

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Medicina y Cirugía Animal**



**INFLUENCIA EN LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE LA ADICIÓN  
DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CRIOPROTECTORES  
PARA LA CONSERVACIÓN DEL SEMEN CANINO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

Ana Celeste Andrade Martins de Carvalho Bessa

Bajo la dirección de los doctores

Ana María Mayenco – Aguirre

Antonio Luiz Mittermayer Madureira Rocha

**Madrid, 2005**

**ISBN: 84-669-2846-4**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL



**INFLUENCIA EN LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE LA ADICIÓN DE  
DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CRIOPROTECTORES PARA  
LA CONSERVACIÓN DEL SEMEN CANINO**

Memoria presentada por la licenciada  
Ana Celeste Andrade Martins de Carvalho Bessa  
Para optar al grado de Doctor en Veterinaria  
Madrid, 2005

Dirigida por:

D<sup>a</sup>. Ana María Mayenco-Aguirre

D. António Luiz Mittermayer Madureira Rocha

Departamento  
Cirugía y Medicina Animal  
Madrid

**Ana María Mayenco Aguirre**, Doctora en Veterinaria y Profesora Titular del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

**António Luiz Mittermayer Madureira Rocha**, Doctor en Medicina Veterinaria y Profesor Asociado con Agregación del Instituto de Ciencias Biomédicas Abel Salazar de la Universidade do Porto (Portugal).

#### **INFORMAN**

Que la Tesis Doctoral titulada **INFLUENCIA EN LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE LA ADICIÓN DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CRIOPROTECTORES PARA LA CONSERVACIÓN DEL SEMEN CANINO** de la que es autora la Licenciada en Medicina Veterinaria Dña. **Ana Celeste Andrade Martins de Carvalho Bessa**, ha sido realizada bajo nuestra dirección y que cumple las condiciones exigidas para ser presentada a efectos de ser juzgada.

Y para que así conste, firmamos el presente informe en Madrid a 10 de mayo del año dos mil cinco.

Fdo. D<sup>a</sup> Ana María Mayenco Aguirre

Fdo. D. Antonio Luiz Mittermayer Rocha

**- A Rita, Carlos y mi Familia**

## Agradecimientos

- A la Universidad de Trás-os-Montes e Alto Douro, en la persona de su Magnífico Rector, el Prof. Dr. Armando Mascarenhas Ferreira, expreso mi reconocimiento por todo el apoyo concedido. Un agradecimiento especial al Director del Departamento de Ciências Veterinárias, Prof. Dr. Jorge de Almeida Rodrigues por todas las facilidades concedidas a lo largo de este trabajo.
- A la Directora de la Tesis, Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana María Mayenco-Aguirre, por su constante interés, dedicación, estricta supervisión, apoyo incondicional a lo largo de este trabajo y por su amistad. Al Prof. Dr. António Mittermayer Rocha, Codirector de la presente tesis, por su apoyo y consejo desde el inicio, por su asesoría en la estancia realizada en el Instituto de Ciencias Biomédicas Abel Salazar, Porto, y por su amistad. A ambos directores agradezco asimismo las preciosas sugerencias y críticas constructivas.
- A los responsables del Laboratorio de Reproducción, Prof<sup>a</sup>. Dra. Concepción García-Botey y Prof. Dr. José Félix Pérez Gutiérrez, por el uso del laboratorio, del material utilizado y por el apoyo constante en la realización de este trabajo.
- Al Director del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de Madrid, Prof<sup>a</sup>. Dra. Juana María Flores Landeira, por todas las facilidades concedidas.
- A los responsables del Servicio Veterinario de la Policía Nacional de Madrid en la Casa de Campo, Dr<sup>a</sup>. Gloria Jiménez Cuevas y Dr. Silvestre Galera Carrillo, así como a los funcionarios de este Servicio, por posibilitaren la utilización de sus perros, a lo largo de la realización de la componente experimental de este trabajo.
- A los compañeros del laboratorio de Reproducción. Un agradecimiento muy especial a Marcelo Terán Donoso, Ana Laura Álvarez, Miriam Iglesias y Jorge Oliva por su colaboración en la realización del trabajo experimental.
- A Rafael Cediél Algovia, por su preciosa ayuda en la orientación del análisis estadístico de los datos.
- Al personal del Centro de Microscopia Electrónica Luis Bru de la Universidad Complutense de Madrid por la realización de las citometrías de flujo.

- A D. Santiago Cano del Departamento de Apoyo de Investigación y Docencia de los Servicios Informáticos de la Universidad Complutense de Madrid, por su ayuda en el procesamiento estadístico de los datos.
- Al personal de Hemeroteca especialmente a Mar Sanz Luengo y Paloma Ortiz.
- Al Prof. Dr. Manuel Vilanova, del Instituto de Ciencias Biomédicas Abel Salazar, por la realización de las citometrías de flujo en este Instituto.
- A los responsables por el Laboratorio de Fisiologia Geral del Instituto de Ciencias Biomédicas Abel Salazar por el uso del laboratorio y por el apoyo concedido durante la estancia en el Instituto.
- Al Laboratorio de Anatomía Patológica y de Biopatología de la Facultad de Madrid por permitirnos el uso del microscopio de fluorescencia.
- A mis amigos del Colegio Mayor Casa do Brasil en Madrid, por su compañerismo, amistad y alegre presencia durante mi estancia, que hicieron de esta Casa un hogar. Gracias muy especiales a Joana y Luisa.
- A los compañeros del Departamento de Ciencias Veterinarias Maria Isabel Ribeiro Dias y Carlos Alberto Antunes Viegas, por su apoyo incondicional, amistad y por sus palabras de aliento en los momentos difíciles.
- Mencionar finalmente que este trabajo ha sido financiado por la “Fundação para a Ciência e a Tecnologia” (FCT), del Ministerio de la Ciencia y de la Enseñanza Superior de Portugal, con la referencia SFRH/BD/7076/2001.

# Índice

1. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. <b>Objetivos</b> .....	8
2. <b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	9
2.1. <b>Principios generales de la criopreservación de semen</b> .....	11
2.2. <b>Impacto de la refrigeración y la congelación en la estructura y función espermáticas</b> .....	14
2.2.1. <b>Susceptibilidad al choque térmico</b> .....	15
2.2.2. <b>Alteraciones morfo-funcionales de la refrigeración y congelación</b> .....	18
2.2.2.1. <b>Refrigeración</b> .....	18
2.2.2.2. <b>Congelación</b> .....	19
2.3. <b>Protocolos de refrigeración y congelación</b> .....	25
2.3.1. <b>Dilución y empleo de crioprotectores</b> .....	25
2.3.1.1. <b>Situación actual de los progresos de refrigeración y de congelación para el semen canino</b> .....	26
2.3.1.2. <b>Papel de los crioprotectores</b> .....	28
2.3.1.2.1. <b>Yema de huevo</b> .....	28
2.3.1.2.2. <b>Glicerol</b> .....	30
2.3.1.2.3. <b>Dimetilsulfoxido</b> .....	34
2.3.1.2.4. <b>Etilenglicol</b> .....	35
2.3.1.2.5. <b>Adición de azúcares</b> .....	36
2.3.1.2.6. <b>Adición de Equex®</b> .....	36
2.3.1.2.7. <b>Adición de aminoácidos</b> .....	39
2.3.1.2.8. <b>Otros compuestos</b> .....	45
2.3.1.3. <b>Periodos de refrigeración y de equilibrio</b> .....	45
2.3.1.4. <b>Ritmos de congelación y descongelación</b> .....	47
2.4. <b>Evaluación de la calidad espermática</b> .....	50
2.4.1. <b>Principios generales</b> .....	50
2.4.1.1. <b>Semen fresco</b> .....	52
2.4.1.2. <b>Semen refrigerado y congelado</b> .....	54
2.4.2. <b>Pruebas clásicas de evaluación seminal</b> .....	55
2.4.2.1. <b>Motilidad espermática</b> .....	55
2.4.2.1.1. <b>Estimación subjetiva</b> .....	55
2.4.2.1.2. <b>Análisis computerizado (CASA)</b> .....	56
2.4.2.2. <b>Prueba de termorresistencia</b> .....	64
2.4.2.3. <b>Concentración</b> .....	65
2.4.2.4. <b>Morfología</b> .....	66
2.4.2.5. <b>Integridad del acrosoma</b> .....	68
2.4.2.6. <b>Integridad de la membrana plasmática</b> .....	72

2.4.2.6.1. <i>Test de endósmosis</i> .....	73
<b>2.4.3. Pruebas complementarias de evaluación seminal</b> .....	73
<b>2.4.3.1. Utilización de marcadores fluorescentes: microscopía de fluorescencia y citometría de flujo</b> .....	73
2.4.3.1.1. <i>Evaluación de la viabilidad</i> .....	75
2.4.3.1.2. <i>Evaluación de la integridad acrosomal</i> .....	75
2.4.3.1.3. <i>Evaluación simultánea de la viabilidad e integridad acrosomal</i> .....	78
2.4.3.1.4. <i>Evaluación de la actividad mitocondrial</i> .....	79
<b>2.4.3.2. Valoración de la capacitación mediante la prueba de tinción con clortetraciclina</b> .....	83
<b>2.4.3.3. Actividad enzimática del acrosoma</b> .....	84
<b>2.4.3.4. Ensayos de unión y penetración a zona pelúcida</b> .....	84
<b>2.4.3.5. Pruebas de inducción de la reacción acrosómica</b> .....	85
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	87
<b>3.1. Diseño experimental</b> .....	89
3.1.1. <b>Experimento 1. Efectos de la adición de aminoácidos en las características del semen refrigerado en el diluyente Tris-fructosa-ácido cítrico</b> .....	89
3.1.1.1. <i>Experimento 1.1. Estudio preliminar: efectos en la motilidad de la suplementación en glutamina, prolina y taurina</i> .....	89
3.1.1.2. <i>Experimento 1.2. Efectos de la suplementación con taurina en las características de motilidad, integridad de la membrana y del acrosoma del espermatozoide refrigerado con distintas proporciones de yema</i> .....	90
3.1.1.3. <i>Experimento 1.3. Evaluación del estado de capacitación de los espermatozoides a lo largo del periodo de refrigeración en el diluyente suplementado por taurina 30 y 50 mM, mediante la prueba de tinción con clortetraciclina</i> .....	92
3.1.2. <b>Experimento 2. Estudio del empleo de etilenglicol como crioprotector en la congelación del espermatozoide de perro</b> .....	93
3.1.3. <b>Experimento 3. Interrelaciones entre la evaluación de la funcionalidad espermática mediante marcaje con Rodamina-PI y los parámetros clásicos de evaluación de la calidad espermática</b> .....	94
3.1.4. <b>Experimento 4. Efectos de la suplementación del diluyente de congelación Uppsala-Equex con los aminoácidos taurina e hipotaurina</b> .....	96
3.1.4.1. <i>Experimento 4.1. Efectos en la motilidad, longevidad, viabilidad, integridad del acrosoma y actividad mitocondrial del espermatozoide descongelado</i> .....	96

3.1.4.2. Experimento 4.2. Inducción de la reacción acrosómica con $Ca^{2+}$ ionóforo A23187 .....	97
3.2. <b> Materiales</b> .....	98
3.2.1. Material biológico .....	98
3.2.2. Material y equipo de laboratorio .....	99
3.2.3. Reactivos, medios y soluciones .....	100
3.2.3.1. Diluyentes de refrigeración .....	101
3.2.3.2. Diluyentes de congelación .....	104
3.2.3.3. Medio de descongelación .....	109
3.2.3.4. Solución hipo-osmótica para evaluación de endósmosis .....	110
3.2.3.5. Solución de formol-citrato .....	110
3.2.3.6. Medios y soluciones para la citometría de flujo .....	110
3.2.3.7. Solución para la prueba con clortetraciclina .....	112
3.2.3.8. Medio de capacitación canino “Canine Capacitation Medium” (CCM) .....	112
3.2.3.9. Solución de eosina-azul de anilina o nigrosina para evaluación del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos y la morfología espermática .....	113
3.2.3.10. Solución de $Ca^{2+}$ ionóforo para inducción de la reacción acrosómica .....	114
3.3. <b> Métodos</b> .....	114
3.3.1. Recolección del semen .....	114
3.3.2. Evaluación del semen .....	114
3.3.2.1. Volumen .....	114
3.3.2.2. Concentración .....	115
3.3.2.3. Motilidad .....	115
3.3.2.3.1. Estimación subjetiva .....	115
3.3.2.3.2. Análisis computerizado de la motilidad (SCA) .....	116
3.3.2.4. Morfología .....	117
3.3.2.5. Evaluación de la integridad de la membrana plasmática, valoración del porcentaje de células vivas y muertas, integridad del acrosoma y actividad mitocondrial .....	117
3.3.2.5.1. Evaluación de la integridad de la membrana plasmática mediante el test de endósmosis .....	117
3.3.2.5.2. Evaluación de la vitalidad espermática mediante coloración con eosina-azul de anilina o con eosina-nigrosina .....	118
3.3.2.5.3. Evaluación de la integridad del acrosoma mediante coloración con Spermac® .....	119
3.3.2.5.4. Evaluación de la calidad espermática mediante citometría de flujo .....	120
3.3.2.5.4.1. Evaluación simultánea de la viabilidad e integridad del acrosoma con PI/Fitc-PSA o PI/Fitc-PNA .....	120

3.3.2.5.4.2. <i>Evaluación simultánea de la viabilidad y actividad mitocondrial con Rodamina 123-PI</i> .....	123
<b>3.3.2.6. Pruebas funcionales</b> .....	125
3.3.2.6.1. <i>Valoración del estado de capacitación mediante marcaje con clortetraciclina</i> .....	125
3.3.2.6.2. <i>Inducción de la reacción acrosómica mediante el uso de ionóforo de calcio A23187</i> .....	126
<b>3.3.3. Procesado del semen</b> .....	127
3.3.3.1. <i>Dilución del semen</i> .....	127
3.3.3.2. <i>Refrigeración del semen</i> .....	128
3.3.3.3. <i>Congelación del semen</i> .....	128
3.3.3.4. <i>Descongelación del semen</i> .....	128
<b>3.4. <u>Análisis estadístico</u></b> .....	129
<b>4. RESULTADOS</b> .....	131
4.1. <b><u>Experimento 1. Efectos de la adición de aminoácidos en las características del semen refrigerado en el diluyente Tris-fructosa-ácido cítrico</u></b> .....	133
4.1.1. Experimento 1.1. ....	133
4.1.2. Experimento 1.2. ....	135
4.1.3. Experimento 1.3. ....	161
4.2. <b><u>Experimento 2. Estudio del empleo de etilenglicol como crioprotector en la congelación del espermatozoide de perro</u></b> .....	165
4.3. <b><u>Experimento 3. Interrelaciones entre la evaluación de la funcionalidad espermática mediante marcaje con Rodamina-PI y los parámetros clásicos de evaluación de la calidad espermática</u></b> .....	177
4.4. <b><u>Experimento 4. Efectos de la suplementación del diluyente de congelación Uppsala-Equex con los aminoácidos taurina e hipotaurina</u></b> .....	183
4.4.1. Experimento 4.1. ....	183
4.4.2. Experimento 4.2. ....	195
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	205
5.1. <b><u>Experimento 1. Efectos de la adición de aminoácidos en las características del semen refrigerado en el diluyente Tris-fructosa-ácido cítrico</u></b> .....	207
5.2. <b><u>Experimento 2. Estudio del empleo de etilenglicol como crioprotector en la congelación de perro</u></b> .....	217
5.3. <b><u>Experimento 3. Interrelaciones entre la evaluación de la funcionalidad espermática mediante marcaje con Rodamina-PI y los parámetros clásicos de evaluación de la calidad espermática</u></b> .....	225
5.4. <b><u>Experimento 4. Efectos de la suplementación del diluyente de congelación Uppsala-Equex con los aminoácidos taurina e hipotaurina</u></b> .....	231

<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	245
<b>7. RESUMEN</b> .....	249
<b>8. SUMMARY</b> .....	253
<b>9. RESUMO</b> .....	257
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	261



## Índice de Figuras

2.1 - Estructura de la membrana celular del espermatozoide y de las alteraciones inducidas por el choque térmico.....	16
2.2 - Representación esquemática de las alteraciones físicas del espermatozoide y del diluyente durante la congelación y la descongelación .....	50
2.3 - Componentes de los sistemas utilizados en la evaluación computerizada de la motilidad espermática (CASA).....	57
2.4 - Parámetros utilizados en el análisis computerizado de la motilidad espermática.....	58
2.5 - Representación esquemática de la reacción acrosómica .....	85
3.1 - Representación de distintos tipos de hinchazón y enrollamiento de colas .....	118
3.2 - Representación de los patrones observados en citometría de flujo de la tinción del espermatozoide con PI/Fitc-PSA .....	121
3.3 - Representación de los patrones de tinción observados bajo microscopía de fluorescencia de la tinción del espermatozoide con PI/Fitc-PSA o PI/Fitc-PNA .....	122
3.4 - Patrón de movimiento espermático característico de hiperactivación.....	127
4.1 - Histogramas de alícuotas diferentes de 50% muestra viva y 50% muerta .....	180

## Índice de Fotografías

2.1 - Formación de repliegues de la membrana plasmática; espermatozoide canino (microscopía electrónica).....	20
2.2 - Presencia de vesículas acrosomales; espermatozoide canino (microscopía electrónica).....	21
2.3 - Componentes de los sistemas utilizados en la evaluación computerizada de la motilidad espermática (CASA).....	57
2.4 - Parámetros utilizados en el análisis computerizado de la motilidad espermática.....	58
2.5 - Representación esquemática de la reacción acrosómica .....	85
3.1 - Sistema informático para el análisis de motilidad, SCA versión 2002.....	116
3.2 - Imagen del sistema informático para el análisis de la motilidad.....	116
3.3 - Tinción con eosina-nigrosina .....	119
3.4 - Tinción con eosina-azul de anilina.....	119
3.5 - Tinción con Spermac <sup>®</sup> .....	119
3.6 - Espermatozoide muerto con acrosoma dañado .....	121
3.7 - Microscopía de fluorescencia (PI-PNA).....	122
3.8 - Microscopía de fluorescencia (PI-PNA).....	122

3.9 - Microscopía de fluorescencia (PI-PNA) .....	122
3.10 - Dot-plot de la tinción PI/Fitc-PSA .....	122
3.11 - Espermatozoide muerto marcado con PI-R123 .....	124
3.12 - Espermatozoide vivo marcado con R123 .....	124
3.13 - Dot-plot e histograma correspondientes a una tinción con Rodamina .....	124
3.14 - Dot-plot e histograma correspondientes a una tinción con Rodamina-PI.....	124
3.15 - Espermatozoide preservado de perro- patrones de coloración con CTC.....	126
3.16 - Espermatozoide preservado de perro- patrones de coloración con CTC.....	126

## Índice de Tablas

2.1 - Consecuencias de la congelación.....	24
2.2 - Implicaciones en la funcionalidad espermática.....	24
2.3 - Atributos del espermatozoide fértil .....	51
2.4 - Características del eyaculado de perros fértiles .....	53
2.5 - Terminología del sistema CASA: definición de las abreviaturas .....	58
2.6 - Factores técnicos que afectan las mediciones cinéticas del espermatozoide.....	59
2.7 - Clasificación morfológica del espermatozoide canino .....	68
3.1 - Diluyentes utilizados en el experimento 2 .....	93
3.2 - Diluyentes utilizados en el experimento 4.1 .....	96
3.3 - Diluyente de refrigeración Tris-20%Yema .....	101
3.4 - Diluyentes de refrigeración Tris-20%Yema-Glutamina 30/50/80 mM.....	101
3.5 - Diluyentes de refrigeración Tris-20%Yema-Prolina 30/50/80 mM .....	102
3.6 - Diluyentes de refrigeración Tris-20% Yema-Taurina 30/50/80 mM .....	102
3.7 - Diluyentes de refrigeración Tris-5/10%Yema.....	103
3.8 - Diluyentes de refrigeración Tris-5/10/20%Yema-Taurina 30 mM .....	103
3.9 - Diluyentes de refrigeración Tris-5/10/20%Yema-Taurina 50 mM .....	104
3.10 - Diluyente Noruego.....	104
3.11 - Diluyente 4% etilenglicol .....	104
3.12 - Diluyente 8% etilenglicol .....	105
3.13 - Diluyente 4% etilenglicol y 4% glicerol.....	105
3.14 - Diluyente "Uppsala/Equex II".....	105

3.15 - Diluyente 5%Etilenglicol y 0,5%Equex .....	106
3.16 - Diluyente "Uppsala/Equex" suplementado con Taurina 25mM .....	106
3.17 - Diluyente "Uppsala/Equex" suplementado con Taurina 50 mM .....	107
3.18 - Diluyente "Uppsala/Equex" suplementado con Taurina 75 mM .....	107
3.19 - Diluyente "Uppsala/Equex" suplementado con Hipotaurina 25mM .....	108
3.20 - Diluyente "Uppsala/Equex" suplementado con Hipotaurina 50 mM .....	108
3.21 - Diluyente "Uppsala/Equex" suplementado con Hipotaurina 75 mM .....	109
3.22 - Medio de descongelación .....	109
3.23 - Solución hipo-osmótica .....	110
3.24 - Solución formol-citrato .....	110
3.25 - Solución salina fosfatada .....	111
3.26 - Composición solución de trabajo PI .....	111
3.27 - Composición solución de trabajo FITC-PSA/PNA .....	111
3.28 - Composición solución de trabajo R123 .....	112
3.29 - Solución de CTC en agua ultrapura .....	112
3.30 - Medio CCM .....	113
3.31 - Tinción eosina-azul de anilina/ eosina-nigrosina .....	113
3.32 - Solución de ionóforo de calcio .....	114
3.33 - Valores utilizados en el análisis computerizado .....	116
4.1 - Motilidad total y progresiva .....	133
4.2 - Características de los pools frescos .....	136
4.3 - Diluyentes evaluados en el experimento 1.2 .....	136
4.4 - Motilidad total visual .....	138
4.5 - Motilidad progresiva visual .....	140
4.6 - Motilidad total .....	142
4.7 - Motilidad progresiva .....	143
4.8 - Velocidad curvilínea .....	144
4.9 - Velocidad rectilínea .....	145
4.10 - Velocidad promedio .....	146
4.11 - Índice de linearidad .....	147
4.12 - Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza .....	148

4.13 - Duración de la longevidad.....	149
4.14 - Test de endósmosis positivo .....	151
4.15 - Espermatozoides con acrosomas intactos.....	153
4.16 - Espermatozoides con acrosomas alterados .....	154
4.17 - Espermatozoides sin acrosoma .....	156
4.18 - Coeficientes de correlación- análisis global .....	157
4.19 - Coeficientes de correlación- análisis seriado.....	157
4.20 - Resultados del test de CTC .....	162
4.21 - Parámetros de motilidad del semen refrigerado .....	162
4.22 - Diferencias significativas (ANOVA) .....	163
4.23 - Diferencias casi significativas (ANOVA) .....	163
4.24 - Coeficientes de correlación .....	163
4.25 - Características de los pools frescos.....	165
4.26 - Diluyentes de congelación utilizados en el experimento 2 .....	166
4.27 - Motilidad total visual .....	167
4.28 - Motilidad total .....	168
4.29 - Motilidad progresiva .....	168
4.30 - Velocidad curvilínea .....	169
4.31 - Velocidad rectilínea .....	170
4.32 - Velocidad promedio.....	170
4.33 - Índice de linealidad .....	171
4.34 - Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza.....	172
4.35 - Longevidad de la motilidad tras la descongelación en minutos.....	172
4.36 - Porcentaje de espermatozoides en relación con su viabilidad y estado acrosomal, en función de la preservación de sus membranas .....	173
4.37 - Espermatozoides vivos .....	174
4.38 - Coeficientes de correlación entre MTV y MTcompt .....	174
4.39 - Coeficientes de correlación entre MT compt y MP comp. ....	174
4.40 - Coeficientes de correlación entre % vivos obtenidos por CF y % vivos obtenidas por E-AA.....	175
4.41 - Características de los pools frescos.....	177
4.42 - Características de motilidad, viabilidad y actividad mitocondrial .....	178

4.43 - Porcentaje de células teñidas con marcadores fluorescentes según recuento por citometría (C) y por fluorescencia .....	178
4.44 - Intensidad obtenida (unidades arbitrarias) para el fluorocromo en la tinción con R123, PI y R123-PI .....	180
4.45 - Coeficientes de correlación entre células vivas, con actividad mitocondrial máxima y móviles .....	181
4.46 - Coeficientes de correlación entre células muertas, con actividad mitocondrial mínima y estáticas.....	181
4.47 - Coeficientes de correlación entre la ausencia de vitalidad y de actividad mitocondrial mínima.....	181
4.48 - Coeficientes de correlación entre la lectura por citometría (C) y fluorescencia (F).....	182
4.49 - Características de los pools frescos .....	183
4.50 - Diluyentes de congelación utilizados en el experimento 4 .....	184
4.51 - Motilidad total visual.....	185
4.52 - Motilidad total .....	185
4.53 - Motilidad progresiva .....	186
4.54 - Velocidad curvilínea.....	186
4.55 - Velocidad rectilínea.....	186
4.56 - Velocidad promedio .....	187
4.57 - Índice de linealidad.....	187
4.58 - Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza.....	188
4.59 - Duración de la longevidad post-descongelación .....	188
4.60 - Resultados tras marcaje con PI-PSA (T0 y T1:30): células muertas .....	190
4.61 - Resultados tras marcaje con PI-PSA (T0 y T1:30): células vivas .....	190
4.62 - Resultados tras marcaje de los espermatozoides con Rodamina-PI: células muertas.....	191
4.63 - Resultados tras marcaje con Rodamina-PI: células vivas.....	191
4.64 - Espermatozoides vivos tras tinción con E-AA .....	191
4.65 - Motilidad visual a T0 y T1:30 .....	192
4.66 - Coeficientes de correlación (células vivas) entre PI <sup>-</sup> , eosina/aa negativo, R <sup>+</sup> PI <sup>-</sup> y motilidad.....	193
4.67 - Porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados (0 μM de Ca <sup>2+</sup> ionóforo) .....	195
4.68 - Porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (0 μM de Ca <sup>2+</sup> ionóforo) .....	196
4.69 - Porcentaje de espermatozoides muertos reaccionados (0 μM de Ca <sup>2+</sup> ionóforo) .....	196

4.70 - Porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma intacto (0 $\mu\text{M}$ de $\text{Ca}^{2+}$ ionóforo) .....	196
4.71 - Diferencias para medias de RA entre distintos diluyentes y el diluyente control (0 $\mu\text{M}$ de $\text{Ca}^{2+}$ ionóforo).....	197
4.72 - Porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados (2,5 $\mu\text{M}$ de $\text{Ca}^{2+}$ ionóforo).....	197
4.73 - Porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (2,5 $\mu\text{M}$ de $\text{Ca}^{2+}$ ionóforo) .....	198
4.74 - Porcentaje de espermatozoides muertos reaccionados (2,5 $\mu\text{M}$ de $\text{Ca}^{2+}$ ionóforo).....	198
4.75 - Porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma intacto (2,5 $\mu\text{M}$ de $\text{Ca}^{2+}$ ionóforo) .....	198
4.76 - Diferencias entre RA de los distintos diluyentes y el diluyente control (2,5 $\mu\text{M}$ de $\text{Ca}^{2+}$ ionóforo).....	199
4.77 - Porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados (10 $\mu\text{M}$ de $\text{Ca}^{2+}$ ionóforo).....	200
4.78 - Porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (10 $\mu\text{M}$ de $\text{Ca}^{2+}$ ionóforo) .....	200
4.79 - Porcentaje de espermatozoides muertos reaccionados (10 $\mu\text{M}$ de $\text{Ca}^{2+}$ ionóforo).....	200
4.80 - Porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma intacto (10 $\mu\text{M}$ de $\text{Ca}^{2+}$ ionóforo) .....	201
4.81- Diferencias para RA entre los distintos diluyentes y el diluyente control (UE) (10 $\mu\text{M}$ de $\text{Ca}^{2+}$ ionóforo) .....	201
4.82 - Diferencias entre RA inducida con 2,5 $\mu\text{M}$ de $\text{Ca}^{2+}$ ionóforo y RA espontánea .....	202
4.83 - Diferencias entre RA inducida con 10 $\mu\text{M}$ de $\text{Ca}^{2+}$ ionóforo y RA espontánea .....	202
4.84 - Porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados (todos los diluyentes).....	203
4.85 - Porcentaje de células vivas (PI-) según la concentración de ionóforo .....	203
4.86 - Motilidad total postdescongelación .....	203
4.87 - Coeficiente de correlación entre acrosomas reaccionados y motilidad .....	204
4.88 - Coeficiente de correlación entre marcaje con PNA y con PSA .....	204

## Índice de esquemas

3.1 - Resumen de los protocolos de los experimentos 1.2 y 1.3 .....	92
3.2 - Protocolo del experimento 3: alícuotas y respectiva coloración .....	95
3.3 - Protocolo del experimento 4.2 .....	98

## Índice de gráficas

4.1 - Motilidad total y progresiva tras 7 días en refrigeración a 4°C .....	133
4.2 - Motilidad total visual.....	137
4.3 - Motilidad progresiva visual.....	139
4.4 - Motilidad total .....	141
4.5 - Motilidad progresiva .....	142
4.6 - Velocidad curvilínea .....	143
4.7 - Velocidad rectilínea.....	144
4.8 - Velocidad promedio .....	145
4.9 - Índice de linearidad.....	146
4.10 - Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza.....	147
4.11 - Duración longevidad espermática (días) .....	149
4.12 - Test de endósmosis positivo.....	150
4.13 - Espermatozoides con acrosomas intactos .....	152
4.14 - Espermatozoides con acrosomas alterados .....	152
4.15 - Espermatozoides sin acrosoma.....	155
4.16 - Motilidad total visual.....	166
4.17 - Motilidad total .....	167
4.18 - Motilidad progresiva .....	168
4.19 - Velocidad curvilínea .....	169
4.20 - Velocidad rectilínea.....	169
4.21 - Velocidad promedio .....	170
4.22 - Índice de linearidad.....	171
4.23 - Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza.....	171
4.24 - Longevidad de la motilidad tras la descongelación en minutos .....	172

4.25 - Porcentaje de espermatozoides según la viabilidad e integridad del acrosoma (T0)....	173
4.26 - Espermatozoides vivos .....	174
4.27 - Motilidad total visual .....	184
4.28 - Motilidad total .....	185
4.29 - Motilidad progresiva .....	185
4.30 - Velocidad curvilínea .....	186
4.31 - Velocidad rectilínea .....	186
4.32 - Velocidad promedio.....	187
4.33 - Índice de linealidad .....	187
4.34 - Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza.....	188
4.35 - Duración de la longevidad post-descongelación.....	188
4.36 - Viabilidad e integridad acrosomal (T0).....	189
4.37 - Viabilidad e integridad acrosomal (T1:30).....	189
4.38 - Viabilidad y actividad mitocondrial (T0).....	190
4.39 - Viabilidad y actividad mitocondrial (T1:30).....	190
4.40 - Espermatozoides vivos .....	191
4.41 - Motilidad visual a T0 y T1:30 tras descongelación .....	192
4.42 - Porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados (0 $\mu\text{M}$ de $\text{Ca}^{2+}$ ionóforo).....	195
4.43 - Porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados (2,5 $\mu\text{M}$ de $\text{Ca}^{2+}$ ionóforo).....	197
4.44 - Porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados (10 $\mu\text{M}$ de $\text{Ca}^{2+}$ ionóforo).....	199
4.45 - Motilidad total postdescongelación .....	203

# **1. INTRODUCCIÓN**



Desde que las asociaciones de criadores de perros de distintos países aprobaran el uso de semen congelado, la demanda de éste y de mejores técnicas de criopreservación han aumentado. Los beneficios de la utilización de semen congelado para propietarios y criadores de perros incluyen la posibilidad de envío de semen congelado a largas distancias con un coste reducido y de conservación por un largo periodo de tiempo, evitándose así las dificultades inherentes al transporte de los animales o de múltiples envíos de semen refrigerado. Para criadores de países con estrictas regulaciones de cuarentena, el hecho de poder obtener material genético proveniente de los mejores ejemplares a nivel mundial facilita la reproducción de perros (Linde-Forsberg y Forsberg, 1989). Mientras, han sido creadas compañías comerciales con el propósito de establecer bancos de semen canino que proporcionan semen de un conjunto de reproductores para el criador de perros, tanto profesional como aficionado. Estos bancos proporcionan igualmente un *pool* genético que puede ser utilizado en poblaciones de perros geográficamente aisladas y así evitar la consanguinidad y las enfermedades hereditarias (Morton y Bruce, 1989). En España, es relevante la contribución que la criopreservación de semen ha proporcionado en el ámbito de la preservación y estandarización de razas como el Alano Español y Bodeguero Andalúz.

La conservación de los espermatozoides y de su capacidad de fertilidad exige la reducción o interrupción del metabolismo celular. Este objetivo se consigue por medio de la refrigeración, o de la congelación, utilizando temperaturas reducidas que depriman el metabolismo. La refrigeración permite mantener la longevidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides por algunos días, sin que su metabolismo sea completamente abolido (Maxweell y Stojanov, 1996). Para periodos de conservación hasta 2 días, la calidad del semen refrigerado de perro es superior a la del semen descongelado, siendo esta apenas equivalente a los 4,9 días de refrigeración (England y Ponzio, 1996).

La congelación tiene, en comparación con la refrigeración, la ventaja de preservar el material genético por un periodo de tiempo indefinido. Sin embargo, es un proceso que destruye un porcentaje considerable de espermatozoides. Watson (1995) observó que la supervivencia post-descongelación se encontraba limitada al 50% de la población inicialmente viable, incluso en la presencia de las mejores técnicas de preservación. De ahí la necesidad de desarrollar técnicas de criopreservación más eficaces y de mejores metodologías sistemáticas para evaluar el espermatozoide criopreservado.

La congelación de semen de perro y respectiva inseminación artificial (IA) conocieron sus días en finales de los años 60 y inicios de los años 70 (Seager, 1969; Gill y *col.*, 1970; Andersen, 1972); en los primeros trabajos las técnicas de congelación y refrigeración han sido adaptadas de las técnicas utilizadas en las especies pecuarias. Posteriormente, los protocolos de congelación y la composición de los diluyentes han sido alterados y optimizados. La calidad pos-descongelación varía ampliamente entre perros y eyaculados, siendo referidas tasas de gestación de 39-51,1%, relativamente bajas en comparación a las de IA de semen fresco (Linde-Forsberg y Forsberg, 1993). Los estudios mas recientes, realizados bajo un estricto control del momento de ovulación mediante citología vaginal y medición de los niveles séricos de progesterona, refieren importantes tasas de nacimiento, alrededor del 70% (Thomassen y *col.*, 2001), o de 84% (Linde-Forsberg y *col.*, 1999; Rota y *col.*, 1999b).

La deposición intra-uterina del semen descongelado a través del uso del catéter transcervical escandinavo, pese a su dificultad técnica debido a la anatomía y posición del cérvix de la perra, produce índices de gestación superiores a la deposición intravaginal y está asociada a una mayor prolificidad (Fontbonne y Badinand, 1993). La causa de las bajas tasas de gestación subsecuentes a la deposición vaginal del semen puede estar atribuida a la reducida longevidad del espermatozoide descongelado (Ferguson y *col.*, 1989; England, 1993). Otras dificultades al éxito de la IA de semen congelado de perro comprenden la identificación del momento óptimo de fecundación para proceder a la IA, la realización de la deposición del semen a nivel intra-uterino y la variación en la calidad del semen descongelado entre distintos individuos (England, 1993).

Los daños que se producen en las membranas durante la refrigeración a 5°C y en la congelación son muchas veces sutiles y a veces difíciles de detectar utilizando análisis laboratoriales de rutina, pero son capaces de alterar severamente las funciones espermáticas, como es el caso de la capacidad de fecundación. Ambos procesos de conservación inducen fases de transición lipídica en la membrana plasmática del espermatozoide, causando alteraciones en su estabilidad y estructura que pueden lesionar la célula y disminuir su capacidad fecundante. También es reconocido que el glicerol, crioprotector habitualmente incorporado en los diluyentes de congelación, interfiere con la fertilidad (Concannon y Battista, 1989).

Por otra parte, la refrigeración y la congelación inducen una reducción en la proporción de células no-capacitadas y, pese a que sea preservada su viabilidad y motilidad, se trata de una población que está desestabilizada por el proceso de

preservación y que *in vivo* puede perder su capacidad fecundante antes de alcanzar el lugar de fecundación (Rota y col., 1999a).

En la investigación de las alteraciones morfológicas, bioquímicas y funcionales provocadas por los procesos tecnológicos a que las células están sujetas durante la congelación y descongelación se utilizan varios métodos. Los análisis laboratoriales de rutina suelen determinar el porcentaje de espermatozoides móviles en una muestra o el porcentaje de células vivas o de células con acrosomas normales. Estas pruebas presentan un valor predictivo de la fertilidad algo variable. La relación entre calidad seminal y fertilidad en el perro es escasa (Linde-Forsberg, 1995). Los exámenes laboratoriales que evalúan cada compartimiento del espermatozoide individualmente pueden no ser previsores efectivos de la fertilidad de una muestra (Graham y col., 1990). Sin embargo, los análisis laboratoriales que evalúan múltiples características del espermatozoide pueden proporcionar una evaluación más exacta de la totalidad de las funciones espermáticas y proporcionar una mejor predicción del potencial fecundante de una muestra (Amann y Hammerstedt, 1993).

