozoides lavados y conservados, tanto en lecitina de soja como en yema de huevo.

No obstante, en nuestro caso, al usar la yema de huevo en polvo como crioprotector, la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides tras la descongelación fue mayor que cuando se usó la lecitina de soja, demostrando que la capacidad de la lecitina de soja en la prevención del daño provocado por la crioconservación era menor. Hecho que se ve reforzado por la alta incidencia de células espermáticas con membranas plasmática y acrosomal intactas pero sin función mitocondrial cuando son conservadas a base de lecitina de soja, independientemente de haber lavado o no el semen. De igual manera, Najafi *et al.* (2013), en espermatozoides de morueco, al utilizar 1% de lecitina de soja en el medio de conservación, observaron baja proporción de células viables, baja actividad mitocondrial y bajo porcentaje de motilidad progresiva en los espermatozoides tras su descongelación. Hallazgos similares han sido reportados por Del Valle *et al.* (2012), señalando que la lecitina de soja aunque es capaz de proteger eficazmente la viabilidad de los espermatozoides de morueco tras la descongelación, induce la pérdida del potencial de membrana mitocondrial que puede reflejarse en reducidos valores de motilidad total y progresiva.

Ante estas evidencias, la yema de huevo parece ser el mejor crioprotector no penetrante a utilizar en los medios de conservación espermática en macho cabrío, a pesar de retirar el plasma seminal, hasta que las pruebas de fertilidad indiquen lo contrario. No obstante, es importante destacar que en la crioconservación espermática en el caprino en un medio a base de lecitina de soja, el plasma seminal o las lipasas que éste contiene no interaccionan de la misma manera que en el caso de usar la yema de huevo, lo que hace de la centrifugación del semen un paso innecesario (Roof *et al.*, 2012) e incluso perjudicial a la vista de los datos de motilidad obtenidos tras la conservación. Así, en base a los resultados obtenidos, la lecitina de soja podría ser una opción muy práctica en la refrigeración espermática, por el hecho de no someter a las células espermáticas al proceso de centrifugación, ya que es un paso engorroso, consume tiempo y puede dar lugar a pérdida o daño de los espermatozoides (Tuli y Holtz, 1994), así como también a la pérdida de las proteínas contenidas en el plasma seminal, descritas en el macho cabrío como GSP (*Goat Seminal Plasma proteins* o proteínas del plasma seminal de caprino; Villemure *et al.*, 2003). Precisamente, estas proteínas GSP son muy importantes para la adecuada funcionalidad del espermatozoide (Cardozo *et al.*, 2006) y además parecen proteger del daño provocado por el choque térmico, como ha sido demostrado en semen de morueco (Colás *et al.*, 2009). Sin embargo, al desconocer el posible daño ocasionado a nivel de las mitocondrias espermáticas durante la refrigeración, tal y como ha sido detectado en los espermatozoides descongelados, seguimos sin poder asegurar la idoneidad de los medios a base de lecitina de soja para la conservación a 5°C.

Por otra parte, en el estudio diseñado para la determinación de la concentración óptima del antioxidante BHT en la conservación espermática, no se ha podido observar ningún tipo de efecto beneficioso de su inclusión (BHT) en el diluyente. La calidad espermática en términos de integridad de membrana funcional y estructural, así como la motilidad total y progresiva tras la refrigeración fueron similares tanto en el medio a base de yema de huevo en polvo como en el medio a base de lecitina de soja, independientemente de la concentración utilizada (0.6, 2.0 ó 5.0 mM), apreciándose solo diferencias en tres parámetros de calidad de movimiento (índice de rectitud, amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza y frecuencia de batido) y obteniendo los peores resultados en los

medios a base de lecitina de soja con y sin BHT. De hecho, estas pequeñas diferencias en los parámetros cinéticos desaparecieron tras la descongelación, lo que en cierta manera coincide con lo descrito por Najjian *et al.* (2013) en macho cabrío, quienes tampoco observaron diferencias en la calidad de movimiento de espermatozoides congelados-descongelados en diferentes concentraciones de BHT (0.5, 1, 2 y 4 mM) incluidas en el medio a base de yema de huevo.

En cambio, en el presente trabajo, tras la descongelación se observó que la motilidad total fue superior en los espermatozoides conservados en el medio a base de yema de huevo en polvo cuando se complementó con 5 mM de BHT respecto al mismo medio con 2 mM o sin BHT, coincidiendo con la influencia favorable reportada por Khalifa *et al.* (2008) en espermatozoides de caprino criopreservados en un medio a base de yema de huevo con 5 mM de BHT, así como también con lo reportado por García (2014) en espermatozoides de morueco, quien obtuvo valores significativamente superiores no solo de motilidad total y progresiva sino también de viabilidad y resistencia osmótica de la membrana plasmática, tras la crioconservación de las células espermáticas en el medio a base de yema de huevo en polvo y 5 mM de BHT respecto a concentraciones inferiores. Por el contrario, otros autores han reportado que la motilidad disminuye al utilizar concentraciones superiores a 3 mM como Najjian *et al.* (2013) en macho cabrío, Shoaie y Zamiri (2008) en toro o Ijaz *et al.* (2009) en búfalo. Posiblemente, estas variaciones puedan estar relacionadas con el crioprotector no penetrante, ya que como Memon *et al.* (2011) mencionan, la eficacia del BHT puede estar relacionada con la cooperativa interacción entre la yema de huevo y el BHT o simplemente por las diferencias en el diseño experimental. A pesar de que la adición de BHT en los medios de conservación espermática no supuso un gran efecto beneficioso en los parámetros de calidad tampoco afectó adversamente la crioconservación de las células espermáticas, por lo que su inclusión en los medios de conservación podría realizarse con el objetivo de valorar si el escaso efecto puede traducirse en una posible mejora de la fertilidad.

En cuanto a la integridad de las membranas de los espermatozoides, una vez descongelados e incubados en la solución isoosmótica o hipoosmótica, tampoco se observaron diferencias

entre las distintas concentraciones de BHT utilizadas en los medios de crioconservación. Pero, sí se observó un notable incremento de espermatozoides con membrana plasmática y acrosomal intactas pero sin función mitocondrial cuando fueron conservados en los medios a base de lecitina de soja, independientemente de la concentración de BHT utilizada. Con lo cual, se reafirma lo observado en el primer experimento de este estudio, sobre el daño que sufren las mitocondrias de los espermatozoides cuando son crioconservados en medios a base de lecitina de soja. La lecitina parece inducir alteraciones en la membrana mitocondrial, que no siempre se ven reflejadas en modificaciones de la motilidad espermática. Del Valle *et al.*, (2012) en espermatozoides de morueco, utilizando una tinción triple (YoPro1/IP/Mitotracker deep red) similar a la utilizada en el presente estudio, también observaron que la funcionalidad mitocondrial se redujo drásticamente por la presencia de la lecitina de soja después de 3 horas de incubación posteriores a la descongelación, señalando que la lecitina induce activamente un daño específico de la mitocondria y que podría ser debido a una disminución en el contenido de cardiolipina, dado que el área de superficie de la membrana mitocondrial se redujo.

La cardiolipina, el principal fosfolípido de la membrana mitocondrial interna (Petit *et al.*, 1994), desempeña un papel tanto estructural como funcional en muchos complejos multiméricos asociados con esta membrana, su principal papel es la organización de los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial (Mileykovskaya *et al.*, 2005; Mileykovskaya y Dowhan, 2014; Paradies *et al.*, 2014). De acuerdo con lo expuesto por Del Valle *et al.*, (2012), la razón por la cual la yema de huevo es capaz de proporcionar mayor protección a la mitocondria podría estar relacionada con su composición, ya que no solo contiene fosfatidilcolina sino también lipoproteínas de baja densidad, con lo cual podría tener una mejor capacidad de proteger la mitocondria, ya que es una macromolécula más compleja y versátil que la lecitina de soja, que está compuesta básicamente por fosfatidilcolinas (Scholfield, 1981; Le Grandois *et al.*, 2009).

En cuanto a la morfometría espermática, en este estudio nuevamente hemos observado que el proceso de congelación-descongelación afecta algunos parámetros, disminuyendo el tamaño y modificando la forma de las células espermáticas, volviéndolas más alargadas tras

su descongelación, coincidiendo con otros autores como Marco-Jiménez *et al.* (2006) e Hidalgo *et al.* (2007) en espermatozoides de caprino, Gravance *et al.* (1998) en bovino y Arruda *et al.* (2002) en equino. Posiblemente, la reducción en el tamaño y la modificación en la forma se producen a consecuencia de la progresiva deshidratación de la célula espermática durante el proceso de criopreservación (Hidalgo *et al.*, 2007), a la alta proporción de espermatozoides con acrosoma dañado y la posterior pérdida del contenido acrosomal (Gravance *et al.*, 1998), a los cambios en la estructura de la cromatina (Arruda *et al.*, 2002) o a la pérdida de la membrana plasmática (Marco-Jiménez *et al.*, 2006).

Finalmente, podemos concluir que la yema de huevo en polvo es el crioprotector no penetrante más conveniente para su uso en la composición de los medios de criopreservación de espermatozoides de macho cabrío, mientras que la lecitina de soja podría ser una alternativa viable a incorporar en los medios de conservación a 5°C, sobre todo porque su uso no implica la remoción del plasma seminal. Sin embargo, no debemos olvidar que la lecitina de soja produce alteraciones en la función mitocondrial. Desafortunadamente, desconocemos si esto podría afectar el poder fecundante de las células espermáticas, por tanto, es necesario realizar estudios de fertilidad, ya sea *In Vitro* o *In Vivo* para valorar los posibles efectos adversos de dicha alteración. En cuanto al uso de las diferentes concentraciones del antioxidante BHT en los medios de conservación espermática, se observó un efecto beneficioso muy escaso, aunque su adición a priori tampoco empeora la criopreservación, por lo que se podría adicionar con el objetivo de valorar si este escaso efecto puede traducirse en una posible mejora de la fertilidad.

Referencias

Arruda RP, Ball BA, Gravance CG, Garcia AR, Liu IKM. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. *Theriogenology* 2002; 58: 253-256

Azerêdo A , Esper CR, Resende KT. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Ruminant Research* 2001; 41:257-263

Cabrera F, Gonzalez F, Batista M, Calero P, Medrano A, Gracia A. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (*Capra hircus*). *Reproduction domestic and animal* 2005; 40: 191-195

Cardozo JA, Fernández-Juan M, Forcada F, Abecia A, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology* 2006; 66: 841–850

Colás C, Junquera C, Pérez-Pé, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against Cold-shock. *Microscopy research and technique* 2009; 72: 566–572

Coloma, M.A., Toledano-Díaz, A., López-Sebastián, A. y Santiago-Moreno J. 2010. *Theriogenology*. 73:900-908

Del Valle I, Gómez-Durán A, Holt WV, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Soy lecithin interferes with mitochondrial function in frozen-thawed ram spermatozoa. *Journal of andrology* 2012; 33: 717-725

Evans G, Maxwell WMC. *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. España: Acribia, 1990

Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini SM, Ostdadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, Abedi P, Nili N, Rahmani HR, Nasr-Esfahani MH. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* 2010; 73: 480-487

Gravance CG, Vishwanath R, Pitt C, Garner DL, Casey PJ. Effects of cryopreservation on Bull sperm head morphometry. *Journal of Andrology* 1998; 19: 704-709

Hancock JL. A staining technique for the study of temperature shock in semen. *Nature* 1951; 167: 323-324

Hidalgo M, Rodríguez I, Dorado JM. The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Animal reproduction science* 2007; 100: 61-72

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

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assays to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984; 70:219-228.

Khalifa TAA, Lymberopoulos AG, El-Saidy BE. Testing Usability of Butylated Hydroxytoluene in Conservation of Goat Semen *Reprod Dom Anim* 2008; 43: 525–530

Le Grandois J, Marchioni E, Zhao M, Giuffrida F, Ennahar S, Françoise B. Investigation of natural phosphatidylcholine sources: separation and identification by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS) of molecular species. *Journal of agricultural and food chemistry* 2009; 57: 6014–6020

Leboeuf B, Restall B, Salamon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal reproduction science* 2000; 62: 113-141

Marco-Jiménez F, Viudes-de-Castro MP, Balasch S, Mocé E, Silvestre MA, Gomez EA, Vicente JS. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology* 2006; 52: 295-304

Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M, Nadia FM, Audrey G. Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen in Tris egg yolk extender. *Animal reproduction science* 2011; 129: 44-49

Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M, Nadia FM. Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in yolk glycerol extender. *Animal reproduction science* 2012; 136: 55-60

Mileykovskaya E, Dowhan W. Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Chemistry and physics of lipids* 2014; 179: 42–48

Mileykovskaya E, Zhang M, Dowhan W. Cardiolipin in Energy Transducing Membranes. *Biochemistry* 2005; 70: 154-158

Naijian HR, Kohram H, Shahneh AZ, Sharafi M, Bucak MN. Effects of different concentrations of BHT on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze-thaw process. *Cryobiology* 2013; 66: 151-155

Palacios LE, Wang T. Egg-Yolk Lipid Fractionation and Lecithin Characterization. *Journal of the American oil chemists' society* 2005; 82: 571-578

Paradies G, Paradies V, De Benedictis V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochimica et biophysica acta* 2014; 1837: 408–417

Peterson K, Kappen MAPM, Ursem PJF, Nöthling JO, Colenbrander B, Gadella BM. Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: Effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. *Theriogenology* 2007; 67: 863-871

Petit JM, Huet O, Gallet PF, Maftah A, Ratinaud MH, Julien R. Direct analysis and significance of cardiolipin transverse distribution in mitochondrial inner membranes. *Eur. J. Biochem* 1994; 220: 871 -879

Purdy PH, Mocé E, Stobart R, Murdoch WJ, Moss GE, Larson B, Ramsey S, Graham JK, Blackburn HD. The fertility of ram sperm held for 24 h at 5 °C prior to cryopreservation. *Animal reproduction science* 2010; 118: 231-235

Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. *Small ruminant research* 2006; 63: 215-225

Roof DJ, Bowley S, Price LL, Matsas DJ. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology* 2012; 77: 412-420

arıözkan , Bucak N, Tuncer B, Tasdemir U, Kinet H, Ulutas A. Effects of different extenders and centrifugation/washing on postthaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm. *Theriogenology* 2010; 73: 316–323

Scholfield R. Composition of soybean lecithin. Journal of the American Oil Chemists' Society 1981; 58: 889-892

Shoae A, Zamiri MJ. Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender. Animal reproduction science 2008; 104: 414-418

Tuli RK, Holtz W. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and motility of Boer goat spermatozoa. Theriogenology 1994; 42:547-555

Villemure M, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. Reproductive biology and endocrinology. 2003

Estudio 4:

VALORACIÓN DE LA EVOLUCIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL Y USO DE
ANTIOXIDANTES E IMPLANTES SUBCUTÁNEOS DE MELATONINA

Abstract

The aims of this last chapter were, firstly, to collect the results obtained throughout a two-years experimental period in order to assess the possible effect of donor age and photoperiod during the semen collection, the inclusion of antioxidants (BHT and melatonin) in the preservation media, the application of melatonin implants outside the breeding season, as to analyze the effect of the individual on buck sperm cryopreservation. Therefore, sperm ($n = 6$) were collected from 6-8 bucks. After collecting, all male semen was mixed, except in individual sperm freezing and washed twice by centrifugation at $600 \times g$ $10'$. In experiment 1, semen collected for 2 consecutive years was washed, split and re-suspended in powdered egg yolk 15% (v/v) based media with or without the inclusion of 5 mM of the antioxidant BHT. In experiment 2, the animals were randomly divided into two groups in two consecutive spring at the age of 18 and 30 months. Sixty days prior to initiate semen collection, subcutaneous implants of melatonin were placed in the males of one of the two groups, meanwhile the other group of males were not applied any specific treatment. Ejaculates from each group of animals were mixed depending on the experimental group, washed and re-suspended in powdered egg yolk 15% (v/v) based media with or without the inclusion of 5 mM of the antioxidant BHT when donors were 18 months old and in powdered egg yolk 15% (v/v) based media with or without the inclusion of 1 mM of the antioxidant melatonin when donors were 30 months old. In experiment 3, washed semen from each male was preserved individually in Tris-based media with powdered egg yolk 15% (v/v) and 5% glycerol (v/v). The diluted sperm was refrigerated for 4 hours at 5 °C and subsequently frozen to -196°C. We observed that functional and structural integrity of plasma membrane of fresh sperm was superior at 18 and 30 months old males during positive photoperiod (late spring) compared to the 14 and 25 months old bucks during negative photoperiod (late autumn). Melatonin implants applied in bucks during the positive photoperiod have a negative effect on sperm viability and resistance to hypo-osmotic shock of fresh semen and total motility, viability and resistance to hypo-osmotic shock in spermatozoa after cooling, when BHT was used in the preservation medium. As well, differences between individuals were observed both in fresh and post-cooled and post-thawed sperm. After compiling the results obtained throughout a two-year experimental will only are noted that the initial sperm quality was better in the positive

photoperiod (late spring) relative to negative photoperiod (late autumn), melatonin implants did not improve sperm quality and individual effect exists on buck sperm cryopreservation, identifying 3 types of males: good, average and bad freezers.

Introducción

El comportamiento sexual y la calidad del semen son los factores principales que limitan la eficiencia reproductiva del macho cabrío durante el año. Estos factores pueden variar de acuerdo con el tamaño testicular, gonadotropinas circulantes, raza, edad, medio ambiente (longitud de la luz del día, temperatura y humedad) y manejo (Iritani 1964; Chemineau, 1986; Ritar y Salamon, 1991; Karagiannidis *et al.*, 2000; Barkawi *et al.*, 2006). Sin embargo, la longitud del día parece ser el principal factor que afecta la calidad del semen en los machos cabríos (Barkawi *et al.*, 2006). Para contrarrestar los efectos negativos del fotoperiodo creciente es muy habitual el uso de implantes de melatonina. Se ha observado que la aplicación de este tipo de implantes incrementa el diámetro testicular (García Pastor *et al.*, 2004) y la capacidad fecundante (Palacín *et al.*, 2006), además de mejorar la congelabilidad del semen (Kaya *et al.*, 2001).

El plasma seminal también puede afectar la calidad espermática a través de la variación en su composición tanto en el contenido de compuestos orgánicos como inorgánicos, incluyendo los niveles hormonales y la actividad enzimática antioxidante (Iritani 1964; Karagiannidis *et al.*, 2000; Cabrera *et al.*, 2005; Casao *et al.*, 2013). Por otro lado, los procedimientos relacionados con la congelación producen *shock* por frío y ataque oxidativo reduciendo la calidad del semen post-descongelación (Bucak *et al.*, 2009). Con lo cual, la adición de antioxidantes en el medio de crioconservación puede mejorar la calidad de las células espermáticas frente al daño inducido por los radicales libres (Memon *et al.*, 2012). Recientemente, la melatonina ha sido utilizada como antioxidante en el medio de congelación de semen de búfalo, determinándose que la calidad espermática mejora tras el proceso de congelación-descongelación (Li *et al.*, 2012). Asimismo, el hidroxitolueno butilado (BHT) ha sido utilizado como antioxidante, demostrando su capacidad para reducir

el estrés oxidativo ocasionado por el proceso de crioconservación en los espermatozoides (Memon *et al.*, 2011).

Es ampliamente aceptado que la susceptibilidad de los espermatozoides a los daños por la congelación varía entre las especies, así como también entre los individuos de una misma especie. En especies como bovinos (Parkinson y Whitfield, 1987), equinos (Loomis y Graham, 2008) y porcinos (Thurston *et al.*, 2002a; 2002b) se ha documentado que existe una variación considerable entre individuos en la viabilidad del semen después de la descongelación. Independientemente de la calidad de los espermatozoides antes del proceso de congelación, el semen de ciertos individuos congelará mal, lo que resulta en mala motilidad, daño de las membranas plasmática y acrosomal y, por tanto capacidad de fecundación reducida (Thurston *et al.*, 2002b). Sin embargo, en caprino la información es prácticamente inexistente.

Por lo antes citado, los objetivos de este último capítulo fueron, en primer lugar, recopilar los resultados obtenidos a lo largo de dos años de experimental con el propósito de valorar el posible efecto de la edad del donante y fotoperiodo durante la recolecta de 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 crioconservación de células espermáticas de macho cabrío.

Material y Métodos

Diseño experimental

Para la recogida de semen, se utilizaron entre 6 y 8 machos cabríos jóvenes de la raza Blanca de Rasquera, a los cuales se les extrajo semen con una vagina artificial, a un ritmo de 2 extracciones por día y 1 ó 2 días por semana de todos los machos.

Experimento 1. Valoración del efecto de la edad, fotoperiodo y del antioxidante BHT, en la conservación de espermatozoides de caprino.

El experimento se llevó a cabo a lo largo de 2 años consecutivos, iniciándose en otoño de 2011 y concluyendo en primavera de 2013. Para ello, se utilizaron entre 3 y 4 machos en dos fotoperiodos positivos a la edad de 18 y 30 meses y entre 6 y 7 machos en dos fotoperiodos negativos a la edad de 14 y 25 meses, realizando un total de 6 replicas en cada edad.

Se utilizaron dos medios de conservación espermática, como se describe a continuación:

- a) Diluyente control sin antioxidante
- b) Diluyente control con 5mM de BHT

La composición del diluyente control de congelación fue la recomendada por Purdy *et al.* (2010), consistente en 300 mM Tris[hidroximetil] aminometano, 28 mM glucosa, 95 mM ácido cítrico y antibióticos (1000 IU/mL de penicilina sódica y 1 mg/mL de sulfato de estreptomicina) a un pH 7.2–7.3, al que se le añadió yema de huevo en polvo y glicerol (v/v) a una concentración final de 15% y 5%, respectivamente.

Tras la recogida, los eyaculados de los machos fueron mezclados con el fin de eliminar el efecto individual del donante y posteriormente, el semen fue diluido (1:5) en la solución TGC (300 mM Tris, 28 mM glucosa, 95 mM ácido cítrico) a 37°C y centrifugado dos veces a 600xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, el sobrenadante fue descartado y el sedimento final fue resuspendido (1:4) en el diluyente de congelación correspondiente en un solo paso.