La microscopía óptica suele ser utilizada para evaluar la viabilidad espermática y la integridad acrosomal. El deterioro morfológico de las estructuras del espermatozoide inducido por la refrigeración o congelación puede ser analizado mediante microscopía electrónica (Rodríguez-Martínez y col., 1993), o utilizando técnicas de coloración como el Spermac<sup>®</sup>, una coloración metacromática que parece presentar la ventaja de que las características del diluyente no afectan a la calidad de las extensiones, además, el fondo no adquiere el tono de la coloración (Oettlé, 1986b).

Sin embargo, algunos de estos procedimientos exigen una extensa preparación de la muestra e implican un examen prolongado que, además, resulta en la evaluación de a penas algunas centenas de espermatozoides en una muestra. Adicionalmente, el glicerol (que frecuentemente se emplea en la congelación de semen) puede interferir con las propiedades de coloración de las tinciones supravitales, como la eosina, nigrosina y azul de anilina. Los espermatozoides de algunas especies poseen acrosomas muy pequeños, lo que hace la evaluación por microscopio óptico muy difícil (Wilhelm y col., 1996).

Recientemente han sido utilizados en la monitorización de la viabilidad, funcionalidad e integridad de las distintas estructuras de los espermatozoides un determinado número de moléculas fluorescentes. Los marcadores fluorescentes

aumentan la capacidad de distinguir células teñidas positiva y negativamente y han sido validadas para el perro recientemente (Peña y col., 1998d; 1999a). Los anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos y las lectinas marcadas con fluoresceína, que se unen a los contenidos y membranas acrosomales, pueden ser utilizados para monitorizar la integridad acrosomal de los espermatozoides.

Los marcadores fluorescentes permiten el recurso a la citometría de flujo para evaluar los diversos atributos de cada célula individualmente como -la viabilidad, -la estructura cromosómica, -la función mitocondrial, así como de múltiples características simultáneamente, incluyendo -la evaluación simultánea de la viabilidad celular y de la función mitocondrial, - la viabilidad celular y la integridad acrosomal o, por otra parte, -la viabilidad, -la función mitocondrial y -el estado acrosomal (Graham, 2001). El mejor aval es número de células que permite analizar por muestra puesto que es considerablemente superior al de la microscopia de fluorescencia.

Por otra parte, se constata que durante los últimos años han sido desarrolladas pruebas funcionales *in vitro* con el objetivo de detectar la integridad del acrosoma y de la membrana plasmática. Estas pruebas pueden ser empleadas para monitorizar la reacción acrosómica y la capacidad fecundante del espermatozoide antes o después de los procesos de congelación y descongelación o inducción de la capacitación *in vitro* (Szász y col., 2000b). Como posibilidades para inducir la RA en los espermatozoides de mamíferos tenemos la utilización de calcio ionóforo, *zona pellucida*, progesterona, heparina. Uno de los obstáculos en la detección de RA se sitúa en la dificultad de observar la pérdida del acrosoma en espermatozoides vivos por microscopia de contraste de fases y, por tanto, en diferenciar la pérdida degenerativa acrosomal que acompaña la muerte del espermatozoide, de la RA verdadera (Mendoza y col., 1992).

Los estudios en el espermatozoide humano indican que la correlación entre la reducción o ausencia de respuesta a la inducción de la RA mediante incubación con calcio ionóforo y sub-fertilidad es significativa (Cummins y col., 1991). En el perro, los primeros estudios acerca de la capacitación y fertilización *in vitro* datan del 1978 (Mahi y Yanagimachi, 1978), pero en los 10 años posteriores no se produjo avance alguno en este tema (Shimazu y col., 1992). Actualmente está establecido que, en esta especie, la respuesta inducida por el calcio ionóforo se traduce por un elevado porcentaje de RA, comparativamente a otras especies, pese a que este proceso sea dependiente de la concentración de calcio existente en el medio (Szász y col., 2000b).

La investigación en la criopreservación de semen de perro debe pasar por la evaluación de distintos crioprotectores y de agentes tampón, la determinación exacta de las tasas de refrigeración, congelación y descongelación, el uso de diluyentes de descongelación y por la evaluación de varios aditivos, como detergentes. Estos conocimientos deben conducir a mejoras en la viabilidad y preservación de la morfología acrosomal postdescongelación, así como aportar una correcta evaluación de las funciones espermáticas, como las funciones de la membrana y la habilidad de fecundación a través de, por ejemplo, análisis de fertilidad *in vitro* (England, 1993). Debe aún existir un esfuerzo en el sentido de la estandarización de las técnicas de refrigeración y congelación de semen de perro, en los métodos de análisis de la calidad seminal y en el desarrollo de los instrumentos necesarios a la deposición intrauterina de semen (Brown, 1992).

Se estudian actualmente los efectos de la incorporación de algunos aditivos en los diluyentes de preservación de semen de perro, como es el caso de algunos aminoácidos al diluyente de congelación (Peña y col., 1998a) y detergentes (Rota y col., 1997; Peña y col., 1998c), azúcares (Yildiz y col., 2000) o la pentoxifilina (Koutsarava y col., 1997).

Estas premisas nos han hecho estudiar otras posibilidades de mejora en la conservación del semen, tanto en refrigeración como en congelación. Basándonos en un amplio estudio bibliográfico, hemos desarrollado este trabajo encaminado a ver el posible efecto mejorante de algunos aminoácidos en la refrigeración, así como del etilenglicol y de aminoácidos en la congelación; efectos que han sido monitorizados por técnicas específicas como se describe en el apartado de material y métodos.

## 1.1. Objetivos

### Objetivo general

Estudiar los efectos que la incorporación de determinados crioprotectores, a los diluyentes de refrigeración y congelación del semen canino, presenta sobre la motilidad espermática, integridad de la membrana plasmática y acrosomal, capacitación, capacidad de reacción acrosómica y funcionalidad mitocondrial.

### Objetivos específicos

Los objetivos específicos de este trabajo han sido:

1. Analizar el impacto sobre la conservación del semen de la adición de distintas concentraciones de aminoácidos al diluyente de refrigeración Tris-Fructosa-Ácido cítrico-yema de huevo y determinar que concentración de Taurina permite óptimos resultados utilizando bajas proporciones de yema.
2. Valorar si el empleo de Etilenglicol como crioprotector en el diluyente de congelación, solo o en combinación con glicerol o Pasta Equex STM, mejora la calidad post descongelación del semen conservado a  $-196^{\circ}\text{C}$ .
3. Evaluar los efectos de la adición al diluyente de congelación de los aminoácidos Taurina e Hipotaurina sobre la calidad del semen descongelado y su influencia en la capacidad de los espermatozoides para sufrir reacción acrosómica inducida.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



## 2.1. Principios generales de la criopreservación de semen

La preservación del semen en diversas especies es un importante campo de investigación, tanto para facilitar las posibilidades de reproducción de diversos individuos y así salvaguardar las características genéticas encaminadas a la mejora de las especies, como para la conservación de muchas especies y razas que están en extinción o cuentan con pocos ejemplares.

Como sabemos, el proceso de refrigeración forma parte del proceso de congelación del semen; sin embargo, también puede utilizarse como método de conservación a corto plazo para lo que necesita medios diluyentes adecuados que deben contener componentes específicos, es decir, una solución tampón, sales, azúcares y sustancias que aporten una cierta protección de la membrana contra el descenso de temperatura, como la yema de huevo. A diferencia de la refrigeración del semen, el proceso de congelación necesita también del empleo de un agente crioprotector que permita un descenso mayor de la temperatura. Desde el descubrimiento del glicerol como agente crioprotector efectivo (Polge y col., 1949) y del establecimiento de las técnicas básicas de criopreservación, el semen de una variedad de especies se congela y utiliza con éxito en la inseminación artificial. Sin embargo y con excepción de los bóvidos, la utilización generalizada de semen congelado no se ha extendido a las otras especies domésticas (Parks y Graham, 1992; Holt, 2000), en parte porque los protocolos de congelación no proporcionaron resultados aceptables de fertilidad (Parks y Graham, 1992). Las diferencias entre especies se deben principalmente a diferencias en la fisiología y la bioquímica del espermatozoide y, también, a las variaciones en la anatomía y fisiología del tracto reproductor femenino que dan lugar a importantes diferencias en las características del transporte espermático (Holt, 2000).

La reducción de la temperatura por debajo de los 37°C y, principalmente, de los 20°C induce una serie de alteraciones de naturaleza biofísica en el espermatozoide (Amann y Pickett, 1987). El mayor desafío para las células en el proceso de congelación no es resistir a las bajas temperaturas del nitrógeno líquido, sino mantener la viabilidad en un rango de temperaturas, entre los -15 y -60°C, que las células experimentan por dos ocasiones, es decir, durante la congelación y durante la descongelación. A -196°C no se producen reacciones térmicas, puesto que debajo de los -130°C no existe agua en el estado líquido (Mazur, 1984).

Con el enfriamiento de la suspensión celular por debajo de los 0°C, se producen una serie de procesos nocivos para la célula que comienzan con la formación de hielo en el

compartimento extra-celular. La membrana plasmática actúa como barrera, impidiendo la expansión de los cristales de hielo del medio exterior hacia el compartimento intra-celular (Watson, 1979). Las sales no forman parte de los cristales de hielo, de modo que habrá una considerable concentración de sales en la porción remanente del agua no-congelada. El aumento del gradiente osmótico a través de la membrana plasmática provoca la difusión del agua intra-celular hacia el ambiente extra-celular, causando deshidratación de la célula y de la membrana plasmática (Amann y Pickett, 1987). Por tanto la deshidratación osmótica, más que la formación de hielo intra-celular, es la principal causa de las alteraciones ultra-estructurales de la membrana y una de sus consecuencias es la pérdida de la selectividad de la membrana (Parks y Graham, 1992).

Cuando las células están sujetas a temperaturas inferiores a 0°C, inicialmente “súper-refrigeran”. El modo en que recuperan el equilibrio depende del ritmo de refrigeración y de su permeabilidad al agua. Si el ritmo de enfriamiento es lento o si la permeabilidad al agua es elevada, las células se equilibran por la transferencia del agua intra-celular hacia el hielo externo, o sea, se equilibran por deshidratación; pero si son refrigeradas rápidamente o si su permeabilidad al agua es baja, éstas se van equilibrar, en parte, por congelación intra-celular (Mazur, 1970). El ritmo de enfriamiento debe, por tanto, tener en cuenta estos fenómenos (Amann y Pickett, 1987).

La presencia de hielo extra-celular, aunque puede deformar las células, no causa ruptura de la membrana plasmática ni tampoco daños irreversibles (Watson, 1979). Por el contrario, la formación intra-celular de cristales de hielo provoca lesión y muerte de la célula. Dado que la formación de hielo intra-celular es dependiente del ritmo de congelación y descongelación, el estricto control del ritmo del descenso y del aumento de la temperatura puede minimizar las lesiones celulares causadas por el hielo intra-celular. Sin embargo, si el ritmo de congelación es extremadamente rápido el hielo intra-celular constituye micro-cristales y los daños derivados son muy reducidos (Amann y Pickett, 1987).

El éxito final de un procedimiento de congelación está condicionado por el proceso de descongelación. Si el ritmo de enfriamiento es rápido, el de calentamiento también lo debe ser; alternativamente, si el ritmo de enfriamiento es lento también debe serlo el de calentamiento. Las células que contienen micro-cristales de hielo intra-celulares deben ser re-calentadas muy rápidamente a fin de evitar la re-cristalización de estos pequeños cristales, en grandes cristales que pueden dañar las células (Amann y Pickett, 1987).

El proceso de criopreservación incluye 5 etapas: dilución, refrigeración, adición del crioprotector, congelación y descongelación. Mientras que algunas fases son relativamente inocuas, otras son muy estresantes, como es el caso de la refrigeración y la congelación (Watson, 1995). Cada etapa del protocolo ejerce una interacción especial con la estructura, la función de la membrana y con el metabolismo celular (Hammerstedt y *col.*, 1990); pudiendo el espermatozoide perder su capacidad de funcionar normalmente en cualquiera de estas etapas (Watson, 1995). Por otra parte, dichas etapas del protocolo de congelación se influyen mutuamente, así que los ritmos de cambio de temperatura elegidos en una determinada etapa del proceso afectan directamente a los que se utilizarán en la etapa siguiente (Hammerstedt y *col.*, 1990). Es por tanto que el logro de una longevidad celular máxima, requiera que el ritmo de descongelación esté en concordancia con el ritmo apropiado de congelación (Mazur, 1984).

La mayor parte de los estudios de criopreservación han sido empíricos, comparando la eficacia de distintos tratamientos a través de pruebas de supervivencia *in vitro* (Watson y *col.*, 1992). El resultado de un protocolo de criopreservación depende de una serie de factores como la composición del diluyente y la concentración del crioprotector, el ritmo de refrigeración y de congelación, y el ritmo de descongelación (Mazur, 1984). Idealmente, estos pasos deberían reducir al mínimo los daños celulares y asegurar una adecuada longevidad *in vivo* e *in vitro* (Farstad, 1996). No obstante y a pesar de los progresos en los protocolos de criopreservación, los datos de motilidad y de integridad de la membrana indican que solo cerca del 50% de las células sobreviven al proceso de congelación (Curry, 2000).

Durante algún tiempo, se ha asumido que los espermatozoides que sobrevivían a los procesos de refrigeración, congelación y descongelación eran semejantes a las células precongeladas, es decir, que no se verían afectados por los tratamientos de conservación. Sin embargo, Watson (1995) advierte que los espermatozoides supervivientes presentan características diferentes a las que tenían antes de la congelación; lo que corrobora tras observar que, utilizando mismo número de espermatozoides en inseminación artificial, los espermatozoides criopreservados proporcionan niveles de fertilidad más reducidos que el semen fresco (Watson, 1996). Asimismo, la evidencia de que la motilidad del semen descongelado se mantiene durante menos tiempo, en comparación con la del semen no-congelado, permite concluir que los espermatozoides descongelados son menos resistentes y que el proceso de congelación altera las membranas (Parks y Graham, 1992).

La membrana plasmática del espermatozoide está altamente compartimentada, y en cada compartimiento presenta una composición y organización característica, lo que origina propiedades físicas y funciones distintas (Holt, 1984). Así, cada compartimiento es susceptible a las variaciones de temperatura y a los daños provocados por la congelación de un modo diferente (Hammerstedt y *col.*, 1990; Parks y Graham, 1992).

Para Parks y Graham (1992), la conservación de dichos compartimentos resulta crítica para las funciones del espermatozoide, ya que cada uno asume una función muy específica en la fecundación. Estos compartimentos son principalmente: *la red mitocondrio-flagelar* (importante en el metabolismo y motilidad del espermatozoide), *el núcleo* (necesario para el almacenamiento estable del ADN), *la cabeza* (de cual destaca la porción anterior, fundamental para la apropiada activación acrosómica) y *el segmento posterior* (imprescindible para la unión espermatozoide-ovocito).

La refrigeración y la congelación son acontecimientos que pueden conducir a la muerte o bien a alteraciones funcionales del espermatozoide. Las lesiones causadas en la membrana y en los distintos orgánulos del espermatozoide derivan de dos de los principales motivos de estrés de la criopreservación: *-las alteraciones de la temperatura y - la formación y disolución de los cristales de hielo* (Watson, 1995). Además de la cristalización, también están implicadas alteraciones osmóticas, que conducen a daños celulares evidentes (Homfy y Berg, 1989). En consecuencia, la motilidad y la integridad acrosómica disminuyen de modo significativo, tras la congelación y la descongelación.

## **2.2. Impacto de la refrigeración y la congelación en la estructura y función espermáticas**

La reducida fertilidad del semen descongelado se atribuye principalmente a las alteraciones en la estructura y función de la membrana durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación (Parks y Graham, 1992). En trabajos realizados con eyaculados de morueco, se observa que tras el proceso de congelación y descongelación solamente entre el 40 y 60 % de los espermatozoides preservan su motilidad, aunque a penas un 20-30% se mantienen biológicamente íntegros. Ésto es indicativo de que la motilidad y la estructura del espermatozoide se afectan en distinto grado, desconociéndose si las alteraciones se producen simultáneamente o en distintas fases del proceso de congelación y descongelación (Salamon y Maxwell, 1995).

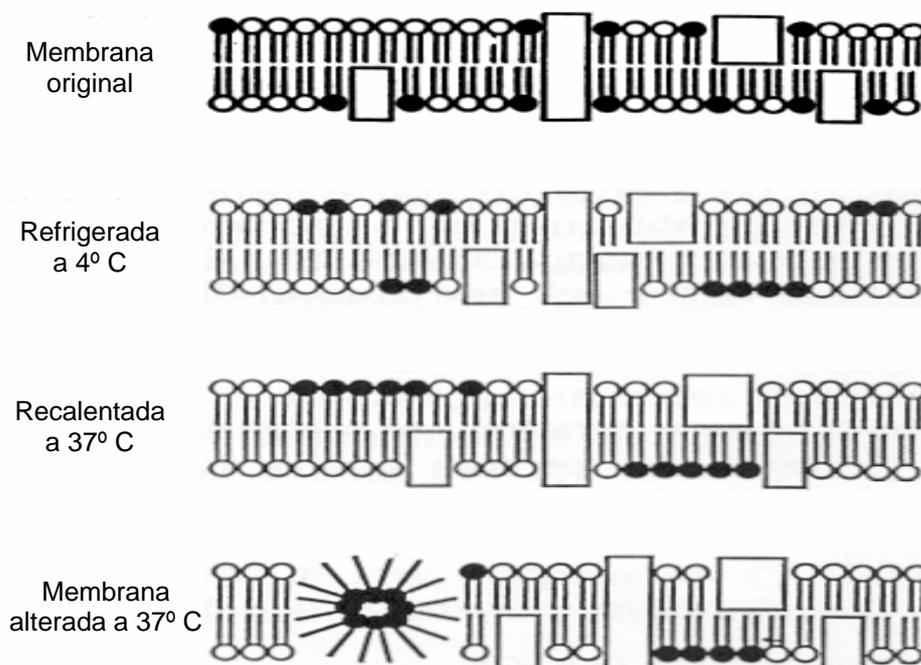
### 2.2.1. Susceptibilidad al choque térmico

Uno de los problemas más evidentes en los procesos de conservación del semen es el conjunto de alteraciones en el espermatozoide, designadas colectivamente como “**choque térmico**”. Dichas alteraciones se ponen en evidencia por la pérdida irreversible de viabilidad que se produce cuando el espermatozoide se enfría rápidamente a 0°C y cuya señal más evidente es la pérdida de motilidad tras el calentamiento (Quinn y White, 1966); observándose movimientos circulares de los espermatozoides y pérdida precoz de la motilidad. Además se observan otras lesiones como son la disminución de la producción energética y el aumento de la permeabilidad de la membrana (Watson, 1981a). Debido a este fenómeno, la refrigeración previa a la congelación se lleva habitualmente a cabo con mucha precaución, de modo que el enfriamiento se realiza lentamente, aunque esto no evita que los cambios de temperatura originen alteraciones en las membranas (Watson, 2000).

La bibliografía consultada demuestra que el espermatozoide se hace susceptible al choque térmico en la región proximal del cuerpo del epidídimo, cuando la gota citoplasmática se mueve en dirección a la porción distal de la pieza intermedia; por tanto, durante la maduración del espermatozoide en el epidídimo, éste adquiere la motilidad pero también la susceptibilidad al choque térmico (White, 1993).

Existen evidencias de que el choque térmico y las lesiones irreversibles asociadas resultan de alteraciones en la organización de los lípidos de la membrana del espermatozoide o **fases de transición lipídica** (Drobnis y col., 1993). A la temperatura fisiológica, los fosfolípidos de membrana están en un estado más o menos fluido y sus cadenas de ácidos grasos son flexibles (De Leeuw y col., 1990). Se sabe que algunos lípidos de la membrana del espermatozoide, los *lípidos no-bicapa*, asumen una disposición hexagonal, estando implicados en la formación de un anillo alrededor de las proteínas que integran la membrana (Parks y Graham, 1992). Así que, la temperatura de la membrana disminuye por debajo de la temperatura de transición de cada uno de los fosfolípidos individuales que la componen. Éstos sufren la fase de transición termotrópica del estado líquido-cristalino al estado gel, comenzando a agregarse (Quinn, 1989). Concretamente, las cadenas de ácidos grasos toman rigidez y se aíslan en dominios de gel, de los cuales son excluidas las proteínas de la membrana que se concentran en áreas fluidas; como se ha demostrado mediante microscopía electrónica (De Leeuw y col., 1990). Este fenómeno afecta las funciones de las proteínas, por ejemplo, en los canales proteicos iónicos (Watson, 2000).

Los lípidos no-bicapa son los que probablemente sufren en primer lugar la fase de transición, agregándose en micro-dominios de gel bi-capa. Tras la refrigeración y principalmente tras el calentamiento, los micro-dominios de lípidos bi-capa no restablecen las asociaciones con los restantes componentes de membrana y las regiones resultantes de agregados hexagonales pueden potencialmente desestabilizar la membrana (Quinn, 1989). La re-organización de los lípidos perturba principalmente las asociaciones normales lípido-lípido y lípido-proteína que son imprescindibles para una función normal de la membrana (Parks y Graham, 1992). La disposición anormal de los fosfolípidos puede permitir la rápida entrada de moléculas que en situaciones normales atravesarían la membrana lentamente (Amann y Pickett, 1987). Tras la descongelación, la capacidad de fusión y las respuestas de la membrana a las señales de transducción pueden también verse alteradas, lo que conduce a la capacitación precoz y, en consecuencia, a la reducción de la longevidad del semen tras la descongelación (Watson, 1995). La figura 2.1 muestra la estructura de la membrana plasmática del espermatozoide y las alteraciones que sufre por el choque térmico.



**Figura 2.1.** Estructura de la membrana celular del espermatozoide y de las alteraciones inducidas por el choque térmico (Tomado de Serres, 2003).

La susceptibilidad al choque térmico varía con las especies, considerándose los espermatozoides de toro y de cerdo entre los más sensibles donde se manifiesta por marcadas alteraciones en el movimiento de iones, con acumulación de  $Ca^{2+}$  y pérdidas de  $K^+$  y  $Mg^{2+}$ . Por el contrario, los espermatozoides del hombre, aves, perro y conejo no evidencian

alteraciones tan marcadas (Quinn y White, 1966). Además en los espermatozoides de toro y cerdo se ha detectado acumulación de  $\text{Na}^+$  (De Leeuw y col., 1990).

Algunos constituyentes de la membrana espermática son altamente importantes en el grado de susceptibilidad de los espermatozoides de las distintas especies al choque térmico, esto es, los fosfolípidos y los ácidos grasos (Poulos y col., 1973; Darin-Bennett y col., 1974). De hecho, espermatozoides de toro, cerdo y morueco, conocidos por su elevada susceptibilidad al choque térmico, presentan una elevada *ratio* entre ácidos grasos poliinsaturados y saturados de aproximadamente 2,5-3,3, mientras que espermatozoides de conejo y hombre presentan una *ratio* de 1. Dicha *ratio* tiene un efecto significativo en algunas propiedades de los sistemas de membrana y está correlacionado con la sensibilidad del espermatozoide al choque térmico (Poulos y col., 1973). Asimismo, comparando la composición de fosfolípidos y de ácidos grasos de la membrana espermática de animales considerados como relativamente resistentes al choque térmico, como es el caso del perro y del gallo, se han observado también algunas diferencias en las proporciones relativas de estos componentes. Sin embargo, la composición en aldehídos y la *ratio* ácidos grasos poliinsaturados/saturados son semejantes en ambas especies, de aproximadamente 1 (Darin-Bennett y col., 1974).

Otro factor también correlacionado con la susceptibilidad del espermatozoide al choque térmico es la *ratio* colesterol/fosfolípidos, habiéndose observado que una *ratio* superior a 0,5 confiere una mayor resistencia al choque térmico. Dadas las propiedades del colesterol en la estabilidad e impermeabilidad de la membrana y en el control de la fluidez de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, éste proporciona una estructura cohesionada en un determinado rango de temperaturas. El colesterol existente en el espermatozoide de toro y de morueco es la mitad del existente en el espermatozoide del conejo o del hombre (Darin-Bennett y White, 1977). El papel inhibitorio del colesterol en la desestabilización del acrosoma quedó probado en el trabajo de Cross (1996), quien identifica al colesterol como el agente del plasma seminal que decapacita los espermatozoides. En el espermatozoide humano se observó durante el choque térmico una pérdida relativamente menor de  $\text{K}^+$ , que se consideró como una señal característica de las lesiones del choque térmico, así como un menor descenso de la motilidad; hecho coexistente con el contenido particularmente elevado en colesterol de su membrana (Drobnis y col., 1993).

En resumen, estos datos sugieren una fuerte relación entre las *ratios* mencionadas y la reacción al choque, variable según la especie, pese a la heterogeneidad de la membrana del espermatozoide (Darin-Bennett y White, 1977) y a la especialización de las membranas

plasmáticas y acrosomales en zonas o dominios (Holt, 1984), lo que dificulta el establecimiento de generalizaciones.

## **2.2.2. Alteraciones morfo-funcionales derivadas de la refrigeración y la congelación**

### **2.2.2.1. Refrigeración**

Los principales daños celulares inducidos por la **refrigeración** incluyen alteraciones morfológicas como ruptura de la membrana plasmática (principal estructura afectada durante la refrigeración), degeneración acrosomal y lesiones en las mitocondrias (De Leeuw y *col.*, 1990). La pérdida de las propiedades de selectividad en la permeabilidad de la membrana es uno de los hechos que más precozmente se producen en el proceso (Quinn y *col.*, 1980), y que, como hemos visto, está asociada a las fases de transición de los lípidos de la membrana debidas al choque térmico (Watson, 1981a; 1995; Drobnis y *col.*, 1993). Esta pérdida de selectividad puede observarse mediante tinción intra-celular con colorantes incapaces de atravesar la membrana cuando ésta permanece intacta (Medeiros y *col.*, 2002). En el cerdo, los daños en la membrana plasmática del espermatozoide asociados a la criopreservación están atribuidos a la refrigeración de las células hasta 5°C, más que a los procesos de congelación-descongelación (Maxwell y Johnson, 1997). En el toro, la dilución y refrigeración a 5°C provocan edema del acrosoma en el 50% de los espermatozoides (Jones y Stewart, 1979). La actividad respiratoria del espermatozoide disminuye, así como la glucólisis, lo que provoca una reducción en los niveles de ATP y por ello, la pérdida de la motilidad. Por otra parte, el ADN sufre degeneración. Las alteraciones bioquímicas del espermatozoide están causadas sobretodo por la pérdida de la selectividad de la membrana y por la pérdida de enzimas y de fosfolípidos (De Leeuw y *col.*, 1990).

La refrigeración anticipa las modificaciones de la membrana plasmática que normalmente se producen durante la capacitación (Watson, 1995); observándose un incremento en la tendencia de las células a mostrar patrones típicos de los estadios de capacitación, cuando son teñidas con colorantes específicos. Estos datos indican que la refrigeración induce un estadio equivalente a la capacitación (Watson, 1996; Green y Watson, 2001); fenómeno también observado a nivel de la reactividad y de la fluidez de la membrana y en las concentraciones celulares de iones, como es el caso del  $\text{Ca}^{2+}$ , ya aludido (Green y Watson, 2001). Además, el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular durante la refrigeración contribuye a las alteraciones de capacitación y al fenómeno de fusión entre las membranas plasmática y acrosomal externa (Watson, 2000).

Sin embargo, estas alteraciones no reflejan la totalidad de los cambios detectados durante la capacitación *in vitro*, dando lugar a un estado de capacitación “intermedia”. Estos espermatozoides muy probablemente no permanecerían viables el tiempo suficiente para alcanzar el lugar de fecundación y por eso, no proporcionarían porcentajes de fertilidad normales *in vivo* (principalmente cuando son inseminados en el tracto genital posterior). Por otra parte, podrían sufrir la reacción acrosómica precoz y serían incapaces de fecundar el ovocito (Green y Watson, 2001).

#### 2.2.2.2. Congelación

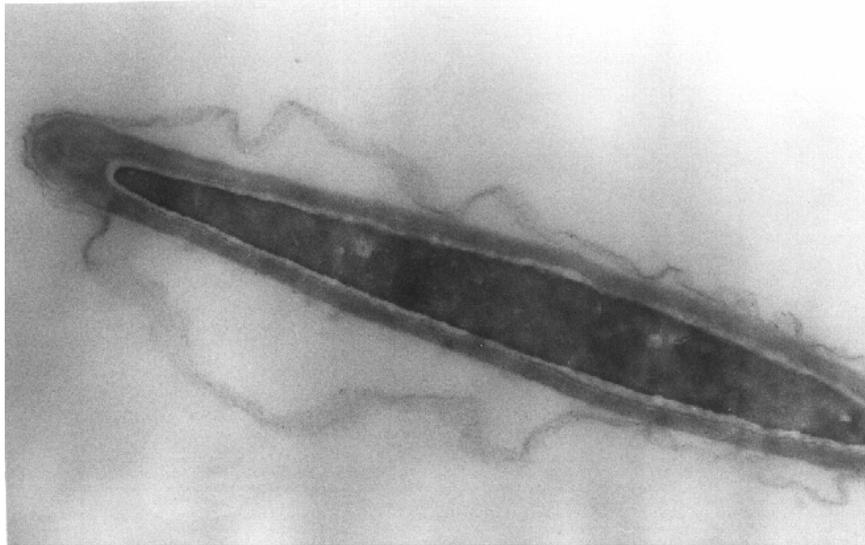
En cuanto a los daños sufridos tras la **congelación**, Salamon y Maxwell (1995), esclarecen que las membranas plasmática y acrosomal son más sensibles que el núcleo y que la porción intermedia; y que en el acrosoma, la membrana externa es más vulnerable que la membrana interna y que su contenido, es decir, que el acrosoma propiamente dicho.

Las principales situaciones de *estrés* para las **membranas** en los procesos de congelación y descongelación son de tipo térmico, mecánico, químico y osmótico; incluyendo: -la adición del crioprotector antes de la congelación, -las alteraciones del volumen de la célula, -las contracciones y expansiones de la membrana, en respuesta a las soluciones hiperosmóticas crioprotectoras, -la deshidratación derivada de la congelación, -las fases de transición de los fosfolípidos de membrana, así como -los efectos de la elevada concentración de solutos y -la formación intra-celular de hielo (Parks y Graham, 1992). En consecuencia, los daños en la membrana del espermatozoide incluyen alteraciones en su organización, fluidez, permeabilidad y en su composición lipídica (Watson, 1995). Además de estos cambios se produce la pérdida de algunas proteínas de la membrana durante estos procesos de congelación y descongelación (Ollero y *col.*, 1998a).

La microscopía electrónica evidencia la pérdida de la integridad de la membrana, constatada por plegamientos de la membrana plasmática que rodea la región acrosómica y la región intermedia (fotografía 2.1). También se ha observado la ruptura de la membrana plasmática (Rodríguez-Martínez y *col.*, 1993).

En el acrosoma, las lesiones son más marcadas tras la descongelación, pero ya empiezan a evidenciarse tras la dilución, refrigeración y equilibrio (Oettlé, 1986a). Éstas alteraciones originan un edema en su porción anterior, que la microscopía electrónica muestra como expansiones de la matriz acrosomal en forma de pliegues y proyecciones.

Parece ser que la membrana acrosomal externa se puede dilatar para cubrir el aumento del área acrosomal (Aalseth y Saacke, 1985).



**Fotografía 2.1.** Formación de repliegues de la membrana plasmática; espermatozoide canino (microscopía electrónica, 20000 aumentos).

El espermatozoide de morueco parece presentar más edema que pérdida de material acrosomal, por lo que las lesiones parecen estar restringidas sobretodo a las zonas apicales sin afectar a las zonas lisas del acrosoma. La microscopía electrónica, además del edema, permite visualizar una reducción en la densidad del material existente en el interior de esta estructura (Quinn y col., 1969). Sin embargo, en la especie bovina, se ha sugerido que puede producirse ruptura de la membrana plasmática que cubre el acrosoma y de la membrana acrosomal externa, con dispersión del contenido acrosomal en una elevada proporción de espermatozoides (Jones y Steward, 1979).

Los daños acrosomales de muchas células, incluyendo la región ecuatorial, se manifiestan por la vesiculación acrosómica, conocida como reacción acrosómica “falsa” o por degeneración celular (fotografía 2.2). Esta reacción consiste en la pérdida del acrosoma debido a la desintegración de las membranas acrosomal y plasmática durante la muerte celular y, a diferencia de la reacción acrosómica “verdadera” o fisiológica, estos espermatozoides no representan la población espermática con posibilidades de fertilizar ovocitos (Way y col., 1995). En ocasiones, la membrana plasmática del espermatozoide permanece intacta. Esta preservación de la membrana plasmática en casos en que el acrosoma se presenta altamente modificado, es un aspecto notable. Este hecho puede contribuir a la detección errónea de un bajo porcentaje de anomalías acrosómicas cuando se

utiliza, como método de evaluación de la morfología espermática, un equipo básico como el microscopio de contraste de fases (Rodríguez-Martínez y col., 1993).



**Fotografía 2.2.** Presencia de vesículas acrosomales; espermatozoide canino (microscopía electrónica; 40000 aumentos) .

En la pieza intermedia se observó pérdida de la matriz mitocondrial con evidencia de disminución en la densidad eléctrica de la matriz (Quinn y col., 1969; Jones y Steward, 1979). Esta pérdida de material de las mitocondrias es esencialmente de naturaleza proteica y no está acompañada por alteraciones en la membrana plasmática que envuelve la pieza intermedia o en la morfología de las criptas mitocondriales (Quinn y col., 1969). Sin embargo, Jones y Steward (1979) observaron ruptura de la membrana plasmática al nivel de la pieza intermedia, que junto con la pérdida de matriz mitocondrial, no habían sido observadas en la refrigeración. En cuanto a los filamentos axiales y a las fibrillas, Quinn y col. (1969), afirman que éstos mantienen íntegramente su forma y densidad, tanto en la pieza intermedia como en la parte proximal de la pieza principal.

Los trabajos de Homfo y Berg (1989), sobre espermatozoides de zorro, han sistematizado las distintas alteraciones morfológicas detectadas por la microscopía electrónica en tres categorías principales, de acuerdo con la estructura afectada y el grado de lesión. Así, han considerado una primera categoría, en la cual se constatan discretas alteraciones en la membrana plasmática, pero acompañada de vesiculación y de desprendimiento de la membrana acrosómica externa. La segunda categoría, la más frecuente según los autores, consiste en una pronunciada vesiculación de la membrana acrosómica externa y desintegración de la membrana plasmática en el área proximal al

segmento ecuatorial; en esta categoría, la densidad de la matriz acrosomal se encuentra disminuida. Por último, la tercera categoría, consiste en una extensa pérdida de la membrana plasmática y ausencia total de la membrana acrosómica externa.

El microanálisis mediante el sistema de microscopía electrónica por excitación de rayos X, en el espermatozoide de perro, pone de manifiesto una marcada disminución en la cantidad de la mayor parte de los elementos que componen la cabeza del espermatozoide, principalmente en las concentraciones de fósforo y sulfato, lo que sugiere alteraciones de la cromatina durante el proceso de criopreservación (Rodríguez-Martínez y col., 1993). También se producen alteraciones significativas en los elementos constituyentes de la región post-acrosómica de la cabeza del espermatozoide, siendo notable la disminución de los niveles de potasio. Las alteraciones acrosómicas observadas en una elevada proporción de los espermatozoides, y la alteración en la composición de las cabezas sugiere que las modificaciones inducidas por la criopreservación pueden afectar a su longevidad y a su capacidad fertilizante (Ström-Holst y col., 1998).

Las lesiones ultra-estructurales del espermatozoide durante la congelación y la descongelación se acompañan de alteraciones bioquímicas y de la pérdida de algunos constituyentes vitales (Salamon y Maxwell, 1995). La pérdida de enzimas en el proceso de congelación está asociada al declive de la actividad metabólica (Watson, 1981a) y se refleja especialmente en las transaminasas ALT y AST, en la hidrogenasa y la deshidrogenasa láctica (Singh y col., 1996). La determinación de enzimas ha sido utilizada para evaluar la integridad de las estructuras del espermatozoide tras la congelación (Pace y col., 1981) y tras la exposición a tratamientos con compuestos que inducen la disolución de la membrana del espermatozoide y del acrosoma (Churg y col., 1974).

Otro aspecto de la función espermática afectado por la congelación es el proceso de capacitación. El espermatozoide congelado y descongelado puede desarrollar reacción acrosómica y fecundación con más rapidez que un espermatozoide fresco no-capacitado (Watson y col., 1992); presentando un estado semejante a la capacitación que contribuye a su reducida longevidad y su rapidez en penetrar los ovocitos sin incubación (Watson, 1995). Una vez capacitado, el espermatozoide exhibe una tasa metabólica elevada (Cormier y col., 1997), motilidad hiperactiva (Curry, 2000), aumento de la fluidez y de la permeabilidad de la membrana y sino llega a alcanzar la fecundación, sufre reacción acrosómica espontánea debido al influjo descontrolado de  $Ca^{2+}$  (Cormier y col., 1997). Sin embargo, una vez alcanzado un determinado grado de desestabilización, el espermatozoide continúa progresivamente con la degeneración de la función de membrana hasta un punto en que es

incapaz de mantener la integridad de la misma, de modo que la capacitación conduce inevitablemente a la muerte celular de los espermatozoides que no fecundaron (Curry, 2000).

Las modificaciones derivadas de la congelación afectan a la capacidad del espermatozoide para mantener el flujo del  $Ca^{2+}$ . Una posible interpretación sería la disminución de la actividad de la fosfolipasa- $A_2$  tras la congelación, responsable de la reducción de la actividad de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa, de la cual resultan el subsiguiente aumento de  $Ca^{2+}$  en el espermatozoide y la capacitación prematura (Cormier y col., 1997).

Asimismo, los trabajos de Pérez y col. (1996) evidenciaron, a través de la prueba de tinción con clortetraciclina (CTC), que las alteraciones funcionales y estructurales derivadas de la congelación del espermatozoide de morueco resultaron en una mayor tendencia a la capacitación y a la reacción acrosómica. Para Bailey y col. (2000), los futuros estudios en criopreservación de semen, considerando la mejora de la fertilidad del espermatozoide, deben tratar de evitar o de revertir la crio-capacitación.

La preservación del espermatozoide canino también hace disminuir de modo significativo la proporción de espermatozoides no-capacitados. Las muestras de semen refrigerado y congelado presentan proporciones de espermatozoides no-capacitados considerablemente más bajas que las muestras de semen fresco, presentando la tinción con CTC una evidencia de patrones de fluorescencia típicos de capacitación. El tiempo necesario para la capacitación suele ser más reducido en las muestras preservadas y los valores de los parámetros de motilidad espermática, considerados como característicos de la hiperactivación, más altos; de modo que, el incremento en la velocidad curvilínea (VCL) y en el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) se observaron con mayor precocidad en las muestras preservadas. Este grupo de espermatozoides que se desestabiliza con el proceso de criopreservación, puede perder rápidamente su capacidad fertilizante, lo que disminuiría la proporción de espermatozoides disponibles para la fecundación (Rota y col., 1999a).

Centola y col. (1990), utilizando la microscopía de fluorescencia con marcadores específicos del núcleo y del acrosoma, demostraron que después de un ciclo de congelación y descongelación aumentaba el número de espermatozoides no-viables que habían sufrido una falsa reacción acrosómica, así como también aumentaba el porcentaje de espermatozoides viables con reacción acrosómica. Por otra parte, disminuían los espermatozoides viables con acrosoma intacto. La menor fertilidad del semen congelado y descongelado podría, según estos autores, estar relacionada con la disminución del número

de espermatozoides con acrosomas funcionales e intactos, factor esencial para su unión a la *zona pelúcida*.

Por otra parte, varios estudios indican que el ciclo de criopreservación aumenta la **peroxidación de los lípidos** de la membrana espermática originando la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y la reducción del contenido en fosfolípidos, especialmente los poli-insaturados (como la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamida). Estas alteraciones y la reducción en la actividad de la enzima superóxido-dismutasa, uno de los sistemas de protección de la célula contra los efectos oxidativos, contribuyen a una función espermática defectuosa con disminución de la motilidad (Álvarez y Storey, 1992). El contenido elevado en ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos hace al espermatozoide más susceptible a las lesiones de peroxidación, que además de afectar a la motilidad, también afectan al metabolismo, la ultra-estructura y la fertilidad (White, 1993).

Durante la preparación del semen para la congelación se puede reducir la peroxidación procediendo bajo condiciones anaeróbicas, o adicionando anti-oxidantes o agentes quelantes (Holt, 2000). Hasta el momento, no hay muchos estudios sobre la producción de ERO durante la criopreservación del semen de perro ni sus efectos en las funciones espermáticas. Las Tablas 2.1 y 2.2 muestran un resumen de las consecuencias de la congelación sobre el espermatozoide y de cómo afectan a la fertilidad, respectivamente.

**Tabla 2.1.** Consecuencias de la congelación

- Alteraciones en la estructura proteico-lipídica de la membrana
- Disminución de la fluidez de la membrana
- Aumento de la permeabilidad de la membrana
- Pérdida de enzimas y de fosfolípidos
- Disminución de la actividad metabólica
- Disminución del consumo de ATP
- Plegamientos de la membrana plasmática
- Edema e rarefacción del acrosoma
- Vesiculación acrosómica
- Formación de radicales de oxígeno

**Tabla 2.2.** Implicaciones en la funcionalidad espermática

- Muerte celular
- Disminución de la motilidad
- Aumento de los espermatozoides capacitados
- Reacción acrosómica precoz
- Reducción de la longevidad

## 2.3. Protocolos de refrigeración y congelación

Tanto la refrigeración como la congelación requieren unos pasos que es necesario seguir para lograr la mejor protección posible de las células, hasta su utilización en inseminación artificial o fecundación *in vitro*.

### 2.3.1. Dilución y empleo de crioprotectores

Tras la obtención del semen, el primer paso a seguir es la dilución en un medio adecuado para la supervivencia de las células durante su procesado y conservación. El tipo de **diluyente** elegido y los ritmos específicos de refrigeración, congelación y descongelación son factores altamente importantes en la calidad del semen calentado o descongelado, pues influyen la morfología y la motilidad de los espermatozoides y éstas, a su vez, influyen los índices de concepción tras la inseminación artificial. En esencia, los diluyentes deberán mantener la osmolaridad, el pH y la concentración adecuada de iones del eyaculado. Es fundamental que el diluyente aporte una fuente de energía y proteja a los espermatozoides de los daños causados por la congelación y la descongelación (England, 1993) y también por la refrigeración y posterior calentamiento (Province y *col.*, 1984; Bouchard y *col.*, 1990).

Existen referencias de inseminaciones artificiales en la perra de los siglos dieciocho practicadas por Spallanzani y diecinueve por Rissi y Heape (Oettlé, 1993). Los primeros trabajos publicados sobre conservación del eyaculado de perro mediante **refrigeración** son de 1952 (Brochart y Coulomb, 1952), mientras que el primer registro de inseminación artificial exitosa con semen diluido y refrigerado data de 1954 (Harrop, 1954). Los diluyentes utilizados en estos estudios contenían yema de huevo con solución de citrato de sodio o fructosa (Brochart y Coulomb, 1952), o bien la leche pasteurizada (Harrop, 1954). Tras estos trabajos, otros autores aportaron más conocimientos sobre los efectos de distintos diluyentes en la refrigeración del semen de perro (Foote, 1964; Foote y Leonard, 1964; Gill y *col.*, 1970; Seager y Fletcher, 1972). En 1975, Andersen adaptó al semen canino el diluyente TRIS-Fructosa-Ácido Cítrico con 20% de yema de huevo y glicerol al 8%; sin embargo, hoy se considera que para la conservación en refrigeración del semen de perro está desaconsejado el uso de glicerol, ya que presenta un efecto depresivo en la motilidad (Province y *col.*, 1984). En los años 80 y 90 los diluyentes utilizados para refrigeración estaban constituidos esencialmente por yema de huevo o leche (Province y *col.*, 1984; Bouchard y *col.*, 1990). Tanto la yema de huevo como la leche aportan lipoproteínas de baja densidad,

principalmente fosfolípidos que actúan estabilizando las membranas nucleares sin que se produzcan cambios aparentes en la composición de las mismas (Parks y Graham, 1992).

La primera referencia de inseminación artificial exitosa con semen **congelado** de perro data de 1969 y fue realizada por Seager, consiguiéndose el nacimiento de 2 cachorros tras deposición intra-vaginal del semen. La misma técnica de inseminación fue empleada en los trabajos siguientes del mismo autor (Seager y Fletcher, 1973), y por Andersen (1972); pero los malos resultados de este último hicieron que el autor diera importancia al **lugar de deposición del semen**, así que optó por la deposición intra-uterina a través del canal cervical con el auxilio de un espéculo apropiado y de un catéter metálico (Andersen, 1975), que se conoce como catéter transcervical escandinavo.

En los primeros trabajos sobre congelación de semen de perro se utiliza el formato de *pellets* o píldoras (Seager, 1969), mientras que en los trabajos posteriores Andersen (1972; 1975) emplea pajuelas de polivinilpirrolidona para el envasado y almacenamiento del semen. Pese a que los trabajos relacionados con la congelación en *pellets* refieren resultados exitosos (Thomas y col., 1993) se reconoce actualmente que es preferible la utilización de las pajuelas, ya que los *pellets* comportan un mayor riesgo de contaminaciones, por agentes infecciosos o por espermatozoides de otros perros; además del inconveniente de que su identificación es más difícil (Linde-Forsberg, 2002). También es unánimemente reconocido que la utilización de las pajuelas permite un mejor control de la descongelación.

### **2.3.1.1. Situación actual de los procesos de refrigeración y congelación para el semen canino**

En las distintas especies domésticas, incluida la especie canina, se han realizado una considerable cantidad de investigaciones con el objetivo de mejorar la viabilidad y la motilidad del semen preservado y, consecuentemente, la fertilidad. Para ello, los protocolos de refrigeración y congelación han sido objeto de distintos estudios sobre el uso de distintos diluyentes, diferentes proporciones de crioprotectores, ritmos de refrigeración, equilibrio y protocolos de congelación y descongelación (Salamon y Maxweel, 1995; Farstad, 1996), llevados a cabo por diversos grupos de investigación en las dos últimas décadas. Los avances en los equipamientos y en las técnicas de evaluación del semen han posibilitado analizar y conocer más ampliamente el impacto de los diluyentes en la longevidad, motilidad y velocidad de los espermatozoides tras la refrigeración (Rota y col., 1995; England y Ponzio,

1996; Pinto y col., 1999; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001a) y la congelación (Silva y Verstegen, 1995; Rota y col., 1997; 2001; Szász y col., 2000a).

En la actualidad, el diluyente de semen canino más utilizado en situaciones prácticas y experimentales sigue siendo el TRIS-Fructosa-Ácido Cítrico, con 20% de yema de huevo y glicerol al 8%, si se pretende la congelación (Dobriniski y col., 1993; Silva y Verstegen, 1995; Rota y col., 1997), diluyente éste conocido por proporcionar índices de concepción razonables. Sin embargo, las investigaciones más recientes estudian las posibilidades de suplementación de este diluyente con diversos azúcares como la trehalosa, la xilosa y la maltosa (Yildiz y col., 2000), metilxantinas como la pentoxifilina (Koutsarova y col., 1997) y detergentes biológicos como la Pasta Equex (Rota y col., 1997, 1999b; Peña y col., 1998c; Tsutsui y col., 2000 a,b; Peña y Linde-Forsberg, 2000; Peña y col., 2003a); los únicos aminoácidos estudiados en esta especie han sido la prolina y la glicina-betaína (Peña y col., 1998a), obteniéndose con la adición de prolina buenos resultados post-descongelación.

Los estudios más recientes siguen investigando y comparando los protocolos de congelación a fin de mejorar la supervivencia espermática post-descongelación. Pero no podemos olvidar, para obtener un elevado porcentaje de nacimientos en esta especie, la necesidad de una rigurosa monitorización del ciclo estral de la perra y el uso de una apropiada técnica de deposición intra-uterina del semen descongelado; factores éstos tan importantes como el método utilizado en la criopreservación.

El uso de semen congelado fue aprobado por el AKC (American Kennel Club) en 1981, y tras 6 años y medio se contabilizaron 101 registros de camadas (Concannon y Battista, 1989). La dificultad en canalizar el cérvix canino para realizar la inseminación intra-uterina puede ser el origen del poco interés suscitado hasta entonces por la congelación del semen de esta especie (Smith, 1986), pero los autores coinciden en que este método proporciona resultados bastante más satisfactorios (Fontbonne y Badinand, 1993). Durante el año 2000 el AKC registró 658 camadas obtenidas con semen congelado, lo que denota la existencia de un gran interés entre los criadores por estas técnicas, en la actualidad (Linde-Forsberg, 2002). En la bibliografía se encuentran referenciados índices de nacimientos tras inseminación intra-uterina con semen descongelado del orden de 67% y 74% (Farstad, 1984; 1996) y de 73,6% (Fontbonne y Badinand, 1993).

En España no hemos tenido una normativa legal para el uso de semen canino congelado hasta el año 2002, cuando la RSCE (Real Sociedad Canina de España) aceptó y reguló esta práctica ([www.cryocel.com](http://www.cryocel.com), 2003).

### 2.3.1.2. Papel de los crioprotectores

El proceso de criopreservación ideal debe preservar, en la mayor proporción posible, la integridad de las diferentes estructuras del espermatozoide (Watson, 1995). La utilización de un agente crioprotector es indispensable en la minimización de los daños que se producen en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación (Gao y col., 1995); pues los crioprotectores tienen efectos notables sobre los fenómenos que acompañan a la congelación y la descongelación de las células vivas, proporcionando protección contra las fuertes alteraciones que se producen en las estructuras celulares y extra-celulares y en la composición química (Fahy y col., 1990).

La yema de huevo y la leche han sido los primeros componentes utilizados para preservar a los espermatozoides del efecto del frío. Éstas son sustancias crioprotectoras puesto que durante los procesos de refrigeración y congelación (Pickett y Komarek, 1966) minimizan la pérdida de los lípidos de membrana aportándole fosfolípidos de bajo peso molecular (Graham y Foote, 1987). **Los crioprotectores** se han clasificado según su capacidad para atravesar la membrana: en **penetrantes** como glicerol, DMSO, etilenglicol, y en **no-penetrantes** incluyendo determinados azúcares (Hammerstedt y col., 1990). Como se describe mas adelante, en la actualidad se incorporan a los diluyentes otras sustancias como detergentes y aminoácidos, combinadas generalmente con glicerol, esperando preservar mejor la capacidad motil y fecundante de los espermatozoides en los procesos de refrigeración y congelación.

#### 2.3.1.2.1. Yema de huevo

La yema de huevo es un componente básico que está presente en casi todos los diluyentes para refrigeración y congelación, cuyas características protectoras contra el frío son conocidas desde los trabajos de Phillips y Lardy (1940). Debido a la compleja naturaleza de la yema, los investigadores se encontraron con dificultades para determinar los factores específicos responsables de los efectos beneficiosos y de su modo de actuación; Kampschmidt y col. (1953) precisaron que la yema contribuía beneficiosamente de dos maneras distintas: *por resistencia*, protegiendo contra el choque térmico y *por conservación*, consiguiendo la supervivencia del espermatozoide. Así, la porción lipídica constituida por los fosfolípidos, lecitina y cefalina, es efectiva en la protección contra el choque térmico; hecho confirmado por Blackshaw (1954), quien precisó que la lecitina era el principal fosfolípido protector. También Quinn y White (1966), constataron que la lecitina impide el influjo y la

acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el espermatozoide de toro y morueco. Durante el tiempo en que se desarrolló está investigación sobre el empleo de la yema de huevo, algunos trabajos atribuyen la actividad protectora de la yema, contra los choques térmicos y la pérdida de motilidad, a la interacción con la membrana (Watson, 1975a), mas concretamente, a la débil interacción de los fosfolípidos de la yema con la membrana plasmática (Quinn y *col.*, 1980). Además de Graham y Foote (1987) han sustentado que las lipoproteínas de baja densidad son los componentes de la yema que consiguen el efecto crioprotector, evitando el choque térmico y preservando la integridad de la membrana (Pace y Graham, 1974; Foulkes, 1977; Watson, 1981b).

También se atribuyen a la yema propiedades protectoras contra los efectos tóxicos del plasma seminal que desestabilizan la membrana del espermatozoide. De modo que, la cantidad de yema contenida en el diluyente debería ser proporcional a la cantidad de plasma seminal en el semen diluido. Así, en casos en que el semen esté muy diluido existe, consecuentemente, una reducida concentración de plasma seminal y por ello, las concentraciones de yema pueden ser reducidas sin impacto negativo en la fertilidad (Shannon y Curson, 1983 a; b).

La estabilización de la membrana del espermatozoide humano por efecto de la yema ha sido también confirmada por los trabajos de Bielfeld y *col.* (1990); quienes comprobaron que la eliminación de la yema por lavado originaba un aumento significativo del número de espermatozoides con reacción acrosómica, siendo posible que mientras la yema se elimina haya una aceleración en la pérdida de colesterol y fosfolípidos, lo que causaría la desestabilización de la membrana y, de este modo, la reacción acrosómica.

Las investigaciones posteriores sobre la naturaleza de esta protección han revelado que la fracción catiónica e hidrosoluble de la yema, debido a su carga, compite con los péptidos catiónicos del plasma seminal en la unión a la membrana del espermatozoide, evitando los efectos negativos de los péptidos (Vishwanath y *col.*, 1992). Otro trabajo reciente se refiere nuevamente a las lipoproteínas de baja densidad, esta vez, como responsables del secuestro de las proteínas del plasma seminal en el semen de toro (Manjunath y *col.*, 2002).

### 2.3.1.2.2. Glicerol

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

Para Quinn y White (1966), dado que las consecuencias del choque térmico y de la congelación en el espermatozoide producen drásticos cambios en las concentraciones de cationes, una de las funciones protectoras del glicerol parece ser precisamente impedir la acumulación de  $Ca^{2+}$  en el espermatozoide; demostrando que la asociación de glicerol con yema de huevo, citrato sódico y fructosa protege al espermatozoide de toro y de cerdo contra el influjo de  $Na^+$  y el aflujo de  $K^+$ . Además, para Medeiros y col. (2002), el glicerol también disminuye el estrés osmótico intracelular resultante de la deshidratación que se produce por la sustitución del agua intra-celular, necesaria para el mantenimiento del volumen celular, por la interacción con iones y macromoléculas e incluso por la depresión del punto de congelación del agua.

Por otra parte, existe consenso en que a pesar de que el glicerol protege las membranas del espermatozoide durante la criopreservación, también ejerce una cierta **toxicidad** celular (Fahy y col., 1990) que afecta a la membrana plasmática (Hammerstedt y col., 1990). Las alteraciones resultantes pueden mermar la fertilidad del espermatozoide, aunque tenga motilidad tras la descongelación (Watson y col., 1979) y seguramente una adecuada producción de energía, ya que puede afectar a otros aspectos importantes (Amann y Pickett, 1987).

Los efectos tóxicos del glicerol comprenden alteraciones de: -las características físicas del citoplasma, en su organización y viscosidad, -la permeabilidad y la estabilidad de la membrana plasmática, -la unión no-covalente de las proteínas a la superficie del espermatozoide, y -el metabolismo y equilibrio bioenergético (Hammerstedt y Graham, 1992). Es probable que el glicerol influya en la reorganización de los fosfolípidos y de las proteínas de la membrana plasmática y, de este modo, afecte al potencial de fusión de la membrana (Amann y Pickett, 1987). Sin embargo, el glicerol es perjudicial para las estructuras del espermatozoide en distintos grados, pareciendo que las membranas de las mitocondrias están más afectadas que las membranas acrosomales y plasmática (Garner y col., 1999).

La sensibilidad a los efectos tóxicos del glicerol varía considerablemente con la especie. Por ejemplo, la susceptibilidad del espermatozoide de cerdo, principalmente para las lesiones acrosomales, puede justificar la baja fertilidad del espermatozoide descongelado en esta especie, cuando se compara con especies más resistentes como el toro (Curry, 2000). También en el espermatozoide equino el glicerol deprime la fertilidad (Bedford y col., 1995), algo semejante a lo que sucede en el espermatozoide de cerdo (Demick y col., 1976).

La concentración óptima para una determinada especie representa siempre un compromiso entre los efectos protectores y los efectos tóxicos (Watson y col., 1979). Por otra parte, la preservación de la motilidad y la integridad de las membranas (plasmática y acrosomales) exigen concentraciones de glicerol ligeramente distintas (Almlid y Johnson, 1988). Sin embargo, un estudio sobre la congelación del espermatozoide de cerdo pone en evidencia que es posible congelarlo sin glicerol cuando los diluyentes contienen el 10% de azúcar (maltosa mono-hidrato) y el 30% de yema de huevo (Abdelhakeam y col., 1991).

Investigaciones sobre la criopreservación del espermatozoide humano manifiestan la interferencia ejercida por el glicerol en la capacidad fertilizante puesto que, en comparación con muestras frescas no tratadas se obtienen índices menores de penetración de ovocitos por espermatozoides descongelados. Sin embargo, cuando el glicerol está presente durante la capacitación espermática y la penetración de ovocitos, se consigue un porcentaje bastante elevado de penetración. También parece ser que después del tratamiento con glicerol el espermatozoide desarrolla una dependencia al mismo, y que en su ausencia se reduce dicha capacidad de penetración (Jeyendran y col., 1985). Otros estudios sobre la penetración de *zona pelúcida* por espermatozoides frescos de morueco muestran que la adición del 10% de glicerol al semen diluido, 30-90 minutos antes de la incubación, estimula la penetración de la zona; concluyendo los autores que el glicerol estimula y sincroniza la reacción acrosómica,

lo que podría ser una de las causas de los bajos índices de concepción tras inseminación con semen congelado y descongelado. Los mecanismos que justifican este hecho pueden estar relacionados con la unión de los ácidos grasos al glicerol que desestabilizaría la membrana o incluso con el aumento de la presión osmótica del medio de cultivo debido a la mera adición del glicerol (Slavík, 1987).

La supervivencia del espermatozoide descongelado puede estar influenciada por el modo en que el glicerol es adicionado antes de la congelación (Fiser y Fairfull, 1989) y por como es eliminado tras la descongelación, ya que ambas operaciones pueden crear un considerable **estrés osmótico**, resultando en daños celulares (Gao y col., 1995). El estrés osmótico está relacionado con las diferencias en la permeabilidad relativa al glicerol y al agua de la membrana plasmática. Tras la exposición a un soluto permeable, como es el caso del glicerol, el espermatozoide encoge debido a la pérdida del agua y después se hincha, así que el agua y dicho soluto permeable entran en la célula. Cuando estas células se suspenden en un medio iso-osmótico, inicialmente se hinchan ya que el agua entra en la célula y después encogen debido a que tanto el agua y como el soluto se mueven hacia el exterior de la célula (Ball y Vo, 2001).

La motilidad y la integridad de la membrana parecen estar afectadas de modo distinto por el estrés osmótico, así que la motilidad es mucho más sensible a las condiciones aniso-osmóticas que la integridad de membrana, especialmente en condiciones hipotónicas frente a hipertónicas (Gao y col., 1995). Tras la exposición a condiciones de estrés hipo-osmótico, los daños en el espermatozoide no revierten por la exposición posterior a condiciones iso-osmóticas, ya que la motilidad no mejora después del restablecimiento de la osmolaridad normal. Además, el potencial de membrana de las mitocondrias está afectado por las situaciones de estrés osmótico. Por tanto, las lesiones en la membrana plasmática y en las mitocondrias pueden estar asociadas al declive de la motilidad observado en el estrés osmótico (Ball y Vo, 2001). La tolerancia osmótica relativa del espermatozoide parece diferir entre especies, dado que la capacidad relativa del espermatozoide para sobrevivir al estrés osmótico está relacionada, en parte, con la capacidad del espermatozoide para sobrevivir a la criopreservación (Wessel y Ball, 2004).

La adición de glicerol y la pérdida intracelular de agua durante la congelación reducen casi a la mitad el volumen (isotónico) del espermatozoide mientras que durante la descongelación, cuando se suspende en una solución isotónica, la célula expande 2 veces su volumen (Parks y Graham, 1992). Hammerstedt y col. (1990) proponen un mecanismo de

acomodación del volumen de la membrana a través de la formación de pliegues hacia el interior (invaginación) y exterior (evaginación).

El hecho de que el glicerol también puede ser nocivo en la descongelación fue observado por Amann y Pickett (1987), quienes sostienen que durante la descongelación, al contrario que en la refrigeración y la congelación, el glicerol se desplaza del interior hacia el exterior de la célula. Cuando la permeabilidad de la membrana es insuficiente, para acomodar este movimiento, resultan daños permanentes que estarán seguramente exacerbados cuando el espermatozoide se coloca en el tracto genital femenino, que es hiposmótico frente al diluyente.

Otros autores defienden que más que la rápida adición del glicerol es su rápida eliminación lo que origina mayores daños a las células, observándose declives en la viabilidad, motilidad y potencial de las membranas mitocondriales; de modo que su retirada por dilución en medio isotónico y en un solo paso resulta perjudicial para la motilidad e integridad de la membrana del espermatozoide fresco equino (Ball y Vo, 2001); habiéndose comprobado mejoras significativas en la dilución en varios pasos (Wessel y Ball, 2004). Sin embargo, el tipo de dilución tras la descongelación no afectó la motilidad del espermatozoide descongelado.

Otro importante aspecto en todo este proceso es la temperatura elegida para la adición de glicerol: a 37°C, a temperatura ambiente (22-25°C), o a 4-5°C (Hammerstedt y col., 1990). En el espermatozoide de cerdo, su adición a 5°C permitió una mejor supervivencia pos-descongelación que a 30°C; independientemente de que la adición y la retirada del glicerol se hayan realizado bien en uno o varios pasos (Fiser y Fairfull, 1989). El hecho de que la motilidad y la integridad acrosomal se mantuvieran en niveles razonables tras la rápida dilución pos-descongelación, con la consecuente disminución de la concentración de glicerol, hace prever que los efectos del estrés osmótico sean menos importantes que los efectos tóxicos (Fiser y Fairfull, 1989).

En el perro no se observaron diferencias entre la adición de glicerol en uno o varios pasos, a la temperatura ambiente o a 5°C (Fontbonne y Badinand, 1993), y tampoco entre la adición de glicerol a 37°C *versus* a 4°C tras 1 o 2 horas de refrigeración (Peña y col., 1998b). Estos resultados permitieron concluir que el glicerol penetra rápidamente en el espermatozoide, tal como ya lo había comunicado Almlid y Johnson (1988) para el espermatozoide de cerdo. Silva y col. (2003) tampoco encontraron diferencias en la adición del glicerol en uno o 3 pasos en la motilidad, longevidad y morfología; sugiriendo que el

espermatozoide canino parece ser, en comparación con otras especies como el caprino, menos sensible a los daños osmóticos causados por la adición del glicerol en un paso.

En relación a las concentraciones de glicerol empleadas en la congelación del espermatozoide de perro, los trabajos refieren índices de gestación más importantes con niveles entre 4 y 8% (Ferguson y *col.*, 1989). También en los trabajos de Cardoso y *col.* (2003) con un diluyente de agua de coco, los porcentajes de 4, 6 y 8% han proporcionado buenos resultados en la preservación de la motilidad, velocidad y morfología del espermatozoide canino. Mientras, otros trabajos sugieren que la motilidad pos-descongelación es superior con glicerol a 8% que a 4 o 6% (Mayenco y Gómez-Cuétara, 1996; Peña y *col.*, 1998b).

En los espermatozoides de perro, algunos de los efectos perjudiciales del glicerol son ya conocidos; se sabe que la adición de este crioprotector afecta a la unión de los espermatozoides a los ovocitos homólogos, a pesar de no afectar tan severamente a la morfología, la motilidad y la preservación del acrosoma. Habiéndose señalado que la detección de las lesiones causadas por el estrés osmótico y provocadas por la adición del glicerol pueden no observarse mediante los procedimientos de tinción rutinaria ya que, la detección del grado de daño en el espermatozoide puede depender bastante del método de evaluación. El estudio de la penetración de ovocitos homólogos es un método más completo de evaluación que la valoración de la morfología y la motilidad (Hay y *col.*, 1997a).

#### 2.3.1.2.3. Dimetilsulfoxido

Los efectos tóxicos del glicerol han impulsado el estudio del empleo de otros crioprotectores como el **dimetilsulfoxido** (DMSO). Esta sustancia permite la fusión de las membranas a una temperatura aproximada de 0°C, evitando la difusión de los cationes y demás componentes intracelulares a través de las roturas de membrana causadas por la formación intracelular de hielo (Shier, 1988). Su adición al diluyente no ha sido beneficiosa para la supervivencia del espermatozoide descongelado de perro, sólo o en combinación con el glicerol, resultando en una marcada reducción de la motilidad (Olar y *col.*, 1989). También se han utilizado otras sustancias, que sustituyen o se combinan con glicerol, con mejor éxito que el DMSO, como el **etilenglicol**, la **pasta Equex®** e incluso **aminoácidos**, esperando conseguir una mejor protección de las membranas.

#### 2.3.1.2.4. Etilenglicol

El etilenglicol (EG) es un polialcohol ( $C_2H_6O_2$ ) crioprotector cuyo peso molecular (62,07) es inferior al del glicerol (92,10) (Massip, 2001). Es utilizado universalmente en la congelación de tejido ovárico (Rodrigues y col., 2004; Demirci y col., 2003) y de embriones de distintas especies (Le Gal y col., 1993; Massip, 2001; Nowshari y Brem, 2001).

La utilización de EG como crioprotector, en la congelación del semen de toro ha ejercido un menor efecto inhibitorio en la motilidad que el glicerol o el DMSO (Guthrie y col., 2002), reduciendo la extensión de las conocidas “lesiones osmóticas” y presentando por tanto, potencial como crioprotector alternativo al glicerol. En el semen ovino, el EG utilizado a concentraciones entre el 1,5 y el 6% ha proporcionado buenos porcentajes de motilidad pos-descongelación (Molinia y col., 1994).

En la congelación del espermatozoide equino, Montovani y col. (2002) consideran, basándose en los valores de la motilidad progresiva del espermatozoide descongelado, que el EG podría sustituir al glicerol si se utiliza en la misma concentración que éste (3%), o incluso más reducida. Asimismo, los trabajos de Henry y col. (2002) en esta especie lo han sugerido, y además puntualizan que el EG, solo o en combinación con glicerol, ha proporcionado buenos resultados en la motilidad progresiva y en la preservación de la integridad de la membrana del espermatozoide y del acrosoma. La posibilidad de que el EG provoque menores “lesiones” osmóticas que otros crioprotectores en el espermatozoide equino, considerado como un espermatozoide con limitada capacidad de tolerancia a condiciones aniso-osmóticas, tendría como consecuencia un menor perjuicio para la motilidad y la viabilidad tras la descongelación; hecho también observado por Ball y Vo (2001). Por otra parte, los trabajos de Alvarenga y otros (2000) han concluido que las propiedades crioprotectoras del EG han sido semejantes a las del glicerol en la congelación del espermatozoide equino, a niveles de conservación de la motilidad y de integridad acrosomal.

En otras especies como el ratón, en que la congelación del eyaculado es considerada más difícil que en las restantes especies domesticas (Sztein y col., 2001), el EG parece un crioprotector prometedor, capaz de minimizar las lesiones de la membrana plasmática (Agca y col., 2002). Por el contrario, Storey y otros (1998) evidenciaron en esta especie una rápida pérdida de la integridad del espermatozoide fresco en presencia de 6% de EG. La adición de EG al 4°C al semen de la *Chinchilla lanigera* aportó mayor protección que la adición de glicerol (Carrascosa y col., 2001).

En la congelación del semen de perro, el EG parece aportar resultados comparables a los del glicerol, al nivel de motilidad y velocidad espermática, así como en la preservación de su estructura (Santos y *col.*, 2001), e incluso, podría sustituir al glicerol (Soares y *col.*, 2002). Además, la buena respuesta del espermatozoide tras la exposición a soluciones hipertónicas de EG hace sugerir que este puede ser utilizado como crioprotector alternativo al glicerol (Songsasen y *col.*, 2002). Sin embargo, otro estudio muestra que la integridad y la motilidad han sido mejor preservadas con glicerol al 7% que con EG al 7 y 4% (Cavalcanti y *col.*, 2002).

#### **2.3.1.2.5. Adición de azúcares**

Los azúcares han sido añadidos a los medios diluyentes como sustancias capaces de aportar energía a los espermatozoides pero disacáridos como trehalosa y sucrosa pueden proporcionar estabilización de la membrana debido a su capacidad para asociarse a las membranas más fuertemente que el glicerol (Anchordoguy y *col.*, 1987). Adicionalmente, Chen y *col.* (1993) aseveran que las membranas de los espermatozoides de toro son impermeables a los disacáridos, pudiendo causar remoción parcial del agua del espermatozoide, y así reducir la posibilidad de formación de hielo intra-celular. En este trabajo los azúcares trehalosa y sucrosa causaron pequeñas mejoras en la supervivencia durante el proceso de congelación y descongelación. En los trabajos de Woelders y *col.* (1997), la trehalosa y sobretodo la sucrosa ejercieron protección contra los daños derivados de la congelación rápida. Para estos autores, la presencia de los azúcares hace a las membranas del espermatozoide bovino menos vulnerables a las rápidas alteraciones que ocurren durante el rápido aflujo de agua; siendo también probable que altere el patrón de cristalización, previniendo de igual modo las lesiones de congelación rápida.

#### **2.3.1.2.6. Adición de Equex®**

El sodio-dodecil-sulfato (SDS) es un detergente soluble, ambifílico y aniónico que solubiliza eficazmente los lípidos de membrana (Helenius y Simons, 1975). El SDS y la trietanolamina-lauryl-sulfato son los principios activos de la Equex- STM Paste y la Pasta Equex.

En la bibliografía, los primeros trabajos que informan de la inclusión de estos compuestos en los diluyentes de congelación versan sobre la congelación de semen de

cerdo (Graham y col., 1971a,b; Pursel y col., 1978), y hacen referencia a sus efectos beneficiosos en la preservación de la motilidad y en la integridad del espermatozoide post-descongelación (Graham y col., 1971a) así como, en la preservación del acrosoma y de su capacidad fecundante (Pursel y col., 1978). Posteriormente, fueron constatados sus efectos beneficiosos en la motilidad y en la preservación de los acrosomas en el espermatozoide bovino (Ahmad y Foote, 1986; Arriola y Foote, 1987). La adición de Equex STM Paste a los espermatozoides de ciervo dio lugar a buenos resultados en el mantenimiento de la motilidad, viabilidad e integridad acrosomal (Cheng y col., 2004). También su inclusión en el proceso de congelación de espermatozoides de morueco mejora significativamente su motilidad pos-descongelación (El-Alamy y Foote, 2001), así como la motilidad y en la preservación del acrosoma en la congelación de espermatozoides de macho cabrío (Aboagla y Terada, 2004). Su adición también ha sido beneficiosa en la criopreservación del espermatozoide epididimario del ratón (Penfold y Moore, 1993; Nakatsukasa y col., 2001). Sin embargo, el Equex STM Paste ha reducido la longevidad pos-descongelación de espermatozoides epididimarios de gato, con disminución en el porcentaje de espermatozoides motiles y de membranas intactas, a pesar de presentar efectos positivos en la integridad del acrosoma (Axnér y col., 2004).

Mientras que en los primeros trabajos los efectos protectores de estos compuestos eran atribuidos a una interacción con la yema de huevo o con la membrana del espermatozoide (Graham y col., 1971a), los trabajos posteriores han precisado que su acción principal parece pasar por la modificación de los componentes de la yema de huevo (Pursel y col., 1978; Arriola y Foote, 1987; Penfold y Moore, 1993); concretamente los fosfolípidos, que es probable actúen aumentando la permeabilidad de la membrana del espermatozoide y reduciendo el stress osmótico en la congelación y la descongelación (Arriola y Foote, 1987).

La adición de estos compuestos detergentes a diluyentes desprovistos de yema acarrea marcados efectos nocivos en la preservación del acrosoma y en la motilidad (Pursel y col., 1978; Foote y Arriola, 1987); recomendándose que siempre que se reduzca el porcentaje de yema también reduzca proporcionalmente la concentración de detergentes (Arriola y Foote, 1987). Este hecho parece ser corroborado por otro estudio, en el que concentraciones elevadas de SDS proporcionan efectos nocivos en la motilidad e integridad acrosomal, que se pueden atribuir al aumento de moléculas libres del SDS, no unidas a la yema, y que se unen directamente a la membrana del espermatozoide causando efectos perjudiciales (Aboagla y Terada, 2004). Es probable que la yema neutralice el potencial efecto espermicida de los detergentes o que la interacción yema-espermatozoide en el

equilibrio, previo a la adición de los detergentes, impida la aparición de lesiones (Foote y Arriola, 1987).

En el espermatozoide de perro, los efectos beneficiosos del Equex STM Paste, han sido demostrados a nivel de la integridad de la membrana inmediatamente tras la descongelación, durante la incubación *in vitro* al 38°C y a lo largo de su longevidad (Rota y col., 1997; Peña y col., 1998c). En relación a la motilidad, los efectos beneficiosos fueron observados inmediatamente tras la descongelación (Peña y col., 1998c) y tras 1, 2 y 3 horas de incubación (Rota y col., 1997); utilizándose una concentración del 0,5%. También Tsutsui y otros (2000a; b) encontraron efectos beneficiosos en la motilidad y en la preservación de los acrosomas con la utilización de porcentajes del 0,5-1%. Sin embargo, los efectos beneficiosos de este detergente no quedaron probados en la fertilidad *in vivo*, esto es, porcentaje de gestaciones y número de fetos (Rota y col., 1999b), al contrario de lo que observaron Tsutsui y otros (2000c).

Adicionalmente a los efectos sobre la motilidad y la integridad de membrana, Peña y Linde-Forsberg (2000), observaron mejoría en la calidad de la motilidad espermática con el Equex STM Paste, sin que fueran perceptibles los patrones de motilidad indicativos de hiperactivación cuando los espermatozoides se someten a condiciones de capacitación *in vitro*. Según estos autores, sus efectos beneficiosos sobre la membrana plasmática resultan de la reducción de las fases de transición lipídica y de la protección de las bombas iónicas de membrana, de modo que las concentraciones intra-celulares de  $Ca^{2+}$  serían más bajas. La adición de Equex STM también mejora la capacidad de *unión* a la *zona pelúcida* de los espermatozoides preservados (Ström Holst y col., 2000).

La fuente del SDS es importante, el estudio comparativo entre los efectos del Equex STM Paste y de la Pasta Equex reveló que la última no proporcionó mejoras, mientras que la primera ha mejorado motilidad, supervivencia y longevidad *in vitro* (Peña y col., 2003a).

El momento de la adición del SDS es otro aspecto a tener en cuenta, parece ser que sus efectos son mas evidentes cuando el espermatozoide se expone a esta sustancia al final del periodo de equilibrio, antes de la congelación, en vez de durante todo el periodo de equilibrio (Peña y Linde-Forsberg, 2000). Esta menor duración de la exposición ha sido más beneficiosa, sobretudo, para preservar la morfología de los acrosomas que la motilidad espermática (Pursel y col., 1978). Parece evidente que el contacto prolongado del espermatozoide con el SDS o con las lipoproteínas solubilizadas de la yema, ejerce un

efecto negativo y directo en las membranas dándoles un exceso de fluidez (Peña y col., 2003a).