Preparación de la yema de huevo en polvo y del Hidroxitolueno butilado

Yema de huevo en polvo. Para la preparación de la yema de huevo en polvo (Hen egg yolk powder 53150, B.V. NIVE) se resuspendió siguiendo las instrucciones del fabricante.

Hidroxitolueno butilado (BHT) como antioxidante. Se utilizó una concentración final de 5 mM de BHT (Sigma W218405) disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO; Sigma D2650). La

concentración final de DMSO en el medio de conservación espermática fue 0.25% (v/v, 35.2 mM), como describe Khalifa *et al.* (2008).

Experimento 2. Efecto de la edad, la inclusión de antioxidante en el medio de conservación y la aplicación de implantes de melatonina en la calidad espermática de caprino en primavera.

Este experimento se llevó a cabo en la primavera de 2 años consecutivos. Para ello, en el primer año de estudio, 6 animales de aproximadamente 18 meses de edad se dividieron en dos grupos homogéneos: en el primer grupo, 60 días antes de iniciar la recogida de semen, a cada macho se le colocaron 2 implantes subcutáneos de 18 mg de melatonina (Melovine® CEVA-Salud Animal) en la base de la oreja y en el segundo grupo, los machos no fueron implantados. Al siguiente año, se utilizaron 8 animales cuando tenían aproximadamente 30 meses de edad, fueron divididos de igual manera en dos grupos 60 días antes de iniciar la recogida de semen y fueron implantados y no implantados como en el año anterior.

Con el fin de minimizar el efecto individual del donante, los eyaculados procedentes de cada grupo de animales se mezclaron en función del grupo experimental. A continuación, el semen fue diluido (1:5) en medio TGC (300 mM Tris, 28 mM glucosa, 95 mM ácido cítrico), lavado dos veces mediante centrifugación a 600 g durante 10 minutos y resuspendido (1:4) en un solo paso en el medio control a base de yema de huevo en polvo al 15% con la inclusión o no de 5 mM del antioxidante BHT a los 18 meses de edad de los donantes, mientras que a los 30 meses de edad la suspensión de espermatozoides fue resuspendida en el medio control a base de yema de huevo en polvo al 15% con o sin la inclusión de 1 mM del antioxidante Melatonina.

La composición del diluyente control de congelación fue la misma que la descrita en el apartado anterior, así como la preparación de la yema de huevo en polvo y del antioxidante Hidroxitolueno butilado. Respecto a la preparación de la Melatonina como antioxidante en el medio, se utilizó una concentración final de 1 mM de melatonina (Sigma M5250)

disuelta en dimetil sulfóxido (DMSO; Sigma D2650), de acuerdo a Succu *et al.* (2011) y Li *et al.* (2012).

Experimento 3. Valoración del efecto del individuo en la congelabilidad de las células espermáticas de macho cabrío de la raza Blanca de Rasquera.

En este experimento se evaluó el efecto del individuo en la congelabilidad del semen caprino. Para ello, se utilizaron 7 machos cabríos de entre 25 y 26 meses de edad, sus eyaculados fueron tratados de manera individual y congelados en el diluyente control a base de 15% de YHP y 5% de glicerol siguiendo la misma metodología que en apartados anteriores.

Protocolo de congelación y descongelación

Después de la dilución, las distintas suspensiones espermáticas se colocaron en un recipiente con agua a 20°C y se mantuvieron a 5°C durante 4 horas, realizando el ajuste de la concentración de espermatozoides a $400 \times 10^6/\text{mL}$. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron envasadas en pajuelas de 0.25 mL y congeladas en vapores de nitrógeno a 5 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido durante 10 minutos, antes de ser sumergidas en el nitrógeno para su conservación.

Las muestras seminales crioconservadas fueron descongeladas por inmersión en baño de agua a 37°C durante un mínimo de 30 segundos. Las pajuelas fueron secadas y cortadas por los extremos, depositando su contenido en tubos de plástico hasta su análisis.

Análisis *in vitro* de las células espermáticas

Tras la recogida del semen se evaluó el volumen de cada eyaculado en un tubo graduado y la motilidad masal del semen en una escala del 0 al 5 (Evans y Maxwell, 1990) con la ayuda de un microscopio óptico conectado a una platina calentable.

La viabilidad de los espermatozoides en fresco y a las 4 horas del inicio de la refrigeración se estimó mediante la tinción vital eosina/nigrosina (Hancock, 1951), así como el análisis de la funcionalidad de la membrana plasmática mediante el test hipoosmótico (*hyposmotic*

swelling test HOS test; Jeyendran *et al.*, 1984, Forouzanfar *et al.*, 2010) como se ha descrito en la sección de material y métodos general.

Además, tras la refrigeración y tras la congelación/descongelación de las distintas suspensiones espermáticas, se llevó a cabo el análisis de los diferentes parámetros de motilidad con la ayuda del sistema computarizado de análisis (CASA) ISAS® (PROISER SL., Valencia). Los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides frescos y congelados/descongelados también fueron analizados mediante este mismo sistema CASA.

Una vez almacenadas las diferentes muestras seminales crioconservadas, se valoró tras su descongelación la integridad de las membranas plasmática y acrosomal así como la función mitocondrial, mediante citometría de flujo utilizando las sondas fluorescentes SYBR14, yoduro de propidio, Ficoeritrina unida a la lectina *Arachis hipogea* (PE-PNA) y *Mitotracker deep red*, en medio isoosmótico e hipoosmótico, tal y como se describe en la sección de material y métodos general.

Resultados

Experimento 1. Valoración del efecto de la edad, fotoperiodo y del antioxidante BHT, en la conservación de espermatozoides de caprino.

Respecto a la calidad inicial del semen utilizado para el desarrollo del presente estudio, se observó tras la analítica seminal de la mezcla de los eyaculados frescos que la motilidad masal fue significativamente inferior en los espermatozoides de animales de 18 meses de edad y fotoperiodo positivo respecto de los espermatozoides de animales de 14 y 25 meses de edad recogido durante fotoperiodo negativo y de 30 meses en fotoperiodo positivo. Por el contrario, el volumen de eyaculado fue significativamente superior en los donantes de 18 meses de edad respecto a todas las edades analizadas, a excepción del volumen obtenido por los donantes de 14 meses, del que no logró diferenciarse estadísticamente. La integridad estructural de la membrana estimada mediante eosina-nigrosina fue inferior tanto a la edad de 14 y 25 meses en fotoperiodo negativo respecto a los 18 y 30 meses en

fotoperiodo positivo. La integridad funcional de la membrana estimada mediante la prueba de Host, fue superior en espermatozoides procedentes de individuos de 25 meses de edad respecto a los de 14 meses, en ambos casos recolectados en fotoperiodo negativo, pero fue inferior tanto a la observada en el semen de donantes de 18 y 30 meses de edad en fotoperiodo positivo (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Efecto de la edad y fotoperiodo sobre los parámetros de calidad inicial en espermatozoides frescos de machos cabríos (media±error estándar).

| Edad (meses) | Estación | Volumen (ml) | Motilidad masal | Viabilidad (%) | Host (%) |
|-----------------|---------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 14 | Invierno (-) | 1.3±0.1 ^{ab} | 2.8±0.2 ^a | 77.0±3.2 ^a | 57.2±4.9 ^a |
| 18 | Primavera (+) | 1.4±0.1 ^b | 1.8±0.1 ^b | 93.3±0.8 ^b | 84.2±3.4 ^c |
| 25 | Otoño (-) | 1.2±0.1 ^a | 3.0±0.2 ^a | 82.4±4.2 ^a | 71.4±3.3 ^b |
| 30 | Primavera (+) | 1.1±0.0 ^a | 2.7±0.3 ^a | 93.3±0.8 ^b | 90.0±2.2 ^c |

Diferente letra en la columna indica diferencia estadística (P<0.05)

(+) fotoperiodo positivo, (-) fotoperiodo negativo

Al evaluar el efecto del fotoperiodo/edad de los donantes, así como la adición del antioxidante BHT en el medio de conservación, tras la refrigeración de los espermatozoides se observó que tanto la viabilidad espermática como la resistencia al shock hipoosmótico, fue inferior en los espermatozoides procedentes de animales de 14 meses de edad, en fotoperiodo negativo, y conservados en el medio a base de yema de huevo en polvo (YHP) sin antioxidante respecto a los procedentes de animales de 18 meses, en fotoperiodo positivo, y conservados en el medio a base de YHP+BHT, sin diferenciarse estadísticamente ninguno de ellos del resto de tratamientos y edades (Tabla 1.2).

Tras el análisis de la motilidad espermática post-refrigeración mediante el sistema ISAS®, no se observaron diferencias en la motilidad total de los espermatozoides conservados en ambos tratamientos (con y sin la inclusión de BHT) en las distintas edades y/o fotoperiodos. Únicamente, los espermatozoides conservados en YHP a los 25 meses de edad presentaron el valor más bajo, siendo éste significativamente inferior respecto al obtenido por los espermatozoides conservados en el mismo medio a los 14 y 30 meses de

edad, así como también, respecto a los conservados en YHP+BHT a los 14 meses de edad, sin diferenciarse estadísticamente ninguno de ellos del resto de tratamientos y edades. En la motilidad progresiva, tampoco se observaron diferencias ni entre tratamientos (con y sin la inclusión de BHT) ni entre las diferentes edades de los donantes o fotoperiodos (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Efecto de la edad/fotoperiodo y antioxidante sobre la calidad de movimiento, integridad estructural y funcional de las membranas de los espermatozoides refrigerados de caprino (media±error estándar).

| Parámetro | YHP | YHP- BHT | YHP | YHP- BHT | YHP | YHP- BHT | YHP |
|----------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Edad (Meses) | 14(-) | | 18(+) | | 25(-) | | 30(+) |
| Viabilidad (%) | 76.8±2.6 ^a | 81.1±2.8 ^{ab} | 89.0±1.0 ^{ab} | 90.1±1.7 ^b | 82.3±3.6 ^{ab} | 80.2±4.8 ^{ab} | 83.4±2.7 ^{ab} |
| Host (%) | 67.9±3.3 ^a | 70.7±1.4 ^{ab} | 78.8±2.2 ^{ab} | 81.5±0.6 ^b | 69.8±4.7 ^{ab} | 71.8±3.3 ^{ab} | 79.5±1.5 ^{ab} |
| MT (%) | 89.3±2.1 ^{ab} | 90.3±2.1 ^a | 85.5±2.4 ^{abc} | 83.8±1.5 ^{abc} | 78.8±4.7 ^c | 80.7±3.8 ^{bc} | 90.7±1.1 ^a |
| MP (%) | 33.1±3.9 | 30.7±3.0 | 35.1±5.8 | 37.1±3.9 | 31.6±4.0 | 31.4±2.8 | 33.1±3.5 |
| VCL (µm/s) | 101.4±3.5 | 99.5±5.8 | 110.2±4.4 | 103.5±1.9 | 116.5±5.7 | 112.3±5.3 | 115.4±5.6 |
| VSL (µm/s) | 55.5±2.8 | 51.7±3.0 | 51.0±3.6 | 54.6±3.4 | 52.7±5.4 | 52.6±5.3 | 67.2±3.4 |
| VAP (µm/s) | 74.3±3.9 ^a | 71.8±5.4 ^a | 66.5±2.7 ^a | 70.4±3.0 ^a | 68.7±5.6 ^a | 68.0±5.7 ^a | 92.8±5.9 ^b |
| LIN (%) | 55.3±2.3 ^{bc} | 52.7±1.3 ^{abc} | 47.5±3.7 ^{ab} | 53.7±3.3 ^{abc} | 45.4±3.1 ^a | 47.0±3.1 ^{ab} | 57.6±1.8 ^c |
| STR (%) | 73.1±3.0 | 71.0±2.3 | 74.6±3.0 | 76.4±2.0 | 74.0±2.6 | 74.3±2.0 | 70.9±2.5 |
| ALH (µm) | 3.5±0.2 ^a | 3.6±0.2 ^a | 4.3±0.3 ^{bc} | 3.6±0.2 ^a | 4.7±0.2 ^c | 3.7±0.1 ^{ab} | 3.5±0.2 ^a |
| BCF (Hz) | 9.0±0.7 ^{ab} | 8.2±0.7 ^a | 10.0±0.9 ^{ab} | 10.9±0.6 ^b | 8.4±0.6 ^a | 10.2±0.3 ^{ab} | 8.8±0.4 ^a |

Diferente letra en la fila indica diferencia estadística (P<0.05)

YHP: Yema de huevo en polvo, BHT: Hidroxitolueno butilado, (-): fotoperiodo negativo, (+): fotoperiodo positivo, 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 batido.

En cuanto a los parámetros de calidad de movimiento de las distintas suspensiones espermáticas, después de la refrigeración no se observaron grandes diferencias en los parámetros de velocidad. De hecho, los valores obtenidos en la VCL y VSL fueron similares en los tratamientos utilizados y en las diferentes edades estudiadas. Solamente, hubo diferencias en la velocidad media (VAP), observando que los espermatozoides conservados en el medio a base de YHP y procedentes de machos de 30 meses de edad, presentaron el valor más alto, diferenciándose estadísticamente de todas las edades y

tratamientos. En los parámetros de progresión, la STR o índice de rectitud fue similar en las diferentes edades y tratamientos utilizados. Asimismo, la LIN de los espermatozoides conservados en YHP+BHT fue similar en las diferentes edades. Sin embargo, cuando los espermatozoides fueron conservados a base de YHP, la LIN fue significativamente inferior en los espermatozoides de machos de 25 meses de edad, diferenciándose estadísticamente de los valores obtenidos en espermatozoides procedentes de machos de 14 y 30 meses de edad. En cuanto a la dirección de la cabeza, la ALH de los espermatozoides conservados en YHP+BHT tampoco difirió en las diferentes edades o fotoperiodos, mientras que la ALH de los espermatozoides conservados únicamente en YHP sin el antioxidante, fue significativamente superior a los 18 y 25 meses de edad respecto a los 14 y 30 meses. Además, se observó que la ALH de los espermatozoides conservados en YHP también fue significativamente superior a los conservados en YHP+BHT a los 18 y 25 meses de edad de los donantes. Por el contrario, la BCF fue similar en los espermatozoides conservados en YHP en las diferentes edades, mientras que la BCF de los espermatozoides conservados en YHP+BHT fue baja en individuos de 14 meses de edad, diferenciándose únicamente de la obtenida a los 18 meses (Tabla 1.2).

Tras la descongelación de las células espermáticas, la edad parece afectar positivamente la viabilidad, observando que el porcentaje de células espermáticas con integridad estructural de la membrana fue inferior en donantes de 14 meses de edad, respecto a los 18 y 25 meses de edad (independientemente del medio de conservación utilizado), aunque sin lograr diferenciarse estadísticamente de los valores obtenidos en los espermatozoides conservados en YHP sin BHT, en donantes de 25 y 30 meses de edad. La motilidad total y progresiva de los espermatozoides tampoco se vio influenciada por el medio de conservación utilizado. Únicamente se observó que tras la descongelación, se sigue manteniendo la significativamente baja motilidad total observada en los espermatozoides refrigerados en YHP procedentes de machos de 25 meses de edad respecto de la obtenida en donantes de 14 meses de edad cuando los espermatozoides fueron conservados tanto en presencia como en ausencia de BHT. También la progresividad de los espermatozoides de donantes de 25 meses conservados en ausencia de BHT fue inferior respecto a la observada en el resto de

tratamientos y edades, aunque solo difirió de forma significativa de la obtenida por los espermatozoides conservados en YHP+BHT a los 18 meses de edad (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Efecto de la edad/fotoperiodo y antioxidante en el medio de conservación sobre la viabilidad y parámetros de movimiento de las células espermáticas congeladas-descongeladas en machos cabríos (media±error estándar).

| Parámetro | YHP | YHP/ BHT | YHP | YHP/ BHT | YHP | YHP/ BHT | YHP |
|----------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| Edad (meses) | 14(-) | | 18(+) | | 25(-) | | 30(+) |
| Viabilidad (%) | 40.7±4.1 ^a | 40.8±2.8 ^a | 57.9±4.3 ^c | 60.1±2.2 ^c | 45.4±4.6 ^{ab} | 54.1±4.2 ^{bc} | 35.3±3.8 ^a |
| MT (%) | 57.9±6.2 ^a | 51.2±5.9 ^a | 40.1±4.6 ^{ab} | 40.2±4.8 ^{ab} | 21.6±2.4 ^b | 37.2±5.2 ^{ab} | 37.1±5.9 ^{ab} |
| MP (%) | 15.2±1.6 ^{ab} | 15.2±1.7 ^{ab} | 12.1±1.9 ^{ab} | 18.0±3.3 ^a | 4.9±0.8 ^b | 12.6±3.1 ^{ab} | 13.9±2.9 ^{ab} |
| VCL (µm/s) | 68.0±3.9 ^a | 70.3±3.4 ^a | 107.5±3.4 ^b | 103.9±4.4 ^b | 100.2±3.3 ^b | 97.9±4.5 ^b | 100.2±5.4 ^b |
| VSL (µm/s) | 37.7±3.3 ^{ab} | 42.2±2.8 ^b | 41.9±2.8 ^b | 52.4±2.3 ^c | 28.8±2.1 ^a | 38.3±4.2 ^{ab} | 46.3±4.3 ^{bc} |
| VAP (µm/s) | 49.8±4.4 ^a | 53.2±3.6 ^{ab} | 59.1±2.7 ^{abc} | 66.1±2.4 ^c | 49.7±1.6 ^a | 55.2±3.7 ^{ab} | 61.2±4.3 ^{bc} |
| LIN (%) | 56.2±2.0 ^{ab} | 60.3±2.6 ^a | 40.8±2.3 ^d | 49.3±2.7 ^{bc} | 31.2±2.1 ^e | 39.6±3.3 ^d | 46.9±2.9 ^{cd} |
| STR (%) | 74.7±1.2 ^{ab} | 78.7±2.0 ^a | 69.6±1.9 ^{bc} | 75.2±2.1 ^{ab} | 57.7±3.0 ^d | 65.4±3.5 ^c | 72.4±2.7 ^{abc} |
| ALH (µm) | 2.5±0.1 ^a | 2.4±0.1 ^a | 4.4±0.1 ^{bc} | 4.0±0.2 ^b | 4.6±0.2 ^c | 4.2±0.2 ^{bc} | 4.0±0.2 ^b |
| BCF (Hz) | 8.1±0.4 | 8.6±0.6 | 8.7±0.8 | 8.9±0.4 | 6.9±0.6 | 7.7±0.3 | 7.5±0.5 |

Diferente letra en la fila indica diferencia estadística ($P < 0.05$)

YHP: Yema de huevo en polvo, BHT: Hidroxitolueno butilado, (-): fotoperiodo negativo, (+): fotoperiodo positivo, 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 batido.

En cuanto a los parámetros de calidad de movimiento, se observaron diferencias en todos los parámetros a excepción de la BCF, que fue similar en los dos medios de conservación utilizados, así como también en los diferentes fotoperiodos/edades de los donantes. En la VCL no hubo diferencias entre los tratamientos (con o sin BHT) en las diferentes edades. Solamente se observó, que éste parámetro de velocidad fue significativamente inferior en espermatozoides de machos de 14 meses de edad respecto a edades superiores. Por el contrario, el BHT parece tener un efecto positivo sobre la VSL, aunque el efecto beneficioso solo fue estadísticamente significativo en los espermatozoides de los donantes de 18 meses y fotoperiodo positivo, siendo además superior al resto de tratamientos y edades, a excepción de lo observado en los espermatozoides conservados en YHP de

individuos de 30 meses. También la VAP mostró un comportamiento similar, observando que los espermatozoides conservados en YHP+BHT obtuvieron un valor superior a la obtenida por los espermatozoides conservados en el medio a base de YHP sin antioxidante, aunque tal superioridad solo fue significativa a los 18 meses respecto a los 14 y 25 meses y sin diferenciarse de la observada en donantes de 30 meses. Además, la VAP parece verse afectada por la edad/fotoperiodo, observando que este parámetro aumentó en fotoperiodo positivo mientras que en fotoperiodo negativo disminuyó, aunque tal efecto no fue estadísticamente significativo. La LIN también fue mayor en el medio que contenía el antioxidante BHT, siendo significativamente superior a los 18 y 25 meses respecto a sus homólogos conservados en ausencia de BHT. En cuanto a la STR, la tendencia de los valores superiores en el medio YHP+BHT se mantuvo, aunque la diferencia respecto al medio YHP solo fue significativa a los 25 meses. Además, los valores de STR obtenidos a los 25 meses, independientemente del medio utilizado, fueron significativamente inferiores al resto de edades. Por el contrario, la ALH fue similar entre los tratamientos (YHP con o sin BHT) en todas las edades estudiadas, sin embargo, fue en los donantes de 14 meses donde se presentó el valor significativamente más bajo respecto a edades superiores (Tabla 1.3).

En el análisis morfométrico de la cabeza del espermatozoide mediante el sistema ISAS® de las distintas suspensiones espermáticas, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los espermatozoides frescos y descongelados en todos los parámetros a excepción del área y rugosidad. Tampoco en la longitud de la cabeza espermática se observaron diferencias, solamente en donantes de 14 meses de edad y fotoperiodo negativo, donde los espermatozoides frescos presentaron una longitud significativamente inferior a la obtenida en los descongelados. Por otro lado, la longitud de los espermatozoides descongelados disminuyó a medida que la edad se incrementó, observando que fue significativamente inferior en donantes de 30 meses respecto a lo observado en donantes más jóvenes.

El perímetro también fue similar entre los espermatozoides frescos y descongelados en todas las edades/fotoperiodos, a excepción de los espermatozoides procedentes de donantes de 14 meses y en fotoperiodo negativo, donde se observó que dicho parámetro fue

significativamente superior en los espermatozoides frescos que en los descongelados. No obstante, el perímetro de los espermatozoides tanto frescos como descongelados también disminuyó de forma progresiva a medida que la edad se incrementó. De hecho, el perímetro de los espermatozoides descongelados procedentes de individuos de 30 meses y fotoperiodo positivo fue significativamente inferior respecto al resto de espermatozoides frescos y descongelados.

La anchura, independientemente del medio de conservación utilizado, fue significativamente inferior tras la descongelación de los espermatozoides respecto a los valores observados en fresco, excepto en los donantes de 30 meses y fotoperiodo positivo, en los que no se observaron diferencias entre espermatozoides frescos y descongelados. Destacar además que este parámetro fue superior en espermatozoides frescos colectados en fotoperiodo negativo, independientemente de la edad del donante, que en espermatozoides colectados en fotoperiodo positivo, mientras que en la elipticidad y elongación el comportamiento de los espermatozoides frescos pareció ser el contrario. En otras palabras, la elipticidad y elongación fueron superiores en fotoperiodo positivo, aunque a los 30 meses de edad de los donantes las diferencias fueron menos notables con los de 25 meses y fotoperiodo negativo. No obstante, estos mismos parámetros (elipticidad y elongación) fueron superiores en las células post-descongelados en todas las edades respecto a los frescos, excepto a los 30 meses donde no se observaron diferencias estadísticas. Mencionar que, independientemente del medio de conservación utilizado y del fotoperiodo, tanto la elipticidad como la elongación de los espermatozoides descongelados disminuyeron a medida que los animales tenían mayor edad.

En cuanto a la regularidad, los valores obtenidos en los espermatozoides descongelados fueron significativamente inferiores respecto a los frescos en los donantes de 14 y 18 meses en fotoperiodo negativo y positivo, respectivamente, sin observar diferencias en espermatozoides de los de 25 y 30 meses en fotoperiodo negativo y positivo, respectivamente. Además, la regularidad de los espermatozoides descongelados procedentes de donantes de estas dos últimas edades fue significativamente superior a los donantes de 14 y 18 meses (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Efecto de la edad/fotoperiodo y antioxidante en el medio de conservación sobre los parámetros morfométricos de las células espermáticas en fresco y tras la descongelación en caprino (media±error estándar).

| | Edad (Meses) | Longitud (µm) | Anchura (µm) | Área (µm ²) | Perímetro (µm) | Elipticidad | Rugosidad | Elongación | Regularidad |
|---------|--------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------|-------------------------|-------------------------|
| Fresco | 14 (-) | 7.75±0.01 ^{ab} | 4.43±0.02 ^{ab} | 29.06±0.10 | 22.29±0.10 ^a | 1.75±0.01 ^a | 0.74±0.01 | 0.27±0.00 ^a | 0.93±0.00 ^b |
| YHP | | 8.01±0.03 ^d | 4.19±0.02 ^e | 28.58±0.16 | 21.91±0.08 ^b | 1.92±0.01 ^e | 0.75±0.00 | 0.31±0.00 ^e | 0.92±0.00 ^c |
| YHP-BHT | | 7.99±0.05 ^{cd} | 4.18±0.01 ^e | 28.48±0.19 | 21.86±0.09 ^{bc} | 1.92±0.01 ^e | 0.75±0.00 | 0.31±0.00 ^e | 0.92±0.00 ^c |
| Fresco | 18 (+) | 7.89±0.07 ^{cd} | 4.35±0.04 ^c | 28.80±0.35 | 21.98±0.14 ^b | 1.82±0.02 ^c | 0.75±0.00 | 0.29±0.01 ^c | 0.94±0.00 ^a |
| YHP | | 7.93±0.05 ^{cd} | 4.25±0.02 ^d | 28.72±0.14 | 21.77±0.09 ^{bc} | 1.87±0.01 ^d | 1.34±0.58 | 0.30±0.00 ^d | 0.92±0.00 ^c |
| YHP-BHT | | 7.92±0.02 ^{cd} | 4.27±0.02 ^d | 28.79±0.10 | 21.77±0.09 ^{bc} | 1.86±0.01 ^d | 2.06±1.29 | 0.30±0.00 ^d | 0.92±0.00 ^c |
| Fresco | 25(-) | 7.72±0.04 ^{ab} | 4.45±0.02 ^a | 28.92±0.25 | 21.70±0.08 ^{bc} | 1.74±0.00 ^a | 0.77±0.00 | 0.27±0.00 ^a | 0.93±0.00 ^{ab} |
| YHP | | 7.84±0.03 ^{bc} | 4.36±0.01 ^c | 28.81±0.13 | 21.70±0.07 ^{bc} | 1.80±0.01 ^{bc} | 2.35±1.44 | 0.29±0.00 ^{bc} | 0.93±0.00 ^{ab} |
| YHP-BHT | | 7.84±0.04 ^{bc} | 4.36±0.02 ^c | 28.92±0.10 | 21.76±0.10 ^{bc} | 1.80±0.01 ^{bc} | 2.16±1.39 | 0.28±0.00 ^{bc} | 0.93±0.00 ^b |
| Fresco | 30(+) | 7.72±0.04 ^{ab} | 4.36±0.04 ^{bc} | 28.43±0.30 | 21.47±0.15 ^{cd} | 1.78±0.02 ^{ab} | 0.77±0.01 | 0.28±0.00 ^{ab} | 0.93±0.00 ^b |
| YHP | | 7.70±0.03 ^a | 4.44±0.01 ^{ab} | 28.66±0.17 | 21.39±0.07 ^d | 1.74±0.01 ^a | 0.79±0.00 | 0.27±0.00 ^a | 0.94±0.00 ^{ab} |

Diferente letra en la columna indica diferencia estadística (P<0.05)

YHP: Yema de huevo en polvo, BHT: Hidroxitolueno butilado, (-): fotoperiodo negativo, (+): fotoperiodo positivo.

Experimento 2. Efecto de la edad, la inclusión de antioxidante en el medio de conservación y la aplicación de implantes de melatonina en la calidad espermática de caprino en primavera.

Respecto a la calidad inicial del semen utilizado para el desarrollo del presente estudio, se observó tras la analítica seminal de la mezcla de los eyaculados frescos que la motilidad masal se incrementó con la edad en animales implantados y no implantados, aunque solo hubo diferencias significativas entre el semen de animales implantados a los 30 meses de edad y los no implantados a los 18 meses de edad. El volumen del eyaculado fue ligeramente superior en los animales implantados respecto a los no implantados, independientemente de la edad de los donantes, aunque tal superioridad no fue

estadísticamente significativa. Sin embargo, el volumen obtenido en machos de 30 meses de edad y no implantados fue significativamente inferior a los machos de 18 meses e implantados. En cuanto a la integridad funcional y estructural de la membrana plasmática, estas no parecen verse afectadas por la edad, mientras que la aplicación de los implantes de melatonina parecen reducir la viabilidad, observando que ésta fue inferior en los espermatozoides de animales implantados respecto a los procedentes de animales no implantados, aunque en el caso de donantes de 18 meses no se apreciaron diferencias significativas. En cuanto a la integridad funcional de la membrana, también se redujo significativamente en los animales implantados, aunque los valores obtenidos en el grupo de animales implantados a los 30 meses no lograron diferenciarse de los obtenidos en el grupo de no implantados a los 18 meses de edad (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Efecto de la edad y la aplicación de implantes de melatonina sobre los parámetros de calidad inicial en espermatozoides frescos de machos cabríos (media±error estándar).

| | Animales no implantados | | Animales implantados | |
|-----------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| | 18 | 30 | 18 | 30 |
| Edad (meses) | | | | |
| Volumen | 1.4±0.1 ^{ab} | 1.1±0.0 ^a | 1.7±0.1 ^b | 1.4±0.1 ^{ab} |
| Motilidad masal | 1.8±0.1 ^a | 2.7±0.3 ^{ab} | 2.3±0.1 ^{ab} | 3.1±0.3 ^b |
| Viabilidad | 93.3±0.8 ^a | 93.0±2.4 ^a | 85.4±1.7 ^{ab} | 82.5±5.0 ^b |
| Host | 84.2±3.4 ^{ab} | 90.0±2.2 ^a | 60.2±4.1 ^c | 74.3±5.0 ^b |

Diferente letra en la fila indica diferencia estadística (P<0.05)

Al evaluar el efecto de la adición del antioxidante en el medio de conservación y la aplicación de implantes de melatonina en machos cabríos, tanto en donantes de 18 como de 30 meses de edad, no se observaron diferencias entre tratamientos (con y sin la inclusión de BHT o Melatonina) para la viabilidad de los espermatozoides después de la refrigeración, así como tampoco en ninguno de los grupos de animales (implantados y no implantados), ni en la edad del donante. Solamente a los 18 meses de edad, se observó un efecto negativo de la aplicación del implante de melatonina en las células espermáticas conservadas en el

medio con BHT sobre la viabilidad ($P < 0.05$), la cual difirió significativamente de la observada en los espermatozoides procedentes de animales no implantados (Tabla 2.2).

En la integridad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides analizada por Host, tampoco se observaron diferencias en ningún tratamiento, ni entre los grupos de animales implantados y no implantados, ni tampoco entre las distintas edades de los donantes. Únicamente, en el grupo de animales implantados, se observó que la resistencia al shock hiposmótico fue inferior en los espermatozoides procedentes de machos de 18 meses conservados en el medio con la presencia de BHT respecto de la observada en los conservados en presencia de Melatonina y procedentes de animales de 30 meses de edad (Tabla 2.2).

Tras el análisis de la motilidad espermática post-refrigeración mediante el sistema ISAS®, la inclusión de antioxidantes en el medio de conservación no mejoró la motilidad total, sin embargo, la edad parece afectar positivamente dicho parámetro, observando mayor porcentaje de movimiento espermático en animales de 30 meses de edad. No obstante, parece existir un efecto sinérgico con los implantes de melatonina ya que la superioridad observada solo fue estadísticamente significativa en los espermatozoides procedentes de animales implantados. En cambio, en la motilidad progresiva, no hubo diferencias significativas ni entre animales con o sin implantes, ni tampoco entre los medios de conservación, solamente se observó una progresividad significativamente inferior en los espermatozoides de animales no implantados de 30 meses de edad y conservados en el medio con la presencia de Melatonina respecto a los espermatozoides de animales implantados de 18 meses y conservados en presencia de BHT (Tabla 2.2).

En el análisis de la calidad de movimiento de las distintas suspensiones espermáticas, los parámetros de velocidad se incrementaron con la edad, observando que la VAP fue significativamente superior en espermatozoides de donantes de 30 meses respecto a los de 18 meses, sin apreciarse diferencias entre tratamientos (con o sin antioxidante) ni entre grupos de animales (implantados o no implantados). En la VSL y VCL tampoco se observó ningún efecto de la adición de antioxidantes al medio de conservación. Sin embargo, los implantes de melatonina parecen tener nuevamente un efecto positivo y sinérgico con la edad en la velocidad rectilínea, ya que dicho parámetro solo fue significativamente superior

en los espermatozoides procedentes de animales de 30 meses e implantados, mientras que en la velocidad curvilínea no hubo efecto ni de los implantes ni de la edad. Únicamente se observó que la VCL de los espermatozoides conservados en ausencia de antioxidantes y procedentes de animales de 30 meses de edad y no implantados fue significativamente superior a la obtenida por los espermatozoides conservados en presencia de BHT y procedentes de animales de 18 meses e implantados.

En los parámetros de progresión, la linealidad de los espermatozoides tiende a ser mayor en los animales de 30 meses de edad, aunque el efecto no es muy evidente, ya que la linealidad obtenida en espermatozoides procedentes de animales implantados de 18 meses de edad y conservados con BHT es equiparable a la obtenida por los espermatozoides procedentes de animales de 30 meses de edad, independientemente de que éstos últimos estuvieran implantados o no y de la presencia o ausencia del antioxidante en el medio.

Por el contrario, la edad parece disminuir la STR, ALH y BCF. Sin embargo, únicamente la STR fue significativamente superior en espermatozoides procedentes de animales más jóvenes cuando éstos no habían sido implantados y en el caso de conservar los espermatozoides en presencia de un antioxidante, mientras que en la ALH, a pesar de seguir esta misma tendencia, no hubo diferencias significativas debidas a la edad de los donantes. De hecho, fue la BCF la que mostró más claramente este efecto de la edad, observándose como disminuyó significativamente en los espermatozoides de animales de 30 meses respecto a los de 18 meses de edad. En lo referente a un posible efecto del antioxidante o de los implantes de melatonina en ninguno de estos tres últimos parámetros parecen observarse evidencias (Tabla 2.2).

Una vez que las muestras espermáticas fueron descongeladas no se observaron diferencias ($P > 0.05$) en ninguno de los parámetros cinéticos analizados entre los espermatozoides procedentes de animales con o sin implantes de melatonina, ni entre los conservados con o sin antioxidante (BHT o Melatonina) en el medio de congelación, tanto a los 18 como a los 30 meses de edad. Es decir, no hubo efecto ni del tratamiento de los animales, ni de su edad, ni de la adición del antioxidante en el medio de conservación (Tabla 2.3).

Tabla 2.2. Efecto de la edad, la inclusión de antioxidante (BHT/Melatonina) en el medio de conservación y la aplicación de implantes de melatonina sobre los parámetros cinéticos, integridad estructural y funcional de las membranas de los espermatozoides refrigerados de caprino en primavera (media±error estándar).

| Edad (meses) | YHP | | YHP-IMP | | YHP | | YHP-IMP | |
|--------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| | 18 | 30 | 18 | 30 | BHT | MEL | BHT | MEL |
| | | | | | 18 | 30 | 18 | 30 |
| Vivos (%) | 89.0±1.0 ^a | 83.4±2.7 ^{ab} | 82.4±1.5 ^{ab} | 84.8±2.8 ^{ab} | 90.1±1.7 ^a | 87.2±2.0 ^{ab} | 78.9±2.7 ^b | 84.8±1.7 ^{ab} |
| Host (%) | 78.8±2.2 ^{ab} | 79.5±1.5 ^{ab} | 74.1±2.7 ^{ab} | 83.0±2.4 ^{ab} | 81.5±0.6 ^{ab} | 80.8±3.3 ^{ab} | 70.8±5.4 ^a | 84.0±0.9 ^b |
| MT (%) | 85.5±2.4 ^{ab} | 90.7±1.1 ^b | 78.3±1.7 ^a | 89.4±2.0 ^b | 83.8±1.5 ^{ab} | 92.3±0.9 ^b | 76.5±3.8 ^a | 90.7±1.8 ^b |
| MP (%) | 35.1±5.8 ^{ab} | 33.1±3.5 ^{ab} | 37.4±2.7 ^{ab} | 37.2±1.6 ^{ab} | 37.1±3.9 ^{ab} | 23.7±2.5 ^a | 42.2±3.7 ^b | 37.6±2.2 ^{ab} |
| VCL (µm/s) | 110.2±4.4 ^{ab} | 115.4±5.6 ^a | 102.3±2.2 ^{ab} | 111.3±2.4 ^{ab} | 103.5±1.9 ^{ab} | 109.7±6.0 ^{ab} | 95.0±3.2 ^b | 112.8±3.7 ^{ab} |
| VSL (µm/s) | 51.0±3.6 ^a | 67.2±3.4 ^{abc} | 55.3±1.9 ^a | 74.2±2.8 ^{bc} | 54.6±3.4 ^a | 56.4±5.8 ^a | 59.7±2.5 ^{ab} | 78.4±4.0 ^c |
| VAP (µm/s) | 66.5±2.7 ^a | 92.8±5.9 ^b | 69.5±2.2 ^a | 94.1±4.1 ^b | 70.4±3.0 ^a | 87.5±6.3 ^b | 72.6±3.2 ^a | 100.1±4.1 ^b |
| LIN (%) | 47.5±3.7 ^a | 57.6±1.8 ^{abc} | 55.3±2.3 ^{abc} | 63.8±1.3 ^{bc} | 53.7±3.3 ^{ab} | 50.6±2.7 ^a | 63.0±1.1 ^{bc} | 66.2±1.6 ^c |
| STR (%) | 74.6±3.0 ^{ab} | 70.9±2.5 ^{bc} | 78.2±1.2 ^{ab} | 75.9±1.4 ^{ab} | 76.4±2.0 ^{ab} | 62.2±2.7 ^c | 81.7±1.2 ^a | 75.5±1.2 ^{ab} |
| ALH(µm) | 4.3±0.3 ^a | 3.5±0.2 ^{abc} | 3.6±0.2 ^{ab} | 3.1±0.1 ^{bc} | 3.6±0.2 ^{ab} | 3.4±0.1 ^{bc} | 3.0±0.1 ^{bc} | 2.7±0.1 ^c |
| BCF (Hz) | 10.0±0.9 ^{ab} | 8.8±0.4 ^{ab} | 10.7±0.5 ^a | 8.4±0.4 ^b | 10.9±0.6 ^a | 7.7±0.2 ^b | 11.1±0.6 ^a | 7.8±0.2 ^b |

Diferente letra en la fila indica diferencia estadística ($P < 0.05$)

YHP: Yema de huevo en polvo, BHT: Hidroxitolueno butilado, MEL: Melatonina, IMP: Implantes de melatonina, 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 batido.

Tabla 2.3. Efecto de la edad, la inclusión de antioxidante (BHT/Melatonina) en el medio de conservación y la aplicación de implantes de melatonina en machos cabríos sobre los parámetros de movimiento en espermatozoides congelados-descongelados de caprino en primavera (media±error estándar).

| Parámetro | YHP | | YHP- IMP | | YHP | | YHP- IMP | |
|--------------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|
| | BHT | MEL | BHT | MEL | BHT | MEL | BHT | MEL |
| Edad (meses) | 18 | 30 | 18 | 30 | 18 | 30 | 18 | 30 |
| MT (%) | 40.1±4.6 | 37.1±5.9 | 34.9±6.0 | 27.5±8.4 | 40.2±4.8 | 33.9±5.7 | 40.1±7.5 | 41.8±4.9 |
| MP (%) | 12.1±1.9 | 13.9±2.9 | 14.5±3.1 | 11.2±3.9 | 18.0±3.3 | 13.1±2.0 | 18.7±4.6 | 16.9±2.4 |
| VCL (µm/s) | 107.5±3.4 | 100.2±5.4 | 97.8±5.7 | 107.1±5.1 | 103.9±4.4 | 99.9±3.4 | 100.7±4.3 | 100.8±2.9 |
| VSL (µm/s) | 41.9±2.8 | 46.3±4.3 | 49.0±5.0 | 46.1±4.6 | 52.4±2.3 | 52.3±0.7 | 51.8±5.2 | 52.7±4.0 |
| VAP (µm/s) | 59.1±2.7 | 61.2±4.3 | 62.7±5.3 | 60.8±5.1 | 66.1±2.4 | 65.9±1.1 | 64.7±4.6 | 67.0±3.6 |
| LIN (%) | 40.8±2.3 | 46.9±2.9 | 49.5±3.7 | 43.7±3.0 | 49.3±2.7 | 51.5±1.5 | 51.5±3.7 | 53.3±2.4 |
| STR (%) | 69.6±1.9 | 72.4±2.7 | 74.4±2.1 | 72.3±2.0 | 75.2±2.1 | 76.4±1.1 | 75.7±2.7 | 75.7±1.7 |
| ALH (µm) | 4.4±0.1 | 4.0±0.2 | 3.7±0.2 | 4.4±0.2 | 4.0±0.2 | 3.8±0.2 | 3.9±0.2 | 3.8±0.1 |
| BCF (Hz) | 8.7±0.8 | 7.5±0.5 | 8.7±0.3 | 7.5±0.3 | 8.9±0.4 | 7.7±0.2 | 8.0±0.3 | 8.0±0.2 |

YHP: Yema de huevo en polvo, BHT: Hidroxitolueno butilado, MEL: Melatonina, IMP: Implantes de melatonina, 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 batido.

Al analizar mediante citometría de flujo las características de los espermatozoides tras la descongelación e incubación en un medio isoosmótico, la integridad de la membrana plasmática parece verse afectada positivamente por la aplicación de los implantes de melatonina en los donantes de 30 meses de edad. De hecho, en el presente trabajo se observó que la significativa inferioridad obtenida en los espermatozoides procedentes de animales más viejos y no implantados, independientemente del medio de conservación utilizado, desapareció cuando los espermatozoides procedían de animales de la misma edad pero que habían sido implantados. En cambio, en los donantes de 18 meses de edad, los implantes parecen tener un efecto contrario, es decir, un efecto perjudicial sobre la integridad de la membrana espermática, aunque las diferencias entre ambos grupos de

animales (implantados y no implantados) no fueron estadísticamente significativas (Tabla 2.4).

En cuanto al porcentaje de acrosomas dañados y al de espermatozoides con membrana plasmática y acrosómica intactas, pero sin función mitocondrial, no hubieron diferencias entre los tratamientos (con y sin la inclusión de antioxidantes) ni entre los grupos de animales (implantados y no implantados), tanto a los 18 como a los 30 meses de edad. No obstante, los valores obtenidos para la población de espermatozoides con membrana plasmática y acrosómica intactas sin función mitocondrial en los donantes de 18 meses tendían a ser superiores, mientras que los acrosomas dañados eran inferiores (Tabla 2.4).

Tras la incubación de las células espermáticas en un medio hipoosmótico, el efecto positivo de la aplicación de los implantes de melatonina sobre la integridad de la membrana plasmática de las células espermáticas también fue observado en los donantes de 30 meses de edad, de tal manera que los espermatozoides procedentes de animales sin implantes, fueron menos resistentes al estrés hipoosmótico respecto a aquellos procedentes de animales implantados, aunque tales diferencias solo fueron estadísticamente significativas cuando el medio de conservación no contenía antioxidantes. Asimismo, el efecto negativo que parecen tener los implantes en animales de 18 meses de edad nuevamente fue observado, al obtenerse un menor porcentaje de espermatozoides con integridad de la membrana plasmática después de ser sometidos al estrés hipoosmótico cuando estos procedían de animales implantados respecto a los no implantados, aunque las diferencias tampoco fueron significativas (Tabla 2.4).