Hay que tener en cuenta que el SDS, cuando es utilizado a una elevada concentración y dado que es un detergente aniónico muy comúnmente utilizado en la solubilización de membranas, causa su lisis y ruptura (Helenius y col., 1979); siendo por tanto, empleado en la extracción de las proteínas del espermatozoide al 2% (Mendoza y col., 1992) y en la descondensación de la cromatina nuclear (Huret, 1986), en el espermatozoide humano. Otros detergentes, como el Tritón X-100 y la Hiamina 2389, son utilizados para -inducir la reacción acrosómica y la activación, posiblemente por modificación de los componentes de la superficie y de la estructura de la membrana del espermatozoide y alteración su permeabilidad (Yanagimachi, 1975) e incluso, para inducir la disolución de la membrana del espermatozoide y del acrosoma y así estudiar el contenido enzimático de esta estructura y la liberación de enzimas de la pieza intermedia (Churg y col., 1974).

#### **2.3.1.2.7. Adición de aminoácidos**

La adición de aminoácidos en los diluyentes parece tener resultados positivos tanto en la refrigeración como en la congelación del semen de especies pecuarias. Las características que poseen estos componentes han motivado su inclusión en los medios de dilución para refrigeración y congelación de semen de diferentes especies.

La suplementación con taurina de un medio de refrigeración mejoró la motilidad y la supervivencia del espermatozoide equino tras 24 h de almacenamiento (Ijaz y Ducharme, 1995). La glicina-betaina aumentó la motilidad de los espermatozoides de toro mantenidos en condiciones de refrigeración (Zhang y col., 2001) y la adición de L-arginina permitió un incremento en el metabolismo del espermatozoide epididimario del macho cabrío protegiéndolo contra la peroxidación lipídica (Srivastava y col., 2000).

La adición de taurina en los medios de congelación resultó en una mayor motilidad tras la descongelación en el toro (Chen, 1993) y en el ovino (Sánchez-Partida y col., 1997), así como la prolina en el morueco (Sánchez-Partida y col., 1992; 1998), en el perro (Peña y col., 1998a) y el caballo (Trimeche y col., 1999). La inclusión de glutamina también resultó en mayor motilidad y velocidad espermática en el hombre (Renard y col., 1996), en el caballo (Trimeche y col., 1999) y en el espermatozoide epididimario del macho cabrío (Kundu y col., 2001).

Distintos investigadores atribuyen estas mejoras a características metabólicas (Renard y col., 1996) y crioprotectoras de los aminoácidos (Renard y col., 1996; Peña y col., 1998a), junto con la protección que permiten contra el choque térmico gracias a la interacción con los fosfolípidos de membrana (Sánchez-Partida y col., 1998) y a propiedades osmorreguladoras (Sanchez-Partida y col., 1997; Trimeche y col., 1999). También es señalada la protección contra los daños causados por la peroxidación lipídica (Ijaz y Ducharme, 1995; Srivastava y col., 2000). Para Chen y col. (1993), los aminoácidos son capaces de aportar protección a la membrana del espermatozoide, lo que aumenta su supervivencia en el tracto genital de la hembra. Además, a los aminoácidos se les atribuyen propiedades potenciadoras de la eficacia del glicerol (Kundu y col., 2001). No obstante, es sabido que sus mecanismos de protección son independientes del glicerol y no podrán sustituirlo (Renard y col., 1996; Trimeche y col., 1999). Por otra parte, concentraciones elevadas de aminoácidos suelen ser perjudiciales, ya que una elevada presión osmótica anula los efectos beneficiosos (Trimeche y col., 1999). Otros autores advierten que sin yema o glicerol en el diluyente de congelación los efectos protectores de los aminoácidos no son observados (Sánchez-Partida y col., 1992).

#### **a. Taurina e hipotaurina**

La **taurina** (ácido 2-aminoetano sulfónico) es uno de los aminoácidos libres presentes en mayores concentraciones en los tejidos animales (Huxtable, 1992). Este aminoácido regula una vasta serie de funciones biológicas tan diversas como el ritmo cardíaco, la temperatura corporal, la excitación neuronal, la visión, la motilidad espermática, el metabolismo energético y la osmorregulación (Jacobsen y Smith, 1968; Huxtable, 1992; Shaffer y col., 2000). También su precursor, la **hipotaurina**, participa en la protección de las membranas biológicas bajo aquellas situaciones que conduzcan a la peroxidación lipídica (Pasantes-Morales y Fellman, 1989) y en la regulación osmótica del fluido uterino humano, donde la taurina es el aminoácido que se encuentra en mayor cantidad (Casslén, 1987).

En la mujer se supone que, a parte de la osmorregulación, la taurina puede actuar en el mantenimiento de la motilidad del espermatozoide en el fluido uterino, protegiéndole contra la influencia adversa de las elevadas concentraciones de  $K^+$  existentes en este ambiente (Casslén, 1987). La taurina y la hipotaurina están igualmente presentes en el fluido del oviducto y/o del útero de animales como la vaca (Meizel y col., 1980; Guérin y col., 1995), coneja (Meizel y col., 1980; Miller y Schultz, 1987; Guérin y col., 1995), macaca (Meizel y col., 1980) y cerda (Guérin y col., 1995).

Los efectos de la taurina en las membranas alteradas por la peroxidación lipídica son probablemente mediados por una acción reguladora, evitando la pérdida de iones y la excesiva entrada de agua a la célula, lo que contribuye al mantenimiento de la integridad funcional y estructural (Pasantes-Morales y Fellman, 1989). Pese a este efecto, la taurina parece no tener un efecto anti-oxidante directo (Aruoma y *col.*, 1988; Pasantes-Morales y Fellman, 1989). Contrariamente, la hipotaurina parece ser un eficaz quelante del ión hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) (Aruoma y *col.*, 1988; Fellman y Roth, 1985; Pasantes-Morales y Fellman, 1989), y el  $\text{ClOH}^\cdot$  (Aruoma y *col.*, 1988). Los tejidos poseen sistemas capaces de oxidar la hipotaurina dando lugar a la taurina, que proviene de la reacción del radical  $\text{OH}^\cdot$  con la hipotaurina (Fellman y Roth, 1985).

En el tracto reproductivo masculino de varias especies se encuentran niveles significativos de taurina e hipotaurina, como en el hombre (Meizel y *col.*, 1980; Holmes y *col.*, 1992), el cobaya y el hamster (Meizel y *col.*, 1980), el ratón (Kochakian, 1975; Fraser, 1986), el toro (Guérin y *col.*, 1995) y el cerdo (Van der Horst y Grooten, 1966; Johnson y *col.*, 1972). Van Der Horst y Grooten (1966), aíslan taurina e hipotaurina en el semen de perro y Buff y *col.* (2001) en el de gato.

Las elevadas concentraciones de hipotaurina en el tracto reproductor masculino pueden estar justificadas por su papel anti-oxidante en la protección de las membranas de los espermatozoides, que en general, son altamente insaturadas (Huxtable, 1992). En el toro, los niveles de hipotaurina y taurina son varias veces superiores a los del hombre (Guérin y *col.*, 1995). En el perro, la presencia de hipotaurina en el espermatozoide y en el plasma seminal fue demostrada por Van der Horst y Grooten (1966). En el cerdo, ambos aminoácidos están presentes en el espermatozoide, el fluido epididimario y las vesículas seminales; sobretodo asociados a la fracción rica en espermatozoides del eyaculado y también del epidídimo (Johnson y *col.*, 1972), como ya lo había reflejado el trabajo de Van der Horst y Grooten (1966). En el ratón también están presentes elevadas concentraciones de taurina y de hipotaurina en el epidídimo, principalmente de taurina en la cola del epidídimo; demostrándose también la relación entre testosterona e hipotaurina, dado que tras la castración casi desaparece la hipotaurina de la próstata y de la vesícula seminal, reapareciendo tras la administración de testosterona (Kochakian, 1975).

La presencia de taurina y, sobretodo, de hipotaurina a elevadas concentraciones en el plasma seminal sugiere que el epidídimo o el testículo son sus lugares de origen (Johnson y *col.*, 1972). Sin embargo, datos revelados por métodos inmunohistoquímicos dan a conocer que la localización de la taurina en el tracto reproductivo del ratón incluye las células

intersticiales del testículo (las células de Leydig), las células endoteliales vasculares y, principalmente, las células epiteliales del conducto eferente. El epidídimo así como los túbulos seminíferos han resultado immuno-negativos, lo que permitió a los autores sugerir que el lugar específico de producción de taurina sean los conductos eferentes (Lobo y col., 2000).

En el hombre, la taurina y la hipotaurina están presentes a niveles significativos en el propio espermatozoide, pero sólo la taurina ha sido detectada en el fluido seminal. Los niveles de hipotaurina espermática se encuentran disminuidos en los eyaculados de hombres infértiles, en cuanto que los de taurina están aumentados, lo que sugiere que en estos pacientes se produce un incremento en la oxidación que permite la conversión de hipotaurina en taurina (Holmes y col., 1992).

Estudios previos han probado que incubando el semen de hamster con taurina, ésta estimula y mantiene la motilidad durante la capacitación (Mrsny y col., 1979; Leibfried y Bavister, 1981; Alvarez y Storey, 1983; Fraser, 1986) igual que con hipotaurina, y que ambas son eficaces en la estimulación de la fecundación *in vitro* en el hamster (Leibfried y Bavister, 1981). Aunque ambas se consideran eficaces en la estimulación de la motilidad del espermatozoide de hamster, la capacidad de la hipotaurina es 3 veces superior a la de la taurina (Gwatkin, 1983).

Los efectos de protección y osmorregulación de la taurina en situación de estrés hiperosmótico en el espermatozoide del chimpancé han sido demostrados en el trabajo de Ozasa y Gould (1982). Este papel osmorregulador también es atribuido a la hipotaurina en el espermatozoide de cerdo (Johnson y col., 1972).

Algunos trabajos en el espermatozoide del conejo dan a conocer que la taurina y la hipotaurina previenen la pérdida de motilidad del espermatozoide e inhiben la peroxidación lipídica, siendo la hipotaurina más eficaz que la taurina. La presencia de hipotaurina en un medio con elevadas concentraciones de  $K^+$  redujo la producción del anión superóxido ( $O_2^{2-}$ ), uno de los radicales de oxígeno que más induce la peroxidación lipídica en el espermatozoide del conejo, lo que demuestra sus efectos protectores. El modo de acción de estos aminoácidos en el mantenimiento de la motilidad del espermatozoide puede ser a través de la inhibición de la peroxidación lipídica (Alvarez y Storey, 1983).

Otra posibilidad de actuación de la taurina y la hipotaurina en el mantenimiento de la motilidad espermática, sugerida a partir de los trabajos de Mrsny y Meizel (1985), es a través de la inhibición de la enzima  $Na^+-K^+$  ATPasa. La disminución de la actividad de esta enzima

reduce el influjo del  $K^+$  extra-celular, y así, sus efectos inhibitorios sobre la motilidad del espermatozoide. Adicionalmente, otro posible mecanismo derivado de la inhibición de esta enzima es el aumento de los niveles intra-celulares de  $Ca^{2+}$ , y, en consecuencia, la motilidad espermática (Mrsny y Meizel, 1985). El posible papel de la taurina en la modulación del flujo de  $Ca^{2+}$  fue objeto de estudios anteriores; así, algunos trabajos sugieren la interferencia de la taurina en la cinética del  $Ca^{2+}$  en la contractibilidad cardiaca, bien porque aumenta la afinidad de las estructuras celulares por el  $Ca^{2+}$  (Dolara y col., 1973a) o la capacidad mitocondrial de unión al  $Ca^{2+}$ , afectando al consumo mitocondrial de oxígeno (Dolara y col., 1973b). En el sistema nervioso central y periférico, la taurina también puede actuar como modulador de la excitabilidad de membrana, disminuyendo la concentración intra-celular del  $Ca^{2+}$  libre (Kuriyama, 1980). No obstante, la incubación en un medio que contenía taurina no afectó a la motilidad ni a la concentración intra-celular libre del  $Ca^{2+}$  del espermatozoide de gallo, en los trabajos de Barna y col. (1998), aunque estos autores defienden que la taurina afecta de alguna manera la formación del huevo.

Posteriormente, se demostró que la adición de hipotaurina reactiva la motilidad de los espermatozoides inmóviles de hamster. Teniendo en cuenta que la reactivación se produjo tras el lavado y dilución de los espermatozoides en un medio químicamente definido, se sugirió que la hipotaurina podría ser necesaria para la manifestación de la motilidad espermática en el hámster y que su pérdida en los lavados y dilución sería el factor responsable de la inmovilización del espermatozoide (Boatman y col., 1990). También Fraser (1986) había observado previamente la disminución de la motilidad tras el lavado de espermatozoides epididimarios de ratón y su posterior incremento después de la adición de taurina.

La taurina, a parte de ejercer un efecto positivo en la motilidad espermática, influye positivamente en la fecundación (Leibfried y Bavister, 1981) y en el desarrollo embrionario; de hecho, la inclusión de taurina en un medio de cultivo dio lugar a un mayor número de embriones de 2 células que alcanzaron la fase de blastocisto (Dumolin y col., 1992). Además, sus niveles se elevan en los fluidos uterinos durante el periodo de pre-implantación de los embriones de conejo (Miller y Schultz, 1987).

Pese al papel fundamental que la taurina parece tener en el mantenimiento de la motilidad espermática en el hamster (Mrsny y col., 1979; Leibfried y Bavister, 1981), su presencia no es imprescindible en el ratón, lo que hace deducir diferentes respuestas a la adicción de taurina e hipotaurina en las diferentes especies (Fraser, 1986). En el hombre, la suplementación del medio de preparación de los espermatozoides con hipotaurina no afectó

a la motilidad progresiva de los espermatozoides, así como tampoco ejerció una protección de la integridad del ADN, ni afectó a la producción de ERO; sin embargo, consiguió una significativa protección contra éste y contra los daños ejercidos por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el ADN celular (Donnelly y col., 2000).

La taurina también es capaz de influir en la capacitación espermática. Ya desde las primeras investigaciones se observan probables efectos en la estimulación de la capacitación del espermatozoide de hámster (Mrsny y col., 1979), además Meizel y col. (1980) consideran que la taurina y la hipotaurina pueden mantener y estimular la motilidad espermática así como estimular la capacitación y/o la reacción acrosómica.

### **b. Glutamina**

Los efectos protectores de la **glutamina** quedaron probados en los trabajos realizados sobre la congelación de fibroblastos de hamster (Kruuv y col., 1988; Kruuv y Glofcheski, 1990; 1992), donde se demuestra que tanto la glutamina como también la prolina aportaron mayor protección celular que otros 15 aminoácidos (Kruuv y Glofcheski, 1992).

El mecanismo de protección de la glutamina en la congelación de fibroblastos parece ser independiente del DMSO, propilenglicol (Kruuv y col., 1988) o glicerol (Kruuv y Glofcheski, 1990) y actúa protegiendo las proteínas de la membrana con lo que contribuye a la manutención de su actividad funcional (Kruuv y col., 1988). Sin embargo, en la congelación de enzimas como la alcohol-deshidrogenasa hepática, la glutamina no actúa independiente del DMSO (Heinz y col., 1990) así como en la protección de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa del retículo sarcoplasmático del músculo esquelético, donde la glutamina aporta una protección mediana (Lalonde y col., 1991).

### **c. Prolina**

Este aminoácido existe naturalmente y a elevadas concentraciones en las plantas halofitas, estando su concentración directamente correlacionada con la tolerancia a la sal. Estos datos sugieren que sus funciones están relacionadas con la regulación osmótica celular, en medios salinos (Steward y Lee, 1974). Estudios en cloroplastos han demostrado su papel crioprotector, observándose también que aporta resistencia a las plantas donde se acumula (Heber y col., 1971).

Por otra parte, estudios realizados en la congelación de fibroblastos han demostrado la eficacia crioprotectora de la prolina en la preservación de la estructura y la función de las membranas (Rudolfh y Crowe, 1985; Anchordoguy y *col.*, 1987; Kruuv y Glofcheski, 1990). También presenta efecto protector en la congelación de enzimas como se ha probado con la lactato-deshidrogenasa (Carpenter y Crowe, 1988).

El mecanismo protector de las membranas parece iniciarse con la interacción hidrofóbica de la prolina en las cadenas de hidrocarbonadas de la membrana (Anchordoguy y *col.*, 1987).

#### 2.3.1.2.8. Otros compuestos

En conjunto con otros crioprotectores como el glicerol, ciertas sustancias han sido utilizadas con éxito, como el **factor activador de plaquetas** (PAF) y la **pentoxifilina**, ambos han mejorado la motilidad pos-descongelación del espermatozoide humano (Bell y *col.*, 1993). Igualmente, la adición de **lacto-albúmina bovina**, la **vitamina E**, así como el **colesterol**, **BSA** (albúmina sérica bovina) y el **plasma seminal** bovino y ovino (Ollero y *col.*, 1996; 1998b) han protegido al espermatozoide ovino de los daños de la criopreservación. La vitamina E ha sido igualmente beneficiosa en la protección contra la peroxidación lipídica en el espermatozoide de macho cabrío (Srivastava y *col.*, 2000). La inclusión de **ácidos linoleico-oleico** y vitamina E conjuntamente con proteínas del plasma seminal presenta efectos beneficiosos en la supervivencia del espermatozoide de morueco y previene los daños de la membrana derivados del choque térmico (Pérez-Pé y *col.*, 2001). Sin embargo, Álvarez y Storey (1993) no encontraron efectos beneficiosos en la presencia de BSA ni de vitamina E en la preservación de la motilidad pos-descongelación del espermatozoide humano.

#### 2.3.1.3. Periodos de refrigeración y de equilibrio

Un aspecto a tener en cuenta en un protocolo de congelación es el **periodo de refrigeración**, es decir, incluyendo desde la recogida y dilución del semen hasta que éste alcanza a una temperatura de 4-5°C y el siguiente **periodo de equilibrio**, a esta temperatura, antes de congelación.

Para Januskauskas y col. (1999), es importante que la refrigeración o enfriamiento se realice bajo condiciones óptimas, puesto que los espermatozoides de la mayoría de los mamíferos son sensibles al enfriamiento rápido, pudiendo afectar a su supervivencia postdescongelación. Estos autores estudiaron dos ritmos distintos de refrigeración (4,2°C/min y 0,1°C/min) de los espermatozoides de toro, a lo largo de un periodo de 4 horas para refrigeración y siguiente equilibrio, no existiendo diferencias significativas entre los parámetros de viabilidad y fertilidad.

Los trabajos de Fiser y col., (1996) en el espermatozoide de cerdo muestran los efectos beneficiosos de periodos largos de equilibrio, observándose mejores porcentajes de espermatozoides móviles y de mantenimiento de la integridad acrosomal tras 4 horas de equilibrio a 5°C. Estos trabajos evidenciaron que no es necesario un crioprotector como el glicerol a ésta temperatura, ya que el semen sin glicerol se comporta de igual modo que el semen "glicerolado" a la exposición a 5°C; pareciendo que este periodo de equilibrio sería sobretodo importante para que puedan producirse alteraciones en la membrana plasmática del espermatozoide, haciéndole menos susceptible a las lesiones de la criopreservación, ya que, como evidenció Almlid y Johnson (1988) la penetración del glicerol es muy rápida. El equilibrio se obtiene en muy poco tiempo (menos de 30sg), no necesitando, por ello, de un periodo de exposición largo. Estos datos hicieron que Fiser y col. (1996) se cuestionaran la necesidad de equilibrio del espermatozoide en la presencia de un crioprotector, en este caso el glicerol, o si, como sugieren, que el semen sea expuesto a la temperatura de 5°C y que glicerol sea adicionado en cualquier momento próximo a la congelación, dada su rápida penetración en la célula. De hecho, la duración de la exposición al glicerol en la precongelación, en el rango de 0,5 a 75 minutos, no tuvo efecto alguno en la viabilidad postdescongelación. Sin embargo, la temperatura a la que se realiza la adición del glicerol, como ya ha sido mencionado, parece ser un factor importante en el espermatozoide de algunas especies como el cerdo; habiendo estos autores observado una reducción en la supervivencia pos-descongelación cuando el glicerol es adicionado entre 20°C y 0°C a diferencia de la adición a 5°C (Almlid y Johnson, 1988).

En la congelación del semen de perro la mayoría de los estudios no han evaluado completamente el ritmo de refrigeración o el período de equilibrio antes de la congelación y han utilizado valores arbitrarios (England, 1993). La escasa investigación llevada a cabo sobre el periodo de equilibrio en la congelación del semen de perro hace que no esté, habitualmente, separado del tiempo de refrigeración (Farstad, 1996).

En la bibliografía encontramos estudios como el de Andersen (1980) quién, tras la dilución del semen, utilizó un periodo de refrigeración y equilibrio de cerca de 2 a 3 horas. Olar y col. (1989) analizaron distintos periodos de refrigeración y de equilibrio, y observaron que un periodo de refrigeración de 1, 2 o 3 h y un periodo de equilibrio de 1 o 2 h no afectaron la motilidad precongelación. Sin embargo, los mejores resultados de motilidad pos-descongelación han sido observados cuando utilizaban 1 h de refrigeración y 1 h de equilibrio o 2 h de refrigeración y 2 h de equilibrio. Los trabajos de Hay y col. (1997a) acerca de la penetración de *zona pelúcida* homóloga tras refrigeración rápida de los espermatozoides en 30 min, en comparación con la refrigeración lenta a lo largo de 3 h, pusieron de manifiesto que la refrigeración lenta de los espermatozoides de perro no afectó a la capacidad de penetrar ovocitos. Al revés, la refrigeración rápida indujo un marcado declive en el número de espermatozoides unidos por ovocito y originó daños como el descenso de la motilidad y la pérdida del acrosoma; pudiendo estos últimos observarse *a posteriori* del primero.

Los estudios para obtener la mejor velocidad de refrigeración deben tener en cuenta la influencia del tipo de diluyente. En los trabajos de Bouchard y col. (1990) los parámetros de motilidad se han mantenido mejor cuando el semen era refrigerado a 4°C a velocidades rápida y media. También observaron que el diluyente constituido con leche descremada y glucosa presentó mejores resultados que otro que contenía yema de huevo-citrato y azúcares, lo que puso en evidencia la interacción entre tipo de diluyente, temperatura y tiempo.

#### **2.3.1.4. Ritmos de congelación y descongelación**

La extensión de los daños sufridos por los espermatozoides durante la criopreservación está, en parte, relacionado con las velocidades a que éstos son congelados y descongelados (Mazur, 1984). Los ritmos de congelación y descongelación deben ser investigados y optimizados conjuntamente con las concentraciones de glicerol, pues la supervivencia de las células depende de estas variables y de sus importantes interacciones (Watson y Martin, 1975; Robbins y col., 1976; Mazur, 1984; Fiser y col., 1993). Además, en el intento de obtener el mejor protocolo de criopreservación, debe buscarse optimizar y mantener la integridad acrosomal y la motilidad (Fiser y col., 1993).

Robbins y col. (1976) observaron, en la congelación del espermatozoide de toro, que para aumentar la concentración de glicerol a fin de proporcionar una buena crioprotección

sería necesario aumentar también la velocidad de descongelación. Estos autores defienden que el glicerol es habitualmente adicionado al semen a concentraciones “normales” pero su concentración va aumentar a niveles “perjudiciales” durante la congelación y la descongelación, debido a la deshidratación derivada de la formación de hielo. En consecuencia, el semen congelado y descongelado rápidamente tendrá una menor exposición a los solutos y al crioprotector concentrados. Un trabajo de Rota y col. (1998) sobre congelación del espermatozoide canino en el que analizaron dos concentraciones de glicerol, el 3 y 5%, así como 2 ritmos de descongelación 38°C/1 min o 70°C/8sg, constataron que el porcentaje mas alto de glicerol asociado a la más rápida velocidad de descongelación proporcionaron el mayor porcentaje de espermatozoides vivos y móviles; así como, una mayor supervivencia durante la incubación.

Existe consenso en que para minimizar la duración de exposición del espermatozoide a las distintas situaciones de estrés de la congelación, y así proporcionar una óptima supervivencia, es necesario un ritmo de **congelación** rápido y también un tiempo suficiente para permitir que el agua salga de la célula por ósmosis evitando la formación de hielo intracelular, letal para el espermatozoide. Generalmente, el espermatozoide es congelado a un ritmo de 15-60°C/min (Watson, 2000).

También existe interacción entre la composición del medio diluyente y el ritmo de congelación, puesto que Woelders y col. (1997) congelando a velocidades más elevadas de lo normal, en presencia de azúcares y osmolaridad elevada del medio (hipertónico) han conseguido una alta protección contra los efectos de un ritmo rápido de congelación.

Para el semen de perro, algunos autores consideran mejores los **ritmos de congelación** más lentos, como 5,1°C/min versus 8°C y 18,8°C/min (Dobrinsky y col., 1993). Por otra parte, Olar y col.(1989), consideró el ritmo moderado de congelación (5°C y 20°C/min) como el mejor, mientras que Hay y col. (1997b) encontraron más efectos beneficiosos en el ritmo de 12-28°C/min que en el lento (0,5°C/min) o en el muy rápido (99-214°C/min). Estas diferencias pueden justificarse por el hecho de que los estudios hayan utilizado distintos diluyentes, así como, distintas condiciones de congelación y descongelación, y diferentes métodos de evaluación del semen tras la descongelación. Rota y col. (1998) que compararon un ritmo lento (10°C/min) y otro rápido (50°C/min) de congelación, no demostraron diferencias significativas entre éstos con respecto a la supervivencia pos-descongelación.

Yu y col. (2002) trabajando con espermatozoides epididimarios, conocidos por su menor susceptibilidad al choque térmico, y teniendo en cuenta sus resultados *in vitro* para la motilidad y la integridad de membrana, consideran el ritmo de 11°C/min como el ritmo de congelación óptimo para una descongelación rápida y el de 3-11°C/min para una descongelación más lenta, lo que evidenció igualmente la interacción entre el ritmo de congelación y de descongelación.

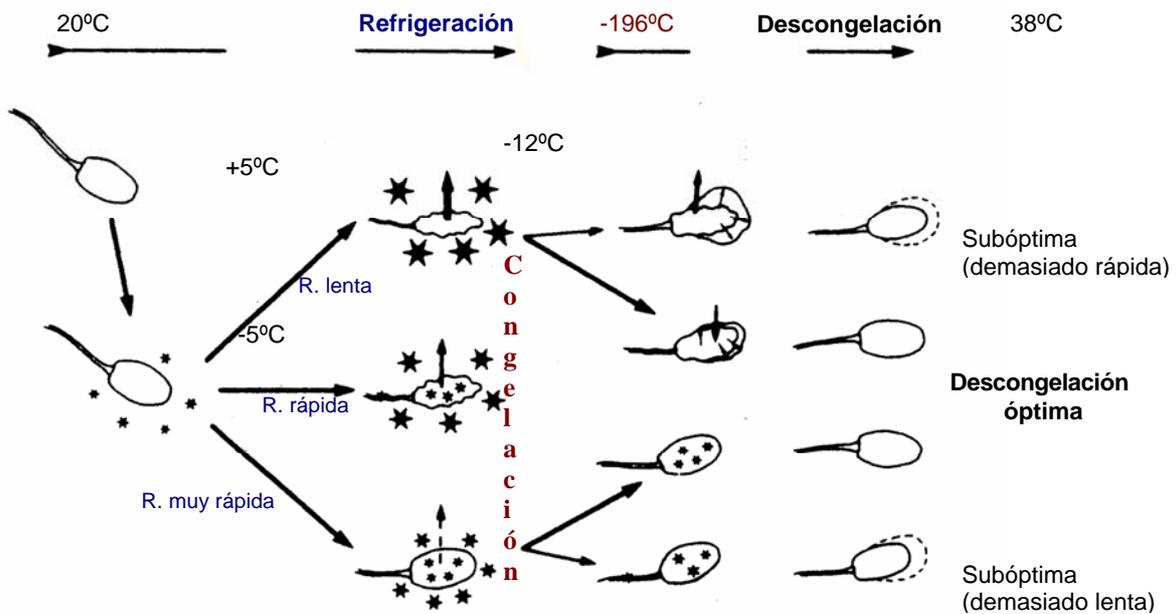
La velocidad de **descongelación** es uno de los factores más importantes que afectan decisivamente a la viabilidad del espermatozoide (Fiser y col., 1993). Esta deberá estar en concordancia con el protocolo de congelación (Mazur, 1984); siendo que los efectos de las velocidades de descongelación en la supervivencia del espermatozoide dependen del ritmo previo de congelación (Watson y col., 1992; Fiser y col., 1993). La existencia de la interacción entre las dos velocidades fue descrita en la congelación de espermatozoides de cerdo (Fiser y col., 1993; 1996), toro (Robbins y col., 1976) y hombre (Henry y col., 1993).

Las velocidades rápidas de congelación exigen ritmos de descongelación igualmente rápidos, con el fin de recuperar el equilibrio osmótico, la re-hidratación y las propiedades de la membrana, de modo semejante al que fue realizado durante la congelación (Farstad, 1996). Para Henry y col. (1993), la supervivencia de las células congeladas con velocidades rápidas es superior cuando las descongelaciones también son rápidas. Por otra parte, estos trabajos en el espermatozoide humano, evidenciaron que cuando la velocidad de congelación es lenta, la motilidad, función mitocondrial e integridad de la membrana son inferiores cuando el espermatozoide es descongelado rápidamente a diferencia de sí se hace lentamente. La figura 2.2. esquematiza los fenómenos que se producen por estas situaciones.

Habitualmente, cuando la descongelación del semen de especies domésticas, previamente congelado en pajuelas sumergidas en nitrógeno líquido o en *pellets* en hielo seco, es rápida se producen mayores proporciones de espermatozoides motiles y con el acrosoma intacto (Fiser y col., 1993). En el espermatozoide de perro, la descongelación a temperaturas elevadas, como 70°C, durante tan sólo 8 segundos favorece más la recuperación de la motilidad y la longevidad espermática que a 37°C durante 1 minuto (Rota y col., 1998).

Hay que tener en cuenta que las descongelaciones lentas resultan perjudiciales ya que proporcionan tiempo suficiente para que los pequeños cristales de hielo intra-celulares se agreguen constituyendo grandes cristales, en un proceso denominado de *recristalización*

(Mazur, 1984). Estos cristales causan daños y muerte celular, por la ruptura física de la membrana plasmática y de los orgánulos (Henry y *col.*, 1993). El aumento de la velocidad de congelación y de descongelación minimiza el tiempo de exposición de la célula a una zona de temperatura intermedia en la que se producen los efectos de solución; este principio es generalmente aceptado en la congelación de distintos tipos de tejidos y células (Saacke, 1983).



**Figura 2.2.** Representación esquemática de las alteraciones físicas del espermatozoide y del diluyente durante la congelación y la descongelación. Las estrellas representan cristales y microcristales de hielo. Las flechas representan el movimiento del agua o del crioprotector (Adaptado de Amann y Pickett, 1987).

## 2.4. Evaluación de la calidad espermática

### 2.4.1. Principios generales

La evaluación del semen antes, durante y después de los procesos de conservación ha sido la base del desarrollo de los métodos de preservación seminal en los laboratorios de investigación (Saacke, 1983). Las pruebas laboratoriales que tienen por objeto la evaluación *in vitro* de la fertilidad seminal y la apreciación de los daños que se producen en el espermatozoide, derivados del proceso de conservación previo a la inseminación, crean la necesidad de técnicas rápidas y exactas (Smith y Murray, 1997).

Pese a que las funciones desempeñadas por el espermatozoide se desarrollan en una compleja secuencia, las distintas funciones espermáticas pueden ser englobadas en 3

grandes grupos: -mantenimiento de la integridad celular, -capacidad de penetración y fecundación del ovocito y -competencia para soportar el desarrollo embrionario (Harrison y col., 1996). La Tabla 2.3 resume las características necesarias para que los espermatozoides puedan ser fértiles.

Continuamente se cuestiona si una determinada prueba laboratorial o la combinación de varias diferentes puede predecir la fertilidad del semen de una determinada muestra o de un macho. De un modo general, los datos publicados tienen un valor muy limitado en el establecimiento de correlaciones entre pruebas de laboratorio y fertilidad. Para que dicha correlación pueda establecerse es fundamental disponer de sistemas de análisis precisos, específicos y rigurosos así como datos de la fertilidad precisos y exactos. Todas las pruebas de laboratorio implicadas en la evaluación de la calidad seminal deben ser cuidadosamente validadas y, una vez establecidas, su precisión debe ser monitorizada diariamente (Amann, 1989).

**Tabla 2.3.** Atributos del espermatozoide fértil

1. Estructura normal de los componentes funcionales vitales.
2. Procesos metabólicos adecuados a nivel de las funciones celulares como la producción de energía necesaria para la motilidad, mantenimiento del potencial de membrana, de los micro-ambientes iónicos, pH y otras.
3. Motilidad suficiente para permitir la penetración a través del cérvix y de la unión útero-tubárica, y permitir la salida de las zonas de "almacenamiento" espermático en la mucosa y el istmo del oviducto, para contactar con el ovocito y penetrar las envolturas alrededor del mismo.
4. Mantenimiento de las proteínas periféricas e integrales de la membrana plasmática, esenciales o facilitadoras de la supervivencia en el ambiente del tracto reproductor femenino.
5. Respuestas apropiadas al micro-ambiente y estímulos en el trato reproductor femenino.
6. Mantenimiento de las proteínas (probablemente integrales) de la membrana plasmática, esenciales al reconocimiento y unión del espermatozoide a la *zona pelúcida* y a la membrana vitelina.
7. Mantenimiento de las enzimas del acrosoma, como pro-enzimas o en forma inhibida, pero disponibles en el tiempo apropiado para facilitar la penetración de las envolturas del ovocito.
8. Membrana plasmática con capacidad de ser alterada de modo oportuno, para permitir la fusión con la membrana acrosomal externa durante la reacción acrosómica o para permitir la fusión de espermatozoide y membrana plasmática del ovocito.
9. *Momento* preciso de los innumerables pasos en la secuencia de eventos entre que la espermátida es formada por la división del espermatozocito secundario hasta que la misma célula entra en el ovocito y forma el pronúcleo masculino, cuyos cromosomas se unen con los del pronúcleo femenino y producen un embrión con la máxima probabilidad de supervivencia.
10. ADN debidamente estabilizado por las nucleoproteínas, pero capaz de sufrir descondensación en el momento apropiado del proceso de fecundación.

(Adaptado de Amann, 1989)

En la evaluación de la calidad seminal, con el objetivo de predecir la fertilidad, es esencial que sean realizados análisis de algunos parámetros independientes, y si es posible evaluar cada atributo usando más de un análisis adecuado. La precisión de cualquier prueba de laboratorio puede estar influenciada por la variación biológica, por el error humano implicado en la realización del análisis y por la *manera de trabajar* del equipo. Por tanto, para que las pruebas laboratoriales sean consideradas útiles en la predicción de la fertilidad ha de tenerse prudencia en la selección de atributos que se analicen, debiendo alcanzar un amplio rango de valores que puedan ser medidos por dichos análisis con alta precisión, y han de ser independientes entre sí pero correlacionados con la fertilidad (Amann, 1989).

Idealmente, los datos laboratoriales y de fertilidad deberían provenir de la misma muestra, hecho que se puede realizar en los bóvidos pero imposible en otras especies, como la humana. Los datos de fertilidad basados en inseminaciones de eyaculados humanos individuales se consideraron demasiado imprecisos para ser significativos. Además, en el toro es posible recoger varios eyaculados en un intervalo de 30 a 90 min que pueden ser reunidos en una muestra única, un pool que puede ser usado para evaluaciones laboratoriales y para inseminación artificial, pudiendo ser preparadas 600 o hasta 1000 muestras a partir de un pool. Evidentemente, la fertilidad de una muestra de semen bovino puede ser establecida con mucha más precisión que la de una muestra de semen humano (Amann, 1989).

#### **2.4.1.1. Semen fresco**

En la evaluación de rutina de un **eyaculado fresco** generalmente están incluidas la determinación inmediata del volumen, de la concentración y del porcentaje de espermatozoides que exhiben motilidad progresiva, siendo estos los parámetros más importantes en la toma de decisiones que conciernen a un posterior procesamiento del eyaculado, como dilución y congelación (Rodríguez-Martínez y col., 1997). Otros parámetros también analizados son la morfología, el pH seminal, la longevidad de la motilidad y el *status* bacteriológico (Malmgren, 1997). Pese a que estas pruebas proporcionan una cantidad apreciable de información, sus correlaciones con la fertilidad son un tanto conflictivas (Malmgren, 1997), tal como ya lo habían señalado Linford y col. (1976). Sin embargo, estos autores evidenciaron que era posible establecer límites, fuera de los cuales las muestras de semen pueden ser consideradas de mala calidad y descartadas. También la determinación de la concentración y el estudio de la morfología espermática permite, dado su valor diagnóstico, la eliminación de eyaculados de sementales con una fertilidad potencialmente

baja antes de la preservación (Rodríguez-Martínez y col., 1996). De un modo general, el espermograma facilita la detección de eyaculados con una capacidad fecundante posiblemente baja, pero no es capaz de predecir el resultado de algunos sementales cuyos parámetros seminales están dentro de los límites normales, especialmente en la congelación (Rodríguez-Martínez y col., 1996).