En la población espermática con membrana plasmática y acrosómica intactas sin función mitocondrial, tras ser incubados en el mismo medio hipoosmótico, a pesar de no observarse ninguna diferencia entre los tratamientos (con y sin la inclusión de antioxidantes), ni entre los grupos de animales (implantados y no implantados), ni entre las edades (18 y 30 meses), los porcentajes de esta población espermática tendieron a ser superiores en animales de 18 meses (Tabla 2.4).

En el análisis morfométrico de la cabeza de los espermatozoides apenas se observaron diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los espermatozoides frescos y descongelados, independientemente de la presencia o ausencia del antioxidante en el medio de congelación y de la aplicación o no de los implantes de melatonina a los sementales. De hecho, no se observaron diferencias en ninguno de los parámetros entre espermatozoides frescos y congelados-descongelados de individuos de la misma edad, salvo alguna pequeña excepción especialmente entre espermatozoides descongelados procedentes de animales no implantados, por lo que la aplicación de los implantes pudiera haber tenido un efecto beneficioso en el mantenimiento de la morfometría de los espermatozoides descongelados. Por otra parte, tampoco la edad de los donantes influyó demasiado en la longitud y anchura, ni en la elipticidad, elongación y regularidad de los espermatozoides frescos, así como tampoco en aquellos congelados-descongelados procedentes de animales implantados. Tan solo el perímetro de los espermatozoides frescos procedentes de animales no implantados y más jóvenes fue significativamente superior a los procedentes de machos mayores. En cuanto al efecto de la inclusión de antioxidantes (BHT o melatonina) en el medio de crioconservación, ninguno de ellos parece influir en los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides (Tabla 2.5).

Tabla 2.4. Efecto de la edad, la inclusión de antioxidante (BHT/Melatonina) en el medio de conservación y la aplicación de implantes de melatonina en machos cabríos sobre la integridad de las membranas y función mitocondrial de espermatozoides descongelados e incubados en una solución isoosmótica e hipoosmótica en primavera (media±error estándar).

| | YHP | | YHP-IMP | | YHP | | YHP -IMP | |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | BHT | MEL | BHT | MEL | BHT | MEL | BHT | MEL |
| Edad (meses) | 18 | 30 | 18 | 30 | 18 | 30 | 18 | 30 |
| SYBR14 ⁺ /IP ⁻ | 42.2±3.9 | 20.6±4.3 | 34.3±2.8 | 32.1±3.3 | 46.9±3.2 | 26.0±3.4 | 39.4±2.0 | 31.1±3.6 |
| SI (%) | ab | d | abcd | abcd | a | cd | abc | bcd |
| SYBR14 ⁺ /IP ⁻ /PE- PNA ⁻ /MT ⁻ SI (%) | 4.5±2.6 | 0.9±0.5 | 2.4±1.2 | 1.5±0.9 | 7.5±3.0 | 0.5±0.2 | 7.7±3.6 | 1.9±1.1 |
| PE-PNA ⁺ (%) | 35.2±4.2 | 43.9±3.1 | 43.8±3.0 | 34.7±2.4 | 27.9±4.2 | 40.7±5.3 | 37.5±4.1 | 31.9±4.5 |
| SYBR14 ⁺ /IP ⁻ | 25.3±2.4 | 14.5±2.9 | 15.3±1.6 | 28.9±2.2 | 29.1±4.7 | 18.7±2.7 | 24.8±2.5 | 24.1±2.1 |
| SH (%) | ab | a | a | b | b | ab | ab | ab |
| SYBR14 ⁺ /IP ⁻ /PE- PNA ⁻ /MT ⁻ SH (%) | 5.3±3.7 | 0.5±0.2 | 0.7±0.6 | 2.1±1.2 | 2.2±1.9 | 0.9±0.4 | 1.7±1.1 | 1.1±0.5 |

Diferente letra en la fila indica diferencia estadística (P<0.001)

YHP: Yema de huevo en polvo, BHT: Hidroxitolueno butilado, MEL: Melatonina, IMP: Implantes de melatonina, SYBR14⁺/IP⁻: Membrana plasmática intacta; SYBR14⁺/IP⁻/PNA⁻/MT⁻: Membrana plasmática intacta, acrosoma intacto sin función mitocondrial; PE-PNA⁺: Acrosomas dañados; SI: incubación en solución isoosmótica; SH: incubación en solución hipoosmótica.

Tabla 2.5. Efecto de la edad, la inclusión de antioxidante (BHT/Melatonina) en el medio de conservación y la aplicación de implantes de melatonina en machos cabríos sobre los parámetros morfométricos de las células espermáticas en fresco y tras la congelación-descongelación en primavera (media±error estándar).

| Parámetro | Fresco | | Fresco imp | | YHP | | YHP-IMP | | YHP | | YHP-IMP | |
|-------------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| | BHT | MEL | BHT/ | MEL | BHT/ | MEL | BHT/ | MEL | BHT/ | MEL | BHT/ | MEL |
| Edad (meses) | 18 | 30 | 18 | 30 | 18 | 30 | 18 | 30 | 18 | 30 | 18 | 30 |
| Longitud (µm) | 7.89±0.07 ab | 7.72±0.04 a | 7.75±0.05 ab | 7.80±0.02 ab | 7.93±0.05 b | 7.70±0.03 a | 7.75±0.04 ab | 7.84±0.03 ab | 7.92±0.02 b | 7.72±0.02 a | 7.71±0.03 a | 7.87±0.03 ab |
| Anchura (µm) | 4.35±0.04 bcd | 4.36±0.04 bcd | 4.40±0.02 cd | 4.32±0.02 abc | 4.25±0.02 a | 4.44±0.01 d | 4.39±0.01 cd | 4.42±0.01 cd | 4.27±0.02 ab | 4.43±0.01 d | 4.39±0.01 cd | 4.43±0.01 d |
| Área (µm ²) | 28.80±0.35 | 28.43±0.30 | 28.43±0.28 | 28.33±0.15 | 28.72±0.14 | 28.66±0.17 | 28.61±0.05 | 28.96±0.15 | 28.79±0.10 | 28.72±0.10 | 28.59±0.15 | 29.16±0.20 |
| Perímetro (µm) | 21.98±0.14 a | 21.47±0.15 bc | 21.72±0.12 abc | 21.57±0.04 abc | 21.77±0.09 abc | 21.39±0.07 c | 21.51±0.03 bc | 21.56±0.07 abc | 21.77±0.09 ab | 21.43±0.05 bc | 21.53±0.08 abc | 21.67±0.09 abc |
| Elipticidad | 1.82±0.02 abc | 1.78±0.02 cde | 1.76±0.01 cde | 1.81±0.01 bcd | 1.87±0.01 a | 1.74±0.01 e | 1.77±0.01 cde | 1.78±0.01 cde | 1.86±0.01 ab | 1.75±0.01 e | 1.76±0.01 de | 1.78±0.01 cde |
| Rugosidad | 0.75±0.00 | 0.77±0.01 | 0.76±0.00 | 0.77±0.00 | 1.34±0.58 | 0.79±0.00 | 0.78±0.00 | 1.20±0.42 | 2.06±1.29 | 0.79±0.00 | 0.78±0.00 | 1.40±0.62 |
| Elongación | 0.29±0.01 abc | 0.28±0.00 cde | 0.27±0.00 cde | 0.29±0.00 bcd | 0.30±0.00 a | 0.27±0.00 e | 0.28±0.00 cde | 0.28±0.00 cde | 0.30±0.00 ab | 0.27±0.00 de | 0.27±0.00 de | 0.28±0.00 cde |
| Regularidad | 0.94±0.00 ab | 0.93±0.00 bc | 0.94±0.00 a | 0.93±0.00 ab | 0.92±0.00 c | 0.94±0.00 ab | 0.93±0.00 ab | 0.94±0.00 ab | 0.92±0.00 c | 0.94±0.00 ab | 0.93±0.00 bc | 0.94±0.00 ab |

Diferente letra en la fila indica diferencia estadística (P<0.01)

YHP: Yema de huevo en polvo, BHT: Hidroxitolueno butilado, MEL: Melatonina, IMP: Implantes de melatonina

Experimento 3. Valoración del efecto del individuo en la congelabilidad de las células espermáticas de macho cabrío de la raza Blanca de Rasquera.

Respecto a la calidad inicial del semen utilizado para valorar el efecto del individuo en la congelabilidad del semen caprino, se observó tras la analítica seminal de los eyaculados frescos en animales de 2 años de edad que la motilidad masal y la concentración espermática fueron similares en los diferentes machos. En cambio, en la integridad estructural de la membrana plasmática estimada por eosina-nigrosina podemos diferenciar estadísticamente 3 grupos de donantes, aquellos con viabilidad alta (60, 63, 65 y 67), intermedia (61 y 66) y baja (62). En cuanto a la funcionalidad de la membrana valorada mediante la prueba de Host, también hubo diferencias individuales, observando que la resistencia al estrés hipoosmótico en los espermatozoides de los sementales 63, 65 y 67 fue superior a los otros machos, sin lograr diferenciarse estadísticamente de los valores obtenidos por los machos 60 y 61. Esta superioridad de los machos 63, 65 y 67 solo fue estadísticamente significativa respecto a los machos 62 y 66, aunque los valores obtenidos en este último semental (66) tampoco se lograron diferenciar de los machos 60 y 61. Las diferencias individuales también se presentaron en el volumen de eyaculado, observando nuevamente tres tipos de donantes bien diferenciados estadísticamente, machos con alto (62 y 66), medio (63 y 67) y bajo volumen (60, 61 y 65; Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Parámetros de calidad inicial en espermatozoides frescos de machos cabríos de la raza Blanca de Rasquera (media±error estándar).

| Macho | Volumen (ml) | Motilidad masal | Concentración (x10 ⁹ spz/ml) | Viabilidad (%) | Host (%) |
|-------|-----------------------|--------------------|--|------------------------|------------------------|
| 60 | 0.8±0.2 ^a | 3.1±0.7 | 1.8±0.1 | 79.8±4.3 ^a | 69.7±5.0 ^{ab} |
| 61 | 0.7±0.1 ^a | 3.3±0.3 | 1.5±0.2 | 73.3±8.7 ^{ab} | 67.6±7.2 ^{ab} |
| 62 | 2.0±0.1 ^b | 3.5±0.0 | 2.2±0.2 | 43.7±2.6 ^b | 42.0±2.9 ^c |
| 63 | 1.2±0.2 ^{ab} | 3.3±0.5 | 2.2±0.2 | 79.8±6.0 ^a | 71.2±5.0 ^a |
| 65 | 0.8±0.1 ^a | 3.5±0.4 | 1.8±0.2 | 82.2±3.1 ^a | 78.1±4.2 ^a |
| 66 | 1.8±0.2 ^b | 2.9±0.3 | 2.0±0.3 | 64.8±8.9 ^{ab} | 51.9±8.0 ^{bc} |
| 67 | 1.5±0.2 ^{ab} | 3.0±0.3 | 2.4±0.2 | 84.6±4.4 ^a | 80.8±3.4 ^a |

Diferente letra en la columna indica diferencia estadística (P<0.01)

Tras el análisis de la motilidad espermática post-refrigeración mediante el sistema ISAS®, se presentaron diferencias individuales en todos los parámetros, excepto en la ALH y VCL, donde no hubo diferencias significativas ($P>0.05$). Concretamente, se observó que los peores resultados fueron obtenidos por el macho 66, tras obtener una motilidad total y progresiva significativamente baja respecto a los machos 63, 65 y 67, mientras que los valores obtenidos por los machos 60, 61 y 62 fueron intermedios. En la calidad de movimiento, el macho 66 también presentó valores bajos de VSL, VAP, STR y BCF, aunque solo se diferenció estadísticamente de los valores obtenidos por las células espermáticas del macho 62, que curiosamente presentó los mejores valores no solo de VSL, VAP, STR y BCF, sino también de LIN. El macho 60 también presentó valores significativamente bajos de VSL, STR y LIN respecto a los obtenidos por los espermatozoides del macho 62. En cuanto a los parámetros de calidad de movimiento espermático de los machos 61, 63, 65 y 67, los valores fueron intermedios (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Efecto del individuo sobre los parámetros cinéticos tras la refrigeración de las células espermáticas de machos cabríos de la raza Blanca de Rasquera (media±error estándar).

| Parámetro | 60 | 61 | 62 | 63 | 65 | 66 | 67 |
|------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| MT (%) | 81.8±4.1 ^{ab} | 85.2±3.0 ^{ab} | 67.3±4.2 ^{ab} | 88.5±1.9 ^b | 90.2±1.2 ^b | 63.3±11.3 ^a | 91.1±1.5 ^b |
| MP (%) | 30.3±4.1 ^{ab} | 39.1±2.4 ^{abc} | 40.1±4.9 ^{abc} | 42.6±0.9 ^{bc} | 42.6±3.9 ^{bc} | 27.8±7.4 ^a | 47.1±2.6 ^c |
| VCL (µm/s) | 121.0±4.4 | 117.3±4.6 | 112.6±1.5 | 114.6±5.6 | 100.9±5.1 | 105.4±8.1 | 110.2±2.6 |
| VSL (µm/s) | 57.0±3.6 ^a | 64.9±1.2 ^{ab} | 76.9±1.3 ^b | 63.5±1.7 ^{ab} | 55.3±2.2 ^a | 53.8±6.8 ^a | 69.4±2.7 ^{ab} |
| VAP (µm/s) | 76.1±2.3 ^{ab} | 80.0±1.5 ^{ab} | 89.0±0.7 ^b | 77.0±2.0 ^{ab} | 68.8±2.3 ^a | 69.7±6.5 ^a | 82.4±2.8 ^{ab} |
| LIN (%) | 48.8±4.5 ^a | 56.2±2.4 ^{ab} | 67.2±1.8 ^b | 56.0±2.9 ^{ab} | 55.2±3.3 ^{ab} | 51.2±5.0 ^{ab} | 62.2±2.1 ^{ab} |
| STR (%) | 72.8±2.4 ^a | 78.9±1.5 ^{ab} | 83.9±1.5 ^b | 79.7±1.1 ^{ab} | 77.1±1.8 ^{ab} | 73.1±3.1 ^a | 81.3±1.1 ^{ab} |
| ALH (µm) | 4.7±0.3 | 4.3±0.2 | 3.5±0.1 | 4.2±0.3 | 3.8±0.3 | 4.1±0.4 | 3.7±0.1 |
| BCF (Hz) | 8.2±0.3 ^{ab} | 8.8±0.2 ^b | 8.8±0.4 ^b | 8.5±0.4 ^{ab} | 7.8±0.2 ^{ab} | 7.3±0.4 ^a | 8.5±0.2 ^{ab} |

Diferente letra en la fila indica diferencia estadística ($P<0.05$)

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 batido.

Sin embargo, tras la descongelación de las células espermáticas no hubo diferencias individuales en ningún parámetro cinético a excepción de la motilidad total, observando

que el macho número 60 obtuvo el mayor porcentaje de células motiles totales respecto a los machos 62 y 66, sin que todos ellos se logaran diferenciar de los otros sementales (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Efecto del individuo sobre los parámetros cinéticos en espermatozoides congelados-descongelados de machos cabríos de la raza Blanca de Rasquera (media±error estándar).

| Parámetro | 60 | 61 | 62 | 63 | 65 | 66 | 67 |
|------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| MT (%) | 60.0±7.4 ^a | 42.8±5.9 ^{ab} | 22.2±13.2 ^b | 42.4±6.3 ^{ab} | 51.8±6.6 ^{ab} | 22.7±4.5 ^b | 44.8±8.5 ^{ab} |
| MP (%) | 19.7±3.9 | 18.8±3.8 | 11.1±6.7 | 19.4±3.2 | 21.6±3.9 | 11.7±3.0 | 20.6±5.2 |
| VCL (µm/s) | 111.4±2.9 | 107.5±8.8 | 110.4±7.4 | 103.6±2.5 | 109.5±2.8 | 108.0±6.4 | 108.4±3.4 |
| VSL (µm/s) | 54.1±4.9 | 58.8±6.3 | 68.8±7.6 | 58.3±2.7 | 57.6±5.1 | 61.2±5.7 | 65.1±7.1 |
| VAP (µm/s) | 71.6±5.2 | 73.2±7.0 | 83.6±8.2 | 72.5±2.8 | 73.5±4.2 | 76.0±4.6 | 83.2±6.2 |
| LIN (%) | 48.3±3.0 | 54.2±2.3 | 61.7±2.6 | 56.2±1.3 | 51.9±3.8 | 56.5±5.7 | 58.9±5.0 |
| STR (%) | 72.1±1.3 | 77.4±1.1 | 79.4±1.2 | 77.5±0.6 | 73.5±2.8 | 76.4±3.3 | 75.2±4.9 |
| ALH (µm) | 4.2±0.1 | 4.0±0.3 | 3.6±0.1 | 3.8±0.1 | 4.1±0.2 | 3.7±0.4 | 3.5±0.1 |
| BCF (Hz) | 7.7±0.3 | 7.7±0.3 | 7.8±0.3 | 7.7±0.2 | 7.6±0.2 | 7.6±0.2 | 7.7±0.2 |

Diferente letra en la fila indica diferencia estadística (P<0.05)

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 batido.

Por otro lado, al analizar las muestras espermáticas mediante citometría de flujo tras su descongelación, se observó que los espermatozoides, después de haber sido incubados en un medio isoosmótico, se volvieron a identificar tres grupos de individuos: el primero obtuvo el mayor porcentaje de integridad de la membrana plasmática formado por los machos 60, 65 y 67, mientras que en el segundo grupo, los machos 61 y 63 obtuvieron valores medios y en el tercer grupo los valores más bajos fueron presentados por los machos 62 y 66. Cuando las células espermáticas descongeladas fueron sometidas a un estrés hipoosmótico, los espermatozoides de los machos 65 y 67 resistieron mejor el estrés, obteniendo el mayor porcentaje de espermatozoides con integridad de la membrana plasmática, mientras que los valores medios fueron obtenidos por los machos 60, 61 y 63 y los que peor resistieron el estrés hipoosmótico también fueron los machos 62 y 66. En tanto que el porcentaje de acrosomas dañados de los espermatozoides tras ser incubados en la

solución isoosmótica, fue significativamente superior en los machos 62 y 66 respecto a todos los machos, a excepción del macho 61, que no se diferenció estadísticamente del macho 66. Con respecto a los espermatozoides con membrana plasmática y acrosomal intacta sin función mitocondrial no se observaron diferencias entre los individuos tras la incubación de las células espermáticas ni en el medio iso ni hipoosmótico. Destacar que la población de espermatozoides vivos con acrosoma dañado, es decir, espermatozoides criocapacitados, no fue observada en ninguno de los donantes (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Efecto del individuo sobre la integridad de las membranas y función mitocondrial de espermatozoides de machos cabríos de la raza Blanca de rasquera tras la descongelación e incubados en las soluciones isoosmótica e hipoosmótica (media±error estándar).

| MACHO | SYBR14 ⁺ /IP ⁻ SI (%) | SYBR14 ⁺ /IP ⁻ /PE-PNA ⁻ /MT ⁻ SI (%) | PE-PNA ⁺ (%) | SYBR14 ⁺ /IP ⁻ SH (%) | SYBR14 ⁺ /IP ⁻ /PE-PNA ⁻ /MT ⁻ SH (%) |
|-------|--|---|----------------------------|--|---|
| 60 | 39.5±1.9 ^a | 0.4±0.3 | 30.7±3.9 ^a | 20.2±4.8 ^{ab} | 0.3±0.2 |
| 61 | 27.1±5.4 ^{ab} | 0.1±0.0 | 37.4±4.6 ^{ab} | 18.8±2.5 ^{ab} | 0.1±0.1 |
| 62 | 18.3±3.2 ^b | 0.0±0.0 | 54.2±3.0 ^c | 13.7±3.0 ^a | 0.0±0.0 |
| 63 | 29.8±4.7 ^{ab} | 0.2±0.1 | 30.4±4.7 ^a | 17.0±3.1 ^{ab} | 0.3±0.2 |
| 65 | 40.2±3.4 ^a | 0.1±0.0 | 24.4±3.5 ^a | 26.8±4.9 ^b | 0.4±0.2 |
| 66 | 20.8±6.1 ^b | 0.0±0.0 | 48.6±4.0 ^{bc} | 13.4±3.9 ^a | 0.1±0.1 |
| 67 | 38.0±5.7 ^a | 0.1±0.0 | 31.6±3.1 ^a | 29.7±4.0 ^b | 0.4±0.2 |

Diferente letra en la columna indica diferencia estadística (P<0.05)

SYBR14⁺/IP⁻: Membrana plasmática intacta; SYBR14⁺/IP⁻/PE-PNA⁻/MT⁻: Membrana plasmática intacta, acrosoma intacto sin función mitocondrial; PE-PNA⁺: Acrosomas dañados; SI: incubación en solución isoosmótica; SH: incubación en solución hipoosmótica

DISCUSIÓN

La calidad espermática de los pequeños rumiantes está influenciada por diversos factores como la edad, fotoperiodo y raza. Sin embargo, en nuestro estudio no hemos podido comparar la misma edad de los sementales en diferentes fotoperiodos, así como tampoco diferentes edades en un mismo fotoperiodo. Aún así, hemos observado que la calidad

inicial del semen de los machos cabríos de la raza Blanca de Rasquera, fue superior en fotoperiodo positivo (final de la primavera) respecto al fotoperiodo negativo (final del otoño) en la integridad funcional y estructural de la membrana plasmática de los espermatozoides. Estos resultados coinciden con lo reportado en machos cabríos de razas de latitudes más bajas (36-38° latitud norte), también ubicados en zonas del Mediterráneo en el sur de España, como la Murciano-Granadina (Roca *et al.*, 1992; Arrebola *et al.*, 2010), la Malagueña y Florida (Pérez y Mateos, 1996) o la Damasco (Al-Ghalban *et al.*, 2004) originaria de Siria y ubicada a 31.5° de latitud norte, donde en todas ellas se ha observado una máxima actividad testicular y producción de espermatozoides en primavera-verano y actividad mínima en otoño-invierno, mientras que son contrarios a lo que sucede en machos cabríos originarios y criados en regiones templadas como Francia (45° latitud norte), donde la época reproductiva comienza en septiembre, cuando la duración del día está disminuyendo y persiste hasta marzo (Fatet *et al.*, 2011). Por ejemplo, en machos de raza Alpina o Saanen, mantenidos en una latitud norte de 46°, se ha observado que la disminución de la duración del día en otoño se acompaña por un aumento en la producción de la hormona gonadotrópica y de los niveles de testosterona (Delgadillo y Chemineau, 1992). Estos cambios hormonales están asociados con cambios en la libido y con el incremento cuantitativo y cualitativo de la producción espermática durante la estación reproductiva (Delgadillo *et al.*, 1991), y a medida que la latitud aumenta, la época reproductiva tiende a restringirse solo al otoño, tal como sucede en la raza Swedish Landrace (Fatet *et al.*, 2011).

No obstante, tras la conservación de las células espermáticas, no se observaron grandes diferencias en la calidad de los espermatozoides colectados en las distintas épocas del año. Únicamente, en las células espermáticas procedentes de animales de 25 meses de edad, tras ser conservadas en el medio a base de yema de huevo en polvo en ausencia de antioxidante se observó un descenso en la motilidad total post-refrigeración, así como también en la motilidad total y progresiva, y en los parámetros de calidad de movimiento (VSL, VAP, LIN y STR) después de la descongelación. Estos pobres resultados pueden haberse debido probablemente al agotamiento de los animales junto con un posible efecto de la época del año, ya que la recogida de semen se realizó cuando el otoño estaba finalizando. Tal y como

indican Al-Ghalban *et al.* (2004) en espermatozoides de macho cabrío de la raza Damasco, el mes de colección afecta la motilidad espermática, observando altos valores de motilidad progresiva durante la primavera y el verano respecto al otoño e invierno.

Sin embargo, la adición de BHT en el medio de conservación parece compensar los efectos detrimentales de la época del año sobre el movimiento espermático, ya que estos bajos valores observados en donantes de 25 meses solo se presentaron cuando los espermatozoides fueron conservados en el medio a base de YHP, por lo que la adición de BHT al medio de conservación pudo ayudar en la conservación de los parámetros cinéticos de las células espermáticas, como ya ha sido demostrado en diversos estudios (Khalifa y El-Saidy, 2006; Memon *et al.*, 2011; Najjian *et al.*, 2013), o incluso en nuestro propio laboratorio en espermatozoides de morueco (García, 2014).

Al igual que otros parámetros evaluados, las dimensiones de la cabeza disminuyeron tras el proceso de congelación-descongelación en el experimento 1, provocando además un alargamiento en la forma de las cabezas al aumentar la elipticidad y elongación, coincidiendo con lo reportado previamente por Hidalgo *et al.* (2007) y Marco-Jiménez *et al.* (2006), quienes también en la especie caprina demostraron que la longitud, anchura, área y perímetro de la cabeza se reducen significativamente tras la descongelación de las células espermáticas. Esta reducción en el tamaño de la cabeza del espermatozoide posiblemente sea debido a la progresiva deshidratación de la célula espermática durante el proceso de crioconservación (Hidalgo *et al.*, 2007), a la alta proporción de espermatozoides con acrosoma dañado y la posterior pérdida del contenido acrosomal (Gravance *et al.*, 1998), a los cambios en la estructura de la cromatina (Arruda *et al.*, 2002) o a la pérdida de la membrana plasmática (Marco-Jiménez *et al.*, 2006).

En el experimento 2, la congelación-descongelación de los espermatozoides también provocó una disminución del tamaño de la cabeza y el alargamiento en la forma, en animales de 18 meses, mientras que en animales de 30 meses, la longitud y anchura de la cabeza, curiosamente se incrementó en los espermatozoides procedentes de animales implantados. Desafortunadamente no existen reportes de este hecho, ya que en la

valoración del efecto de los implantes sobre la calidad espermática en la mayoría de los casos únicamente se analizan los parámetros de calidad básicos y en semen fresco.

Por otro lado, los implantes de melatonina aplicados en los machos cabríos durante el fotoperiodo positivo, no tan solo no mejoraron la calidad seminal, sino que parecen tener un efecto negativo sobre la viabilidad espermática y la resistencia al shock hipoosmótico del semen fresco, aunque el volumen y la motilidad masal de los eyaculados no parecen verse afectados. En machos cabríos, Zarazaga *et al.* (2012) tampoco observaron ningún efecto beneficioso de la aplicación de implantes de melatonina en la raza Payoya, mientras que en el mismo estudio pero en la raza Murciano-Granadina los implantes sí aumentaron la capacidad reproductora. En otro trabajo de Zarazaga *et al.* (2010) en machos cabríos de razas mediterráneas, la aplicación de los implantes también incrementó el volumen del eyaculado y la concentración espermática. Igualmente, Ramadan *et al.* (2009) observaron un incremento en la viabilidad de las células espermáticas en machos cabríos de raza Damasco expuestos a un tratamiento de fotoperiodo (días largos) combinado con la administración oral de 2 mg de melatonina. La disparidad en estos resultados podría estar relacionado con la cantidad de melatonina que fue suministrada a los donantes, ya que en nuestro caso y siguiendo las instrucciones del fabricante, insertamos 2 implantes de melatonina, mientras que en los estudios realizados por Zarazaga *et al.* (2010, 2012) utilizaron 3 implantes.

También parece existir un efecto adverso del uso de los implantes de melatonina sobre la motilidad total, la viabilidad y resistencia al shock hipoosmótico en los espermatozoides después de la refrigeración, cuando se utilizó el antioxidante BHT en el medio de conservación, aunque este efecto perjudicial desapareció tras la descongelación. Por el contrario, Kaya *et al.* (2001) señalan que la aplicación de implantes de melatonina en morueco, mejora la capacidad de los espermatozoides para someterse al proceso de crioconservación, obteniendo mayor viabilidad y porcentaje de acrosomas intactos en las muestras post-descongelación, mientras que en nuestro laboratorio, García (2014) no observó ningún efecto beneficioso de la aplicación de los implantes de melatonina sobre la calidad espermática de los espermatozoides crioconservados.

A pesar de que Li *et al.* (2012) en espermatozoides de búfalo y Succu *et al.* (2011) en espermatozoides de ovino, han demostrado que la adición de melatonina en el medio de crioconservación protege a las células espermáticas del daño causado por la congelación-descongelación obteniendo menores porcentajes de fragmentación de ADN, mayor integridad de la membrana, mayor actividad de las mitocondrias, así como mayor porcentaje de motilidad total y progresiva, en nuestro caso, desafortunadamente la adición de la melatonina en el medio de conservación, no supuso ninguna mejora en los parámetros de calidad espermática evaluados.

En cuanto al efecto de la edad, no se observaron grandes cambios. Únicamente los parámetros de calidad de movimiento (VAP, VSL y LIN) de las células espermáticas tras su refrigeración fueron superiores en espermatozoides de donantes de 30 meses respecto a los 18 meses. Por el contrario, Roca *et al.* (1991) señala que hay una importante influencia de la edad en los parámetros reproductivos de los machos cabríos de la raza Murciano-Granadina, aunque dicha influencia es más evidente en aquellos parámetros que definen la cantidad del eyaculado. Osinowo *et al.* (1998) en moruecos indican que la calidad de los espermatozoides fue mejor a los 3.4 años respecto a los 1.4 y 2.4 años, mientras que en bovinos, Snoj *et al.* (2013) reportaron que la calidad espermática fue baja en animales con edad inferior a 24 meses respecto a los animales entre 61 y 84 meses de edad. La calidad del semen aumenta desde la pubertad hasta la edad adulta, debido al incremento en el peso y tamaño testicular que están asociados a la eficiencia de la espermatogénesis como señala Toe *et al.* (1994).

Es ampliamente reconocido que la susceptibilidad de los espermatozoides a los daños por la congelación varía entre los individuos de una misma especie, siendo en humanos donde se empezó a clasificar a los donantes como buenos o malos congeladores (revisado por Curry, 2000). En las especies domésticas, la existencia de buenos y malos congeladores fue reportado por Parkinson y Whitfield (1987), de hecho, es en el ganado lechero, por la industria de la inseminación artificial, donde los toros han sido seleccionados durante muchos años sobre la base de la capacidad de sus espermatozoides para soportar el estrés de la congelación (Loomis *et al.*, 2008).

En nuestro estudio no solo se observaron diferencias individuales en la congelabilidad de los espermatozoides, sino también en los espermatozoides refrigerados y en el semen fresco, aunque el concepto de malos congeladores no sugiere que la criosupervivencia esté relacionada necesariamente con la calidad inicial de la muestra de semen. En otras palabras, ciertos individuos aparentemente con buenos parámetros espermáticos antes de la congelación, la supervivencia tras la descongelación puede ser pobre (revisado por Curry, 2000). En nuestro caso y como era de esperar, los animales que presentaron una pobre calidad inicial del semen también registraron los peores resultados tras la refrigeración y la congelación-descongelación de sus espermatozoides, ya que siempre hablamos de valores absolutos y no del porcentaje de células que sobreviven satisfactoriamente a la congelación partiendo del número de células viables antes de ser sometidas a este proceso. Probablemente el no incluir en el análisis, la calidad inicial de las muestras seminales, sea un factor que generalmente no se contemple y que podría ser una buena herramienta a la hora de comparar los resultados entre los diferentes protocolos de conservación, laboratorios o, en definitiva, los propios sementales.

No obstante, a pesar de que el número de animales utilizados en la conservación espermática fue reducido, en base a los parámetros cinéticos y a la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides tras ser sometidos o no a un proceso de estrés hipoosmótico, podemos clasificar a los donantes en: buenos, moderados o malos congeladores. De igual manera, en nuestro laboratorio, García (2014) en espermatozoides de ovino, también observó diferencias individuales identificando los tres tipos de individuos.

En equinos (Janett *et al.*, 2003) y porcinos (Holt *et al.*, 2005; Yeste *et al.*, 2013), también se ha observado que la supervivencia después de la crioconservación varía considerablemente entre los individuos. Sin embargo, es en la especie porcina donde los estudios sugieren que existe una base genética para la variación en la calidad de semen después de la descongelación y que las tecnologías moleculares modernas son capaces de identificar los marcadores vinculados a los genes que influyen en esta variación (Thurston *et al.*, 2002b; Benson *et al.*, 2012). De hecho, Thurston *et al.* (2002a), ya han identificado 16 marcadores

moleculares ligados a genes que controlan la congelabilidad del semen de cerdo, aunque los mecanismos por los cuales las diferencias genéticas se relacionan con la diferente susceptibilidad al proceso de crioconservación, se desconocen. Estas diferencias podrían estar relacionadas con una distinta composición lipídica o proteica de la membrana espermática o podrían igualmente estar relacionadas con las variaciones en la composición del plasma seminal o funcionalidad de las glándulas accesorias (Holt *et al.*, 2005). De hecho, en equinos Zahn *et al.* (2005) demostraron que la composición proteica del plasma seminal varía considerablemente entre sementales y que algunas de estas proteínas están relacionadas con la congelabilidad del semen. Más recientemente, Casas *et al.* (2010) en porcino han determinado que la proteína HSP90 está presente en los eyaculados de buenos congeladores en mayor nivel que en los malos congeladores.

La identificación y validación rigurosa de los marcadores moleculares como medida predictiva de la congelabilidad de los espermatozoides puede proporcionar una oportunidad para mejorar la calidad de los espermatozoides crioconservados, mejorando así la eficiencia productiva a través de los programas de reproducción selectiva. La identificación de marcadores genéticos ligados a genes de la congelabilidad puede ser en un futuro un instrumento de conservación viable en la creación de bancos de recursos genéticos de especies en peligro de extinción mediante una óptima crioconservación de los espermatozoides (Thurston *et al.*, 2002a).

Tras recopilar los resultados obtenidos a lo largo de dos años de experimental únicamente se observó que la calidad espermática inicial fue mejor en el fotoperiodo positivo (final de la primavera) respecto al fotoperiodo negativo (final del otoño). Asimismo, se observó que los implantes de melatonina no mejoran la calidad espermática, y que por el contrario, tienen un efecto negativo sobre la viabilidad espermática y la resistencia al shock hipoosmótico del semen fresco y sobre la motilidad total, la viabilidad y resistencia al shock hipoosmótico en los espermatozoides después de la refrigeración, cuando se utilizó el antioxidante BHT en el medio de conservación. Tampoco la adición de melatonina en el medio de conservación supuso ninguna mejora en los parámetros de calidad espermática

evaluados, mientras que el BHT parece compensar los efectos detrimentales de la época del año sobre el movimiento espermático.

En cuanto al efecto del individuo sobre la crioconservación de células espermáticas, se observaron diferencias entre los individuos, tanto en el semen fresco como en los espermatozoides refrigerados y descongelados, identificando 3 tipos de individuos: buenos, moderados y malos, pero muchos y más complejos estudios deberán llevarse a cabo para poder categorizar los sementales caprinos.

Referencias

Al-Ghalban AM, Tabbaa MJ, Kridli RT. Factors affecting semen characteristics and scrotal circumference in Damascus bucks. *Small ruminant research* 2004; 53: 141-149

Arrebola F, Pérez-Marín CC, Santiago-Moreno J. Limitation of seasonality in reproductive parameters of Mediterranean bucks, using photoperiod treatment. *Small ruminant research* 2010; 89: 31-35

Arruda RP, Ball BA, Gravance CG, Garcia AR, Liu IKM. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. *Theriogenology* 2002; 58: 253-256

Barkawi AH, Elsayed EH, Ashour G, Shehata E. Seasonal changes in semen characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. *Small ruminant research* 2006; 66: 209-213

Benson JD, Woods EJ, Walters EM, Critser JK. The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology* 2012; 78: 1682-1699

Bucak BN, Tuncer PB, Sariözkan S, Ulutas PA, Coyan K, Baspinar N, Özkalp B. Effects of hypotaurine, cysteamine and aminoacids solution on post-thaw microscopic and oxidative stress parameters of Angora goat semen. *Research in veterinary science* 2009a; 87: 468-472

Cabrera F, Gonzalez F, Batista M, Calero P, Medrano A, Gracia A. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (*Capra hircus*). *Reproduction domestic and animal* 2005; 40: 191-195

Casao A, Cebrián I, Asumpção ME, Pérez-Pé R, Abecia JA, Forcada F, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reproductive biology and endocrinology* 2010; 8:59

Casao A, Pérez-Pé R, Abecia JA, Forcada F, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. The effect of exogenous melatonin during the non-reproductive season on the seminal plasma hormonal profile and the antioxidant defence system of Rasa Aragonesa rams. *Animal reproduction science* 2013; 138: 168-174

Casas I, Sancho S, Ballester J, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Fàbrega A, Rodríguez-Gil JE, Bonet S. The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. *Theriogenology* 2010; 74: 940-950

Chemineau P. Sexual behaviour and gonadal activity during the year in the tropical Creole meat goat. II. Male mating behaviour, testis diameter, ejaculate characteristics and fertility. *Reprod Nutr Develop* 1986; 26: 453-460

Curry MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of reproduction* 2000; 5: 46-52

Delgadillo JA, Chemineau P. Abolition of the seasonal release of luteinizing hormone and testosterone in Alpine male goats (*Capra hircus*) by short photoperiodic cycles. *Journal of reproduction and fertility* 1992; 94: 45-55

Delgadillo JA, Leboeuf B, Chemineau P. Decrease in the seasonality of sexual behavior and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. *Theriogenology* 1991; 36: 755-770

Evans G, Maxwell WMC. *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. España: Acribia, 1990

Fatet A, Pellicer-Rubio MT, Leboeuf B. Reproductive cycle of goats. *Animal reproduction science* 2011; 124: 211-219

Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini SM, Ostdadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, Abedi P, Nili N, Rahmani HR, Nasr-Esfahani MH. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* 2010; 73: 480-487

García Pastor L, González JM, Figueras L, Callejas M, Cebrián LM, Espada M. Implantes de melatonina en moruecos. Efecto sobre algunos índices reproductivos en un rebaño de raza Rasa Aragonesa. *SEOC* 2004; 29: 149-151

García VWC. Optimización de los protocolos de crioconservación de semen ovino de las razas autóctonas en peligro de extinción Xisqueta y Aranasa. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona 2014

Gravance CG, Vishwanath R, Pitt C, Garner DL, Casey PJ. Effects of cryopreservation on Bull sperm head morphometry. *Journal of Andrology* 1998; 19: 704-709

Hancock JL. A staining technique for the study of temperature shock in semen. *Nature* 1951; 167: 323-324.

Hidalgo M, Rodríguez I, Dorado JM. The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Animal reproduction science* 2007; 100: 61-72

Holt WV, Medrano A, Thurston LM, Watson PF. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology* 2005; 63: 370-382

Iritani A, Nishikawa Y, Nagasawa S. Studies on the egg-yolk coagulating enzyme in goat semen. VII. Variations in the enzyme activity of the semen between breeding season and non-breeding season, and in each ejaculate collected three times successively. *Jap. Journal Animal Reproduction* 1964; 10: 52-56

Jannett F, Thun R, Bettschen S, Burger D, Hassig M. Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches–Montagnes stallions. *Animal reproduction science* 2003; 77: 213-221

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assays to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984; 70:219-228.

Karagiannidis A, Varsakeli S, Alexopoulos C, Amarantidis I. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *Small ruminant research* 2000; 37: 125-130

Kaya A, Aksoy M, Baspinar N, Yildiz C, Ataman MB. 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. *Reproduction in domestic animal*. 2001; 36:211-215

Khalifa TAA, El-Saidy BE. Pellet-freezing of Damascus goat semen in a chemically defined extender. *Animal reproduction science* 2006; 93: 303-315

Khalifa TAA, Lymberopoulos AG, El-Saidy BE. Testing Usability of Butylated Hydroxytoluene in Conservation of Goat Semen. *Reprod Dom Anim* 2008; 43: 525–530.

Li XX, Yang XG, Lu YQ, Lu SS, Zhang M, Yao HL, Meng LJ, Lu KH. Protective effects of melatonin against oxidative stress in flow cytometry-sorted buffalo sperm. *Reproduction in domestic animal* 2012; 47: 299-307

Loomis PR, Graham JK. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal reproduction science* 2008; 105: 119-128

Marco-Jiménez F, Viudes-de-Castro MP, Balasch S, Mocé E, Silvestre MA, Gomez EA, Vicente JS. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology* 2006; 52: 295-304

Martínez-Pastor F, Aisen E, Fernández-Santos MR, Estes MC, Maroto-Morales A, García-Álvarez O, Garde JJ. Reactive oxygen species generators affect quality parameters and apoptosis markers differently in red deer spermatozoa. *Reproduction* 2009; 137: 225-235

Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M, Nadia FM, Audrey G. Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen in Tris egg yolk extender. *Animal reproduction science* 2011; 129: 44-49

Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M, Nadia FM. Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in yolk glycerol extender. *Animal reproduction science* 2012; 136: 55-60

Naijian HR, Kohram H, Shahneh AZ, Sharafi M, Bucak MN. Effects of different concentrations of BHT on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze–thaw process. *Cryobiology* 2013; 66: 151-155

O WS, Chen H, Chow PH. Male genital tract antioxidant enzymes—Their ability to preserve sperm DNA integrity. *Molecular and cellular endocrinology* 2006; 250: 80-83

O'Flaherty C, De Lamirande E, Gagnon C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: Triggering and modulation of phosphorylation events. *Free radical biology & medicine* 2006; 41: 528-540

Osinowo OA, Ahmed MS, Ekpe GA. Semen quality and sperm output of Yankasa rams at different ages. *Theriogenology* 1998; 29: 381-386

Palacín I, Abecia JA, Forcada F, Casao A, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T, Palacios C, Pontes JM, García MF, Pontes García JM. Efecto del tratamiento con melatonina en los moruecos sobre la circunferencia escrotal y los índices reproductivos de las ovejas. *SEOC* 2006; 31: 355-357

Parkinson TJ, Whitfield CH. Optimisation of freezing conditions for bovine spermatozoa. *Theriogenology* 1987; 27: 781-797

Pérez B, Mateos E. Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malagueña breeds. *Small ruminant research* 1996; 22: 163-168

Purdy PH, Mocé E, Stobart R, Murdoch WJ, Moss GE, Larson B, Ramsey S, Graham JK, Blackburn HD. The fertility of ram sperm held for 24 h at 5 °C prior to cryopreservation. *Animal reproduction science* 2010; 118: 231-235

Ramadan TA, Taha TA, Samak MA, Hassan A. Effectiveness of exposure to longday followed by melatonin treatment on semen characteristics of Damascus male goats during breeding and non-breeding seasons. *Theriogenology* 2009; 71: 458-468

Ritar AJ, Salamon S. 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* 1991; 4: 29-37

Roca J, Martínez E, Vázquez JM, Coy P. Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area. *Animal reproduction science* 1992; 29: 255-262

Roca J, Martínez E, Vázquez JM, Ruíz S, Coy P. Influencia de la edad sobre los parámetros reproductivos de machos cabríos de raza Murciano-Granadina. *Archivos de zootecnia* 1991; 40: 173-179

Snoj T, Kobal S, Majdic G. Effects of season, age, and breed on semen characteristics in different *Bos taurus* breeds in a 31-year retrospective study. *Theriogenology* 2013; 79: 847-852

Succu S, Fiammetta B, Pasciu V, Satta V, Leoni GG, Naitana S. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *Journal of pineal research* 2011; 50: 310-318

Tavilani H, Goodarzi MT, Vaisi-raygani A, Salimi S, Hassanzadeh T. Activity of antioxidant enzymes in seminal plasma and their relationship with lipid peroxidation of spermatozoa. *International Brazilian journal of urology* 2008; 34: 485-491

Thurston LM, Siggins K, Mileham AJ, Watson PF, Holt WV. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biology of reproduction* 2002a; 66: 545-554

Thurston LM, Watson PF, Holt WV. Semen cryopreservation: a genetic explanation for Species and individual variation?. *CryoLetters* 2002b; 23: 255-262

Toe F, Lahlou-Kassi A, Mukasa-Mugerwa E. Semen characteristics of Ile-de-France rams of different age and physical condition. *Theriogenology* 1994; 42: 321-326

Yeste M, Estrada E, Casas I, Bonet S, Rodríguez-Gil JE. Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. *Theriogenology* 2013; 79: 929-939

Zahn FS, Papa FO, Melo CM, Brisola ML. Protein profile of equine seminal plasma: correlation to semen freezability. *Animal reproduction science* 2005; 89: 313-315

Zarazaga LA, Gatica MC, Celi I, Guzmán JL, Malpoux B. Effect of artificial long days and/or melatonin treatment on the sexual activity of Mediterranean bucks. *Small ruminant research* 2010; 93:110-118

Zarazaga LA, Gatica MC, Celi I, Guzmán JL. Reproductive Performance is Improved During Seasonal Anoestrus when Female and Male Murciano–Granadina Goats Receive Melatonin Implants and in Payoya Goats when Females are thus Treated. *Reproduction in domestic animal* 2012; 47: 436-442

Capítulo VI.
DISCUSIÓN GENERAL

La yema de huevo fresco se utiliza habitualmente como un agente crioprotector en los medios de conservación espermática. Sin embargo, en los últimos años se ha desarrollado un notable interés por sustituirla, debido a que su uso presenta desventajas higiénicas y prácticas (Pillet *et al.*, 2011). Se ha reportado que la yema de huevo fresco, contiene sustancias que impiden la respiración de los espermatozoides, pudiendo reducir la motilidad espermática (Salmani *et al.*, 2014). Por otro lado, al tratarse de un producto de origen animal, constituye un potencial riesgo de contaminación microbiológica (Marco-Jiménez *et al.*, 2004). Para tratar de minimizar estos efectos se han buscado diferentes alternativas, desde el uso de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que pueden estar esterilizadas (Pillet *et al.*, 2011) o no (Tonieto *et al.*, 2010), la yema de huevo en polvo pasteurizada (Marco-Jiménez *et al.*, 2004), las lecitinas de origen vegetal como la lecitina de soja (Vidal *et al.*, 2012) o componentes como el hidroxitolueno butilado (BHT; Khalifa *et al.*, 2008).