En el perro, la mayoría de los investigadores defienden que solo eyaculados con un mínimo de 85-90% de motilidad o 75-85% de motilidad progresiva deben ser considerados útiles para congelación, y que las muestras con menos de 70% de motilidad son malas candidatas a la congelación (Concannon y Battista, 1989). Sin embargo, en esta especie la información sobre la relación entre la calidad seminal y fertilidad es escasa (Morton y Bruce, 1989; Linde-Forsberg, 1995). La mayoría de los estudios de las variables en la congelación han estado limitados en esta especie por la falta de indicadores concretos de fertilidad (Concannon y Battista, 1989). Tampoco existe mucha información relativa a las variaciones en la calidad de semen fresco de perros fértiles, pero parece ser que el rango de valores seminales compatibles con la fertilidad es mayor que el esperado (Tabla 2.4) y, por otra parte, que los perros con mala calidad seminal pueden ser fértiles, en determinadas circunstancias (England y Allen, 1989).

**Tabla 2.4.** Características del eyaculado de perros fértiles\*

Parámetro	
Motilidad (%)	89,5±7,6
Volumen (mL)	1,2±0,7
Concentración ( $\times 10^6$ /mL)	299,6±127,9
Número total de esp. en un eyaculado ( $\times 10^6$ )	332,75±166,5
Morfología normal (vivos)	78,2±7,9
Anomalías primarias (vivos y muertos)	1,6±2,6
Anomalías secundarias (vivos y muertos)	10±5,4

(\*n=28) (Adaptado de England y Allen, 1989)

Los parámetros de calidad del semen fresco no parecen predecir la motilidad progresiva pos-descongelación, como fue observado por Nöthling y col. (1997), con excepción de la persistencia de las gotas citoplasmáticas, que se correlacionaron negativamente con la motilidad pos-descongelación.

#### 2.4.1.2. Semen refrigerado y congelado

En cuanto a la evaluación de la calidad espermática después de un calentamiento a 37°C en un semen **refrigerado** o bien tras la **descongelación**, la prueba más adecuada para evaluar la eficacia de las técnicas de congelación del semen sería la evaluación de los porcentajes de concepción (Oettlé, 1986a; Watson, 1996) y del tamaño de la camada resultante de la inseminación artificial (Farstad, 1996). Ambos son indicativos de la eficacia de la fecundación de los ovocitos por espermatozoides con capacidad para mantener y sustentar el desarrollo embrionario (Watson, 1996). Sin embargo, el prolongado intervalo interestral de la perra compromete seriamente las pruebas de fertilidad *in vivo* (Bouchard y col., 1990) que, por su parte, exigen un considerable dispendio de tiempo y recursos (Watson, 1979). Estos análisis resultarían completamente impracticables cuando están implicadas especies o razas exóticas (Harrison, 1998). También hay que tener en cuenta que la fertilidad de una muestra seminal es una variable continua, así que serían necesarias múltiples inseminaciones para el establecimiento de una correcta evaluación (Watson, 1979). Sería, por otra parte, prácticamente imposible obtener datos con significado estadístico a partir de eyaculados únicos (Harrison, 1998). Además de exigir un número substancial de animales, las pruebas de fertilidad dependen de determinados factores que no están exclusivamente relacionados con la calidad del semen, como es el caso de la dosis de inseminación, el volumen, número de inseminaciones, lugar de deposición del semen, *momento óptimo* de la inseminación y factores individuales de la hembra (Farstad, 1996).

Las investigaciones alternativas a los ensayos de fertilidad incluyen pruebas *in vitro* que valoran las diferentes características del espermatozoide necesarias para la fecundación, como son la **motilidad progresiva**, la **viabilidad** y la **integridad** de las membranas plasmática y acrosómica. Combinando dos o más de estas pruebas es posible obtener una correlación importante con el potencial fertilizante de la muestra de semen (Amann y Hammerstedt, 1993). Otros análisis incluyen las concentraciones de metabolitos, la actividad de enzimas específicas y la interacción espermatozoide-ovocito (Den Daas, 1992).

Para Harrison y col., (1996) las pruebas de fertilización *in vitro* serían claramente los más apropiados para la evaluación global de las funciones de fecundación del espermatozoide; de modo que, con los progresos en las condiciones de cultivo, éstas pruebas podrían ser utilizadas en el futuro para evaluar la capacidad de fecundación y desarrollo embrionario del espermatozoide. Sin embargo, estos autores advierten que para la realización de esta prueba es necesario un largo número de ovocitos madurados, lo que hace la técnica altamente costosa para un análisis de rutina por lo que se han sugerido

pruebas funcionales alternativas como el ensayo de hemi-zona. Es, además, una técnica lenta y muy exigente en recursos y pericia (Harrison, 1998).

#### **2.4.2. Pruebas clásicas de evaluación seminal**

Éstos incluyen principalmente la motilidad y longevidad, viabilidad, concentración, morfología e integridad de la membrana plasmática y del acrosoma.

##### **2.4.2.1. Motilidad espermática**

La **motilidad** es considerada el criterio más importante en la evaluación de la fertilidad del macho, el objeto de su estimación es determinar la proporción de espermatozoides móviles y la proporción de los que se mueven progresivamente (Malmgren, 1997). La motilidad del espermatozoide es un factor crítico en el proceso de interacción de los gametos; una disminución en la velocidad y en la proporción de células móviles progresivas refleja lesiones celulares que pueden reducir las posibilidades de fecundación (Kjaestad y col., 1993). Motilidad y velocidad espermáticas muestran dos aspectos distintos de la actividad flagelar, pero ambos dependen de la función del axonema, por tanto, se espera una correlación entre estos parámetros (Kjaestad y col., 1993).

##### **2.4.2.1.1. Estimación subjetiva**

La **estimación visual** del porcentaje de espermatozoides móviles es el examen laboratorial, para evaluación de la calidad espermática, más frecuentemente realizado (Budworth y col., 1988); existiendo una variación, que puede ser marcada, entre los técnicos del mismo o de distintos laboratorios en la apreciación subjetiva de la motilidad progresiva de una muestra (Amann, 1989).

Para mejorar el rigor de este examen algunos aspectos técnicos deben ser estandarizados, como es el caso de -la previa dilución del semen (fresco), para evitar la aglutinación de los espermatozoides y reducir la influencia de la concentración y del pH seminal, -la utilización de las mismas condiciones como la concentración apropiada y -un volumen constante de muestra así como -la dimensión del cubre y -el control estricto de la temperatura del equipamiento y del material (Malmgren, 1997) y -la misma ampliación

microscópica (Concannon y Battista, 1989). El entrenamiento y la experiencia del técnico son aspectos igualmente importantes (Linford y col., 1976). Cuando se trata de comparar diferencias entre tratamientos las estimaciones de motilidad deben ser efectuadas por el mismo individuo (Concannon y Battista, 1989).

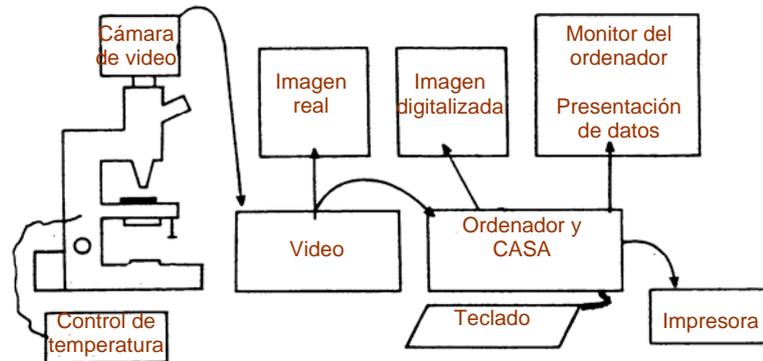
#### **2.4.2.1.2. Análisis computerizado (CASA)**

La determinación objetiva de la motilidad de una muestra no siempre es posible basándose en un examen visual, por la subjetividad inherente y a la reducida cantidad de la muestra. En consecuencia, evaluar una muestra o un protocolo de criopreservación de semen con base en este parámetro podrá resultar en una baja correlación con la fertilidad *in vivo*. Desde los años ochenta, este problema está perdiendo importancia con la introducción de los sistemas de análisis de imagen computerizados (figura 2.3), **CASA** (Computer Assisted Sperm Analysis), que han sido desarrollados inicialmente para su uso en el análisis de la motilidad del semen humano (Johnson y col., 1996). Estos sistemas computerizados posibilitan un análisis de la motilidad automático, rápido y objetivo (Anzar y col., 1991; Malmgren, 1997), basado en la evaluación de los espermatozoides individualmente, proporcionando un cálculo preciso de los distintos parámetros seminales (Verstegen y col., 2002).

Inicialmente su aplicación ha sido problemática en el semen de las especies animales, pero con las mejoras introducidas durante años, estos sistemas están siendo ampliamente utilizados en la investigación y en la industria (Johnson y col., 1996). Estos sistemas minimizan la subjetividad de la apreciación humana siendo particularmente ventajosos en situaciones de evaluación de un gran número de muestras o cuando existen frecuentes cambios de los técnicos del laboratorio (Tuli y col., 1992). Los trabajos de Farrell y col. (1998) indican que el porcentaje de células móviles detectadas por CASA ha sido más alto que el detectado subjetivamente, lo que sugiere que el sistema CASA proporciona una estimación más discriminatoria que los métodos subjetivos.

El concepto general subyacente a los sistemas de análisis de la motilidad espermática reside en la utilización de un microscopio de contraste de fases (contraste negativo), a partir del cuál y por medio de una cámara de video se obtiene la imagen de la muestra y se digitaliza. A continuación, son aplicados varios algoritmos para analizar la motilidad espermática (Amann, 1989). Básicamente existen 2 tipos principales de sistemas CASA, uno que captura una secuencia de 20 imágenes en aproximadamente 0,8 segundos y

analiza los movimientos del espermatozoide retrospectivamente y otro que opera en tiempo real en periodos de tiempo prolongados (Holt, 1996).



**Figura 2.3.** Componentes de los sistemas utilizados en la evaluación computarizada de la motilidad espermática (CASA). Adaptado de Budworth y col. (1988). Este modelo necesitaba 2 monitores, uno donde visualizar las imágenes y otro para el ordenador como era necesario para el SCA<sup>®</sup> 2000; en la actualidad, únicamente con el monitor del ordenador pueden realizarse ambas funciones como sucede con la versión 2002.

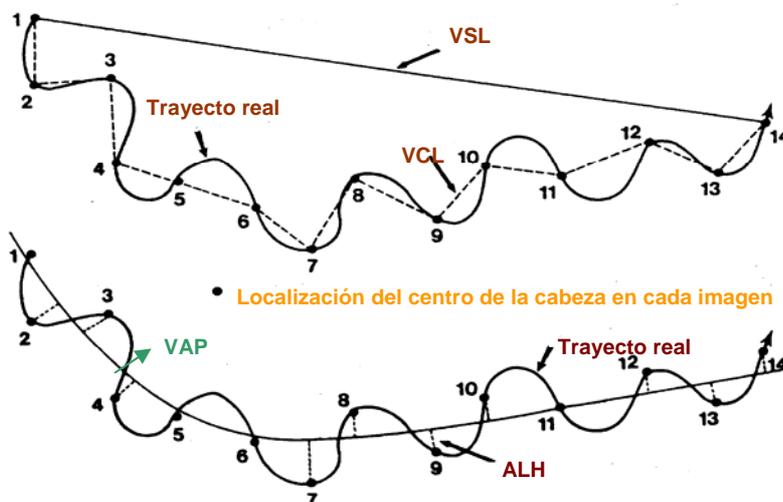
Las mediciones de la cinética individual de cada espermatozoide están basadas en la hipótesis de que la motilidad espermática revela información acerca de la *actuación* funcional del axonema y de las membranas (Davies y Siemers, 1995). Los sistemas miden los movimientos de los espermatozoides en 10 parámetros diferentes y procesan los respectivos datos (Johnson y col., 1996) (Tabla 2.5). En comparación, resulta más exacto el análisis computerizado de una muestra que el realizado visualmente por distintos técnicos (Tuli y col., 1992). El CASA proporciona estimaciones de múltiples características del movimiento espermático con alta probabilidad de repetición (Farrell y col., 1998).

A pesar de la naturaleza automática del proceso y la objetividad de los resultados es importante proceder a la validación cuidadosa del sistema (Malmgren, 1997). Tal como en algunos métodos cualitativos, el rigor y la precisión están limitados por factores biológicos y técnicos (Tabla 2.6) incluyendo las condiciones en que se realiza la medición como la temperatura, el tipo de cámara utilizada y su profundidad y los métodos de medición (Davis y Siemers, 1995). Los valores de los parámetros del sistema son distintos para las distintas especies, debiendo éstos junto con el medio diluyente, los procedimientos y todos los factores que afectan estar claramente adaptados a la especie y a las condiciones del procedimiento; debiendo corresponderse con las características particulares de los espermatozoides, su concentración, velocidad, tamaño y la temperatura (Verstegen y col., 2002).

**Tabla 2.5.** Terminología del sistema CASA: definición de las abreviaturas

Abreviatura	Definición	Descripción
<b>MOT</b>	Espermatozoides móviles (%)	Porcentaje de espermatozoides con motilidad
<b>PM</b>	Espermatozoides móviles progresivos (%)	Porcentaje de espermatozoides con STR >80%
<b>VCL</b>	Velocidad curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ )	La media de la velocidad del recorrido de los espermatozoides desde el punto actual al punto real siguiente (figura 2.4)
<b>VAP</b>	Velocidad promedio ( $\mu\text{m/s}$ )	Velocidad del recorrido promedio realizado por el espermatozoide (figura 2.4)
<b>VSL</b>	Velocidad rectilínea ( $\mu\text{m/s}$ )	Velocidad del recorrido medido en línea recta desde el punto inicial al punto final (figura 2.4).
<b>STR</b>	$VSL/VAP$ (%)	Estima la proximidad del recorrido del espermatozoide a una línea recta, y es el resultado de dividir el valor de la VSL entre la VAP (%)
<b>LIN</b>	Índice de linearidad ( $VSL/VCL$ ) (%)	Estima la proximidad de la trayectoria real del espermatozoide a una línea recta, y es el resultado de dividir el valor de la VSL entre la VCL (%)
<b>BCF</b>	Frecuencia de cruces o promedio de la frecuencia (Hz)	Promedio de la frecuencia (en el tiempo) con la que la trayectoria curvilínea del espermatozoide cruza la trayectoria promedio
<b>ALH</b>	Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza ( $\mu\text{m/s}$ )	Magnitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide con respecto a su trayectoria promedio (figura 2.4)

(Adaptado de [www.microopticsl.com](http://www.microopticsl.com))



**Figura 2.4.** Parámetros utilizados en el análisis computerizado de la motilidad espermática. Adaptado de Budworth y col. (1988).

La exactitud de estos métodos es también dependiente de las especificaciones del *software* (Rodríguez-Martínez y *col.*, 1996). Por otra parte, estos instrumentos no están libres de la influencia del técnico que analiza las muestras, siendo aspectos esenciales -un control de calidad interno, -una correcta definición de las condiciones de preparación de la muestra y del funcionamiento del sistema, así como -una estricta preparación del técnico (Rodríguez-Martínez y *col.*, 1997).

Además, este sistema permite al técnico alterar los parámetros del análisis con facilidad y, por visualización del monitor, comprobar si se está permitiendo una correcta discriminación de las partículas; hecho especialmente importante en la identificación correcta de los espermatozoides móviles, inmóviles y de partículas estáticas que no sean espermatozoides (Tardif y *col.*, 1997). Dentro de los parámetros que el técnico puede controlar destacan la intensidad, el tamaño de las partículas, el ritmo de adquisición de imágenes (entre 15, 30 y 60 Hz) y la selección del número de imágenes incluidas en el análisis de motilidad (Verstegen y *col.*, 2002).

Las desventajas de estos sistemas están, en resumen, relacionadas con los costes del equipo, la necesidad extrema de validación, el control de calidad y de la estandarización de las mediciones realizadas (Verstegen y *col.*, 2002). La aplicación del CASA para evaluación de rutina en los laboratorios de reproducción animal sigue limitada por sus costes (Johnson y *col.*, 1996).

**Tabla 2.6.** Factores técnicos que afectan las mediciones cinéticas del espermatozoide

1. Condiciones de medición (temperatura, tipo de cámara, profundidad, medio de suspensión, longitud de onda y intensidad)
2. Estabilidad matemática de la medición
3. Exactitud y precisión del equipo
4. Ritmo de captura
5. Tamaño de la muestra
6. Análisis estadístico
7. Estado biológico de la muestra

(Adaptado de Davis y Siemers, 1995)

Se reconoce que los sistemas CASA proporcionan datos fiables solo en un rango óptimo de concentración espermática, dado que en presencia de pocos espermatozoides el análisis es logísticamente impracticable mientras que, en presencia de demasiados surgen errores en la estimación de la concentración y de los movimientos, debido al cruzamiento de

trayectorias de los espermatozoides (Irvine, 1995). Las muestras de semen fresco deben ser diluidas antes del análisis computerizado a fin de reducir la concentración de espermatozoides y así, permitir el análisis de las trayectorias individuales; de modo que el diluyente utilizado para reducir la concentración debe estar libre de partículas de tamaño semejante al tamaño de la cabeza del espermatozoide, para evitar su clasificación como espermatozoide inmóvil (Malmgren, 1997). También en la evaluación de semen bien calentado o descongelado es recomendable la previa dilución, a fin de proporcionar una concentración más apropiada para la evaluación computerizada de motilidad espermática, que en el semen de toro es de 10-12 millones/mL (Amann, 1989). Para el sistema computerizado Hamilton-Torn la concentración óptima para evaluación está en el rango 5-50 millones/mL (Irvine, 1995), mientras que Verstegen y col. (2002) refieren que la mayoría de los sistemas CASA pueden funcionar para estimaciones de concentración y de motilidad con muestras en el rango 20 a 50 hasta 300 millones/mL, pero recomienda su verificación manual.

Las características de motilidad del espermatozoide congelado en un diluyente que contiene glicerol suelen ser considerablemente distintas de las características que han sido medidas en una muestra de semen fresco y diluido en un medio con menor viscosidad (Amann, 1989). El análisis de la concentración y de la motilidad de las muestras depende de si éstas son frescas o descongeladas, exigiendo distintos *valores* de los parámetros, teniendo en cuenta el medio de congelación con el que el eyaculado fue previamente diluido (Verstegen y col., 2002).

El número de campos a analizar depende del número de espermatozoides por campo (Budworth y col., 1988), pero se considera de un modo general que aumentando el número de campos y de células analizadas incrementará la precisión de los resultados (Malmgren, 1997). Aumentando el número de campos se observa una disminución en el error estándar de parámetros como el porcentaje de espermatozoides móviles y de la velocidad lineal, pero parece no existir ventaja en analizar más de 200 espermatozoides por muestra (Budworth y col., 1988). Además, el técnico debe controlar la temperatura del equipo, del diluyente y del porta y eliminar o minimizar las potenciales fuentes de error como la presencia de detritus (Budworth y col., 1988).

Estos equipos también pueden proporcionar la determinación de la concentración, proceso rápido y fiable (Anzar y col., 1991) que presenta una elevada correlación con la espectrofotometría (Farrel y col., 1998) y de la morfología (Coetzee y col., 1999). Se recomienda una adecuada dilución del semen para el cálculo de la concentración y así, evitar

la presencia simultánea de 2 o más espermatozoides en el mismo punto (Anzar y col., 1991). Algunos autores han observado cierta sobrestimación en el cálculo de la concentración que puede ser debida a las colisiones, ya que la evaluación correcta se obtuvo realizando los cálculos tras matar los espermatozoides con una solución hipertónica de NaCl al 9% (Verstegen y col., 2002). Al evaluar la concentración es necesario tener en cuenta determinados factores, ya que tanto el diluyente utilizado (su densidad y su previa ultrafiltración) como los valores del programa afectan significativamente a dicha estimación. También el ligero movimiento de fondo causado por el movimiento de las células y el movimiento de la solución puede conducir al recuento de falsos espermatozoides móviles; ésto puede evitarse diluyendo las muestras a la ratio más apropiada y utilizando una gota del volumen adecuado (Anzar y col., 1991).

En muchos estudios, el análisis cuantitativo de la motilidad espermática conlleva el tratamiento de los datos en valores de la media o mediana, derivados de la serie de los trayectos espermáticos medidos individualmente. Este método es conveniente para el análisis de datos, especialmente cuando hay un gran número de muestras, pero es probable que se pierda información o que ésta sea poco clara (Holt, 1996); pudiendo el análisis estadístico clásico revelarse inadecuado para la evaluación de la motilidad espermática (Verstegen y col., 2002). Se reconoce que el eyaculado contiene distintas poblaciones y que éstas pueden ser seleccionadas (por ejemplo, mediante *swim-up*), por este motivo y en este caso concreto, es lógico proceder a alguna selección de las sub-poblaciones del conjunto de datos aplicando filtros numéricos (Holt, 1996). Con relación al análisis de datos, es preferible aplicar un análisis multifactorial que permita la fragmentación de la población de espermatozoides en sub-poblaciones. El procesamiento de imágenes digitalizadas pos-adquisición permite exactamente el análisis de parámetros morfológicos, particularmente de la cabeza, y la distinción de sub-poblaciones en relación con las características de motilidad (Verstegen y col., 2002), estudio éste ya efectuado en el espermatozoide fresco y refrigerado de caballo (Quintero-Moreno y col., 2003).

El mayor interés de estos sistemas en el estudio de la motilidad espermática es la posibilidad de estandarizar los análisis y así permitir comparaciones entre laboratorios; para ello se requiere que los instrumentos operen bajo condiciones estandarizadas de temperatura, tipo de cámara de incubación, composición del medio y número de células, así como, variables operacionales, que incluyen la velocidad de captura de imágenes, magnificación e iluminación (Irvine, 1995). Sin embargo, existe todavía una falta de uniformidad entre los equipamientos y los analistas, que hace difícil la definición de valores estándar de motilidad normal (Malmgren, 1997). Los autores proponen que los estudios que

hagan uso de los sistemas CASA deben referenciar clara y ampliamente los métodos utilizados, como el ritmo de adquisición, tiempo de captura, número de células examinado, tipo y profundidad de cámara, modelo de equipo y versión de *software*, microscopio óptico y magnificación. Es frecuente que estos datos no sean referidos en las publicaciones, reduciendo las posibilidades de comparación de trabajos entre distintos laboratorios (Verstegen y col., 2002).

La cuestión de si las determinaciones computerizadas de la motilidad espermática pueden predecir el potencial fertilizante de una muestra mejor que los métodos convencionales necesita ser más investigado (Malmgren, 1997). La motilidad y la velocidad espermática (rectilínea y lineal, respectivamente) evaluadas por estos sistemas mostraron correlación con la fertilidad (índice de fertilidad competitiva, una medida de la fertilidad relativa) en el espermatozoide descongelado de toro (Budworth y col., 1988). En conclusión, la evaluación computerizada de la motilidad puede ser muy útil y con el perfeccionamiento en la detección de la imagen y en el análisis debe mejorar la medición de los atributos de la motilidad espermática. Éstos pueden, si se disponen de datos exactos y precisos de fertilidad, correlacionarse con la misma (Amann, 1989). Los trabajos de Bailey y col. (1994) observaron la correlación entre los valores del ALH y los niveles de  $Ca^{2+}$  intra-celular del espermatozoide descongelado y el flujo de  $Ca^{2+}$ , lo que podría predecir la fertilidad en esta especie; encontrando reducción de fertilidad en la presencia de niveles de  $Ca^{2+}$  intracelulares superiores a los del espermatozoide fresco. Además, los trabajos de Farrell y col. (1998) han encontrado una elevada correlación entre la combinación de variables como ALH/BCF/LIN/VAP/VSL y fertilidad del espermatozoide de toro.

La eficacia de estos equipos también ha sido comprobada en la evaluación de los parámetros de motilidad del semen de perro (Ellington y col., 1993; Günzel-Apel y col., 1993; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001b).

Ellington y col. (1993) destacan la influencia del analista en la selección del intervalo de *valores* utilizados en el análisis, proponiendo que éste deba ser siempre referido en los trabajos; también sugieren que se deben utilizar límites de motilidad elevados de forma que se puedan analizar más células móviles y, en consecuencia, se diferenciarán mejor las células funcionales de las células moribundas en una población. La presencia de subpoblaciones espermáticas con características de motilidad distintas en el eyaculado de perro fue determinada por Rigau y col. (2001), aunque el análisis estadístico no ha permitido una precisa identificación de estas poblaciones.

Por otra parte, Iguer-Ouada y Verstegen (2001b) constataron la influencia de la temperatura en los parámetros de motilidad, siendo los 38°C la temperatura recomendada; ésta es la temperatura fisiológica del útero y proporcionará unas condiciones similares a las fisiológicas durante la fecundación.

La motilidad de una muestra es también dependiente del ambiente y de las condiciones en las cuales el semen es analizado, no habiendo necesariamente una medida exacta de viabilidad en todas las condiciones (Saacke, 1983). Las observaciones de De Leeuw y col. (1991) evidenciaron que el porcentaje de células inmóviles aumentaba cuando el semen era incubado a 37°C durante 30 min, sin embargo, la mayoría de estas células recuperaron la motilidad cuando el semen se introducía en el *mucus* vaginal obtenido de vacas en estro. Dobrinski y col. (1993) observaron que la viscosidad del medio diluyente afecta a la velocidad de los espermatozoides de perro, reduciéndola; pero defienden que en contacto con los fluidos del tracto genital femenino ésta también se eleva, no atribuyendo así demasiada importancia a este parámetro. Harrison y Vickers (1990) constataron que los espermatozoides inmóviles con membrana intacta recuperaban la motilidad tras la adición de ditiotereitol, de modo que, las células intactas mantenidas bajo condiciones ideales, han sido capaces de expresar motilidad; además afirman que una motilidad pobre no indica siempre daño celular. Estos hallazgos les permitieron concluir que la manifestación de la motilidad no es sistemáticamente un parámetro fidedigno de la integridad celular.

En el perro, el uso de materiales tóxicos, como los utilizados en las vaginas artificiales, para la recogida de semen pueden inducir una pérdida de motilidad en los espermatozoides de machos fértiles cuando ambos entran en contacto (Oettlé, 1993). Así, un contacto de corta duración puede tener como consecuencia un efecto dañino en la motilidad, mientras que el contacto prolongado produce además alteraciones en la morfología espermática (England y Allen, 1992). Los parámetros de motilidad y velocidad post-descongelación han presentado, una relación significativa con la fertilidad *in vivo* en el semen de toro, proporcionando una base segura para la predicción de la fertilidad (Kjaestad y col., 1993). En el espermatozoide humano, la motilidad y la velocidad de espermatozoides preparados por *swin-up* han tenido un efecto significativo en los índices de fertilización *in vitro* (Bongso y col., 1989). Sin embargo, otros autores no encontraron correlaciones estadísticamente significativas (Januskauskas y col., 1999). A pesar de algunas divergencias, la motilidad permanecerá como el parámetro más importante en la determinación de la viabilidad en una muestra fresca, la determinación del grado de daño causado por la congelación-descongelación e incluso para "predecir" el potencial fertilizante de la muestra (Rodríguez-Martínez, 1998).

En el semen equino, a pesar de que la relación entre motilidad espermática y fertilidad es algo pobre, Voss y col., (1981) determinan que tanto la motilidad como la calidad de la motilidad parecen ser los mejores criterios en la predicción rutinaria de la fertilidad.

En el perro, la motilidad ha sido un parámetro muy utilizado para evaluar los efectos de distintos protocolos de congelación (diluyentes, periodos de equilibrio, ritmos de congelación y de descongelación) y basándose en sus valores, los investigadores han conseguido mejorar dichos protocolos (Concannon y Battista, 1989). En esta especie, la motilidad de un eyaculado normal debe exceder el 70% (Linde-Forsberg, 1995), pudiendo variar entre 66-90% (Concannon y Battista, 1989). La motilidad post-descongelación en la especie canina es el mejor indicador de su fertilidad, en comparación con la morfología o la integridad del acrosoma (Nöthling y col., 1997). La comparación de la motilidad pre-congelación *versus* la post-descongelación es utilizada como medida del éxito de la técnica de congelación, de modo que la mayoría de los investigadores hace esfuerzos para obtener una motilidad post-descongelación de por lo menos del 50-65% (Concannon y Battista, 1989). Sin embargo, los autores consultados advierten que muestras pos-descongelación que presenten apenas 30 a 40% de motilidad frecuentemente no son descartadas, ya que el número total de espermatozoides móviles deseados para la fertilidad la oscila entre 35 y 100 millones por dosis (Fastard, 1998) cuando se practica una inseminación intrauterina transcervical (Andersen, 1975).

#### **2.4.2.2. Prueba de termorresistencia**

Consiste en medir el tiempo durante el cual el espermatozoide mantiene su viabilidad y motilidad cuando es incubado a la temperatura corporal (mimetizando, en cierto modo, el ambiente fisiológico del tracto genital de la hembra), tras el calentamiento del semen refrigerado o tras la descongelación. Esta prueba se considera también importante en la predicción de la capacidad fertilizante de la muestra (England, 1993); siendo además bastante razonable ya que el semen debe mantener la viabilidad, a esa temperatura, durante un determinado período de tiempo en el genital femenino. La incubación también puede tener un importante carácter informativo ya que permite revelar daños latentes derivados del proceso de preservación y que potencialmente pueden reducir la vida funcional del espermatozoide (Saacke, 1983).

En el semen equino, dicha prueba permite solo obtener una información de valor limitado en la predicción del potencial fertilizante de una muestra, considerándose que sería

más importante evaluar su longevidad en el tracto genital femenino tras la rápida deposición del semen en el útero de la yegua, dada la baja relación real que existe entre la motilidad y la fertilidad para esta especie (Voss y col., 1981).

Debe tenerse en cuenta que la motilidad de los espermatozoides durante la incubación *in vitro* en un determinado diluyente es probablemente distinta a la que presentan *in vivo*; ya que *in vivo* el espermatozoide no permanece en el diluyente, sino que se rodea por los fluidos y las condiciones específicas del trato genital femenino (Saacke, 1983).

Concannon y Battista (1989) consideran, no obstante, que esta prueba debe ser realizada rutinariamente en la evaluación de las técnicas de congelación del semen de perro, dada su ya reconocida termolabilidad pos-descongelación.

#### **2.4.2.3. Concentración**

En la mayoría de las especies ganaderas, las mediciones de concentración son realizadas con el espectrofotómetro, un método indirecto que relaciona el grado de dispersión de luz con un número de espermatozoides en función de una curva de calibración. Para la realización de dicha curva es necesario determinar previamente la concentración celular de distintas muestras, mediante una cámara de recuento microscópica, para poder establecer dicha relación. El uso de este método se ha extendido dado que, como sugiere Den Daas (1992), la mayor desventaja del recuento con cámara microscópica del eyaculado de especies pecuarias es el elevado número de células que debe ser contada y la elevada dilución de semen previa al recuento, para obtener la mayor exactitud posible.

En el semen de perro la determinación de la concentración es frecuentemente calculada utilizando una cámara de recuento de Neubauer modificada y el número de espermatozoides es calculado multiplicando la concentración por el volumen de la segunda fracción del eyaculado, habiéndose recogido exclusivamente dicha fracción (England y Allen, 1989) o a través de fotómetros calibrados para el semen de perro (Farstad, 1998b). En cuanto a los valores de la concentración espermática en el perro, England y Allen (1989) refieren en un estudio realizado en 28 perros fértiles una concentración media de  $299,6 \pm 127,9$  millones de espermatozoides por mililitro, mientras que Farstad (1998b) refiere entre 100-700 millones/mL.

#### 2.4.2.4. Morfología

El estudio de la morfología es un componente importante en la evaluación de la calidad seminal (Malmgren, 1997), indicadora del *status* fisiológico o patológico de la producción espermática y del almacenamiento en los conductos extra-gonadales (Saacke, 1983). En los toros sementales durante las estaciones de reproducción, el estudio morfológico es un método seguro y económico de monitorizar las funciones de testículo, epidídimo y glándulas anejas (Rodríguez-Martínez, 1998). El hecho de que la fertilidad disminuye cuando el porcentaje de células anormales aumenta ha quedado establecido hace tiempo (Oettlé, 1993).

En el toro, la morfología se estudia rutinariamente en extensiones secas y teñidas, principalmente para examinar la forma de la cabeza y la presencia de otras células; mientras que las extensiones “húmedas” de células fijadas y no teñidas (fijadas en suspensión) son utilizadas para el examen de otros aspectos del espermatozoide preservado, principalmente tras la congelación y descongelación, valorándose las lesiones de la membrana, del acrosoma y las anomalías de la forma de la cola, siendo estas últimas frecuentemente producidas por el manejo del semen (Rodríguez-Martínez, 1998).

En especies como la equina, la morfología no asume la misma importancia en la predicción del potencial fertilizante que en otras especies domesticas (Voss y *col.*, 1981), dada la variabilidad entre las características morfológicas observadas entre garañones y entre eyaculados de los mismos animales. Los autores también refieren una considerable variabilidad entre los investigadores en relación a la clasificación morfológica del espermatozoide equino, tal como fue posteriormente constatado en el perro (Kustritz y *col.*, 1998), lo que suscita la necesidad del establecimiento de una nomenclatura estandarizada para las evaluaciones morfológicas.

En el semen de perro, la morfología del espermatozoide suele ser evaluada con microscopio óptico convencional o con microscopio de contraste de fases con o sin tinción (Kustritz y *col.*, 1998). Entre las técnicas de tinción más utilizadas destaca la eosina-nigrosina (Bartlett, 1962; England y Allen, 1989), el Giemsa-Wright rápido, conocido por Diff-Quick, la eosina Y/ nigrosina, conocido por Hancock, la eosina B/ nigrosina (Kustritz y *col.*, 1998) y azul de anilina o cristal violeta (Keenan, 1998). El porcentaje de espermatozoides con morfología normal en el perro varía entre el 65-90% (Farstad, 1998b). En esta especie la morfología parece estar relacionada con la fertilidad. En un trabajo de Oettlé (1993), la morfología fue, en comparación con la motilidad, el parámetro que mayor correlación positiva

presentó con la tasa de fertilidad; las anomalías morfológicas estuvieron asociadas a fertilidad disminuida, ya que un porcentaje de espermatozoides normales inferior a 60% resultó en fertilidad disminuida. Este autor presentó un sistema de clasificación basado en la estructura afectada del espermatozoide, siendo cada una subdividida según el grado de afectación presente en mayores o menores (Tabla 2.7). Cuando en el espermatozoide están presentes más de una anomalía, la clasificación debe tener en cuenta la anomalía de mayor importancia, o la más predominante, si están presentes anomalías de igual importancia. En trabajos previos, la clasificación está en la estructura del espermatozoide afectada, diferenciándose el defecto en cuestión en anomalía primaria y secundaria (Bartlett, 1962; Christiansen, 1984) según tengan su origen en el testículo o fuera de él. Independientemente del sistema de clasificación utilizado, deben evaluarse morfológicamente por lo menos 200 espermatozoides por muestra (Malmgren, 1997).

Las anomalías más frecuentemente encontradas en la cabeza del espermatozoide de perro son las cabezas hinchadas y los acrosomas hinchados y “protuberantes”; en la pieza intermedia se han encontrado gotas proximales y distales así como piezas intermedias torcidas y en la cola se observaron colas torcidas y enrolladas a nivel de la pieza intermedia (Kustriz y *col.*, 1998). En un estudio realizado por Morton y Bruce (1989) sobre 167 perros fértiles el porcentaje de células normales fue de 69,1%, las anomalías en la cabeza de 5,62%, en la pieza intermedia 13,4 %, y en la cola 4,7%. Estos autores destacan que algunos defectos morfológicos, como es el caso de persistencia de gota proximal en el tracto intermedio, están asociados a porcentajes de concepción más reducidos. El motivo por el cual los espermatozoides con gota proximal no congelan bien podría estar relacionado con el contenido de las gotas en enzimas lisosomales, así, tras la congelación y la descongelación sufren destrucción de su membrana, causando liberación de las enzimas hidrolíticas y rompiendo la membrana del espermatozoide y, en consecuencia, afectando severamente su motilidad. Este defecto origina una motilidad post-descongelación inferior a la aceptable del 50%, mientras algunas anomalías en el cuello como fractura y, en piezas intermedias y colas como las dobladas o las enrolladas cursan con motilidades prácticamente nulas (Morton y Bruce, 1989).

**Tabla 2.7.** Clasificación morfológica del espermatozoide canino

<b>Morfología normal</b>
<b>Anomalía acrosomal</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Mayores:</b> picudo, quístico o con defecto de 'crater', distribución irregular</li> <li>• <b>Menores:</b> reacción acrosómica, edema, daño severo, pérdida</li> </ul>
<b>Anomalía en la cabeza</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Mayores:</b> macrocefálica, microcefálica, piriforme, defecto en diadema, vacuolas nucleares, espermatozoide estriado, formas dobles, pleomorfismo grave o formas raras</li> <li>• <b>Menores:</b> cabezas estrechas, defectos en la base, cabezas destacadas, descondensación nuclear</li> </ul>
<b>Anomalías en la pieza intermedia</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Mayores:</b> gota citoplasmática proximal, ruptura de la pieza, defecto de pseudo-gota, pieza doblada</li> <li>• <b>Menores:</b> gota distal</li> </ul>
<b>Anomalías en la cola</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Mayores:</b> enrollada alrededor de la cabeza o de la pieza intermedia, cola doble</li> <li>• <b>Menores:</b> cola torcida, en látigo, enrollada en la porción terminal</li> </ul>
<b>Aglutinación</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cabeza con cabeza, cabeza con cola, cola con cola, o adhesión a otras células</li> </ul>

(Adaptado de Oettlé, 1993)

La comparación de distintas técnicas de tinción ha demostrado que bien el colorante o bien la técnica de preparación pueden alterar la morfología del espermatozoide, creándose artefactos que potencian la aparición de determinados tipos de anomalías y, simultáneamente, disminuyen otras. Además, el dominio de la técnica es fundamental para la comparación de la morfología de muestras del mismo animal o de perros distintos (Kustritz y *col.*, 1998).