En el presente estudio, tras comparar tres tipos de yema de huevo (fresco, clarificado y en polvo) a dos concentraciones (2 y 15%, en función de la presencia o ausencia de plasma seminal, respectivamente) y en dos años consecutivos, no observamos diferencias en la capacidad protectora de los diferentes tipos de yema de huevo en ninguno de los parámetros de calidad evaluados, tanto en espermatozoides post-refrigeración como post-descongelación, a diferencia de lo observado por Ansari *et al.* (2010) en toro o Marco-Jiménez *et al.* (2004) en morueco, quienes obtuvieron mejor viabilidad y motilidad en los espermatozoides crioconservados en el medio a base de yema de huevo en polvo que en el medio a base de yema de huevo fresco. Asimismo, el uso de LDL en el medio de conservación de espermatozoides de toro parece mejorar no solo la motilidad y la calidad de movimiento (Moussa *et al.*, 2002), sino que también se ha llegado a obtener mayor tasa de división después de la fecundación *in Vitro* (Amirat *et al.*, 2004). Sin embargo, en espermatozoides de ovino los resultados son más variables, observando que la motilidad espermática puede mejorar (Tonieto *et al.*, 2010) o no (Moustacas *et al.*, 2011; García, 2014). En espermatozoides de caprino, Al-Ahmad *et al.* (2008) también observaron que la motilidad espermática y el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática y acrosomal intactas son mayores al incluir LDL y 25 mM de glutamina.

A pesar de que en nuestro estudio no hemos observado los efectos beneficiosos del uso de la yema de huevo en polvo o de la yema de huevo clarificado, tampoco hemos observado efectos adversos. Por tanto, ambos tipos de yema de huevo pueden sustituir a la yema de huevo fresco, aunque la yema de huevo en polvo resulta más conveniente, ya que es sometida a un proceso de pasteurización para destruir las bacterias y los lotes tienen una composición más homogénea.

En cuanto a la centrifugación y eliminación del plasma seminal (lavado), ésta se recomienda a menudo para mejorar la calidad del semen congelado-descongelado de caprino cuando se utiliza yema de huevo en los diluyentes y, aunque las opiniones difieren respecto a la necesidad de eliminar el plasma seminal (Roof *et al.*, 2012), nuestros resultados indican claramente que la eliminación del plasma seminal fue beneficiosa para la conservación espermática, tanto en el primero como en el segundo año de vida de los donantes. Concretamente, los parámetros espermáticos analizados y observados, tanto en espermatozoides refrigerados como descongelados, fueron superiores en espermatozoides lavados y conservados en el medio a base de yema de huevo al 15% respecto de los espermatozoides conservados en los medios con 2% de yema de huevo y en presencia de plasma seminal, coincidiendo plenamente con Ritar y Salamon, (1982) y Memon *et al.* (1985), quienes también reportaron que la eliminación del plasma seminal en eyaculados de macho cabrío es beneficiosa en la preservación de la integridad de los espermatozoides después de la congelación.

No obstante, también debemos destacar que la presencia del plasma seminal no fue tan perjudicial en el semen refrigerado, cuando los donantes tenían dos años de edad, posiblemente debido a las diferencias en la composición del plasma seminal. Se ha encontrado que varias proteínas como la β -lactoglobulina, transferrina y albúmina tienen efecto positivo sobre la actividad de las lipasas (Pellicer-Rubio y Combarrous, 1998), por tanto, éstas u otras proteínas similares pueden variar su concentración de acuerdo a la época del año o la edad, modulando la actividad de la enzima en el plasma seminal. Por otro lado, también se ha mencionado que el pH, la temperatura e incluso la fuente del huevo (raza de la gallina) podrían modificar la toxicidad de la yema de huevo (Leboeuf *et al.*, 2000).

En la valoración del efecto del sistema tampón en la conservación del semen de caprino, no se observaron grandes beneficios del uso del tampón zwitteriónico Test, solamente se mejoraron ligeramente algunos parámetros de movimiento. De hecho, se observó que la motilidad total en los espermatozoides refrigerados fue más alta en el medio a base de Test con yema de huevo en polvo respecto al medio a base de Tris con lecitina de soja, coincidiendo con Yániz *et al.* (2011), quienes también observaron que los tampones zwitteriónicos registran los mejores resultados en la motilidad total y progresiva, así como también en la integridad de la membrana de los espermatozoides refrigerados de morueco.

Tras la descongelación de las células espermáticas, la motilidad progresiva fue significativamente superior en los espermatozoides conservados en los medios a base del sistema tampón Test, aunque solo cuando el medio contenía yema de huevo en polvo y BHT respecto a los medios a base de Tris cuando estos contenían lecitina de soja. Resultados similares también han sido reportados por Molinia *et al.* (1994) y Abdelhakeam *et al.* (1991) en espermatozoides de morueco post-descongelación, observando que la motilidad es mayor en el medio a base del tampón zwitteriónico que en Tris.

A pesar de observar estas pequeñas diferencias, no podemos sugerir que el tampón Test sea superior al Tris, ya que en la mayoría de los parámetros analizados, el Tris tiende a ser ligeramente superior. Por tanto, el sistema tampón Tris sigue siendo el componente de elección para su uso en la conservación de los espermatozoides de caprino.

La sustitución del glicerol por la trehalosa tampoco parece proporcionar una mejor protección de los espermatozoides frente al estrés hipotérmico, ya que en los medios donde se utilizó este azúcar como crioprotector, los distintos parámetros espermáticos analizados tras la refrigeración y descongelación de los espermatozoides fueron significativamente peores. Posiblemente, las bajas concentraciones utilizadas en nuestro estudio pueden explicar los pobres resultados, ya que la inclusión de 375 (Aboagla y Terada, 2003) o 198.24 mM (Naing *et al.*, 2010) de trehalosa en el medio, sí mejoró la calidad espermática tras la congelación-descongelación de los espermatozoides de macho cabrío. No obstante,

el glicerol es también el crioprotector penetrante de elección en la crioconservación de las células espermáticas de macho cabrío.

Por otra parte, la sustitución de la yema de huevo en polvo por el BHT resultó en una evidente pérdida de calidad de los espermatozoides, sobre todo después de la congelación-descongelación, ya que tanto la viabilidad como los parámetros cinéticos fueron significativamente peores en los espermatozoides crioconservados en el medio a base de BHT a diferencia de los resultados descritos por Khalifa *et al.* (2008), quienes obtuvieron que la motilidad y fertilidad en el semen descongelado se mantiene. Estos autores señalan que el uso de BHT a una concentración de 0.6 mM puede ser una alternativa viable para sustituir a la yema de huevo en los medios de conservación de caprino. Sin embargo, en espermatozoides de toro, Graham y Hammerstedt (1992) reportaron que la motilidad espermática era reducida, al utilizar medios con análogos de BHT sin yema de huevo comparado con la presencia de yema de huevo, lo que sugiere que la yema de huevo interactúa sinérgicamente con los análogos de BHT en la protección de los espermatozoides del shock por frío, por tanto, el uso conjunto de BHT y yema de huevo en el diluyente podría mejorar la conservación de los espermatozoides de caprino.

En cuanto a la sustitución de la yema de huevo en polvo por la lecitina de soja en los medios de conservación espermática de caprino, se podría decir que la lecitina de soja es una alternativa viable al no encontrar diferencias entre estos dos crioprotectores no penetrantes en la integridad funcional y estructural de las membranas de los espermatozoides, tras la refrigeración y congelación-descongelación. Sin embargo, los parámetros de movimiento fueron peores en los espermatozoides conservados en medios a base de lecitina de soja que en aquellos conservados a base de yema de huevo en polvo, no siendo la capacidad protectora de la lecitina de soja del todo satisfactoria, a pesar de que autores como Vidal *et al.* (2012) y Salmani *et al.* (2013, 2014) también en caprino, mencionan que la lecitina de soja puede sustituir con éxito a la yema de huevo en los medios de crioconservación, sin afectar adversamente la motilidad y viabilidad espermática post-descongelación. En cambio, Del Valle *et al.* (2012), en espermatozoides de morueco, señalan que mientras que la lecitina de soja al 3.5% es capaz de proteger eficazmente la

viabilidad espermática tras la descongelación, ésta induce pérdida del potencial de membrana mitocondrial, lo que podría reflejarse en valores reducidos de motilidad total y progresiva. No obstante, estas alteraciones en los parámetros de motilidad de los espermatozoides conservados en lecitina de soja también podrían deberse a su alta viscosidad y a la presencia de restos de partículas en el medio como señalaron Van Wagendonk *et al.* (2000) en espermatozoides de bovino y Forouzanfar *et al.* (2010) en ovino.

En el presente trabajo, al tratar de mejorar los medios de conservación a base de yema de huevo en polvo o lecitina de soja mediante la sustitución del sistema tampón y la adición del antioxidante BHT a una concentración de 5 mM, se observó nuevamente que la motilidad progresiva de los espermatozoides conservados en los medios a base de lecitina de soja fue inferior, después de la refrigeración y congelación-descongelación. Estos resultados coinciden con el bajo porcentaje de motilidad progresiva obtenido por Najafi *et al.* (2013) en espermatozoides congelados-descongelados de morueco al utilizar lecitina de soja al 1% en el medio de crioconservación y también con la baja motilidad progresiva observada por Bittencourt *et al.* (2008) en espermatozoides de caprino, después de la crioconservación en el medio comercial Bioexcell® a base de lecitina de soja.

Sin embargo, al sustituir la yema de huevo en polvo por la lecitina de soja en el medio de conservación espermática, con o sin plasma seminal, la lecitina de soja fue capaz de mantener la integridad funcional y estructural de la membrana plasmática de los espermatozoides tras la refrigeración, sin la necesidad de eliminar el plasma seminal. Además, los parámetros cinéticos de los espermatozoides no lavados y conservados en lecitina de soja fueron superiores a los espermatozoides lavados y conservados en el mismo medio, después de los procesos de refrigeración y de congelación-descongelación, aunque sin diferenciarse de los valores obtenidos por los espermatozoides lavados y conservados en yema de huevo en polvo. No obstante, la capacidad de la lecitina de soja en la prevención del daño provocado por la crioconservación fue menor que la observada en el medio a base de yema de huevo en polvo, observando baja integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides y un alto porcentaje de células espermáticas con membranas plasmática y

acrosomal intactas pero sin función mitocondrial cuando son conservadas a base de lecitina de soja, independientemente de haber lavado o no el semen. Recientemente, también se ha reportado que la proporción de células viables, la actividad mitocondrial y la motilidad progresiva de los espermatozoides de morueco conservados en lecitina de soja es baja después de la congelación-descongelación (Najafi *et al.*, 2013), además de inducir pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Del Valle *et al.*, 2012). Esta menor capacidad crioprotectora puede estar influenciada por su composición, al contener únicamente fosfatidilcolina (Le Grandois *et al.*, 2009), mientras que la yema de huevo es una macromolécula más compleja y versátil, que además de la fosfatidilcolina contiene lipoproteínas de baja densidad, con lo cual podría tener una mejor capacidad de protección espermática (Del Valle *et al.*, 2012).

Al intentar mejorar la capacidad crioprotectora de la lecitina de soja, así como también de la yema de huevo mediante el uso de una óptima concentración del antioxidante BHT (0.6, 2 y 5 mM) en el medio de conservación, nuevamente en los medios a base de lecitina de soja se observó un notable incremento de espermatozoides con membrana plasmática y acrosomal intactas pero sin función mitocondrial, independientemente de la concentración de BHT utilizada, reafirmando lo expuesto anteriormente sobre el daño que sufren las mitocondrias de los espermatozoides cuando son crioconservados en medios a base de lecitina de soja.

Ante estas evidencias, la yema de huevo en polvo parece ser el mejor crioprotector no penetrante a utilizar en los medios de conservación espermática en macho cabrío, a pesar de tener que retirar el plasma seminal, hasta que las pruebas de fertilidad indiquen lo contrario. No obstante, es importante señalar que, en la crioconservación espermática en el caprino en un medio a base de lecitina de soja no es necesario retirar el plasma seminal, porque su presencia no provocó efectos adversos sobre las células espermáticas, simplificándose así el protocolo de conservación, mientras que su ausencia provocó una significativa reducción en la motilidad de los espermatozoides conservados en lecitina de soja. La eliminación del plasma seminal, además de ser un paso engorroso que consume tiempo, también provoca la pérdida de espermatozoides (Tuli y Holtz, 1994) y de las proteínas contenidas en el plasma

seminal, denominadas en el macho cabrío como GSP (*Goat Seminal Plasma proteins* o proteínas del plasma seminal de caprino; Villemure *et al.*, 2003), importantes para la adecuada funcionalidad del espermatozoide (Cardozo *et al.*, 2006), así como también en la protección del daño provocado por el choque térmico, como ha sido sugerido por Colás *et al.* (2009) en espermatozoides de morueco.

La inclusión de lecitina de soja en los diluyentes de conservación a 5°C simplificaría el protocolo de conservación en el macho cabrío al evitar el proceso de centrifugación. Sin embargo, no podemos asegurar que su uso sea conveniente en la conservación espermática, sobre todo a 5°C, porque desconocemos si durante la refrigeración también se reduce la función mitocondrial, como fue detectado en los espermatozoides congelados-descongelados.

En cuanto al uso de BHT como antioxidante, al incluirlo a una concentración de 5 mM en los medios de conservación, apenas se observó algún efecto significativamente beneficioso tras la descongelación de las células espermáticas. Aunque, se apreció un ligero incremento en la integridad funcional y estructural de la membrana plasmática, así como también en la motilidad total de los espermatozoides refrigerados, cuando fue combinado con yema de huevo en polvo, sin llegar a diferenciarse estadísticamente de los resultados obtenidos en los medios que no contenían BHT. Autores como Memon *et al.* (2011) y Najjian *et al.* (2013) en macho cabrío e Ijaz *et al.* (2009) en búfalo, señalan que el efecto protector del BHT frente al estrés inducido por el enfriamiento o congelación, varía ampliamente con la concentración utilizada en el medio, destacando que la calidad del espermatozoide se deteriora cuando se utilizan concentraciones superiores a 3 mM. Sin embargo, al utilizar diferentes concentraciones de BHT (0.6, 2.0 y 5.0 mM) en el medio de conservación, tampoco fue posible observar ningún efecto beneficioso cuando se incluyeron concentraciones inferiores a 5 mM en el diluyente. Solamente en los espermatozoides congelados-descongelados, se observó que la motilidad total fue significativamente superior cuando el medio contenía yema de huevo en polvo y 5 mM de BHT respecto al mismo medio con 2 mM o sin BHT, coincidiendo con la influencia favorable observada por Khalifa *et al.* (2008) en la motilidad post-descongelación de los espermatozoides de

caprino, así como también con lo reportado por García (2014) en espermatozoides de morueco, quien obtuvo valores significativamente superiores de viabilidad, resistencia osmótica de la membrana plasmática, motilidad total y progresiva tras la crioconservación de las células espermáticas en el medio a base de yema de huevo en polvo y 5 mM de BHT respecto a concentraciones inferiores. En cambio, Najjian *et al.* (2013) en macho cabrío, Shoaie y Zamiri (2008) en toro o Ijaz *et al.* (2009) en búfalo, reportaron que la motilidad espermática disminuye al utilizar concentraciones superiores a 3 mM de BHT en el medio de conservación. El nivel óptimo de BHT parece depender de la interacción entre el BHT y el crioprotector no penetrante, tal como señalan Memon *et al.* (2011) en caprino, después de la deteriorada calidad espermática observada en el medio a base de 18% de yema de huevo cuando contenía 3 mM de BHT comparado con 2 mM. También Graham y Hammerstedt (1992) sugieren que la yema de huevo interactúa sinérgicamente con los análogos de BHT en la protección de los espermatozoides del shock por frío y además Najjian *et al.* (2013) señalan que la época del año en que se realiza la crioconservación e incluso el procedimiento de congelación podrían influir en esta interacción.

Por otro lado, la respuesta a la aplicación de implantes de melatonina en los machos cabríos durante la primavera en la calidad espermática fue negativa, disminuyendo los parámetros de viabilidad espermática y resistencia al shock hipoosmótico en el semen fresco, tampoco el volumen del eyaculado y la motilidad espermática parecen verse afectados ni positiva ni negativamente, como también fue observado por Trejo y Toledo, (2006) en corderos prepúberes. Zarazaga *et al.* (2012) tampoco observaron ningún efecto beneficioso de la aplicación de implantes de melatonina en la raza caprina Payoya, aunque anteriormente, también Zarazaga *et al.* (2010), habían reportado mayor volumen de eyaculado y mejor concentración espermática en el semen de machos cabríos de razas mediterráneas cuando fueron implantados. En cambio, Ramadan *et al.* (2009) observaron un incremento en la viabilidad de las células espermáticas en machos cabríos expuestos a un tratamiento de fotoperiodo (días largos) combinado con la administración oral de 2 mg de melatonina. La diferencia en estos resultados podría estar relacionada con la cantidad de melatonina suministrada a los donantes, ya que en nuestro caso y siguiendo las instrucciones del

fabricante, insertamos 2 implantes de melatonina, mientras que en los estudios realizados por Zarazaga *et al.* (2010, 2012) utilizaron 3 implantes.

El efecto adverso del uso de los implantes de melatonina sobre la motilidad total, la viabilidad y resistencia al shock hipoosmótico también se observó en los espermatozoides después de la refrigeración, cuando se utilizó el antioxidante BHT en el medio de conservación, aunque este efecto perjudicial desapareció tras la descongelación, a diferencia de Kaya *et al.* (2001), quienes observaron mayor viabilidad y porcentaje de acrosomas intactos en espermatozoides post-descongelación de moruecos implantados.

Por otro lado, en la valoración de factores como la edad, fotoperiodo/estación y del individuo sobre la calidad espermática, la edad afectó positivamente la calidad espermática, observando que la integridad funcional de la membrana tras la prueba de Host y la motilidad masal del semen fresco fueron superiores en animales de dos años respecto a los de un año, como ya había sido descrito por otros autores como Roca *et al.* (1991) en la raza caprina Murciano-Granadina y Al-Ghalban *et al.* (2004) en la raza Damascus. En bovinos también se ha observado que la calidad espermática varía en función de la edad de los donantes, Bhakat *et al.* (2011), en espermatozoides frescos de la raza Sahiwal, observaron que la mejor calidad seminal fue obtenida en el grupo de 4-5 años de edad. No obstante, aunque la calidad de los espermatozoides frescos mejora gradualmente con la edad (Brito *et al.*, 2012), también puede influir negativamente sobre los parámetros de calidad, como sugiere Joshi *et al.* (2003), al observar en la raza ovina Garole, que la linealidad y rectitud de los espermatozoides disminuyó significativamente en los animales con edad superior a 4 años.

En las células espermáticas congeladas-descongeladas, también se observó que la calidad es mejor en los donantes de dos años respecto a los de un año de edad, coincidiendo con Lymberopoulos *et al.* (2010), quienes observaron que los espermatozoides de ovino después de la congelación-descongelación tenían mayor porcentaje de membrana plasmática intacta y mitocondrias funcionales en animales maduros (4-5 años) que en jóvenes (1-2 años).

La edad/fotoperiodo también influyó en la calidad inicial del semen de los machos cabríos de la raza Blanca de Rasquera, observando que la integridad funcional y estructural de la membrana plasmática de los espermatozoides fue superior a los 18 y 30 meses de edad en fotoperiodo positivo (final de la primavera) respecto a los 14 y 25 meses de edad en fotoperiodo negativo (final del otoño), teniendo en cuenta que en nuestro trabajo no hemos podido comparar la misma edad de los sementales en diferentes fotoperiodos, así como tampoco diferentes edades en un mismo fotoperiodo. No obstante, nuestros resultados parecen coincidir con lo reportado en otras razas ubicadas también en zonas del Mediterráneo en el sur de España, como la Murciano-Granadina (Roca *et al.*, 1992) o la Malagueña y Florida (Pérez y Mateos, 1996), en las que se ha observado la máxima actividad testicular y producción de espermatozoides en primavera-verano y la actividad mínima en otoño-invierno, a diferencia de las razas originarias de zonas templadas, mantenidas en una latitud norte de 46° como la Alpina o Saanen, que generalmente, muestran una actividad sexual mínima en primavera y verano y máxima en otoño e invierno (Delgadillo y Chemineau, 1992; Chemineau *et al.*, 2003).