#### 2.4.2.5. Integridad del acrosoma

El espermatozoide eyaculado y fresco no puede experimentar la reacción acrosómica verdadera cuando es expuesto a inductores biológicos de la misma, debiendo primeramente sufrir el proceso de capacitación (Cross y Meizel, 1989). La capacitación espermática implica algunas alteraciones fisiológicas previas a la reacción acrosómica en la membrana del espermatozoide y es por tanto un pre-requisito para ella. La reacción acrosómica consiste en la fusión de la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática, resultando en la liberación del contenido acrosomal (Way y *col.*, 1995). La capacidad para sufrir la reacción acrosómica resulta *in vivo* del contacto del espermatozoide con la *zona pelúcida* (Harrison, 1998); pudiendo esta capacidad del espermatozoide para responder a los inductores de la

reacción acrosómica ser utilizada como marcador de este estado fisiológico de capacitación (Cross y Meizel, 1989).

En el proceso de dilución, refrigeración y congelación queda particularmente afectada la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide, pero también la membrana de las mitocondrias, del acrosoma y el flagelo (Hammerstedt *y col.*, 1990). Estos datos son significativos, teniendo en cuenta que el acrosoma contiene enzimas que desarrollan un papel crucial en la penetración de la *zona pelúcida* y en sus mecanismos celulares (Bedford, 1970). La desintegración del acrosoma derivada de la refrigeración y de la congelación es probablemente capaz de afectar a la habilidad fecundante del espermatozoide (Watson, 1975b). La reacción acrosómica se produce tras la exposición a las condiciones ambientales del lugar de fecundación o tras la unión específica del espermatozoide a la *zona pelúcida* (Den Daas, 1992); así que el porcentaje de células que poseen un acrosoma intacto y que son aptas para exhibir reacción acrosómica, tras la debida estimulación, es una importante característica seminal (De Leeuw *y col.*, 1991). Por tanto, es necesario evaluar correctamente el *status* acrosomal.

Idealmente, el método para determinar el *status* acrosomal debe ser exacto y fiable, rápido, aplicable a un pequeño número de células, inocuo para la función espermática, utilizable en distintos medios y fluidos y capaz de proporcionar la diferenciación entre reacciones acrosómicas falsas, que están asociadas a la muerte de la célula, y las verdaderas, asociadas a la fecundación (Cross y Meizel, 1989).

La evaluación del *status* acrosomal en el espermatozoide de perro es considerado como un criterio fiable en la predicción de la fertilidad post-descongelación (Concannon y Battista, 1989). La evaluación de la integridad acrosomal es frecuentemente utilizada como criterio para comparar distintos protocolos de congelación (Ström-Holst *y col.*, 1997; Yildiz *y col.*, 2000; Hay *y col.*, 1997b) o para evaluar la calidad del semen pre-congelación (Hay *y col.*, 1997b; Ivanova *y col.*, 1999). Los trabajos de Oettlé (1986a) en el espermatozoide de perro evidenciaron que los daños en la estructura del acrosoma ocurrían en cada uno de los grandes pasos del proceso de congelación, no encontrando correlación significativa entre el descenso de la motilidad y los daños acrosomales.

La evaluación de la integridad acrosomal es posible gracias a determinadas técnicas de tinción, de las cuales destacan las coloraciones metacromáticas del acrosoma que son utilizadas para la detección de alteraciones en esta estructura, como el Spermac<sup>®</sup> (Oettlé, 1986a; b; Oettlé y Soley, 1988; Hay *y col.*, 1997b; Ström-Holst *y col.*, 1997). Esta tinción

permite diferenciar el acrosoma, que aparece teñido de verde, de la región post-acrosómica, que aparece rosa, lo que posibilita la rápida observación de los daños en esta estructura o su ausencia bien total o parcial (Oettlé y Soley, 1988).

Entre otras tinciones utilizadas en la evaluación del acrosoma destacan el método Giemsa (Watson, 1975b), la eosina/nigrosina, la eosina/nigrosina/Giemsa, el Hoescht® 33258 y las lectinas como el *Pisum sativum* (PSA) asociado a la fluoresceína FITC (isotiocianato de fluoresceína), de las cuales las 2 últimas exigen el uso de la microscopía de fluorescencia. Para una evaluación efectiva del acrosoma, Smith y Murray (1997) recomiendan el uso de la PSA-FITC, debido a la facilidad de preparación y de lectura debido a la fuerte coloración que proporciona, del cual hablaremos adelante. Como recomendación estos autores advierten que la preparación de las muestras es crítica y que en éstas deben haberse lavado los diluyentes de congelación, como la yema y la leche para evitar la fluorescencia del fondo.

Algunos de los primeros trabajos en la observación del acrosoma defienden el examen con microscopio de contraste de interferencia diferencial (“differential interference contrast microscopy, DIC) en muestras sin fijación (Saacke y Marshall, 1968). Cross y Meizel (1989) confirman que, para especies de acrosomas grandes, la visualización de espermatozoides móviles, por este método o por el uso del microscopio de contraste de fases en muestras no-fijadas, es adecuada para la evaluación de esta estructura. Sin embargo, las tinciones fijadas y secas son preferibles a las extensiones “húmedas” sin fijación, ya que cuando la motilidad es moderada o alta la evaluación cuantitativa de la morfología detallada del acrosoma es difícil (Aalseth y Saacke, 1986). También la observación de espermatozoides vivos y móviles en preparaciones “húmedas” en el microscopio de fluorescencia es difícil y exige bastante tiempo porque las células se mueven rápidamente en el campo microscópico (Way y col., 1995). Adicionalmente, para las especies con acrosomas más pequeños o con propiedades ópticas semejantes a las otras estructuras de la cabeza del espermatozoide estos métodos (microscopía de contraste de fases o DIC) no se revelan eficaces (Cross y Meizel, 1989).

Si además de la morfología acrosomal también es efectuada la evaluación simultánea de la viabilidad, es posible diferenciar la reacción acrosómica verdadera de la reacción acrosómica falsa; Aalseth y Saacke (1986) propusieron para tal objetivo la tinción Fast-Green FCF-eosina B, tal como más tarde, para el mismo propósito, Tamuli y Watson (1994) propusieron el uso de la eosina-nigrosina-Giemsa; con esta tinción, las células muertas presentan un color rojo en la región post-acrosómica, mientras que en las vivas esta región es rosa y la región acrosómica se mantiene roja hasta que la reacción acrosómica empieza.

Way y col. (1995) recomiendan para este propósito la eosina B-azul de anilina, el Fast Green FCF/eosina B y el ioduro de *propidium* asociado a la lectina del *Pisum sativum*, (del cual hablaremos detalladamente adelante) para la evaluación del *status* acrosomal y de la viabilidad de espermatozoide de bovino.

De Leeuw y col. (1991) sugieren una técnica de tinción que incluye el marcador de viabilidad celular fluorescente, Hoechst® bisbenzimidida 33258, recurriendo para su visualización a la microscopía de fluorescencia, asociada al microscopio de contraste de fases para observación del acrosoma, permitiendo así la diferenciación entre reacción acrosómica verdadera de la pérdida degenerativa de las membranas acrosomales post-mortem. La mayor ventaja de esta técnica es, según los autores, que puede ser utilizada en muestras congeladas/ descongeladas sin utilizar las técnicas habitualmente utilizadas en la evaluación del *status* acrosomal que, frecuentemente, exigen centrifugación para remover el diluyente o el colorante y por otra parte, no se realiza la tinción en portas que puede provocar, debido a las sucesivas inmersiones, una mayor pérdida en espermatozoides vivos.

Un asunto de considerable interés es saber si es suficiente una única prueba laboratorial o si es necesaria la combinación de varios análisis para la evaluación de una muestra, dado que el examen de la integridad acrosomal exige equipamiento adecuado y es más lento que la evaluación de la motilidad (Berndtson y col., 1981). En los trabajos de Kjaestad y col. (1993) no se verificó correlación entre motilidad e integridad acrosomal, ni entre este último parámetro y la fertilidad *in vivo*. Los trabajos de Berndtson y col. (1981), igualmente en semen congelado y descongelado, también constataron que la motilidad y la integridad acrosomal representan características distintas de la integridad del espermatozoide que varían de manera independiente. De este modo, ninguna de las pruebas puede ser utilizada en sustitución de otra. Saacke (1983) observó que los daños en la integridad acrosomal experimentados por los espermatozoides durante la congelación y la descongelación podrían estar latentes en el momento de la descongelación, evidenciándose el rápido deterioro del acrosoma entre 2 y 4 h de incubación a 37°C, a diferencia de la motilidad que sufrió antes de las 2-4 h una dramática disminución. Este autor recomienda el uso combinado de pruebas, que denomina de “características irreversibles”, como son la observación de la integridad de la membrana y del acrosoma conjuntamente con la motilidad, a fin de evitar errores de apreciación de los métodos de preservación.

Por su parte, Harrison y Vickers (1990) evidenciaron que el *status* acrosomal en el espermatozoide de cerdo y morueco no refleja el estado de la membrana plasmática, existiendo más células con membrana plasmática intacta que con acrosomas intactos. En el

espermatozoide de morueco la integridad de la membrana se correlacionó más con la motilidad visual, lo que no ocurrió en el cerdo.

#### 2.4.2.6 Integridad de la membrana plasmática

La **integridad de la membrana** espermática es un pre-requisito fundamental para el apropiado metabolismo y funciones espermáticas como la unión a la *zona pelúcida*, penetración y la fusión con el *oolemma* durante la fecundación (Rodríguez-Martínez, 1998). La importancia del mantenimiento de esta característica del espermatozoide se justifica por la incapacidad de la célula espermática para sellar o restaurar la integridad de la membrana cuando sufre daños (Den Daas, 1992).

La integridad de esta membrana es el requerimiento mínimo para que el espermatozoide sea móvil (De Leeuw y col., 1991). El espermatozoide con la membrana plasmática afectada no es capaz de mantener las concentraciones citoplasmáticas de iones y de co-factores esenciales como el nucleótido adenina, imprescindible para el movimiento flagelar. Es posible que algunas células inmóviles puedan aparentemente mantener algún grado de integridad de la membrana por lo cual, son todavía capaces de excluir los marcadores que indican la muerte celular pese a que otras alteraciones hacen que esté inmóvil (De Leeuw y col., 1991). Por estos motivos, cuando la célula está fluorescente (marcada) puede ser calificada con toda seguridad como célula muerta; sin embargo, cuando la célula no adquiere fluorescencia se califica como célula viva aunque esto no es tan seguro (De Leeuw y col., 1991).

La evaluación de la integridad de la membrana plasmática proporciona una valiosa información sobre los métodos de procesamiento del semen y la identificación de los puntos del proceso que más contribuyen a las alteraciones en la membrana del espermatozoide (Johnson y col., 1996). El grado de lesión de las membranas plasmática y acrosomal está relacionado con la fertilidad de la muestra procesada, pero solamente en los casos en que el daño sea extenso (Rodríguez-Martínez, 1998).

Una de las técnicas de valoración de la integridad de la membrana plasmática es la ausencia de inclusión de colorantes, porque la membrana esté íntegra; estas técnicas son conocidas como recuentos de *vivos y muertos* y para ellas se necesitan combinaciones de colorantes como eosina/nigrosina, eosina/nigrosina/Giemsa, Hoescht<sup>®</sup> 33258, carboxifluoresceína / yoduro de *propidium*, y SYBR-14/yoduro de *propidium* (Smith y Murray,

1997). En las 3 últimas técnicas de tinción mencionadas es necesario recurrir a la microscopía de fluorescencia. La presencia de glicerol en una muestra, a porcentajes que excedan el 4%, puede interferir con las tinciones vivos/muertos, haciendo disminuir los porcentajes de espermatozoides viables probablemente porque el glicerol induzca un aumento de la permeabilidad de la célula al colorante (Mixner y Saroff, 1954).

#### **2.4.2.6.1. Test de endósmosis**

La integridad de la membrana puede ser evaluada por medio de la incubación de los espermatozoides en un medio hipo-osmótico, mediante el **test de endósmosis**. El influjo del agua al interior del espermatozoide provoca la hinchazón y el enrollamiento de la cola, indicativo de que el transporte del agua a través de la membrana se produce con normalidad, es decir, que la membrana está intacta y presenta una actividad funcional normal. El hinchamiento de la membrana es observado de modo especial en la membrana de la cola del espermatozoide, pues esta es más distensible y está menos unida a las estructuras de soporte que la membrana de los otros compartimentos. La respuesta a esta prueba está correlacionada con la capacidad del espermatozoide de penetrar los ovocitos, por lo tanto, es indicativo del potencial fertilizante de la muestra (Jeyendran y *col.*, 1984).

#### **2.4.3. Pruebas complementarias de evaluación seminal**

##### **2.4.3.1. Utilización de marcadores fluorescentes: *microscopía de fluorescencia y citometría de flujo***

Se han desarrollado recientemente técnicas específicas de tinción, que permiten la evaluación de la integridad, viabilidad y funcionalidad del espermatozoide a través de la utilización de **marcadores fluorescentes** excitados por una luz de apropiada longitud de onda. Los marcadores fluorescentes son indicadores más sensibles de los daños en el espermatozoide que el examen del acrosoma por microscopía de contraste de fases o la estimación de motilidad (Harrison y Vickers, 1990), y la lectura de las preparaciones se facilita por la intensidad y consistencia de las coloraciones fluorescentes (Kawakami y *col.*, 1993b). Adicionalmente, las combinaciones específicas de marcadores pueden proporcionar importantes informaciones cuantitativas por el hecho de que las propiedades de permeabilidad de la membrana y las propiedades de coloración de los fluorocromos sean discriminatorias entre espermatozoides funcionales y no-funcionales (Garner y *col.*, 1986).

De estos se destacan el diacetato de carboxi-fluoresceína (CFDA), el yoduro de *propidium* (PI) (Garner y col., 1986; Harrison y Vickers, 1990; Valcárcel y col., 1994), el isotiocianato de fluoresceína (Fitc) conjugado con la aglutinina del guisante *Pisum sativum* (PSA) (Berger, 1990), el Hoechst® 33258 (De Leeuw y col., 1991; Kawakami y col., 1993b) y el SYBR-14 (Ferrara y col., 1997) y el bromuro de etidio (Evenson y col., 1982).

Los métodos de coloración fluorescentes exigen el uso de la microscopía **de fluorescencia** (Centola y col., 1990; Harrison y Vickers, 1990; Valcárcel y col., 1994) o bien de **citometría de flujo** (Garner y col., 1986; Garner y Johnson, 1995; Maxwell y Johnson, 1997). Contrariamente a la fluorescencia, la técnica de citometría de flujo permite analizar múltiples características en millares de células, aunque no todas al unísono pero si en un corto periodo de tiempo y con una preparación previa mínima (Graham y col., 1990). En el examen del espermatozoide, y recurriendo a los marcadores fluorescentes ya citados, la citometría de flujo permite evaluar la viabilidad espermática, la proporción de espermatozoides con reacción acrosómica (Morrell, 1991; Fierro y col., 1996), el contenido en ADN (Dresser y col., 1993), la integridad de la cromatina espermática, la concentración de espermatozoides en una muestra (Evenson y col., 1993), y el flujo intra-celular de calcio (Nolan y col., 1992; Brewis y col., 2001).

Los primeros trabajos sobre la aplicación de la citometría de flujo en la investigación de poblaciones de espermatozoides se han realizado en semen humano, de ratón y toro; utilizándose como marcador nuclear el naranja de acridina y estudiándose la correlación de la estructura de la cromatina espermática con la fertilidad (Evenson y col., 1980). Posteriormente, se extendió esta tecnología a otras especies, destacando su rapidez y precisión en el análisis de una gran población de espermatozoides, y el hecho de que sus resultados están altamente correlacionados con otros parámetros de la calidad seminal (Garner y col., 1986). También son aludidas otras ventajas como: - el hecho de no necesitar una preparación lenta y laboriosa que suele ser necesaria para determinadas extensiones (Graham y col., 1990), - su especificidad en el examen individual de los espermatozoides, - la capacidad de repetición y que - el tamaño de muestra exigido sea reducido (Johnson y col., 1996). No obstante, los elevados costes de los aparatos son un impedimento para su presencia en la gran mayoría de los laboratorios (Malmgren, 1997). Comparativamente, la utilización de la microscopía de fluorescencia resulta más económica pero mucho mas lenta y laboriosa (Garner y col., 1988) por lo que a penas algunas centenas de células pueden ser evaluadas por muestra (Johnson y col., 1996; Rodríguez-Martínez y col., 1997).

#### 2.4.3.1.1. Evaluación de la viabilidad

Una combinación utilizada para la determinación de la viabilidad celular es el CFDA-PI (Garner y *col.*, 1986; Almlid y Johnson, 1988; Harrison y Vickers, 1990; Valcárcel y *col.*, 1994). En cuanto al PI, las células con la membrana plasmática intacta impiden su entrada, mientras que cuando las membranas son permeables éste entra en la célula, donde tiene la propiedad de unirse y teñir el ADN celular, indicando que están dañadas. Cuando el PI penetra en la célula, ésta emite una fluorescencia roja, y la cabeza del espermatozoide se tiñe de este color. Por su parte, cuando el CFDA penetra la membrana intacta es esterificado y convertido por las esterasas intracelulares en carboxi-fluoresceína libre, que es fluorescente e impermeable, lo que provoca una coloración de toda la célula verde homogénea y nos permite visualizar fácilmente los espermatozoides vivos mediante microscopía de fluorescencia (Garner y *col.*, 1986; Harrison y Vickers, 1990). Esta coloración es conocida por proporcionar buena visualización de los espermatozoides en medios opacos, conteniendo yema o leche, al revés de que suele pasar con las coloraciones vitales (Garner y *col.*, 1988). También el CFMDA, usado conjuntamente con el PI es un indicador efectivo de la viabilidad (Johnson y *col.*, 1996) ya que permite ver también las células no teñidas por PI.

También la doble tinción SYBR-14, que tiñe el núcleo de las células vivas de verde-brillante, asociado al PI es utilizada en el estudio de la viabilidad espermática (Garner y *col.*, 1994; Medrano y Holt, 1996; Maxweel y Johnson, 1997; Maxwell y *col.*, 1997; Smith y Murray, 1997; Thomas y *col.*, 1997; Merkies y *col.*, 2000; He y *col.*, 2001). Esta coloración es considerada bastante fiable, dado que sus componentes reaccionan con el mismo constituyente celular, el ADN espermático, estable y fácilmente cuantificable por la tinción (Garner y Johnson, 1995). Son identificadas 3 poblaciones distintas: - vivas que se tiñen con el SYBR-14, - muertas que tiñen con el PI y - moribundas que tiñen simultáneamente de ambos colorantes (Garner y Johnson, 1995).

#### 2.4.3.1.2. Evaluación de la integridad acrosomal

En la evaluación de la integridad acrosomal se utilizan lectinas de origen vegetal asociadas a marcadores fluorescentes, de las cuales además de la PSA, destacan la PNA (aglutinina del cacahuete *Arachis hypogea*), la WGA (aglutinina del maíz *Triticum vulgare*), la Con-A (aglutinina de la *Concavalina ensiformis*), o la UEA-1 (aglutinina del *Ulex europaeus*) (Berger, 1990; Fierro y *col.*, 1996; Vásquez y *col.*, 1996).

Las lectinas presentan propiedades de unión a los carbohidratos, concretamente en la región interior del acrosoma, que las hace muy útiles en la detección de sustancias específicas sub-celulares (Flesch *y col.*, 1998). Es frecuente la utilización de Fitc-PSA (Berger, 1990; Smith y Murray, 1997; Farlin *y col.*, 1992; Mendoza *y col.*, 1992) y de Fitc-PNA (Szasz *y col.*, 2000; Aboagla y Terada, 2003) que tiñen el interior del acrosoma (Cross *y col.*, 1986) o la membrana acrosomal externa (Mortimer *y col.*, 1987), respectivamente; lo que permite visualizar tanto el inicio de la reacción acrosómica como la presencia de reacción acrosómica parcial, como también la presencia de reacción acrosómica completa que se evidencia por la ausencia de coloración excepto en el área ecuatorial (Köhn *y col.*, 1997; Jaiswal *y col.*, 1999). También se utilizan la ficoeritrina (PE) asociada al PSA (Wilhem *y col.*, 1996) y al PNA (Fazeli *y col.*, 1997), que actúan de modo semejante, ambas se unen en la célula no-permeabilizada a las regiones acrosómicas dañadas, provocando fluorescencia de esta zona (Graham, 2001). Los espermatozoides con el acrosoma intacto poseen una membrana plasmática intacta y funcional que cubre la membrana acrosomal externa, formando una barrera contra los marcadores de modo que no se observa señal fluorescente alguna. Por el contrario, el tratamiento con alcohol o detergentes conduce a la permeabilización de las membranas y, realizado antes de la tinción resulta en fluorescencia de la región acrosomal (Fazeli *y col.*, 1997).

El mecanismo molecular responsable de la tinción de los acrosomas con PSA parece ser debido a su unión al grupo sacaroideo de la proacrosina, una glucoproteína (Mendoza *y col.*, 1992), evidenciando esta lectina, bajo microscopio de fluorescencia, un marcaje de la membrana acrosomal externa en células no permeabilizadas (Farlin *y col.*, 1992), mientras en espermatozoides permeabilizados el marcaje suele ser en las porciones anterior y ecuatorial del acrosoma (Cross *y col.*, 1986). Sin embargo, la PNA parece tener una mayor especificidad por el acrosoma que la PSA, puesto que en medios con yema ésta parece tener alguna afinidad por la PSA (Thomas *y col.*, 1997). Las observaciones con microscopía electrónica permiten evidenciar que la localización específica de la PNA es en la membrana acrosomal externa (Fazeli *y col.*, 1997), hecho también constatado en el espermatozoide de perro (Sirivaidyapong *y col.*, 2000).

La utilización de lectinas fluorescentes es preferible a las técnicas de tinción convencionales en especies de acrosomas pequeños, como es el caso del caballo. Las lectinas también son preferibles a los anti-cuerpos monoclonales puesto que se obtienen fácilmente y pueden ser conjugadas con distintos compuestos fluorescentes, no exigiendo la necesidad de incorporar un reactivo adicional como en el caso de los anti-cuerpos

monoclonales, donde es necesario un segundo anti-cuerpo fluorescente para la visualización del acrosoma (Farlin y *col.*, 1992).

La citometría de flujo presenta la ventaja de detectar únicamente la fluorescencia asociada a partículas, como consecuencia, no es necesario remover el marcador que no se encuentra unido antes del análisis (Graham, 2001; Nagy y *col.*, 2003). No obstante, en el examen de la integridad del acrosoma, la especificidad de la lectina por el acrosoma es un aspecto de gran importancia, ya que la unión a regiones del espermatozoide no-acrosómicas puede ser diferenciado por microscopía de fluorescencia, pero no en la citometría de flujo, puesto que ésta identifica la señal fluorescente de la célula entera y no de regiones específicas. Para interpretar la fluorescencia y diferenciar correctamente espermatozoides con y sin acrosoma es necesario que la adhesión de la lectina por el acrosoma sea altamente específica y que la intensidad de la fluorescencia sea elevada (Tao y *col.*, 1993). En este sentido, los autores dan importancia a la necesidad de limpiar previamente las muestras de semen de los diluyentes de congelación, a fin de evitar la unión del Fitc-PSA a las partículas de la leche o a la yema de huevo, utilizando para tal la sucrosa o gradiente de Percoll y así evitar la fluorescencia en el fondo (Smith y Murray, 1997). Sin embargo, algunos autores precisan que la remoción de las partículas de yema por lavado probablemente induce la deterioración del espermatozoide (Nagy y *col.*, 2003), este hecho fue confirmado por Kavak y *col.* (2003), que han encontrado más conveniente la utilización del gradiente de densidad de Percoll en la centrifugación para separación de detritus que el lavado. Graham y *col.* (1990) consideran suficiente la filtración con malla de nylon de 40µm.

Las lectinas permiten el estudio de la distribución y de las alteraciones en las glucoproteínas durante la capacitación y reacción acrosómica (Vásquez y *col.*, 1996), siendo posible observar por microscopía de fluorescencia sub-poblaciones de células en distintos estadios de la reacción acrosómica. Aunque la utilización de la microscopía de fluorescencia en la evaluación cuantitativa de la heterogeneidad de los espermatozoides en el proceso de reacción acrosómica es bastante difícil y complicado (Nikolaeva y *col.*, 1998). Por otra parte, su utilización en conjunto con la citometría de flujo permite evaluar específicamente la capacidad de los espermatozoides para alcanzar la reacción acrosómica cuando son incubados con el calcio ionóforo, así como la cinética de la reacción acrosómica (Fierro y *col.*, 1996; Nikolaeva y *col.*, 1998).

En los trabajos de Fierro y *col.* (1996), así como en el estudio de Flesch y *col.* (1998), las lectinas WGA y del PNA revelaron su gran especificidad para las membranas plasmática y acrosomal externa, respectivamente, lo que les permitió conocer profundamente

las modificaciones bioquímicas durante la capacitación y reacción acrosómica. Estos trabajos son importantes para la identificación de la membrana plasmática y de la membrana acrosómica externa para posteriores estudios moleculares sobre la unión espermatozoide-zona (Flesch y *col.*, 1998). Adicionalmente, la citometría fue utilizada en un estudio con el fin de investigar la capacidad del espermatozoide para unirse a las proteínas de la zona pelúcida conjugadas con el Fitc en el transcurso de la incubación bajo condiciones de FIV (Harkema y *col.*, 1998).

#### **2.4.3.1.3. Evaluación simultánea de la viabilidad e integridad del acrosoma**

En la evaluación de las lesiones celulares derivadas del proceso de criopreservación es necesario emplear métodos de tinción que permitan diferenciar, correctamente, células viables con reacción acrosómica de las células que se encuentran muertas y que han perdido la integridad de la membrana (Way y *col.*, 1995). En este sentido, determinadas combinaciones de marcadores pueden ser utilizadas para evaluar, simultáneamente, la viabilidad de la célula y el *status* del acrosoma, como es el caso del **PI** asociado al Fitc-PSA (Centola y *col.*, 1990; Way y *col.*, 1995; Sukardi y *col.*, 1997) y Fitc-PNA (Coy y *col.*, 2002). Otra posibilidad es emplear el Hoescht<sup>®</sup> 33258 asociado al Fitc-PSA (Cross y *col.*, 1986; Berger, 1990; Kawakami y *col.*, 1993b; Uhler y *col.*, 1993; Baumber y *col.*, 2000), que, tal como para el PI-Fitc-PSA o PNA, también posibilita la evaluación del porcentaje de células que han perdido sus acrosomas pero que mantienen intacta la membrana sobre el núcleo, o sea, el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosómica “verdadera” (Berger, 1990). Sin embargo, el PI puede sustituir al Hoescht<sup>®</sup> 33258 como marcador de viabilidad, debido a que su técnica es más accesible, siendo particularmente útil la combinación con Fitc-PSA para el examen simultáneo del acrosoma, puesto que PI y Fitc-PSA pueden excitarse a la misma longitud de onda (488 nm) (Centola y *col.*, 1990) igual que sucede con Fitc-PNA (Coy y *col.*, 2002).

La asociación PI-Fitc-PSA permite la detección de 4 sub-poblaciones de células: I) viable, acrosoma intacto; II) viable, reacción acrosómica “verdadera”; III) muerto, acrosoma intacto; IV) muerto, reacción acrosómica “falsa” o por degeneración celular (Centola y *col.*, 1990; Sukardi y *col.*, 1997).

Además, se estudia el uso de otros marcadores como es el caso Lyso Tracker Green DND-26 (LYSO-G) (Thomas y *col.*, 1997; 1998) y la Merocyanina/540/Yo-Pro-1

(Kavak *y col.*, 2003), ambas para la evaluación de la integridad del acrosoma, así como el SYTO-17 (Thomas *y col.*, 1997) y el SNARF-1 (Peña *y col.*, 1999a; Kavak *y col.*, 2003), ambos para el estudio de la viabilidad del espermatozoide, este último asociado al PI-Fitc-PSA, o del indo-1/AM para determinación del flujo de calcio intra-celular (Brewis *y col.*, 2001).

#### 2.4.3.1.4. Evaluación de la actividad mitocondrial

Adicionalmente al estudio de la viabilidad e integridad acrosomal, también la **actividad mitocondrial** puede ser evaluada simultáneamente con marcadores fluorescentes. El interés en evaluar esta estructura deriva de la importancia de las mitocondrias en la producción de ATP (adenosina-tri-fosfato), producido por fosforilación oxidativa y necesario para la motilidad y la fertilización. También es necesaria en el mantenimiento de la motilidad y la preservación de la funcionalidad de las membranas plasmática y mitocondrial (O'Connell *y col.*, 2002).

Son conocidos los efectos de la congelación sobre la pieza intermedia, como la ruptura de la membrana y la disminución de la densidad eléctrica de la matriz mitocondrial (Jones y Stewart, 1979). La disminución de la motilidad puede ser atribuida a la pérdida de la función mitocondrial (O'Connell *y col.*, 2002) y la ruptura de la membrana mitocondrial puede ser un acontecimiento inicialmente potenciador de la muerte celular (Henry *y col.*, 1993). Sin embargo, la susceptibilidad de las membranas plasmática y mitocondrial a la criopreservación puede diferir dependiendo del tipo de crioprotector (O'Connell *y col.*, 2002).

Los trabajos de Harrison y Vickers (1990) indican que la membrana plasmática y mitocondrial pueden responder al choque térmico de modos distintos. Para estos autores, la pérdida de la impermeabilidad plasmática induce, a su vez, una rápida pérdida de componentes intra-celulares y como consecuencia inmediata se produce una insuficiencia de nucleótidos como la adenina que no estarán disponibles para la fosforilación oxidativa; hecho que afectará a la motilidad, independientemente de la potencial capacidad de la mitocondria para proveer energía. En este sentido, el marcador mitocondrial **Rodamina 123** (R123) ha sido utilizado en distintos trabajos con el fin de evaluar la funcionalidad de este orgánulo del espermatozoide.

La especificidad de la R123 para la mitocondria fue descrita por Johnson *y col.* (1980), quedando probado que sería altamente improbable que otras estructuras citoplasmáticas puedan ser teñidas con la R123. Este marcador fluorescente permite la

localización de las mitocondrias en células vivas, dada su elevada selectividad por este orgánulo, posibilitando la detección de alteraciones en la distribución, forma y organización mitocondrial (Jonhson y *col.*, 1980). La R123 tiene una carga positiva en un pH fisiológico y parece que su acumulación selectiva en las mitocondrias de las células vivas se basa en la atracción entre sus moléculas y en el potencial eléctrico negativo y relativamente elevado que tiene la mitocondria funcional (Jonhson y *col.*, 1980;1981; Chen y *col.*, 1982).

Los trabajos de Graham y *col.* (1990) han confirmado que la R123 puede ser utilizada en la detección de células espermáticas y que su intensa acumulación se verificó en mitocondrias completamente funcionales, de hecho, las células muertas no acumularon este marcador. En el trabajo de Fraser y *col.* (2002), cuando la proporción de células que exhibían fluorescencia con R123 disminuía, esta se acompañaba de un aumento concomitante de células que marcaban con PI o H33258.

En cuanto al impacto de la R123 en el espermatozoide, esta no tiene efectos citotóxicos evidentes (Johnson y *col.*, 1980), ni afecta en los procesos metabólicos, como su consumo de oxígeno o la producción de dióxido de carbono (Downing y *col.*, 1991).

La R123 puede ser utilizada sola (Tucker y *col.*, 1986) o, mas frecuentemente, asociada a marcadores de viabilidad como es el caso del PI (Auger y *col.*, 1989; 1993; Karabinus y *col.*, 1991; Henry y *col.*, 1993; De Baulny y *col.*, 1997; Papaioannou y *col.*, 1997; Segovia y *col.*, 2000; Fraser y *col.*, 2002), o en tinción triple, asociada al diacetato de carboxi-dimetil-fluoresceína (CDMFDA)-PI (Ericsson y *col.*, 1993), con el PI-PE-PSA (Graham y *col.*, 1990) o con PI-Fitc-PNA (Carvajal y *col.*, 2004), para análisis simultáneo de viabilidad y status acrosomal. La utilización conjunta R123-PI parece adecuada para evaluar espermatozoides suspendidos en medios con yema de huevo, caracterizados por una cierta opacidad (Fraser y *col.*, 2002).

Este marcador ha sido utilizado con éxito en la investigación de la función mitocondrial en distintos estudios. Como ejemplo tenemos los estudios del impacto de la criopreservación en la función mitocondrial del espermatozoide del morueco (Windsor y White, 1995) y del hombre (O'Connell y *col.*, 2002), en la comparación de la eficacia de distintos protocolos de congelación del semen bovino (Karabinus y *col.*, 1991), o humano (Henry y *col.*, 1993), e incluso para estudiar la posible correlación entre los estudios citométricos de la función mitocondrial y los parámetros clásicos de análisis de la calidad seminal y la fertilidad *in vivo* (Ericsson y *col.*, 1993). También ha sido utilizada en el estudio de los efectos que la citometría de separación, conocida por "sorting", tenía en el

espermatozoide humano (Auger y col., 1993), en la evaluación de distintos crioprotectores en el espermatozoide de trucha (De Baulny y col., 1997), o en la evaluación de los efectos de los antibióticos en la refrigeración (Segovia y col., 2000).

La utilización de la R123 conjuntamente con la microscopía de fluorescencia posibilita la monitorización del potencial de membrana mitocondrial en células vivas de modo que las variaciones en la intensidad fluorescente reflejan las variaciones intra-celulares del potencial de membrana mitocondrial (Jonhson y col., 1981). Tras estas primeras investigaciones con microscopía de fluorescencia esta tinción se aplicó con citometría de flujo para la evaluación del potencial de la membrana mitocondrial del espermatozoide y de células somáticas cultivadas (Chen y col., 1982; Evenson y col., 1982). Los trabajos de Evenson y col. (1982) han evaluado simultáneamente la viabilidad espermática, recurriendo al bromuro de etidio. Se ha concluido que las alteraciones de la fluorescencia de la R123 se deben a alteraciones en el potencial de membrana de la mitocondria y no en su número. Además, se ha observado una buena correlación entre motilidad espermática e intensidad de coloración de R123.

Tucker y col. (1986) han ampliado los conocimientos sobre las funciones de la R123 en el espermatozoide humano criopreservado e incubado a 37°C. En este trabajo, la R123 se reveló como un método preciso de evaluación de la viabilidad y del *status* metabólico del espermatozoide. En el espermatozoide metabólicamente activo, su rápido y previsible transporte, permite la exacta monitorización de su membrana y de su integridad funcional. En este trabajo, realizado con microscopía de fluorescencia, la intensidad de coloración de la pieza intermedia ha sido correlacionada con el número de mitocondrias mas que con su potencial.

Los trabajos de Auger y col. (1989) en el espermatozoide humano confirman la correlación entre actividad mitocondrial y motilidad espermática computerizada, particularmente significativa tras incubación en un medio capacitante, en el que el parámetro con mayor correlación con los resultados de la citometría ha sido el ALH y menos marcada para los parámetros de velocidad. Tras 24 h de incubación el descenso de la actividad mitocondrial ha sido menos marcado que el de la motilidad. Recientemente, los estudios de O'Connell y col. (2002), también evidenciaron en el espermatozoide humano una correlación positiva entre la entrada de R123 y la motilidad progresiva del espermatozoide fresco y descongelado. Este trabajo también evidenció que la reducción de la motilidad podría ser justificada por la reducción en la actividad mitocondrial, así como una similitud en la

extensión de los daños causados por la criopreservación en las membranas plasmática y mitocondrial, tal como ya lo habían concluido Henry y col. (1993).

Los estudios de Windsor y White (1993; 1995) y de Windsor (1997) han evaluado el semen de morueco por medio de la determinación cuantitativa de la *absorción* de R123 por espectrofotometría. Estos trabajos evidenciaron que esta absorción de R123 cambió en presencia de los factores que reducen directamente el potencial de membrana del espermatozoide, reforzando el interés de la utilización de la R123 como indicador en la evaluación de las lesiones en las membranas derivadas del choque térmico (Windsor y White, 1993). También se puso de manifiesto que en el proceso de congelación/descongelación (Windsor y White, 1995) se inducía la disminución significativa de la absorción de R123. Por otra parte, las lesiones mitocondriales causadas por la congelación están implicadas en la disminución de la fertilidad del semen descongelado (Windsor, 1997), y que éstas no quedan protegidas por la presencia de glicerol (Windsor y White, 1995; Windsor, 1997).

Además de la R123, el fluorocromo **JC-1** es otro marcador mitocondrial que ha sido estudiado en distintos trabajos. Este marcador destaca por su elevada capacidad de diferenciación de las mitocondrias de acuerdo con su potencial de membrana (Garner y col., 1997), diferenciando células con mitocondrias altamente funcionales de células con mitocondrias poco funcionales (Graham, 2001). Este fluorocromo penetra selectivamente en la membrana mitocondrial (Love y col., 2003) permitiendo la identificación de dos poblaciones de espermatozoides: - una población que tiñe de rojo-naranja, indicativo que el JC-1 se acumula en la mitocondria bajo la forma de agregados y característico de células que exhiben un elevado potencial de membrana, y - una segunda población que tiñe de verde, debido a la presencia de monómeros en el interior de la membrana, característico de células que presentan un bajo potencial de membrana (Thomas y col., 1998). Su aplicación en la evaluación de la funcionalidad mitocondrial ya se encuentra descrita en el hombre (Kasai y col., 2002), en el toro (Thomas y col., 1998), en el caballo (Baumber y col., 2000; Gravance y col., 2000), en el ratón (Gravance y col., 2001), y en el cerdo (Huo y col., 2002). Los resultados obtenidos con el empleo de esta tinción han presentado una rigurosa estimación de la función mitocondrial así como, una fuerte correlación con el *status* funcional del espermatozoide (Gravance y col., 2001). Otros trabajos destacaron la correlación entre los parámetros de motilidad total (Love y col., 2003), potencial fertilizante (Kasai y col., 2002) y viabilidad (Huo y col., 2002; Love y col., 2003) con la funcionalidad mitocondrial. Estos últimos autores encontraron también correlación entre el potencial de la membrana y el tipo de movimiento espermático, concretamente con los parámetros de motilidad ALH, STR y LIN

(Love y col., 2003). De igual modo, los trabajos de Martínez-Pastor y col. (2004), han encontrado alguna correlación entre la actividad mitocondrial medida por el JC-1 y la motilidad total y progresiva.