Es ampliamente reconocido que la susceptibilidad de los espermatozoides a los daños por la congelación varía entre los individuos de una misma especie. Así, diferencias individuales han sido reportadas en el toro (Parkinson y Whitfield, 1987), caballo (Janett *et al.*, 2003) y cerdo (Holt *et al.*, 2005; Yeste *et al.*, 2013), pero, es en el humano donde se empezó a hablar de buenos o malos congeladores (revisado por Curry, 2000). El concepto de malos congeladores sugiere que la criosupervivencia no está relacionada necesariamente con la calidad inicial de la muestra de semen, de tal manera que para ciertos individuos aparentemente con buenos parámetros espermáticos antes de la congelación, la supervivencia tras la descongelación es pobre (revisado por Curry, 2000). Sin embargo, en nuestro caso a pesar de que el número de animales utilizados en la conservación espermática fue reducido, no solo se observaron diferencias individuales en la congelabilidad de los espermatozoides, sino también en los espermatozoides refrigerados y en el semen fresco.

Aunque habitualmente la clasificación solo incluye buenos y malos congeladores, en base a los parámetros cinéticos y a la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides tras ser sometidos o no a un proceso de estrés hipoosmótico, pudimos clasificar a los donantes en: buenos, moderados o malos congeladores, debido a que el número de individuos es tan reducido que nos es muy difícil determinar qué valores podrían delimitar las distintas categorías.

Bajo la premisa de que existe una base genética para la variación en la calidad de semen después de la descongelación, en el cerdo, ya se han identificado 16 marcadores moleculares ligados a genes que controlan la congelabilidad del semen (Thurston *et al.*, 2002a; 2002b; Benson *et al.*, 2012).

La identificación y validación rigurosa de los marcadores moleculares como medida predictiva de la congelabilidad de los espermatozoides puede proporcionar una oportunidad para mejorar la calidad de los espermatozoides crioconservados a través de los programas de reproducción selectiva, mejorando así la eficiencia productiva, así como también puede ser, en un futuro, un instrumento de conservación viable en la creación de bancos de recursos genéticos mediante la crioconservación de espermatozoides de especies en peligro de extinción (Thurston *et al.*, 2002a).

Como hemos observado, factores como la edad, individuo y época del año, tienen una importante influencia sobre la calidad espermática en el macho cabrío, por tanto, en la creación de un banco de semen, no solo debemos utilizar un buen medio de conservación espermática, sino que también debemos considerar los factores antes mencionados.

Capítulo VII.
CONCLUSIONES

La yema de huevo en polvo puede sustituir a la yema de huevo fresco, lo que supone mayor seguridad sanitaria, ya que es sometida a un proceso de pasteurización, así como también una mayor composición homogénea de los medios de conservación. El uso de la yema de huevo clarificado no supuso ninguna ventaja a la yema de huevo fresco, complicando todavía más el proceso de elaboración de los medios de conservación.

La eliminación del plasma seminal resultó beneficiosa para la crioconservación espermática en los medios a base de 15% de yema de huevo, aunque el efecto de su presencia afectó de desigual manera en función de la edad de los sementales.

La sustitución de la yema de huevo en polvo (15%) por el BHT (0.6mM) no mejoró la capacidad de conservación de los espermatozoides de caprino, mientras que la lecitina de soja al 1% podría ser una alternativa a incorporar en los medios de conservación a 5°C, sobre todo porque su uso no implica la remoción del plasma seminal. Sin embargo, hemos observado que la lecitina de soja produce alteraciones en la función mitocondrial, las cuales podrían afectar el poder fecundante de las células espermáticas. Por tanto, es necesario realizar estudios de fertilidad ya sea *in vitro* o *in vivo* para valorar los posibles efectos adversos de dicha alteración.

La sustitución del glicerol (5%) por la trehalosa (100mM) tampoco proporcionó una mejor protección de los espermatozoides frente al shock térmico, así como tampoco la sustitución del tampón Tris por el Test, por lo que la combinación de glicerol y el tampón Tris continúa siendo la mejor elección para su uso en la conservación de los espermatozoides de caprino.

En cuanto al uso de las diferentes concentraciones del antioxidante BHT en los medios de conservación espermática, no se ha podido observar claramente un efecto beneficioso de su inclusión en los diluyentes tanto a base de yema de huevo en polvo como de lecitina de soja. Sin embargo, su inclusión a una concentración de 5 mM en el medio a base de yema de huevo en polvo mejoró ligeramente la calidad de movimiento de los espermatozoides refrigerados, observándose una baja ALH y una alta BCF, así como una motilidad significativamente superior total tras la congelación-descongelación.

Tras recopilar los resultados obtenidos a lo largo de dos años de experimental y teniendo en cuenta que en nuestro trabajo no hemos podido comparar la misma edad de los sementales en diferentes fotoperiodos, así como tampoco diferentes edades en un mismo fotoperiodo, únicamente se observó que la calidad espermática inicial fue superior a los 18 y 30 meses de edad en fotoperiodo positivo (final de la primavera) respecto a los 14 y 25 meses de edad en fotoperiodo negativo (final del otoño).

Los implantes de melatonina aplicados en los sementales en primavera no mejoraron la calidad espermática, por el contrario, tuvieron un efecto negativo sobre la viabilidad espermática y la resistencia al shock hipoosmótico del semen fresco, así como en la motilidad total, la viabilidad y resistencia al shock hipoosmótico en los espermatozoides después de la refrigeración, cuando se utilizó el antioxidante BHT en el medio de conservación. En cambio, en los espermatozoides congelados-descongelados, el efecto detrimental en los parámetros cinéticos no fue observado, mientras que sólo la integridad de la membrana plasmática parece verse afectada positivamente por la aplicación de los implantes de melatonina en los donantes de 30 meses de edad.

En cuanto al efecto del individuo, se observaron diferencias individuales, tanto en el semen fresco como en los espermatozoides refrigerados y descongelados, identificando tres tipos de individuos según su calidad espermática tras la crioconservación: buenos, moderados y malos. No obstante, un mayor número de animales testados y análisis seminales deben llevarse a cabo para poder establecer dichas categorías.

Capítulo VIII.
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abaigar T, Holt WV, Harrison RAP, Del Barrio G. Sperm subpopulations in Boar (*Sus scrofa*) and Gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biology of reproduction* 1999; 60:32-41

Abdelhakeam AA, Graham EF, Vazquez IA, Chaloner KM. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen. Development of an Extender for Freezing: Effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars, and the method of dilution. *Cryobiology* 1991; 28: 43-49

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

Aboagla EME, Terada T. Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 2004b; 62:809-818

Aboagla EME, Terada T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of reproduction* 2003; 69:1245-1250

Abou-haila A, Tulsiani DRP. Signal transduction pathways that sperm capacitation and the acrosoma reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2009; 485: 72-81

Aires VA, Hinsch KD, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* 2003; 60: 269-279

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

Aisen EG, Medina VH, Venturino A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 2002; 57: 1801-1808

Aitken RJ, Baker MA, De Iuliis GN, Nixon B. New insights into sperm physiology and pathology. *Handb Exp Pharmacol* 2010; 198: 99–115

Aitken RJ. Sperm function tests and fertility. *International journal of andrology* 2006; 29: 69-75

Akhter S, Ansari MS, Andrabi SMH, Rakha BA, Ullah N, Khalid M. Soya-lecithin in Extender Improves the Freezability and Fertility of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bull Spermatozoa. *Reproduction in domestic animals* 2012; 47:815-819

Al Ahmad A, Chatagnon G, Amirat-Briand L, Moussa M, Tainturier D, Anton M, Fieni F. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. *Reproduction in domestic animals* 2008; 43: 429-436

Al-Ghalban AM, Tabbaa MJ, Kridli RT. Factors affecting semen characteristics and scrotal circumference in Damascus bucks. *Small ruminant research* 2004; 53: 141-149

Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gérard O, Courtens JL, Anton M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 2004; 61: 895-907

Anel L, De Paz P, Alvarez M, Chamorro CA, Boixo JC, Manso A, Gonzalez M, Kaabi M, Anel E. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology* 2003; 60: 1293-1308

Ansari MS, Rakha BA, andrabi SM, Akhter S. Usefulness of powdered and fresh egg yolk for cryopreservation of Zebu bull spermatozoa. *Reproductive biology* 2010; 10: 235-240

Arrebola F. Capítulo 13: Macho cabrío. Manejo y datos específicos. In: Ferre MLM, Ramos AJJ, Lacasta LD. *Gestión integral del macho: en las explotaciones de ovino y caprino*. España: ICE SALUD & VET. 2012: 150-166

Ashrafi I, Kohram H, Najjian H, Bahreini M, Mirzakhani H. Effect of controlled and uncontrolled cooling rate on motility parameters of cryopreserved ram spermatozoa. *BMC Research Notes* 2011; 4: 547

Ávila-Portillo LM, Madero JI, López C, León MF, Acosta L, Gómez C, Delgado LG, Gómez C, Lozano, JM, Reguero MT. Fundamentos de criopreservación. Revista colombiana de obstetricia y ginecología 2006; 57: 291-300

Babich H. Butylated hidroxytoluene (BHT): A review. Environmental Research 1982; 29: 1-29

Balcázar SJA, Porras AAI. Manual de prácticas en manejo reproductivo de ovinos y caprinos. México: UNAM. 2008

Barbas JP, Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Cell Tissue Bank 2009; 10: 49-62

Barkawi AH, Elsayed EH, Ashour G, Shehata E. Seasonal changes in semen characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. Small ruminant research 2006; 66: 209-213

Becerril ML, Huerta CR, Méndez MM, Hernandez GO, Aragón MA. Use of multivariate statistics to identify unreliable data obtained using CASA. Systems Biology in Reproductive Medicine 2013; 59: 164-171

Benson JD, Woods EJ, Walters EM, Critser JK. The cryobiology of spermatozoa. Theriogenology 2012; 78: 1682-1699

Bergeron A, Crete MH, Brindle Y, Manjunath P. 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. Biology of reproduction 2004; 70:708-717

Bergeron A, Manjunath P. New Insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. Molecular reproduction and development 2006; 73: 1338-1344

Berlinguer F, Madeddu M, Pasciu V, Succu S, Spezzigu A, Satta V, Mereu P, Leoni GG, Naitana S. Semen molecular and cellular features: these parameters can reliably predict

subsequent ART outcome in a goat model. *Reproductive biology and endocrinology* 2009; 7:125

Bhakat M, Mohanty TK, Raina VS, Gupta AK, Khan HM, Mahapatra RK, Sarkar M. Effect of age and season on semen quality parameters in Sahiwal bulls. *Trop Anim Health Prod* 2011; 43:1161–1168

Bispo CAS, Pugliesi G, Galvão P, Rodrigues MT, Ker PG, Filgueiras B, Carvalho GR. Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. *Small ruminant research* 2011; 100: 54-58

Bittencourt RF, Ribeiro Filho AL, Chalhoub M, Alves SGG, Vasconcelos MF, Biscarde CE, Leal LS, Oba E, Efeito de um quelante de cálcio, um detergente e da lecitina de soja sobre a qualidade do sêmen caprino congelado-descongelado. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 2008; 45, 305–31

Blanco RA, García MJ. Capítulo 16: Aparato genital masculino. In: Gazquez OA, Blanco RA. *Tratado de histología veterinaria*. España: Masson, 2004. p 363-379

Bonet S, Briz M, Pinart E, Sancho S, García-Gil N, Badia E. *Morfología espermática en porcino*. España: Institut d'Estudis Catalans. 2000

Bonet S, Martínez E, Rodríguez JE, Barrera X. *Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino*. España: Universidad de Girona. Red temática nacional de reproducción porcina. 2006

Bousseau S, Brillard JP, Marquant-Le GB, Guérin B, Camus A, Lechat M. 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* 1998; 50: 699-706

Bravo DJA. *Estudio de la influencia de la estación sobre los parámetros seminales y morfométricos del espermatozoide de morueco de raza Ile de France*. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura. Cáceres 2010

Brito LFC, Barth AD, Wilde RE, Kastelic JP. Effect of growth rate from 6 to 16 months of age on sexual development and reproductive function in beef bulls. *Theriogenology* 2012; 77: 1398-1405

Brouwers JFHM, Gadella BM. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. *Free Radical Biology & Medicine* 2003; 35: 1382–1391

Bucak BN, Tuncer PB, Sariözkan S, Ulutas PA, Cuyan K, Baspinar N, Özkalp B. Effects of hypotaurine, cysteamine and aminoacids solution on post-thaw microscopic and oxidative stress parameters of Angora goat semen. *Research in veterinary science* 2009a; 87: 468-472

Bucak NM, Sariözkan S, Tuncer PB, Ulutas PA, Akcada HI. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. *Small Ruminant Research* 2009b; 81: 90-95

Buerkle T. El 20 por ciento de razas de animales domésticos está en peligro de extinción. FAO 2008 www.fao.org/NEWSROOM/es/news/2006/1000464/index.html

Byrne GP, Lonergan P, Wade M, Duffy P, Donovan A, Hanrahan JP, Boland MP. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Animal reproduction science* 2000; 62: 265-275

Cabrera F, Gonzalez F, Batista M, Calero P, Medrano A, Gracia A. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (*Capra hircus*). *Reproduction domestic and animal* 2005; 40: 191-195

Cambor P, Anel L, Carbajo, Domínguez JC, Anel E, Boixo JC, Álvarez M, Celorrio I. Estudio de la influencia de la curva de congelación sobre la viabilidad del semen de morueco. XIX Jornadas científicas de la SEOC; 1994: 520-524

Cardozo JA, Fernández-Juan M, Forcada F, Abecia A, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology* 2006; 66: 841–850

Carné S, Roig N, Jordana J. La Cabra Blanca de Rasquera: caracterización estructural de las explotaciones. *Archivos de Zootecnia* 2007; 56: 43-54.

Carné S, Roig N, Jordana J. La Cabra Blanca de Rasquera: caracterización estructural de las explotaciones y estudio morfológico de la raza. V Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe. Montevideo (Uruguay). Libro de resúmenes 2005; 106

Casao A, Pérez-Pé R, Abecia JA, Forcada F, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. The effect of exogenous melatonin during the non-reproductive season on the seminal plasma hormonal profile and the antioxidant defence system of Rasa Aragonesa rams. *Animal reproduction science* 2013; 138: 168-174

Cebrián PJA, Muiño-Blanco MT, Pérez-Pé R, Casao GA, Palacios RC. Capítulo 8: Manejo del semen e inseminación artificial. En: Abecia MA, Forcada MF. Manejo reproductivo en ganado ovino. España: Servet. 2010. Pag: 113-144

Chemineau P, Morello H, Delgadillo JA, Malpaux B. Estacionalidad reproductiva en pequeños rumiantes: mecanismos fisiológicos y técnicas para la inducción de una actividad sexual a contra-estación. 3er Congreso ALEPRYCS, Viña del Mar, Chile, 2003

Chemineau P. Sexual behaviour and gonadal activity during the year in the tropical Creole meat goat. II. Male mating behaviour, testis diameter, ejaculate characteristics and fertility. *Reprod Nutr Develop* 1986; 26: 453-460

Colás C, Junquera C, Pérez-Pé, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock. *Microscopy research and technique* 2009; 72: 566–572

Contri A, Gloria A, Robbe D, Valorz C, Wegher L, Carluccio A. Kinematic study on the effect of pH on bull sperm function. *Animal reproduction science* 2013; 136: 252-259

Cox JF, Alfaro V, Montenegro V, Rodriguez-Martinez H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology* 2006; 860-867

Cseh S, Faigl V, Amiridis GS. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminant. *Animal reproduction science* 2012; 130: 187-192

Curry MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of reproduction* 2000; 5: 46-52

De Paz P, Estes MC, Alvarez M, Mata M, Chamorro CA, Anel L. Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. *Theriogenology* 2010; 74:663-671

De paz P, Mata-Campuzano M, Tizado JE, Álvarez M, Álvarez-Rodríguez M, Herraes P, Anel L. The relationship between ram sperm head morphometry and fertility depends on the procedures of acquisition. *Theriogenology* 2011; 76: 1313-1325

Del Valle I, Gómez-Durán A, Holt WV, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Soy lecithin interferes with mitochondrial function in frozen-thawed ram spermatozoa. *Journal of andrology* 2012; 33: 717-725

Delgadillo JA, Chemineau P. Abolition of the seasonal release of luteinizing hormone and testosterone in Alpine male goats (*Capra hircus*) by short photoperiodic cycles. *Journal of reproduction and fertility* 1992; 94: 45-55

Donoghue AM, Donoghue DJ. Effects of water- and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. *Poultry Science* 1997; 76: 1440-1445

Dorado J, Hidalgo M, Muñoz A, Rodríguez I. Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. *Animal reproduction science* 2009; 112: 150-157

Dorado J, Molinia I, Muñoz-Serrano A, Hidalgo M. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Florida goats. *Theriogenology* 2010; 74: 795-804

Dorado J, Rodríguez I, Hidalgo M. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology* 2007; 68:168-177

Estrada E, Rodríguez-Gil JE, Rocha LG, Balasch S, Bonet S, Yeste M. Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. *Andrology* 2014; 2: 88-99

Evans G, Maxwell WMC. Inseminación artificial de ovejas y cabras. España: Acribia, 1990

Faigl V, Vass N, Jávora A, Kulcsár M, Solti L, Amiridis G, Cseh S. Artificial insemination of small ruminants- a review. *Acta Veterinaria Hungarica* 2012; 60: 115–129

FAO. Lista mundial de vigilancia para la diversidad de los animales domésticos. Conservar los recursos genéticos de los animales domésticos. Departamento de agricultura. 1992. <http://www.fao.org/docrep/v8300s/v8300s0d.htm>

Fernández A, Gonzalvo MA, Clavero A, Ruiz de Assín R, Zamora S, Roldán M, Rabelo B, Ramírez JP, Yoldi A, Castilla JA. Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen. *Artículo III* 2009; 14: 17-25

Fingerova H, Oborna I, Novotny J, Svobodova M, Brezinova J, Radova L. The measurement of reactive oxygen species in human neat semen and in suspended spermatozoa: a comparison. *Reproductive biology and endocrinology* 2009; 7:118

Fiser PS, Ainsworth L, Fairfull RW. Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram. *Theriogenology* 1987; 28:599-607

Fiser PS, Fairfull RW. The Effects of Rapid Cooling (Cold Shock) of Ram Semen, Photoperiod, and Egg Yolk in Diluents on the Survival of Spermatozoa before and after Freezing. *Cryobiology* 1986; 23: 518:524

Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini SM, Ostdadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, Abedi P, Nili N, Rahmani HR, Nasr-Esfahani MH. In vitro comparison of egg yolk-based and

soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* 2010; 73: 480-487

Francesch A, Jordana J, Pares PM, Such X. Les races domèstiques autòctones de Catalunya (I). *Entre Camps i Animals* 2002; 36: 4-10.

Furstoss V, Borderes F, Forgerit Y, Guillouet B, Leboeuf B. The value of the percentage of motile sperm in predicting a significant portion of the fertility variation of frozen-thawed buck semen. *Theriogenology* 2010; 74: 1197-1206

García-Pastor L, González JM, Figueras L, Callejas M, Cebrián LM, Espada M. Implantes de melatonina en moruecos. Efecto sobre algunos índices reproductivos en un rebaño de raza Rasa Aragonesa. *SEOC* 2004; 29: 149-151

García-Herreros M, Aparicio IM, Barón FJ, García-Marín LJ, Gil MC. Standardization of sample preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. *International journal of andrology* 2006; 29: 553-563

Garde JJ, Soler AJ, Cassinello J, Crespo C, Malo AF, Espeso G, Gomendio M, Roldan ERS. Sperm cryopreservation in three species of endangered gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorrr*, and *G. dorcas neglecta*). *Biology of reproduction* 2003; 69:602-611

Garner DL, Johnson A, Yue ST, Roth BL. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *Journal of andrology* 1994; 15: 620-629

Garner DL, Johnson LA. Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Biology of reproduction* 1995; 53: 276-284

Garner DL, Thomas CA, Hannes WJ, Dejarnette JM, Marshall CE. Fluorometric Assessments of Mitochondrial Function and Viability in Cryopreserved Bovine Spermatozoa. *Biology of reproduction* 1997; 57: 1401-1406

Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 2005; 63: 445-457

González VD, Quintero-Moreno A, Garde LJJ, Estes MC, Fernández-Santos MR, Rubio-Guillén J, Mejía SW, González MY, León AG, Bohórquez CR. Caracterización morfométrica de la cabeza del espermatozoide porcino mediante análisis computarizado (resultados preliminares). *Revista científica, FCV-LUZ* 2008; 18: 570-577

Gorlach A. *Transferencia de Embriones en el Ganado Vacuno*. España Acribia, 1999.

Graham JK, Hammerstedt RH. Differential Effects of butylated hydroxytoluene analogs on Bull sperm subjected to cold-induced membrane stress. *Cryobiology* 1992; 29: 106-117

Gravance CG, Champion ZJ, Casey PJ. Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of Cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology* 1998; 49: 1219-1230

Grobfeld R, Sieg B, Struckmann C, Frenzel A, Maxwell WMC, Rath D. New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology* 2008; 70:1225-1233

Gunalp S, Onculoglu C, Gurgan T, Kruger TF, Lombard CJ. A study of semen parameters with emphasis on sperm morphology in a fertile population: an attempt to develop clinical thresholds. *Human reproduction* 2001; 16: 110-114

Hafez B, Hafez ESE. *Reproducción e inseminación artificial en animales*; Ed. INTERAMERICANA Mc GRAW- HILL; ed. 7ª; México, D. F. 2002

Hallap T, Nagy S, Jaakma U, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by Mitotracker deep red 633. *Theriogenology* 2005; 63: 2311-2322

Hammerstedt RH, Amann RP, Rucinsky T, Morse PD, Lepock J, Snipes W, Keith AD. Use of spin labels and electron spin resonance spectroscopy to characterize membranes of bovine sperm: effect of butylated hydroxytoluene and cold shock. *Biology of reproduction* 1976; 14: 381-397

Hancock JL. A staining technique for the study of temperature shock in semen. *Nature* 1951; 167: 323-324.

Hidalgo M, Rodríguez I, Dorado JM. The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Animal reproduction science* 2007; 100: 61-72

Hidalgo M, Rodríguez I, Pérez C, Dorado J, Sanz J, Sánchez M. Parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide de macho cabrío. *SEOC* 2002; 1053-1058

Hidalgo PM. Estudio del efecto de la congelación-descongelación sobre los parámetros morfométricos del espermatozoide de macho cabrío. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba. Córdoba 2004

Holt W, Watson P, Curry M, Holt C. Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems used in a practical workshop. *Fertil Steril* 1994; 62: 1277–1282

Holt WV, Medrano A, Thurston LM, Watson PF. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology* 2005; 63: 370-382

Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal reproduction science* 2000; 62: 3-22

Hossain S, Johannisson A, Wallgren M, Nagy S, Pimenta SA, Rodriguez-Martinez H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian Journal of Andrology* 2011; 13: 406–419

Hu JH, Li QW, Zan LS, Jiang ZL, An JH, Wang LQ, Jia YH. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing–thawing. *Animal reproduction science* 2010; 117: 11-17

IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp

IDESCAT 2013. <http://www.idescat.cat/es/>

Iguer-Ouada M, Verstegen JP. Evaluation of the “Hamilton Thorn computer-based automated system” for dog semen analysis. *Theriogenology* 2001; 55: 733–749

Ijaz A, Hunter AG, Graham EF. Identification on the capacitating agent for bovine sperm in egg yolk-test semen extender. *Journal of dairy science* 1989; 72: 2700-2706

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

Iritani A, Nishikawa Y, Nagasawa S. Studies on the egg-yolk coagulating enzyme in goat semen. VII. Variations in the enzyme activity of the semen between breeding season and non-breeding season, and in each ejaculate collected three times successively. *Jap. Journal Animal Reproduction* 1964; 10: 52-56

Jafaroghli M, Khalili B, Farshad A, Zamiri MJ. The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. *Small ruminant research*. 2010

Jannett F, Thun R, Bettschen S, Burger D, Hassig M. Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches–Montagnes stallions. *Animal reproduction science* 2003; 77: 213-221

Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology* 2003; 60: 743-758

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assays to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984; 70:219-228.

Jiang ZL, Li QW, Hu JH, Li WY, Zhao HW, Zhang SS. Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. *Cryobiology* 2007; 54: 301-304

Jiménez-Rabadán P, Ramón M, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Del Olmo E, Pérez-Guzmán MD, Bisbal A, Fernández-Santos MR, Garde JJ, Soler AJ. Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculate. *Animal reproduction science* 2012; 132: 88-95

Jones JM, Bavister BD. Acidification of intracellular pH in bovine spermatozoa suppresses motility and extends viable life. *Journal of andrology* 2000; 21: 616-624

Jordan J. Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM* 2003; 22: 100-106

Jordana J, Parés PM, Such X. La Raza Caprina Blanca de Rasquera. En: *Guía de Campo de las Razas Autóctonas Españolas*. Ed. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino 2009; 188-190

Jordana J, Vidilla M, Ferrando A. Cabra Blanca de Rasquera. *Races Autóctonas (I)*. Dossier Tècnic 2010; 43: 31-35

Joshi A, Naqvi SMK, Bag S, Dang AK, Sharma RC, Rawat PS, Mittal JP. Sperm motion characteristic of Garole rams raised for a prolonged period in a semi-arid tropical environment. *Tropical animal health and production* 2003; 35: 249-257

Karagiannidis A, Varsakeli S, Alexopoulos C, Amarantidis I. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *Small ruminant research* 2000; 37: 125-130

Kaur BA, Bilaspuri. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary medicine international* 2011; 1-7

Kaya A, Aksoy M, Baspinar N, Yildiz C, Ataman MB. 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. *Reproduction in domestic animal*. 2001; 36:211-215

Khalifa TAA, Lymberopoulos AG, El-Saidy BE. Testing Usability of Butylated Hydroxytoluene in Conservation of Goat Semen. *Reprod Dom Anim* 2008; 43: 525–530.

Kulaksiz R, Cebi C, Akcay E, Daskin A. The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small ruminant research* 2010; 88: 12-15

Kumar S, Millar JD, Watson PF. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology* 2003; 46: 246–253

Kundu CN, Chakrabarty J, Dutta P, Bhattacharyya D, Ghosh A, Majumder GC. Effect of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. *Reproduction* 2002; 123: 907-913

Kundu CN, Das K, Majumder GC. Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. *Cryobiology* 2001; 41: 21-27

Le Grandois J, Marchioni E, Zhao M, Giuffrida F, Ennahar S, Françoise B. Investigation of natural phosphatidylcholine sources: separation and identification by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS) of molecular species. *Journal of agricultural and food chemistry* 2009; 57: 6014–6020

Leboeuf B, Restall B, Salamon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal reproduction science* 2000; 62: 113-141

Lenzi A, Gandini L, Lombardo F, Picardo M, Maresca V, Panfili E, Tramer F, Boitani C, Dondero F. Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and blutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic to clinic. *Contraception* 2002; 65: 301-304

Loomis PR, Graham JK. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal reproduction science* 2008; 105: 119-128

Lusignan M, Bergeron A, Lafleur M, Manjunath P. The major proteins of bovine seminal plasma interact with caseins and whey proteins of milk extender. *Biology of reproduction* 2011; 85: 457-464

Lymberopoulos AG, Tsakmakidis IA, Khalifa TAA. Effect of Ram Age on Structural and Functional Competence of Frozen–Thawed Spermatozoa in Dairy Sheep. *Reproduction in domestic animals* 2010; 45: 572-578

Mahfouz RZ, Sabanegh E, Du Plessis SS, Agarwal A. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. *Fertility and Sterility* 2008. Article in press

Manjunath P, Thérien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology* 2002; 53: 109–119

Mara L, Dattena M, Pilichi S, Sanna D, Branca A, Cappai P. Effect of different diluents on goat semen fertility. *Animal reproduction science* 2007; 102: 152-157

Marco-Jiménez F, Puchades S, Mocé E, Viudes-de-Castro MP, Vicente JS, Rodríguez M. Use of powdered egg yolk vs fresh egg yolk for the cryopreservation of ovine semen *Reprod Dom Anim* 2004; 39: 438–441

Marco-Jiménez F, Viudes-de-Castro MP, Balasch S, Mocé E, Silvestre MA, Gomez EA, Vicente JS. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology* 2006; 52: 295-304

Marie D, Vaultot D, Partensky F. Application of the novel nucleic acid dyes Yoyo-1, Yo-Pro-1, and picogreen for flow cytometric analysis of marine prokaryotes. *Applied and environmental microbiology* 1996; 62: 1649-1655

Maroto-Morales A, Ramón M, García-Álvarez, Soler AJ, Esteso MC, Martínez-Pastor F, Pérez-Guzmán MD, Garde JJ. Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the Sperm-Class Analyzer. *Theriogenology* 2010; 73: 437-448

Martínez-Pastor F, Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Anel L, De Paz P. Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reproduction and domestic animals* 2010; 45 (suppl 2): 67-78

Martínez-Pastor F, Tizado EJ, Garde JJ, Anel L, De Paz P. Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology* 2011; 75: 783-795

Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M, Nadia FM, Audrey G. Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen in Tris egg yolk extender. *Animal reproduction science* 2011; 129: 44-49

Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M, Nadia FM. Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in yolk glycerol extender. *Animal reproduction science* 2012; 136: 55-60

Memon MA, Bretzlaff KN, Ott RS. Effect of washing on motility and acrosoma morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. *American journal of veterinary research* 1985; 46: 473-475

METEOCAT: Servei Meteorològic de Catalunya 2013.
<http://www.meteocat.com/servmet/index.html>

Mocé E, Purdy PH, Graham JK. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Animal reproduction science* 2010; 118: 236-247

Molina FC, Evans G, Maxwell WMC. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology* 1994a; 42: 849-858

Molinia FC, Evans G, Maxwell WMC. Fertility of ram spermatozoa pellet-frozen in zwitterion-buffered diluents. *Reproduction, nutrition, development* 1996; 36: 21-29

Molinia FC, Evans G, Maxwell WMC. In vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing spermatozoa. *Reproduction, nutrition, development* 1994b; 34: 491-500

Morillo-Rodríguez A, Macías-García B, Tapia JA, Ortega-Ferrusola C, Peña FJ. Consequences of butylated hydroxytoluene in the freezing extender on post-thaw characteristics of stallion spermatozoa in vitro. *Andrologia* 2012; 44: 688-695

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

Moustacas VS, Zaffalon FG, Lagares MA, Loaiza-Eccheverri AM, Varago FC, Neves MM, Heneine LGD, Arruda RP, Henry M. Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* 2011; 75: 300-307

Muiño R, Rivera MM, Rigau T, Rodríguez-Gil JE, Peña AI. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *Animal reproduction science* 2008; 109:50-64

Muiño-Blanco T, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reproduction in domestic animals* 2008; 43 (Suppl. 4): 18–31

Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Tocci V, Failli P, Forti G, Baldi E. Nuclear staining identifies two populations of human sperm with different DNA fragmentation extent and relationship with semen parameters. *Human reproduction* 2008; 23: 1035-1043

Naijian HR, Kohram H, Shahneh AZ, Sharafi M, Bucak MN. Effects of different concentrations of BHT on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze–thaw process. *Cryobiology* 2013; 66: 151-155

Naing SW, Wahid H, Mohd Azam K, Rosnina Y, Zuki AB, Kazhal S, Bukar MM, Thein M, Kyaw T, San MM. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. *Animal reproduction science* 2010; 122: 23-28

Najafi A, Zhandi M, Towhidi A, Sharafi M, Sharif AA, Motlagh MK, Martinez-Pastor F. Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology* 2013; 66: 275-282

Nuñez MI, Morán JM, Peña FJ. Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. *Journal of andrology* 2006; 27: 596-603

Ortega-Ferrusola C, Macías GB, Suárez RV, Gallardo-Bolaños JM, González-Fernández L, Tapia JA, Rodríguez-Martínez H, Peña FJ. Identification of sperm subpopulations in stallion ejaculates: changes after cryopreservation and comparison with traditional statistics. *Reproduction in domestic animals* 2009; 44: 419-423

Pace MM, Graham EF. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal of animal science* 1974; 39: 1144-1149

Palacín I, Abecia JA, Forcada F, Casao A, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T, Palacios C, Pontes JM, García MF, Pontes García JM. Efecto del tratamiento con melatonina en los moruecos sobre la circunferencia escrotal y los índices reproductivos de las ovejas. *SEOC* 2006; 31: 355-357

Papa FO, Felício B, Melo-Oña CM, Alvarenga A, De Vita B, Avanzi BR, Dell'Aqua JA. Effect of substituting soybean lecithin for egg yolk in an extender used for the cryopreservation of stallion semen. *Animal reproduction science* 2010; 121S: S171-S172

Papa FO, Felício GB, Melo-Oña CM, Alvarenga MA, De Vita B, Trinquê C, Puoli-Filho JN, Dell'Aqua JA. Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. *Animal reproduction science* 2011; 129: 73-77

Parés CPM, Francesch VA, Jordana VJ, Such MX. Races autòctones, la protecció d'un patrimoni col·lectiu. *Agro cultura* 2006; 25: 30-34

Parkinson TJ, Whitfield CH. Optimisation of freezing conditions for bovine spermatozoa. *Theriogenology* 1987; 27: 781-797

Paulenz H, Söderquist L, Pérez-Pé R, Berg KA. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology* 2002; 57: 823-836

Pellicer-Rubio MT, Combarous Y. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *Journal of reproduction and fertility* 1998; 122: 95-105

Peña FJ, Rodríguez MH, Tapia JA, Ortega FC, González FL, Macías GB. Mitochondria in Mammalian Sperm Physiology and Pathology: A Review. *Reproduction domestic animals* 2009; 44: 345-349

Peña FJ, Saravia F, Johannisson A, Walgren M, Rodriguez-Martínez H. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. *International journal of andrology* 2005; 28: 107-114

Pérez B, Mateos E. Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malagueña breeds. *Small ruminant research* 1996; 22: 163-168

Peterson K, Kappen MAPM, Ursem PJF, Nöthling JO, Colenbrander B, Gadella BM. Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: Effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. *Theriogenology* 2007; 67: 863-871

Petrunkina AM, Harrison RAP. Cytometric Solutions in Veterinary Andrology: Developments, Advantages, and Limitations. *Cytometry Part A* 2011; 79A: 338-348

Petrunkina AM, Harrison RAP. Fluorescence technologies for evaluating male gamete (dys)function. *Reproduction domestic animals* 2013; 48 (suppl 1): 11-24

Pillet E, Duchamp G, Batellier F, Beaumal V, Anton M, Desherces S, Schmitt E, Magistrini M. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology* 2011; 75: 105-114

Purdy PH, Mocé E, Stobart R, Murdoch WJ, Moss GE, Larson B, Ramsey S, Graham JK, Blackburn HD. The fertility of ram sperm held for 24 h at 5 °C prior to cryopreservation. *Animal reproduction science* 2010; 118: 231-235

Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. *Small ruminant research* 2006; 63: 215-225

Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulations in rabbit semen and to predict semen fertility and litter size. *Reproduction in domestic animal* 2007; 42: 312-319

Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology* 2003; 61: 673-690

Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology* 2004; 61: 673-690

Ramadan TA, Taha TA, Samak MA, Hassan A. Effectiveness of exposure to longday followed by melatonin treatment on semen characteristics of Damascus male goats during breeding and non-breeding seasons. *Theriogenology* 2009; 71: 458-468

Ramalho-Santos J, Amaral A, Sousa AP, Rodrigues AS, Martins L, Baptista M, Mota PC, Tavares R, Amaral S, Gamboa S. Probing the structure and function of mammalian sperm using optical and fluorescence microscopy. *FORMATEX* 2007; 394-402

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

Reece WO. Capitulo 38: Reproducción del macho en mamíferos. In: *Dukes fisiología de los animales domésticos*. 12a ed. España: Acribia. 2010

Ritar AJ, Salamon S. 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* 1991; 4: 29-37

Ritar AJ, Salamon S. 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. *Australian journal of biological science* 1982; 35: 305-312

Roca J, Gil MA, Hernández M, Parrilla I, Vázquez JM, Martínez EA. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Journal of andrology* 2004; 25: 397-405

Roca J, Martínez E, Vázquez JM, Coy P. Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area. *Animal reproduction science* 1992; 29: 255-262

Roca J, Martínez E, Vázquez JM, Ruíz S, Coy P. Influencia de la edad sobre los parámetros reproductivos de machos cabríos de raza Murciano-Granadina. *Archivos de zootecnia* 1991; 40: 173-179

Rodríguez-Martínez H, Saravia F, Wallgren M, Roca J, Peña FJ. Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 2008; 70: 1242-1250

Rodriguez-Martinez H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia?. *Reproduction domestic animals* 2003; 38: 312-318

Roof DJ, Bowley S, Price LL, Matsas DJ. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology* 2012; 77: 412-420

Royere D, Barthelemy C, Hamamah S, Lansac J. Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. *Human reproduction update* 1996; 2: 553-559

Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal reproduction science* 1995a; 37: 185-249

Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal reproduction science* 1995b; 38: 1-36

Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Animal reproduction science* 2000; 62: 77-111

Salmani H, Mahdi NM, Vaseghi-Dodaran H, Bozlur RM, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Towhidi A, Zare SA, Zhandi M. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small ruminant research* 2013; 112: 123-127

Salmani H, Towhidi A, Zhandi M, Bahreini M, Sharafi M. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology* 2014; 68: 276-280

Sancho S, Vilagran I. Capítulo 9: The boar ejaculate: sperm function and seminal plasma analyses. In: Bonet S, Casas I, Holt WV, Yeste M. *Boar reproduction fundamentals and new biotechnological trends*. Springer, 2013. Pag: 471-516

Santiago-Moreno J, Coloma MA, Dorado J, Pulido-Pastor A, Gómez-Guillamon F, Salas-Vega R, Gómez-Brunet A, López-Sebastián A. Cryopreservation of Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) sperm obtained by electroejaculation outside the rutting season. *Theriogenology* 2009; 71: 1253-1260

Santiago-Moreno J, Toledano-Díaz A, Pulido-Pastor A, Dorado J, Gómez-Brunet A, López-Sebastián A. Effect of egg yolk concentration on cryopreserving Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 2006; 66: 1219-1226

Shoae A, Zamiri MJ. Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender. *Animal reproduction science* 2008; 104: 414-418

Sieme H, Harrison RAP, Petrunkina AM. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Animal reproduction science* 2008; 107: 276-29

Silva PFN, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 2006; 65: 958-978

Söderquist L, Madrid-Bury N, Rodriguez-Martinez H. Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology* 1997; 48: 1115-1125

Suzuki K, Geshi M, Yamauchi N, Nagai T. Functional changes and motility characteristics of Japanese Black bull spermatozoa separated by Percoll. *Animal reproduction science* 2003; 77: 157-172

Tatone C, Di Emidio G, Vento M, Ciriminna R, Artini PG. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. *Gynecological endocrinology* 2010; 26: 563-567

Tejerina F, Buranaamnuay K, Saravia F, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H. Assessment of motility of ejaculated, liquid-stored boar spermatozoa using computerized instruments. *Theriogenology* 2008; 69: 1129–1138

Thérien I, Moreau R, Manjunath P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biology of reproduction* 1999; 61: 590-598

Thurston LM, Siggins K, Mileham AJ, Watson PF, Holt WV. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biology of reproduction* 2002a; 66: 545-554

Thurston LM, Watson PF, Holt WV. Semen cryopreservation: a genetic explanation for Species and individual variation?. *CryoLetters* 2002b; 23: 255-262

Tonieto RA, Goularte KL, Gastal GDA, Schiavon RS, Deschamps JC, Lucia Jr. T. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Ruminant Research* 2010; 93: 206–209

Torres E. Las razas autóctonas catalanas y su recuperación. En: *Libro Conmemorativo del Centenario del Cuerpo Nacional Veterinario*. Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. 2007; 333-343

Trejo GA, Toledo FD. Efecto de la melatonina y la hormona del crecimiento sobre la actividad gonadal en machos ovinos prepúberes. XIII Congreso Nacional de Producción Ovina- AMTEO 2006

Tuli RK, Holtz W. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and got-release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology* 1994; 42:547-555

Tuli RK, Holtz W. The effect of zwitterion buffers on the freezability of Boer goat semen. *Theriogenology* 1992; 37: 947-951

Van Wagtendonk-de Leeuw AM, Haring RM. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology* 2000; 54: 57-67

Vázquez JM, Martínez EA, Martínez P, García-Artiga C, Roca J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology* 1997; 47: 913-922

Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2002; 57: 149-179

Vidal AH, Batista AM, Cordeiro BDE, Arruda GW, Arruda PM, Valcácia SS, Pessoa GMM. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small ruminant research* 2012

Vidilla M. Caracterització del creixement dels cabrits de cabra Blanca de Rasquera. Treball Pràctic Tutorat. ETSEA, Universitat de Lleida, Lleida. 2008.

Villemure M, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reproductive biology and endocrinology*. 2003

Vishwanath R, Shannon P, Curson B. Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilising ability of bull sperm. *Animal reproduction science* 1992; 29: 185-194

Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal reproduction science* 2000; 62: 23-53

Watson PF. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *Journal reproduction and fertility* 1981; 62: 483-492

Watson PF, Anderson WJ. Influence of viability butylated hydroxytoluene (BHT) of ram spermatozoa undergoing the cold shock. *Journal reproduction and fertility* 1983; 69: 229-235

Watson PF, Martin ICA. Artificial insemination of sheep: the effect of semen diluents containing egg yolk on the fertility of ram semen. *Theriogenology* 1976; 6: 559-564

Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science* 2000; 60-61: 481-492

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

Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 2004; 48: 146-156

Wrobel KH, Bergmann. Chapter 12: Male reproductive system. In: Eurell JA, Frappier BL. Dellmann's editors. *Textbook of veterinary histology*. 6a ed. EU: Blackwell, 2006. p 233-255

Yanagimachi R. *In vitro* capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *Journal reproduction and fertility* 1969; 18: 275-286

Yanagimachi R. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *Journal reproduction and fertility* 1970; 23: 193-196

Yániz JL, Mateos JA, Santolaria P. Zwitterionic buffers preserve ram semen quality more efficiently than TRIS during storage at 15 °C. *Small ruminant research* 2011; 95: 54-60

Yániz JL, Palacín I, Vicente-Fiel S, Gosalvez J, López-Fernández C, Santolaria P. Comparison of membrane-permeant fluorescent probes for sperm viability assessment in the ram. *Reproduction in domestic animals* 2013

Yániz JL, Vicente-Fiel S, Capistrós S, Palacín I, Santolaria P. Automatic evaluation of ram sperm morphometry. *Theriogenology* 2012; 77: 1343-1350

Yeste M, Estrada E, Casas I, Bonet S, Rodríguez-Gil JE. Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. *Theriogenology* 2013; 79: 929-939

Zarazaga LA, Gatica MC, Celi I, Guzmán JL, Malpaux B. Effect of artificial long days and/or melatonin treatment on the sexual activity of Mediterranean bucks. *Small ruminant research* 2010; 93:110-118

Zarazaga LA, Gatica MC, Celi I, Guzmán JL. Reproductive performance is improved during seasonal anoestrus when female and male Murciano–Granadina goats receive melatonin implants and in Payoya goats when females are thus treated. *Reproduction in domestic animal* 2012; 47: 436-442