#### **2.4.3.2. Valoración de la capacitación mediante la prueba de tinción con clortetraciclina**

La capacidad de fecundación exige una correcta motilidad e integridad de la membrana plasmática y del acrosoma, así como la propiedad de capacitarse normalmente.

Una de las pruebas de evaluación del estado de capacitación espermática es la **tinción fluorescente con clortetraciclina (CTC)**. En este examen las propiedades fluorescentes de la CTC son utilizadas para evaluar el estado de capacitación y la integridad del acrosoma. Para ello, los espermatozoides son incubados *in vitro* en un medio estimulante de la capacitación y la exostosis acrosomal, como es el caso del ionóforo de calcio (A23187); verificándose tras un periodo de incubación, diferentes patrones de distribución de la CTC, que demuestran los estadios de capacitación. Estos patrones son: no-capacitado y acrosoma intacto, designado por patrón F; capacitado y acrosoma intacto, patrón B; capacitado y acrosoma reaccionado, patrón AR (Ward y Storey, 1984; DasGupta y col., 1993). Estos patrones de fluorescencia de la CTC reflejan las alteraciones asociadas a los niveles del  $\text{Ca}^{2+}$  intra-citoplasmáticos. En el patrón F toda la cabeza del espermatozoide exhibe una coloración fluorescente homogénea, mientras en el patrón B la fluorescencia está limitada a la región anterior de la cabeza. Cuando ocurre la reacción acrosómica la coloración es muy marcada, y tras ésta, en el patrón AR, la cabeza presenta una fluorescencia débil, exceptuando una banda fina fluorescente en el segmento ecuatorial.

La aplicabilidad y fiabilidad de esta prueba en la determinación del estado de capacitación del espermatozoide, ya utilizada en otras especies como el cerdo (Wang y col., 1995; Jonhson y col., 1996) también está comprobada en el perro (Hewitt y England, 1998; Guérin y col., 1999; Rota y col., 1999a). La utilización simultánea de un marcador de viabilidad, como es el caso del Hoechst 33258, permite la monitorización de la viabilidad y del *status* funcional (Hewitt y England, 1998).

#### 2.4.3.3. Actividad enzimática del acrosoma

La detección de determinadas alteraciones provocadas por el ciclo de criopreservación puede exigir otro tipo de pruebas. Por ejemplo, el proceso de congelación y descongelación induce ciertos daños en el acrosoma, concretamente en la actividad de la enzima amilasa, traducándose en alteraciones de la permeabilidad de los acrosomas no detectadas por estudio microscópico (De Las Heras y col., 1996). En el perro, la determinación de la actividad de la enzima acrosina es indicativa del grado de lesión celular tras el proceso de congelación y descongelación (Froman y col., 1984). Sin embargo, Garner y col. (1986) sostienen que es muy difícil obtener una cuantificación exacta de la actividad de esta enzima.

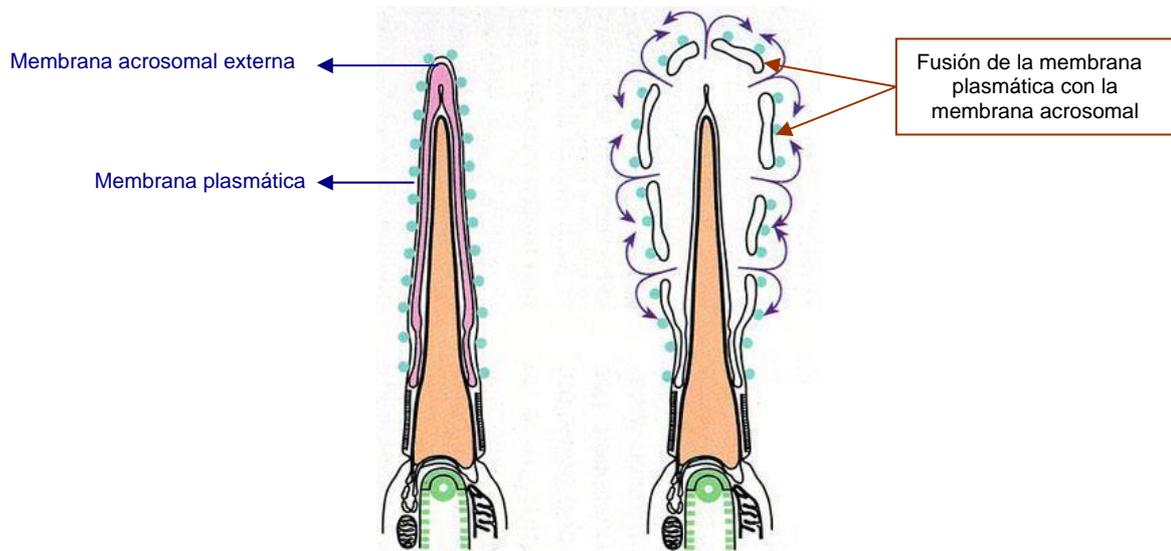
#### 2.4.3.4. Ensayos de unión y penetración a zona pelúcida

Una otra posibilidad de analizar la funcionalidad del espermatozoide *in vitro* es evaluar su capacidad de penetración en la zona pelúcida. Los dos aspectos de la función espermática necesarios para la fecundación *in vivo* son observados en esta prueba: la motilidad y la propiedad de capacitarse normalmente. Los porcentajes de penetración de los espermatozoides a la zona son indicativos y predictivos de su potencial fertilizante (Ivanova y Mollova, 1993). Estos ensayos de interacción permiten observar el número de espermatozoides adheridos a la superficie de la zona o los que ya iniciaron la reacción acrosómica y la penetración.

Para evaluar la capacidad fertilizante del semen de perro ha sido utilizado el ensayo de penetración de zona pelúcida (Hewitt y England, 1997) y el de unión a zona (Ström-Holst y col., 2000; Peña y col., 2004), así como el ensayo de **hemi-zona**, en el que una mitad de la zona es incubada con semen de una muestra-referencia (control), mientras la otra mitad es incubada con la muestra con capacidad fertilizante desconocida (Mayenco-Aguirre y Pérez-Cortés, 1998; Ivanova y col., 1999). Este método es utilizado con frecuencia en la evaluación del semen humano (Franken y col., 1993), siendo también utilizado para evaluar espermatozoides de cerdo (Fazeli y col., 1997). En el perro, el ensayo de hemizona, se ha utilizado también para la evaluación de la eficacia de distintos diluyentes (Sirivaidyapong y col., 2000).

Estas pruebas de penetración y unión a zona están consideradas por algunos autores como lentas, caras y limitantes porque apenas evalúan un pequeño conjunto de espermatozoides en una población.

#### 2.4.3.5. Pruebas de inducción de la reacción acrosómica



**Figura 2.5.** Representación esquemática de la reacción acrosómica.  
(Tomado de [www.wisc.edu/ansci\\_repro](http://www.wisc.edu/ansci_repro)).

La capacidad de los espermatozoides a sufrir la reacción acrosómica *in vitro* es un pre-requisito a la fusión espermatozoide-ovocito. Esta capacidad se puede observar en respuesta al estímulo del calcio ionóforo A23187 y está significativamente relacionada con el *status* de fertilidad. Así se ha demostrado que la capacidad de sufrir reacción acrosómica está disminuida o incluso ausente en hombres sub-fértiles. La utilización conjunta de marcadores fluorescentes específicos del acrosoma ha permitido la monitorización de las reacciones acrosómicas, así, con la asociación Fitc-PSA se ha conseguido la diferenciación de 3 patrones distintos: acrosoma intacto, parcialmente dañado y acrosoma dañado (Cummins y *col.*, 1991).

El A23187 también indujo la reacción acrosómica *in vitro* en el espermatozoide de caballo con éxito, así como la heparina (Christensen y *col.*, 1996). Otros compuestos son conocidos por inducir artificialmente la reacción acrosómica como es el caso del dilaurilfosfatidil-colina, también conocido por PC12 (Nolan y *col.*, 1992).

En el perro fue posible inducir motilidad hiperactivada y reacción acrosómica del semen fresco por Mahi y Yanagimachi (1978) tras 7 h de incubación en un medio desarrollado por ellos para la capacitación canina que es conocido como Canine Capacitation Medium o CCM que tiene bajo contenido en albúmina. Mas recientemente, Shimazu y *col.*, (1992) solo han necesitado 4h de incubación en un medio de Krebs-solución de bicarbonato de Ringer, cuyo contenido en albúmina de suero bovino es el doble que para el CCM y con unas condiciones de incubación similares, es decir, a 37°C bajo 5% de CO<sub>2</sub>, pero con una concentración espermática reducida a la mitad.

Otra posibilidad de inducir la reacción acrosómica en esta especie es a través de la incubación con la *zona pelúcida* intacta o solubilizada (Kawakami y *col.*, 1993 a), método que posteriormente fue utilizado en el espermatozoide de cerdo (Córdova y *col.*, 1997).

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3.1. Diseño experimental

Para alcanzar los objetivos propuestos hemos dividido el estudio en dos grandes partes y diseñado los siguientes experimentos:

#### Parte I - Refrigeración

##### 3.1.1. Experimento 1. Efectos de la adición de aminoácidos en las características del semen refrigerado en el diluyente Tris-fructosa-ácido cítrico

Este experimento se ha dividido en 3 estudios independientes:

###### 3.1.1.1. Experimento 1.1. Estudio preliminar: efectos en la motilidad de la suplementación en glutamina, prolina y taurina

El objeto de este experimento fue valorar visualmente la motilidad total y progresiva de los espermatozoides en refrigeración diluidos en medios suplementados con los aminoácidos glutamina, prolina y taurina, a concentraciones de 30, 50 y 80 mM, a fin de determinar cual de los aminoácidos y en que concentración permite conservar mejor las características de motilidad del espermatozoide canino en refrigeración a 4°C.

Para ello, se ha utilizado la fracción espermática de 9 eyaculados de 9 perros Pastor Alemán de entre 3 y 6 años. Dichos eyaculados fueron agrupados de 3 en 3 a fin de constituir pools y así, obtener una mayor variabilidad de individuos, al mismo tiempo que un mayor volumen y número de espermatozoides por muestra a analizar; de modo que fuera posible realizar los análisis a lo largo de los días. Únicamente se emplearon eyaculados con motilidad progresiva mayor al 70% y un porcentaje de formas anormales menor del 20%, las cuales fueron evaluadas por tinción con eosina-nigrosina. Esta selección de eyaculados fue realizada *in situ*, inmediatamente a la recogida de cada eyaculado; además se comprobó inmediatamente a la constitución de cada pool que estos mantenían la motilidad. Cada pool fue dividido en 10 alícuotas, las cuales se mezclaron con cada uno de los medios diluyentes en la proporción 1:5 (semen: diluyente) dando lugar a una concentración de aproximadamente  $50 \times 10^6$  espermatozoides por mL. Los eyaculados se obtuvieron entre Octubre y Noviembre del 2001. Las mediciones se realizaron visualmente a las 24, 48, 72, 96 y 168 horas (7 días)

post-refrigeración a 4°C, tras 5 min a 38°C. El diluyente tris-fructosa-ácido cítrico-20% yema sin suplementación funcionó como control. Para estudio de morfología se han realizado extensiones teñidas con eosina-nigrosina. El estudio estadístico consistió en la comparación mediante análisis de la varianza (ANOVA) y el test de comparaciones múltiples de Duncan para  $p < 0,05$ , siendo realizadas 3 réplicas en este estudio preliminar (Martins y col., 2002).

### **3.1.1.2. Experimento 1.2. Efectos de la suplementación con taurina en las características de motilidad, integridad de la membrana y del acrosoma del espermatozoide refrigerado con distintas proporciones de yema**

El objeto de este experimento fue conocer el impacto de la suplementación de la taurina sobre distintos aspectos de las funciones espermáticas; haciendo variar el porcentaje de yema en el diluyente de refrigeración. De este modo sería posible determinar si la adición de este aminoácido al medio de refrigeración permitiría, además de una posible mejora en la movilidad espermática, bajar la concentración de yema del diluyente.

En este experimento han sido utilizados un total de 10 eyaculados, procedentes de 2 Rottweiler, 7 Pastor Alemán y 1 Retriever Labrador con edades comprendidas entre los 2 y 4 años y utilizados de 2 a 2, para constituir pools.

Tras la recogida, las motilidades total y progresiva de una muestra de cada eyaculado y de cada pool han sido examinadas de inmediato. Simultáneamente, se realizaron extensiones de cada pool fresco para su tinción con Spermac<sup>®</sup> a fin de analizar las características de morfología espermática y de la integridad del acrosoma. La evaluación de la integridad de la membrana plasmática fue determinada mediante el test de endósmosis (esquema 3.1).

Cada pool ha sido diluido *in situ* y a la temperatura ambiente en 9 alícuotas de igual volumen, la dilución practicada ha sido de 1:5. La concentración de espermatozoides en la suspensión final varió entre 40 y  $50 \times 10^6$  espermatozoides por mL.

Han sido realizadas 5 réplicas de este experimento. En cada réplica el diluyente tris-fructosa-ácido cítrico-20% yema sin suplementación funcionó como control. El periodo de las recogidas fue desde Septiembre hasta Diciembre de 2002.

Previamente a cada análisis de motilidad (visual y computerizado) las muestras de cada alícuota permanecen 5 minutos a la temperatura ambiente, son diluidas hasta  $25 \times 10^6$  espermatozoides por mL en su medio correspondiente y calentadas a 38°C en el baño antes de la evaluación. Para el análisis visual se ha utilizado un microscopio de contraste de fases, provisto de una pletina calentable a 38°C. Han sido analizados un total de 6 campos por cada muestra y en cada réplica. Las evaluaciones de la motilidad (porcentaje de espermatozoides móviles y móviles progresivos) han sido realizadas por la misma persona a lo largo del experimento. Para el análisis computerizado de la motilidad se ha utilizado el analizador computerizado de imagen Sperm Class Analyzer (SCA<sup>®</sup> 2002).

El análisis estadístico ha consistido en la comparación, mediante un análisis de la varianza de pruebas repetidas (ANOVA) y el test de comparaciones múltiples de Duncan para  $p < 0,05$ , de los nueve diluyentes de cada experimento entre sí día a día. También se obtuvieron las posibles correlaciones estadísticas entre los diferentes factores investigados.

Las variables estudiadas en cada una de las 9 alícuotas desde el día 0, día de la recogida, tras la dilución e inmediatamente antes de la refrigeración, hasta que la motilidad fuese próxima a cero, han sido:

**Cada 24h:** hasta que la motilidad fuese próxima a cero,

- a) Motilidad total y progresiva visuales
- b) Integridad de la membrana mediante el test de endosmósis
- c) Integridad del acrosoma mediante tinción con Spermac<sup>®</sup>

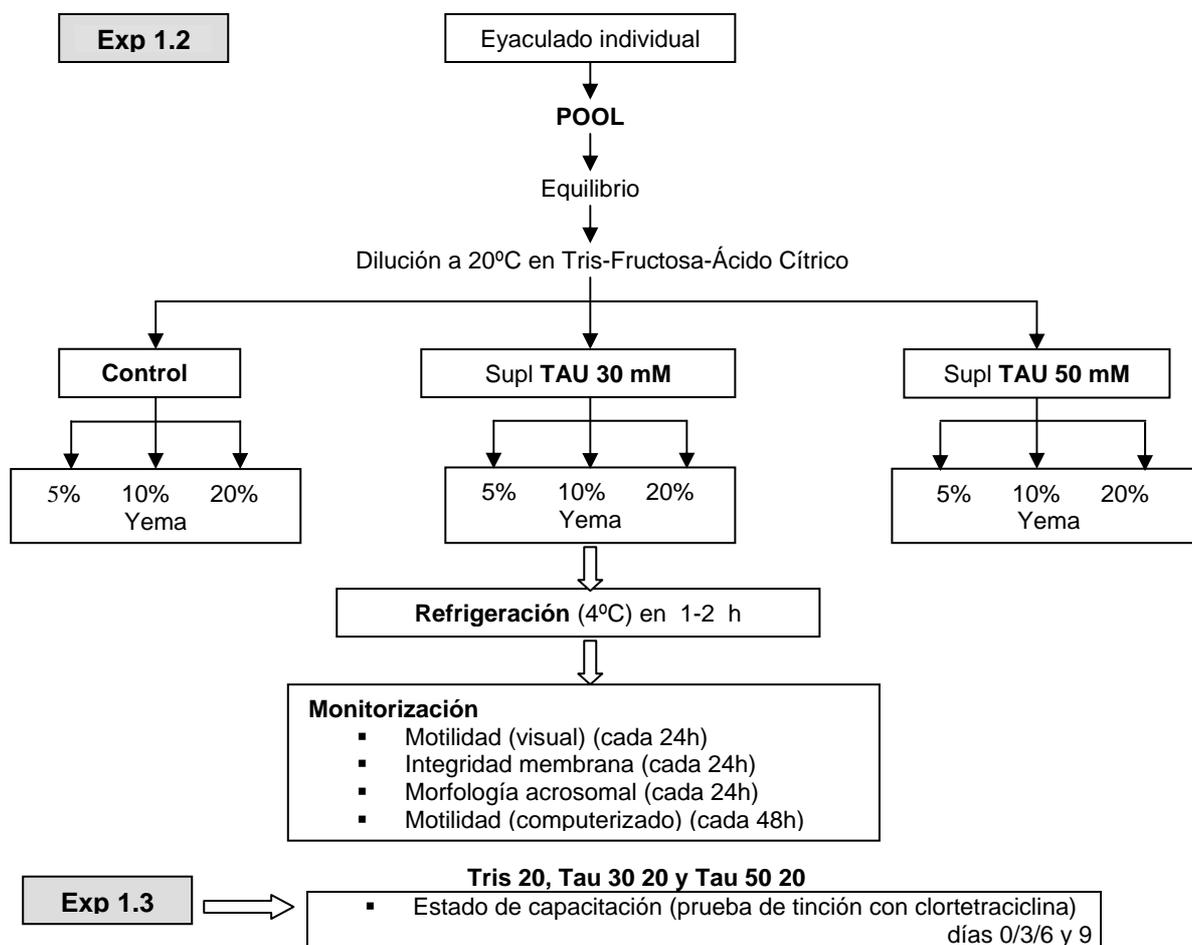
**Cada 48h:** hasta que el número de alícuotas para diluyente era  $\geq 2$

- a) Motilidad y velocidad mediante análisis computerizada de motilidad (Sperm Class Analyzer, SCA<sup>®</sup> 2002)

**3.1.1.3. Experimento 1.3. Evaluación del estado de capacitación de los espermatozoides a lo largo del periodo de refrigeración en el diluyente suplementado por taurina 30 y 50 mM, mediante la prueba de tinción con clortetraciclina**

En función de los resultados del experimento anterior seleccionamos los diluyentes con taurina a 0, 30 y a 50 mM con el 20% de yema para valorar el estado de capacitación de los espermatozoides realizando un marcaje con clortetraciclina (CTC).

Se utilizaron las segundas fracciones de eyaculados de 6 perros de 2 a 7 años y de raza Pastor Alemán, agrupados 2 a 2. Fueron tomadas muestras simultáneas para el análisis con CTC y para la evaluación computerizada de la motilidad y de los parámetros de velocidad, realizándose estos análisis a intervalos de 72 horas, en los días 0, 3, 6 y 9 tras la dilución y refrigeración (esquema 3.1). Se realizaron 3 réplicas de éste experimento, realizado entre Marzo y Abril de 2002. El análisis estadístico se basó en la comparación mediante la ANOVA de un factor y la prueba de Duncan, para  $p < 0,05$ .



**Esquema 3.1.** Resumen de los protocolos de los experimentos 1.2 y 1.3.

## Parte II: Congelación

### 3.1.2. Experimento 2. Estudio del empleo de etilenglicol como crioprotector en la congelación del espermatozoide de perro

Este experimento se realizó con el propósito de comparar la eficacia del etilenglicol a distintas concentraciones frente a dos diluyentes más utilizados (Noruego y Uppsala-Equex) y de eficacia reconocida, que fueron considerados como medios control.

Para ello se utilizaron 13 eyaculados de 10 perros con edades entre los 2 y 5 años y de las razas Pastor Alemán, Rottweiler, Retriever Labrador y Cocker Spaniel. Los eyaculados han sido agrupados para constituir 5 pools distintos, cada uno de los cuales fue dividido en 6 alícuotas y diluido en los siguientes medios (ver tabla 3.1) a la concentración final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

**Tabla 3.1** - Diluyentes utilizados en el experimento 2

Diluyentes	Abreviatura
Tris-Yema-Ácido Cítrico-8% Glicerol (Noruego)	I
Tris-Yema-Ácido Cítrico-4% Etilenglicol	II
Tris-Yema-Ácido Cítrico-8% Etilenglicol	III
Tris-Yema-Ácido Cítrico- 4% Glicerol + 4% Etilenglicol	IV
Tris-Yema-Ácido Cítrico-5% Glicerol + 0,5% Equex (Uppsala-Equex II)	V
Tris-Yema-Ácido Cítrico-5% Etilenglicol + 0,5% Equex	VI

La descongelación se realizó a 70°C durante 8 segundos y, a continuación, las muestras se diluyeron lentamente en el medio de descongelación, buffer Tris (v. ítem 3.2.3.3), a proporción 1:1 (v:v), manteniéndose en incubación en baño-maría a 38°C en tubos protegidos de la luz.

Las variables estudiadas fueron:

**- Tras la descongelación y de 30-30 minutos hasta que la motilidad se acercara a 0%:**

- Motilidad total visual.
- Motilidad computerizada, total y progresiva, determinada con el sistema computerizado SCA<sup>®</sup> 2002.
- Longevidad celular pos-descongelación, en función de la duración de la motilidad.

**- Tras la descongelación y después de 1h y 30 min en incubación:**

- d) Viabilidad e integridad del acrosoma, determinadas mediante citometría de flujo tras marcaje con los fluorocromos yoduro de propidio (PI) y Fitc-PSA.
- e) Porcentaje de células vivas en muestras teñidas con eosina-azul de anilina.

Se han realizado 5 réplicas del experimento. Las recogidas de eyaculados y su congelación fueron realizadas entre los meses de Octubre y Diciembre del 2003. El estudio estadístico consistió en la comparación de los distintos diluyentes, utilizando el análisis de varianza factorial (ANOVA) y el test de comparaciones múltiples de Duncan para estudio de las diferencias entre grupos. Las diferencias se consideran significativas para  $p < 0,05$ .

**3.1.3. Experimento 3. Interrelaciones entre la evaluación de la funcionalidad espermática mediante marcaje con Rodamina-PI y los parámetros clásicos de evaluación de la calidad espermática**

El objeto de este experimento fue evaluar la calidad espermática mediante citometría de flujo asociada al marcaje de los espermatozoides con fluorocromos indicadores de su funcionalidad, Rodamina (R123) y PI, correlacionándolo con la motilidad y vitalidad espermáticas.

Para ello hemos recogido 10 eyaculados provenientes de 8 perros Pastor Alemán, agrupados de 2 a 2 a fin de constituir 5 *pools*. Las recogidas fueron practicadas durante el mes de Abril 2004. Cada *pool* fue dividido en 2 fracciones, siendo una mitad procesada para la obtención de espermatozoides muertos, sumergiendo la alícuota en nitrógeno líquido sin diluyente y descongelándola a 38°C un total de 3 veces consecutivas, a fin de inducir daños en la membrana. A continuación, se diluyó en el medio Tris-Fructosa-Ácido cítrico-Yema; siendo esta considerada como muestra muerta. La otra mitad fue preservada con diluyente Tris-Fructosa-Ácido cítrico-Yema, sin alterar los espermatozoides, siendo considerada como muestra viva.

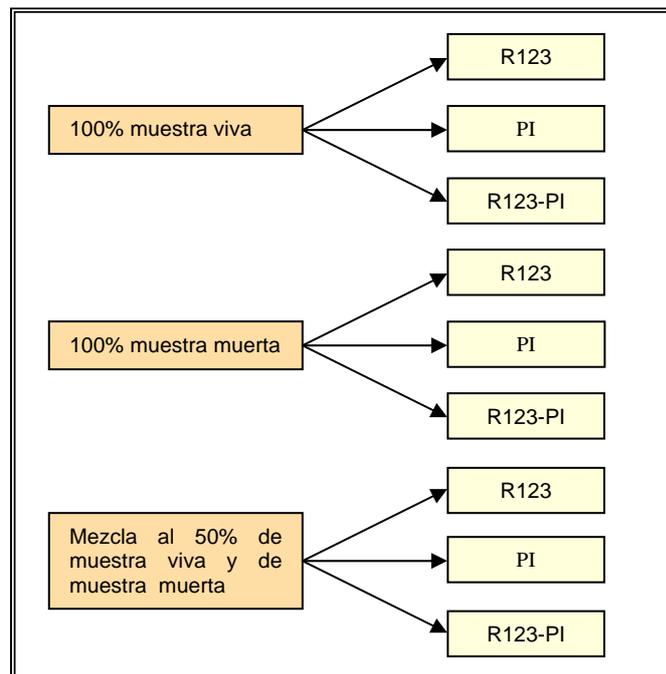
De este modo se obtuvieron a partir de cada *pool* 3 alícuotas con las siguientes proporciones (esquema 3.2):

- 1) 100% de muestra viva, 0% de muestra muerta;
- 2) 100% de muestra muerta, 0% muestra viva;
- 3) 50% de muestra viva + 50% de muestra muerta.

En cada alícuota se han realizado los siguientes análisis:

- Viabilidad y actividad mitocondrial evaluadas mediante citometría de flujo tras marcaje con R123, PI y su combinación.
- Porcentaje de células vivas y muertas con eosina-nigrosina.
- Motilidad total visual.
- Comparación de los resultados obtenidos por citometría y por microscopía de fluorescencia de cada una de las alícuotas mezcladas al 50% de muestra viva y muerta.

Se han realizado 5 réplicas del experimento. El análisis estadístico consistió en el análisis de varianza factorial (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan, comparándose las características de motilidad, viabilidad y actividad mitocondrial de las distintas alícuotas. Las diferencias se consideran significativas para  $p < 0,05$ . Se realizaron asimismo correlaciones entre los distintos parámetros evaluados (motilidad, vivos mediante la tinción con eosina y rodamina positivos).



**Esquema 3.2.** Protocolo del experimento 3: alícuotas y respectiva coloración.

### 3.1.4. Experimento 4. Efectos de la suplementación del diluyente de congelación Uppsala-Equex con los aminoácidos taurina e hipotaurina

Este experimento incluye la realización de 2 estudios independientes, a partir de los mismos eyaculados.

#### 3.1.4.1. Experimento 4.1. Efectos en la motilidad, longevidad, viabilidad, integridad del acrosoma y actividad mitocondrial del espermatozoide descongelado

El objetivo del experimento 4.1 fue estudiar los efectos de la suplementación en aminoácidos taurina y hipotaurina a concentraciones de 0, 25, 50 y 75 mM del diluyente que mejores resultados ha demostrado en el experimento 3, el diluyente Uppsala-Equex II.

Para ello hemos recogido las segundas fracciones del eyaculado de 15 perros, agrupándolas de 3 en 3 con el objeto de obtener 5 pools distintos. Se pretendía conseguir el mayor número posible de pajuelas a concentración aproximada de 80 millones de espermatozoides por mL. Se realizaron 5 réplicas del experimento, siendo el periodo de recogidas durante el mes de Mayo de 2004. Cada *pool* fue diluido en los siguientes diluyentes (ver tabla 3.2).

Tras la descongelación (70°C durante 8sg) el semen es diluido hasta 25 millones/mL en buffer Tris y después de 5 minutos en equilibrio a 38°C se procedió a evaluar la motilidad.

**Tabla 3.2** - Diluyentes utilizados en el experimento 4.1

Experimento 4.1 - Diluyentes de congelación
1. Uppsala-Equex II (Control)
2. Uppsala-Equex II + 25 mM Taurina
3. Uppsala-Equex II + 50 mM Taurina
4. Uppsala-Equex II + 75 mM Taurina
5. Uppsala-Equex II + 25 mM Hipotaurina
6. Uppsala-Equex II + 50 mM Hipotaurina
7. Uppsala-Equex II + 75 mM Hipotaurina

En el **experimento 4.1** las variables estudiadas fueron:

**- Tras la descongelación y de 30-30 minutos hasta que la motilidad fuese próxima a 0%, en incubación a 38°C:**

- a) Motilidad total visual.
- b) Motilidad computerizada, total y progresiva, determinada mediante el sistema SCA<sup>®</sup>2002.
- c) Longevidad pos-descongelación de la motilidad.

**-Tras la descongelación y a la 1h y 30 min de incubación a 38°C:**

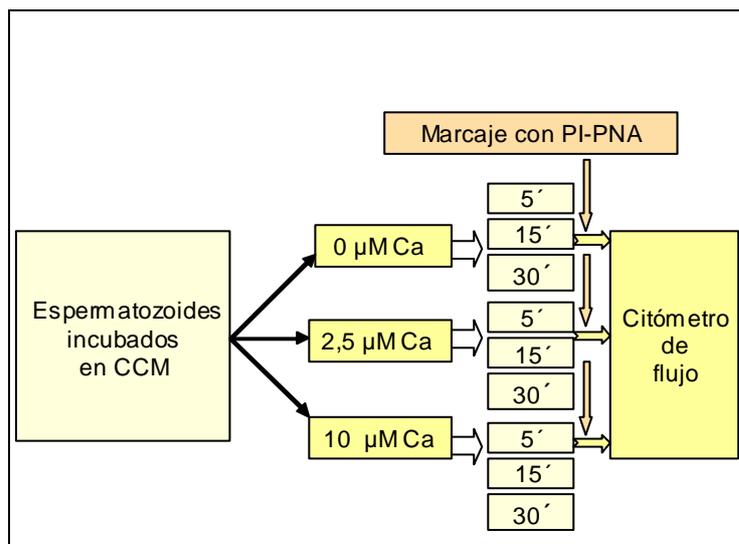
- d) Motilidad total visual.
- e) Viabilidad e integridad del acrosoma determinadas mediante la citometría de flujo con los fluorocromos PI/Fitc-PSA.
- f) Viabilidad y actividad mitocondrial con los fluorocromos Fitc-R123/PI, mediante citometría de flujo.
- g) Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos en muestras teñidas con eosina-azul de anilina.

#### **3.1.4.2. Experimento 4.2. Inducción de la reacción acrosómica con Ca<sup>2+</sup> ionóforo A23187**

En éste experimento el objetivo fue estudiar la capacidad funcional de los espermatozoides congelados en los distintos diluyentes del experimento anterior para sufrir reacción acrosómica *in vitro* inducida por el calcio ionóforo. Los fluorocromos, PI y Fitc-PNA o Fitc-PSA, asociados a la citometría de flujo han sido utilizados para monitorizar las alteraciones en el tiempo.

Las variables estudiadas en este experimento han sido:

- a) motilidad tras la descongelación y pasados 20 minutos de incubación en CCM.
- b) integridad de la membrana plasmática y *estado* del acrosoma mediante citometría de flujo asociada a los fluorocromos PI/Fitc-PNA a los 5, 15 y 30 minutos tras el inicio de la incubación con el Ca<sup>2+</sup> ionóforo. En algunos casos también se utilizó PI/Fitc-PSA en el marcaje de los 30 minutos, para establecer una similitud de tinción entre las mismas.



**Esquema 3.3.** Protocolo del experimento 4.2.

En ambos experimentos el estudio estadístico se ha realizado utilizando un análisis de la varianza para pruebas repetidas y el test de Duncan de comparación de las medias, para  $p < 0,05$ .

## 3.2. Materiales

### 3.2.1. Material biológico

Como donantes de semen se han utilizado un total de 19 perros de fertilidad anterior probada y que no recibían tratamiento alguno o padecían lesiones evidentes que pudieran alterar su fertilidad. Sus edades estaban comprendidas entre 2 y 7 años y sus razas eran 13 Pastor Alemán, 3 Rottweiler, 2 Retriever Labrador y 1 Cocker Spaniel, pertenecientes a la Unidad de Perros Policía de la Policía Nacional, cuya sede está situada en la Casa de Campo de Madrid. Estas instalaciones distan de la Facultad de Veterinaria unos 15 minutos, siendo en ellas realizadas las primeras valoraciones espermáticas encaminadas a la selección de los eyaculados y las diluciones iniciales.

### 3.2.2. Material y equipo de laboratorio

#### **a. Material de laboratorio**

- Contador manual de células
- Cronómetro digital
- Cámaras de Neubauer
- Micropipetas Biohit
- Probetas graduadas
- Matraces Erlenmeyer
- Tubos de citometría Becton Dickinson 352052
- Tubos Eppendorf de 1 mL
- Tubos Falcon de 15 mL
- Vasos de precipitado
- Espátulas, papel de aluminio,
- Filtros de acetato de celulosa con membrana de 0,20  $\mu\text{m}$  (Albet)
- Filtros Millipore con membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  F-8273 (Millipore)
- Malla de nylon de 34  $\mu\text{m}$  de paso de luz (distribuida por Nessler. SA. Madrid)
- Pajuelas de 0,5 mL (IMV), bolas metálicas para su taponamiento
- Material fungible: portaobjetos, cubreobjetos, puntas de pipetas
- Vectashield<sup>®</sup> (VectorLab, Burlingame, Ca - 24010)

#### **b. Equipo de laboratorio**

- Sistema computerizado de análisis de motilidad, constituido por:
  - . Microscopio de contraste de fases Olympus BX50 con pletina calentable.
  - . Cámara Sony B/N
  - . Programa Sperm Class Analyzer (Microptic S.L.<sup>®</sup>, Barcelona) versión 2002
- Microscopio Olympus BX50 dotado de emisor de fluorescencia DP50 con diversas longitudes de onda, incluida la de 488 nm que ha sido utilizada en este trabajo.
- Microscopio de fluorescencia Olympus BH2 dotado con emisión de fluorescencia a 530 nm.

- Citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) equipado con Láser de Argón capaz de operar a una longitud de onda de 488nm
- Microscopio óptico Olympus CH20
- Pletina con temperatura regulable (Minitüb HT200)
- Medidor de pH Micro pH 2000 (Crison)
- Osmómetro Advanced wide-range osmometer 2w2 (Advanced Instruments, USA)
- Baño María con temperatura regulable
- Centrífuga
- Vórtex
- Agitador magnético
- Balanza de precisión Gram
- Cámara de refrigeración a 4-5° C, cámara de congelación a -20°C.
- Contenedor de nitrógeno líquido Taylor-Warton

### 3.2.3. Reactivos, medios y soluciones

#### ***a. Preparación de los medios diluyentes de refrigeración y congelación***

Al diluyente-base constituido por Tris (hidroximetil) aminometano, ácido cítrico, D-fructosa, penicilina y di-hidro-estreptomicina, le fueron añadidos los aminoácidos Taurina o Glutamina a distintas molaridades y, por último, la yema de huevo a concentraciones de 5, 10 o 20% (v/v).

Los diluyentes fueron preparados con una semana de antelación, divididos en alícuotas y guardados en tubos y conservados en congelación a -20°C hasta su uso. El pH de los diluyentes fue ajustado a 6,6-6,8. Los diluyentes, dependiendo de su constitución, han sido filtrados en filtros de 0,20 y 0,45 µm; cuando contenían yema de huevo fueron centrifugados a 3000g durante 30 min, antes de ser filtrados. Inmediatamente antes de su uso, los diluyentes se descongelaron en baño de agua a 37°C. Las cantidades de los distintos constituyentes están calculadas para un volumen final de diluyente de 200 mL.

El agua ultra-pura utilizada en la preparación de los medios y soluciones fue destilada en el Milli Q.Plus<sup>®</sup>, Millipore.

### 3.2.3.1. Diluyentes de refrigeración

#### a. Diluyente Tris-Fructosa-Ácido cítrico-20% Yema (Andersen, 1972)

Tabla 3.3 - Diluyente de refrigeración Tris-20%Yema

Componente	Referencia	Cantidad
Tris	141940 (Panreac)	6,05 g
Ácido cítrico	141018 (Panreac)	3,4 g
Fructosa	142728 (Panreac)	2,5 g
Penicilina	P-3032 (Sigma)	200000 UI
Estreptomina	S-9137 (Sigma)	0,2 g
Yema de huevo		20%(40mL)
pH		6,62
Osmolaridad		331 mOsm

#### b. Diluyentes Tris-Fructosa-Ácido cítrico-20% Yema suplementados con Glutamina

Tabla 3.4 - Diluyentes de refrigeración Tris-20%Yema-Glutamina 30/50/80 mM

Componente	Referencia	Glutamina 30	Glutamina 50	Glutamina 80
Tris	141940 (Panreac)	6,05 g	=	=
Ácido cítrico	141018 (Panreac)	3,4 g	=	=
Fructosa	142728 (Panreac)	2,5 g	=	=
L-Glutamina	G-5763 (Sigma)	30 mM	50 mM	80 mM
Penicilina	P-3032 (Sigma)	200000 UI	=	=
Estreptomina	S-9137 (Sigma)	0,2 g	=	=
Yema de huevo		20%(40mL)	=	=
pH			6,7	
Osmolaridad		357 mOsm	373 mOsm	407 mOsm

**c. Diluyentes Tris-Fructosa-Ácido cítrico-20% Yema suplementados con Prolina**

**Tabla 3.5 - Diluyentes de refrigeración Tris-20% Yema-Prolina 30/50/80 mM**

Componente	Referencia	Prolina 30	Prolina 50	Prolina 80
Tris	141940 (Panreac)	6,05 g	=	=
Ácido cítrico	141018 (Panreac)	3,4 g	=	=
Fructosa	142728 (Panreac)	2,5 g	=	=
Prolina	P-8449 (Sigma)	30 mM	50 mM	80 mM
Penicilina	P-3032 (Sigma)	200000 UI	=	=
Estreptomina	S-9137 (Sigma)	0,2 g	=	=
Yema de huevo		20%(40mL)	=	=
pH		6,7		
Osmolaridad		307 mOsm	320 mOsm	365 mOsm

**d. Diluyentes Tris-Fructosa-Ácido cítrico-20% Yema suplementados con Taurina**

**Tabla 3.6 - Diluyentes de refrigeración Tris-20%Yema-Taurina 30/50/80 mM**

Componente	Referencia	Taurina 30	Taurina 50	Taurina 80
Tris	141940 (Panreac)	6,05 g	=	=
Ácido cítrico	141018 (Panreac)	3,4 g	=	=
Fructosa	142728 (Panreac)	2,5 g	=	=
Taurina	T-9931 (Sigma)	30 mM	50 mM	80 mM
Penicilina	P-3032 (Sigma)	200000 UI	=	=
Estreptomina	S-9137 (Sigma)	0,2 g	=	=
Yema de huevo		20%(40mL)	=	=
pH		6,6		
Osmolaridad		316 mOsm	348 mOsm	386 mOsm

**e. Diluyentes Tris-Fructosa-Ácido cítrico-5/10% Yema****Tabla 3.7 - Diluyentes de refrigeración Tris-5/10%Yema**

Componente	Referencia	Tris 5	Tris 10
Tris	141940 (Panreac)	6,05 g	=
Ácido cítrico	141018 (Panreac)	3,4 g	=
Fructosa	142728 (Panreac)	2,5 g	=
Penicilina	P-3032 (Sigma)	200000 UI	=
Estreptomina	S-9137 (Sigma)	0,2 g	=
Yema de huevo		5%(10mL)	10%(20mL)
pH		6,62	
Osmolaridad		331 mOsm	

**f. Diluyentes Tris-Fructosa-Ácido cítrico-5/10/20% Yema suplementados con Taurina****Tabla 3.8 - Diluyentes de refrigeración Tris-5/10/20%Yema-Taurina 30 mM**

Componente	Referencia	Taurina 30 5	Taurina 30 10	Taurina 30 20
Tris	141940 (Panreac)	6,05 g	=	=
Ácido cítrico	141018 (Panreac)	3,4 g	=	=
Fructosa	142728 (Panreac)	2,5 g	=	=
Taurina	T-9931 (Sigma)	30 mM	=	=
Penicilina	P-3032 (Sigma)	200000 UI	=	=
Estreptomina	S-9137 (Sigma)	0,2 g	=	=
Yema de huevo		5%	10%	20%
pH		6,62		
Osmolaridad		316 mOsm		

**Tabla 3.9 - Diluyentes de refrigeración Tris-5/10/20%Yema-Taurina 50 mM**

Componente	Referencia	Taurina 50 5	Taurina 50 10	Taurina 50 20
Tris	141940 (Panreac)	6,05 g	=	=
Ácido cítrico	141018 (Panreac)	3,4 g	=	=
Fructosa	142728 (Panreac)	2,5 g	=	=
Taurina	T-9931 (Sigma)	50 mM	=	=
Penicilina	P-3032 (Sigma)	200000 UI	=	=
Estreptomicina	S-9137 (Sigma)	0,2 g	=	=
Yema de huevo		5%	10%	20%
pH			6,63	
Osmolaridad			348 mOsm	

### 3.2.3.2. Diluyentes de congelación

#### *a. Diluyente Noruego (Andersen, 1972)*

**Tabla 3.10 - Diluyente Noruego**

Componente	Laboratorio	Cantidad
Tris	141940 (Panreac)	6,05 g
Ácido cítrico	141018 (Panreac)	3,4 g
Fructosa	142728 (Panreac)	2,5 g
Glicerol	141339 (Panreac)	16 mL
Penicilina	P-3032 (Sigma)	200000 UI
Estreptomicina	S-9137 (Sigma)	0,2 g
Yema de huevo		20%
pH		6,78
Osmolaridad		2900 mOsm

#### *b. Diluyente con 4% de Etilenglicol*

**Tabla 3.11 - Diluyente 4% etilenglicol**

Componente	Laboratorio	Cantidad
Tris	141940 (Panreac)	6,05 g
Ácido cítrico	141018 (Panreac)	3,4 g
Fructosa	142728 (Panreac)	2,5 g
Etilenglicol	141316 (Panreac)	8 mL
Penicilina	P-3032 (Sigma)	200000 UI
Estreptomicina	S-9137 (Sigma)	0,2 g
Yema de huevo		20%
pH		6,74
Osmolaridad		1368 mOsm

**c. Diluyente con 8% de Etilenglicol****Tabla 3.12** - Diluyente 8% etilenglicol

Componente	Laboratorio	Cantidad
Tris	141940 (Panreac)	6,05 g
Ácido cítrico	141018 (Panreac)	3,4 g
Fructosa	142728 (Panreac)	2,5 g
Etilenglicol	141316 (Panreac)	16 mL
Penicilina	P-3032 (Sigma)	200000 UI
Estreptomina	S-9137 (Sigma)	0,2 g
Yema de huevo		20%
pH		6,74
Osmolaridad		2807 mOsm

**d. Diluyente con 4% Etilenglicol y 4% de Glicerol****Tabla 3.13** - Diluyente 4% etilenglicol y 4% glicerol

Componente	Laboratorio	Cantidad
Tris	141940 (Panreac)	6,05 g
Ácido cítrico	141018 (Panreac)	3,4 g
Fructosa	142728 (Panreac)	2,5 g
Glicerol	141339 (Panreac)	8 mL
Etilenglicol	141316 (Panreac)	8 mL
Penicilina	P-3032 (Sigma)	200000 UI
Estreptomina	S-9137 (Sigma)	0,2 g
Yema de huevo		20%
pH		6,73
Osmolaridad		2993 mOsm

**e. Diluyente de congelación 5% Glicerol y 0,5% Equex®** ("Uppsala/Equex II")

(Linde-Forsberg, 2002)

**Tabla 3.14** - Diluyente "Uppsala/Equex II"

Componente	Laboratorio	Cantidad	
		A	B
Tris	141940 (Panreac)	3,025 g	3,025 g
Ácido cítrico	141018 (Panreac)	1,7 g	1,7 g
Fructosa	142728 (Panreac)	1,25 g	1,25 g
Glicerol	141339 (Panreac)	3 mL	7 mL
Equex®	Nova Chemical**	-	1 mL
Benzil-Penicilina	P-3032 (Sigma)	0,06* g	0,06* g
Estreptomina	S-9137 (Sigma)	0,1 g	0,1 g
Agua ultrapura		Hasta 77 mL	hasta 72 mL
Yema de huevo		20 mL	20 mL
pH		6,74	
Osmolaridad		988 mOsm	2905 mOsm

\*En 0,3 mL de agua miLi-Q \*\*Nova Chemical Sales Inc., Scituate, MA, USA

**f. Diluyente de congelación 5% Etilenglicol y 0,5% Equex®****Tabla 3.15 - Diluyente 5%Etilenglicol y 0,5%Equex**

Componente	Laboratorio	Cantidad	
		A	B
Tris	141940 (Panreac)	3,025 g	3,025 g
Ácido cítrico	141018 (Panreac)	1,7 g	1,7 g
Fructosa	142728 (Panreac)	1,25 g	1,25 g
Etilenglicol	141316 (Panreac)	3 mL	7 mL
Equex®	Nova Chemical	-	1 mL
Benzil-Penicilina	P-3032 (Sigma)	0,06* g	0,06* g
Estreptomicina	S-9137 (Sigma)	0,1 g	0,1 g
Agua ultrapura		Hasta 77 mL	hasta 72 mL
Yema de huevo		20 mL	20 mL
pH		6,74	
Osmolaridad		1058 mOsm	2961 mOsm

\*En 0,3 mL de agua mLi-Q

**g. Diluyentes Uppsala-Equex suplementados con aminoácidos****Diluyentes Uppsala-Equex-Taurina****Tabla 3.16 - Diluyente "Uppsala/Equex" suplementado con Taurina 25mM**

Componente	Laboratorio	Cantidad	
		A	B
Tris	141940 (Panreac)	3,025 g	3,025 g
Ácido cítrico	141018 (Panreac)	1,7 g	1,7 g
Fructosa	142728 (Panreac)	1,25 g	1,25 g
Glicerol	141339 (Panreac)	3 mL	7 mL
Equex®	Nova Chemical	-	1 mL
Taurina	T-9931 (Sigma)	12,5 mM	12,5 mM
Benzil-Penicilina	P-3032 (Sigma)	0,06* g	0,06* g
Estreptomicina	S-9137 (Sigma)	0,1 g	0,1 g
Agua ultrapura		hasta 77 mL	hasta 72 mL
Yema de huevo		20 mL	20 mL
pH		6,70	6,73
Osmolaridad		965 mOsm	2997 mOsm

\*En 0,3 mL de agua mLi-Q

Tabla 3.17 - Diluyente "Uppsala/Equex" suplementado con Taurina 50 mM

Componente	Laboratorio	Cantidad	
		A	B
Tris	141940 (Panreac)	3,025 g	3,025 g
Ácido cítrico	141018 (Panreac)	1,7 g	1,7 g
Fructosa	142728 (Panreac)	1,25 g	1,25 g
Glicerol	141339 (Panreac)	3 mL	7 mL
Equex®	Nova Chemical	-	1 mL
Taurina	T-9931 (Sigma)	25 mM	25 mM
Benzil-Penicilina	P-3032 (Sigma)	0,06* g	0,06* g
Estreptomicina	S-9137 (Sigma)	0,1 g	0,1 g
Agua ultrapura		hasta 77 mL	hasta 72 mL
Yema de huevo		20 mL	20 mL
pH		6,73	6,72
Osmolaridad		974 mOsm	2999 mOsm

\*En 0,3 mL de agua miLi-Q

Tabla 3.18 - Diluyente "Uppsala/Equex" suplementado con Taurina 75 mM

Componente	Laboratorio	Cantidad	
		A	B
Tris	141940 (Panreac)	3,025 g	3,025 g
Ácido cítrico	141018 (Panreac)	1,7 g	1,7 g
Fructosa	142728 (Panreac)	1,25 g	1,25 g
Glicerol	141339 (Panreac)	3 mL	7 mL
Equex®	Nova Chemical	-	1 mL
Taurina	T-9931 (Sigma)	32,5 mM	32,5 mM
Benzil-Penicilina	P-3032 (Sigma)	0,06* g	0,06* g
Estreptomicina	S-9137 (Sigma)	0,1 g	0,1 g
Agua ultrapura		Hasta 77 mL	hasta 72 mL
Yema de huevo		20 mL	20 mL
pH		6,72	
Osmolaridad		1009 mOsm	3004 mOsm

\*En 0,3 mL de agua miLi-Q

**Diluyentes Uppsala-Equex-Hipotaurina****Tabla 3.19** - Diluyente "Uppsala/Equex" suplementado con Hipotaurina 25mM

Componente	Laboratorio	Cantidad	
		A	B
Tris	141940 (Panreac)	3,025 g	3,025 g
Ácido cítrico	141018 (Panreac)	1,7 g	1,7 g
Fructosa	142728 (Panreac)	1,25 g	1,25 g
Glicerol	141339 (Panreac)	3 mL	7 mL
Equex®	Nova Chemical	-	1 mL
Hipotaurina	H-1384 (Sigma)	12,5 mM	12,5 mM
Benzil-Penicilina	P-3032 (Sigma)	0,06* g	0,06* g
Estreptomicina	S-9137 (Sigma)	0,1 g	0,1 g
Agua ultrapura		hasta 77 mL	hasta 72 mL
Yema de huevo		20 mL	20 mL
pH		6,72	
Osmolaridad		984 mOsm	2990 mOsm

\*En 0,3 mL de agua miLi-Q

**Tabla 3.20** - Diluyente "Uppsala/Equex" suplementado con Hipotaurina 50 mM

Componente	Laboratorio	Cantidad	
		A	B
Tris	141940 (Panreac)	3,025 g	3,025 g
Ácido cítrico	141018 (Panreac)	1,7 g	1,7 g
Fructosa	142728 (Panreac)	1,25 g	1,25 g
Glicerol	141339 (Panreac)	3 mL	7 mL
Equex®	Nova Chemical	-	1 mL
Hipotaurina	H-1384 (Sigma)	25 mM	25 mM
Benzil-Penicilina	P-3032 (Sigma)	0,06* g	0,06* g
Estreptomicina	S-9137 (Sigma)	0,1 g	0,1 g
Agua ultrapura		hasta 77 mL	hasta 72 mL
Yema de huevo		20 mL	20 mL
pH		6,72	6,73
Osmolaridad		998 mOsm	2990 mOsm

\*En 0,3 mL de agua miLi-Q

**Tabla 3.21** - Diluyente "Uppsala/Equex" suplementado con Hipotaurina 75 mM

Componente	Laboratorio	Cantidad	
		A	B
Tris	141940 (Panreac)	3,025 g	3,025 g
Ácido cítrico	141018 (Panreac)	1,7 g	1,7 g
Fructosa	142728 (Panreac)	1,25 g	1,25 g
Glicerol	141339 (Panreac)	3 mL	7 mL
Equex®	Nova Chemical	-	1 mL
Hipotaurina	H-1384 (Sigma)	32,5 mM	32,5 mM
Benzil-Penicilina	P-3032 (Sigma)	0,06* g	0,06* g
Estreptomicina	S-9137 (Sigma)	0,1 g	0,1 g
Agua ultrapura		hasta 77 mL	hasta 72 mL
Yema de huevo		20 mL	20 mL
pH		6,73	6,71
Osmolaridad		1022 mOsm	2991 mOsm

\*En 0,3 mL de agua mLi-Q

### 3.2.3.3. Medio de descongelación

Este medio que, básicamente es un tampón Tris-fructosa (Linde-Forsberg, 2002; Peña y *col.*, 2003b), fue utilizado para diluir las muestras tras la descongelación y como medio de incubación para la prueba de termorresistencia, realizado a 38°C en condiciones de oscuridad en tubos protegidos de la luz siendo para tal revestidos por papel de aluminio.

**Tabla 3.22** - Medio de descongelación

Componente	Laboratorio	Cantidad
Tris	141940 (Panreac)	3,025 g
Acido cítrico	141018 (Panreac)	1,7 g
Fructosa	142728 (Panreac)	1,25 g
Agua ultrapura		hasta 100 mL
Benzil-Penicilina	P-3032 (Sigma)	0,06 g
Estreptomicina	S-9137 (Sigma)	0,1 g
pH		6,74
Osmolaridad		378mOsm

### 3.2.3.4. Solución hipo-osmótica para evaluación de endósmosis

Esta solución (England y Plummer, 1993) se conserva en refrigeración a 4°C hasta su uso, dentro de 24h.

**Tabla 3.23 - Solución hipo-osmótica**

Componente	Laboratorio	Cantidad
Citrato sódico	131655 (Panreac)	1,02 g
Agua ultrapura		100 mL
pH		6,75
Osmolaridad		100 mOsm

### 3.2.3.5. Solución de formol-citrato

Esta solución se conserva a temperatura ambiente.

**Tabla 3.24 - Solución formol-citrato**

Componente	Laboratorio	Cantidad
Citrato sódico	131655 (Panreac)	3,4 g
Formol		0,5 mL
Agua ultrapura		100 mL

### 3.2.3.6. Medios y soluciones para la citometría de flujo

#### a. PBS

La solución salina fosfatada (PBS) es utilizada para diluir el semen tras la descongelación y como medio de incubación antes del marcaje del semen con los fluorocromos. También se utiliza para diluir los eyaculados tras la recolección, para el apropiado examen de la motilidad visual.

**Tabla 3.25** - Solución salina fosfatada

Componente	Laboratorio	Cantidad
PSB	P-3813 (Sigma)	1 sobre
Agua ultrapura		1000 mL
pH		6,8

### **b. Solución de PI para evaluación de la viabilidad**

La solución de PI se preparó a partir de la solución stock (1 mg/mL) diluida posteriormente hasta una concentración de trabajo de 0,1 mg/mL (Papaioannou y *col.*, 1997). Permite determinar el porcentaje de espermatozoide vivos y muertos mediante citometría de flujo y microscopia de fluorescencia.

**Tabla 3.26** - Composición solución de trabajo PI

Componente	Laboratorio	Cantidad
PI	P-4170 (Sigma)	0,1 mg
Agua ultra-pura		1 mL

Esta solución de trabajo se conserva por refrigeración y al abrigo de la luz.

### **c. Solución FITC-PSA o PNA para evaluación de la integridad del acrosoma**

La solución FITC-PSA o PNA (isotiocianato de fluoresceína conjugado con la lectina de *Pisum sativum*, PSA, o con la lectina de *Arachis hypogea*, PNA) permite la determinación de la reacción del acrosoma mediante citometría de flujo o microscopia de fluorescencia. La solución de trabajo se prepara diluyendo la solución stock (1mg/mL) para conseguir la concentración de trabajo de 0,1 mg/mL. Esta solución de trabajo se conserva en refrigeración y al abrigo de la luz.

**Tabla 3.27** - Composición solución de trabajo FITC-PSA/PNA

Componente	Laboratorio	Cantidad
Fitc-PSA	L-0770 (Sigma)	0,1 mg
Fitc-PNA	L-7381 (Sigma)	
PBS		1 mL

#### d. Solución Rodamina 123 para evaluación de la actividad mitocondrial

Esta solución permite valorar de la presencia de actividad mitocondrial de los espermatozoides, mediante la tinción del tracto intermedio, determinada por citometría de flujo o por microscopia de fluorescencia. Se prepara a partir de la solución *stock* (1 mg/mL), a fin de obtener la concentración (de trabajo) o solución final de 0,1 mg/mL (Papaioannou y *col.*, 1997), que se conserva por refrigeración y al abrigo de la luz.

**Tabla 3.28** - Composición solución de trabajo R123

Componente	Laboratorio	Cantidad
R123	R-8004 (Sigma)	0,1 mg
Agua ultra-pura		1 mL

#### 3.2.3.7. Solución para la prueba con clortetraciclina

La solución de clortetraciclina (CTC) (Guérin y *col.*, 1999), para determinación del estado de capacitación del espermatozoide ha sido preparada inmediatamente antes de cada experimento y mantenida protegida de la luz. La preparación de esta solución comprende la elaboración previa de un "buffer" al cual es añadida la clortetraciclina.

**Tabla 3.29** - Solución de CTC en agua ultrapura

	Componente	Laboratorio	Molaridad
<b>Buffer</b>	<b>Tris</b>	141940 (Panreac)	20 mM
	<b>Cl Na</b>	S-5886 (Sigma)	130 mM
	<b>DL-cisteina</b>	C-4022 (Sigma)	5 mM
<b>CTC</b>		C-4881 (Sigma)	750 $\mu$ M
<b>pH</b>			7,8

#### 3.2.3.8. Medio de capacitación canino 'Canine Capacitation Medium' (CCM)

Hemos utilizado el medio de capacitación descrito por Guérin y cols (1999), (CCM modificado), en cuya composición el Tris sustituye el  $\text{CO}_3\text{HNa}$  a fin de evitar los efectos dañinos que este ejerce en el espermatozoide del perro. Sin embargo, hemos mantenido la concentración de BSA de la formula del CCM "original" (Mahi y Yanagimachi, 1978),

dado que no se buscaba acelerar la capacitación del semen mediante el incremento en la concentración de este componente, al revés de lo que realizó Guérin y cols (1999).

**Tabla 3.30 - Medio CCM**

Componente	Laboratorio	Cantidad
Cloruro de sodio (NaCl)	S-5886 (Sigma)	83,49 mM
Cloruro de potasio (KCl)	P-8041 (Sigma)	4,78 mM
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	C-7902 (Sigma)	1,71 mM
Fosfato de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	P-6416 (Sigma)	1,19 mM
Tris (Hidroximetil) Aminometano	141940 (Panreac)	66 mM
D-Glucosa	G-8270 (Sigma)	2,78 mM
Ácido Pirúvico (sal sódico)	P-4562 (Sigma)	0,25 mM
Ácido Láctico (sal sódico)	71716 (Fluka)	21,55 mM
Albumina sérica bovina (BSA)	A-9418 (Sigma)	2 g/L
Penicilina G	P-3032 (Sigma)	100 UI/mL
Sulfato de estreptomicina	S-9137 (Sigma)	50µg/mL
pH		7,8
Osmolaridad		300 mOsm

### 3.2.3.9. Solución de eosina-azul de anilina o nigrosina para evaluación del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos y la morfología espermática

La tinción eosina-azul de anilina permite determinar el número de espermatozoides vivos y muertos en una extensión de semen así como su examen morfológico.

**Tabla 3.31 - Tinción eosina-azul de anilina/eosina-nigrosina**

Componente	Referencia	Cantidad
Eosina Y	E-6003 (Sigma)	0,4 g**
Azul de anilina	253708.1604 (Panreac)	5 mg*
o Nigrosina	50420 (Panreac)	5 mg*
Citrato de sodio	141655 (Panreac)	3 g*
pH		6,8

\* en 100 mL de agua ultra-pura \*\*en 50 mL de solución buffer de citrato de sodio

La solución de *buffer* citrato se prepara poniendo 3 g de citrato de sodio en 100 mL de agua ultra-pura, ajustando el pH a 6,8 con una solución de ácido cítrico al 4%. Mientras, el azul de anilina o la eosina se preparan poniendo 5 mg de azul de anilina/

eosina en 100 mL de agua ultra-pura. La eosina-azul de anilina/nigrosina se prepara disolviendo 0,4 g de eosina Y en 50 mL de solución buffer y se agregan 5 mL de solución de azul de anilina/nigrosina (Borg y col., 1997). Se han utilizado indistintamente las dos tinciones, dado que ambas son tradicionalmente utilizadas para el mismo cometido en todas las especies. La extensión se prepara atemperando previamente eosina-azul de anilina, portaobjetos y cubreobjetos a 38°C. La proporción eosina-azul de anilina/ semen es volumen/ volumen.

### 3.2.3.10. Solución de Ca<sup>2+</sup> ionóforo para inducción de la reacción acrosómica

Se ha empleado ionóforo de calcio A23187 a una solución inicial de 2 mM en dimetil-sulfóxido (DMSO) para preparar soluciones finales de 2,5 y 10 µM en medio CCM.

Tabla 3.32 - Solución de ionóforo de calcio

Componente	Laboratorio
Ionóforo cálcico A23187	C7522 (Sigma)
DMSO	D2650 (Sigma)

## 3.3. Métodos

### 3.3.1. Recolección del semen

Los eyaculados utilizados en este trabajo se obtuvieron mediante manipulación digital, según el método descrito por Seager (1972). En todos los experimentos realizados, las 3 fracciones del eyaculado se recogieron por separado, utilizándose exclusivamente la segunda fracción o fracción espermática.

### 3.3.2. Evaluación del semen

#### 3.3.2.1. Volumen

Tras la recogida, el volumen de la fracción espermática de cada eyaculado fue determinado de inmediato, midiendo el volumen en tubo calibrado.

### 3.3.2.2. Concentración

La concentración de cada pool fue determinada, para todos los experimentos, utilizando una cámara de recuento de Neubauer, tras la dilución del semen a 1:200 con formol citrato. El número total de espermatozoides se calculó multiplicando la concentración por el volumen de la segunda fracción (England y Allen, 1989).

### 3.3.2.3. Motilidad

#### 3.3.2.3.1. Estimación subjetiva

Inmediatamente tras la recogida una muestra de cada eyaculado es analizada visualmente *in situ* para la estimación subjetiva de la motilidad total y progresiva. Para ello, dicha muestra es diluida 1:6 v/v en PBS a 34°C colocándose una gota entre un porta y un cubre precalentados en pletina calentable a 38°C. Se determinó el porcentaje aproximado de espermatozoides mótiles y mótiles progresivos (movimiento rápido, rectilíneo y constante) visualizando al menos 5 campos y estimando subjetivamente la media. Este examen se realizó con microscopio óptico bajo 40 y 400 aumentos, respectivamente. Solamente se utilizaron eyaculados con una motilidad progresiva superior al 75%.

Para el análisis de la motilidad subjetiva de las alícuotas tras la refrigeración y la descongelación, las muestras han sido previamente suspendidas en PBS o en el medio de descongelación hasta obtener una concentración de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Se ha utilizado un microscopio de contraste de fases, provisto de una pletina calentable a 38°C, analizándose un total de 6 campos por cada muestra.

Las evaluaciones de la motilidad (porcentaje de espermatozoides mótiles y mótiles progresivos) fueron realizadas por la misma persona a lo largo del experimento.

### 3.3.2.3.2. Análisis computerizado de la motilidad (SCA)

Las muestras analizadas fueron previamente diluidas hasta  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL, del mismo modo que para la evaluación subjetiva de la motilidad. Se utilizaron 5  $\mu$ L de cada alícuota diluida, en porta caliente a 38°C cubierto con cubre de 22x22 mm. Siendo capturados 6-10 campos de cada muestra obtenidos a partir de 2 gotas distintas, de los cuales 5 han sido guardados para su posterior procesamiento.



Fotografía 3.1. Sistema informático para el análisis de motilidad, SCA versión 2002.

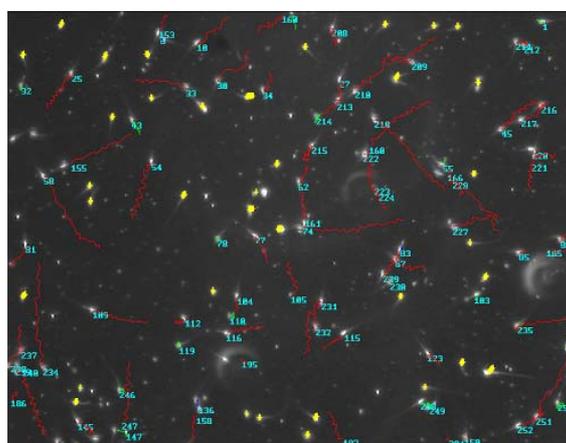
En cada análisis se han estudiado entre 150 y 200 espermatozoides en función de las siguientes características de motilidad, velocidad y angularidad:

- total mótiles (MT, %)
- mótiles progresivos (MP, %),
- velocidad curvilínea (VCL,  $\mu$ m/s)
- velocidad rectilínea (VSL,  $\mu$ m/s)
- velocidad promedio (VAP,  $\mu$ m/s)
- índice de linealidad (LIN, %)
- amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH,  $\mu$ m)

Tabla 3.33 - Valores utilizados en el análisis computerizado

Parámetro	Valor
Imágenes/seg.	25
Óptica	PH negativo
Área partículas (mínimo)	20
Progresivos (%STR)	80
Conectividad	12
Nº min para calcular ALH	10

La velocidad se ajustó en cada secuencia para que los espermatozoides sin movimiento se catalogaran como estáticos.



Fotografía 3.2. Imagen del sistema informático para el análisis de la motilidad. Los espermatozoides estáticos se marcan amarillos, mientras que los rápidos marcan en rojo.

#### **3.3.2.4. Morfología**

Las extensiones de semen se realizaron en portas, que se secaron al aire y se fijaron y tiñeron con Spermac<sup>®</sup> (Stain Enterprises, Republic of South Africa), para proceder al análisis de las características de morfología espermática y de la integridad del acrosoma (Oettlé, 1986b; 1993) con microscopio óptico y de contraste de fases ( $\times 1000$ ) bajo aceite de inmersión. La tinción con eosina-nigrosina o azul de anilina (Borg y col., 1997) fue también utilizada para determinar las anomalías morfológicas de los espermatozoides y además, para evaluar el porcentaje de células vivas y muertas.

La tinción con Spermac<sup>®</sup> se compone de 4 soluciones: un fijador, 2 colorantes y una solución metacromática que se emplea entre ambos colorantes; estando los tiempos de actuación sobre los frotis aconsejados por el fabricante. Para la tinción con eosina-nigrosina o azul de anilina, se preparan frotis mezclando sobre un portaobjetos 5  $\mu\text{L}$  de semen con igual volumen de colorante previamente atemperado a 38°C, durante 60 segundos, procediendo a continuación a realizar la extensión de la mezcla. Ambos colorantes se conservan en refrigeración a 4°C.

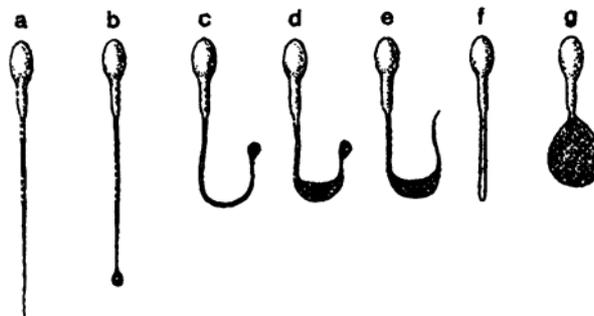
Las anomalías morfológicas individuales han sido clasificadas de acuerdo con su localización; cabeza, cuello, pieza intermedia (incluyendo las gotas citoplasmáticas proximales) o cola (Christiansen, 1984). Se contaron, para cada evaluación, un total de 200 espermatozoides por muestra, localizados en 2 portas.

#### **3.3.2.5. Evaluación de la integridad de la membrana plasmática, valoración del porcentaje de células vivas y muertas, integridad del acrosoma y actividad mitocondrial**

##### **3.3.2.5.1. Evaluación de la integridad de la membrana plasmática mediante el test de endósmosis**

Esta prueba se realizó incubando 100  $\mu\text{L}$  de semen en 900  $\mu\text{L}$  de solución hiposmótica, previamente calentada a 38°C, en baño de agua a la misma temperatura durante 45 minutos (Jeyendran y col., 1992; England y Plummer, 1993). Se analiza una alícuota de 5,5  $\mu\text{L}$  en microscopio de contraste de fases ( $\times 400$ ), contando un total de 200

espermatozoides. Son considerados positivos al test de endósmosis los espermatozoides que presentan las colas hinchadas o enrolladas (Jeyendran y col., 1984).



**Figura 3.1.** Representación de distintos tipos de hinchazón y enrollamiento de colas (b-g); sin hinchazón (a) según Yeyendran y col. (1984).

### 3.3.2.5.2. Evaluación de la vitalidad espermática mediante coloración con eosina-azul de anilina o con eosina-nigrosina

Una gota de 5 $\mu$ L del colorante, precalentado a 38°C, se coloca en el borde de un porta y dentro de ella se añade otra gota del mismo volumen del semen a analizar. Tras 1 minuto se procede a la extensión de la muestra sobre el porta. En aquellos casos en que las muestras han tenido que ser analizadas con posterioridad se ha preparado en otro porta una gota de igual volumen de paraformaldehído al 2% dentro de la cual se colocó otra gota de 5 $\mu$ L del semen teñido y tras 1 minuto se procede a la extensión con cubre. Se han evaluado 200 células en 2 portas, bajo microscopio óptico ( $\times 1000$  o  $\times 400$ ) y con aceite de inmersión.

Esta tinción se realiza para obtener el porcentaje de células vivas y muertas de cada muestra analizada, al tiempo que permite el recuento de las formas anormales. Si el espermatozoide se encuentra muerto, la membrana plasmática permite el paso de la eosina, la cabeza del espermatozoide aparece teñida de color rosa. Mientras, en las células vivas la cabeza es de color blanco, ya que su membrana no permite el paso de la eosina.



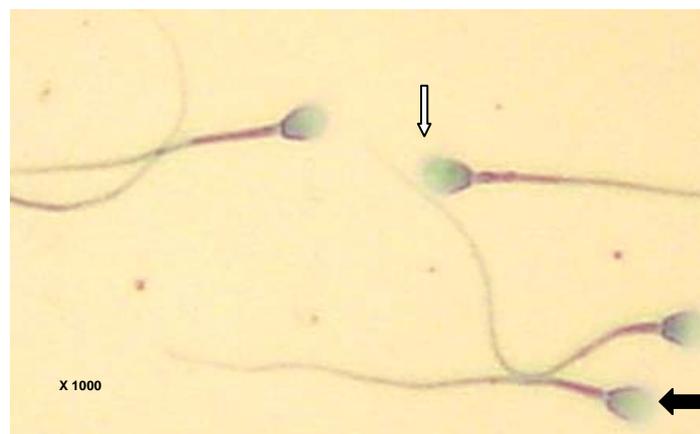
**Fotografía 3.3.** Tinción con eosina-nigrosina (espermatozoides muertos). También puede observarse la alteración y ausencia de acrosomas. X400.



**Fotografía 3.4.** Tinción con eosina-azul de anilina (las flechas indican los espermatozoides muertos cuya la cabeza se presenta teñida por eosina), la presencia de eritrocitos en el frotis impide la preservación de este semen. X400.

### 3.3.2.5.3. Evaluación de la integridad del acrosoma mediante coloración con Spermac<sup>®</sup>

Las muestras han sido fijadas y después teñidas con Spermac<sup>®</sup>; evaluando la integridad acrosomal, en microscopio de contraste de fases ( $\times 1000$ ) bajo aceite de inmersión. La integridad acrosomal, expresada por la proporción de espermatozoides con acrosoma intacto, se monitorizó en 2 portas de cada alícuota, habiendo sido evaluadas 200 células, utilizando la caracterización previamente descrita para el perro (Oettlé, 1986a).



**Fotografía 3.5.** Tinción con Spermac<sup>®</sup>: espermatozoides refrigerados, donde la presencia de acrosoma se diferencia por la tinción verde del mismo (la flecha blanca señala una célula con acrosoma en fase de reacción y la flecha negra, una célula con ausencia de acrosoma) y donde podemos observar una tinción postacrosomal rojiza.  $\times 1000$ .

#### 3.3.2.5.4. Evaluación de la calidad espermática mediante citometría de flujo

La utilización de marcadores fluorescentes asociada a la citometría de flujo permite el análisis objetivo de millares de células en un corto espacio de tiempo (Papaioannou y col., 1997). La preparación de la muestra para citometría de flujo depende del fluorocromo utilizado, como describimos adelante. Para cada diluyente y para cada fluorocromo utilizado han sido realizados sistemáticamente controles en blanco y con espermatozoides muertos. Las muestras han sido excitadas por un láser de Argón a una longitud de onda de 488 nm. Los espermatozoides contados por el citómetro, según presentaran fluorescencia o no por incorporación de PI, de Fitc-PSA o PNA y su combinación con PI, fueron analizados usando el software Cell Quest (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Las medidas fueron expresadas como porcentaje de células que emiten fluorescencia. En cada alícuota se evaluaron un mínimo de 20000 células.

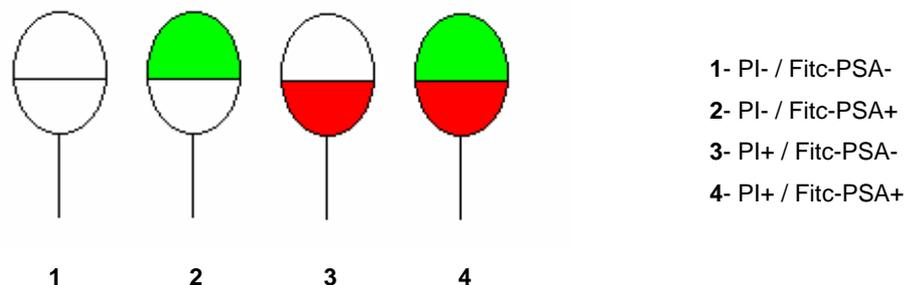
##### 3.3.2.5.4.1. Evaluación simultánea de la viabilidad e integridad del acrosoma con PI/Fitc-PSA o PI/Fitc-PNA

La evaluación simultánea de estos parámetros de la funcionalidad espermática ha sido realizada mediante la coloración PI/Fitc-PSA o PI/Fitc-PNA. Las muestras han sido procesadas basándonos en la técnica de Peña y col. (1999b), Gómez-Cuétara (2000) y Serres (2004). Para ello, se ha tomado una alícuota de 400  $\mu$ L de semen descongelado y filtrado a través de un filtro de 34  $\mu$ L y rediluido en PBS, al cual se añaden 3  $\mu$ L de PI (0,1mg/mL). Se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente, tras los cuales se añaden 5  $\mu$ L de Fitc-PSA o Fitc-PNA (0,1 mg/mL). A continuación la muestra es filtrada en filtro de 34  $\mu$ L y analizada por citometría de flujo. El análisis se repitió en todas las muestras tras 1h 30 min de incubación a 38°C, protegiendo el semen descongelado de la luz.

La asociación PI/Fitc-PSA o de PI/Fitc-PNA permite la detección de 4 subpoblaciones (Fig. 3.2) celulares en espermatozoides no-permeabilizados bajo citometría de flujo (Peña y col., 1999b):

1. **PI-PSA-**: espermatozoide vivo, acrosoma intacto;
2. **PI-PSA+**: espermatozoide vivo, acrosoma dañado o reaccionado (reacción acrosómica “verdadera” inicial o avanzada);
3. **PI+PSA-**: espermatozoide muerto, acrosoma intacto;

4. **PI+PSA+**: espermatozoide muerto, acrosoma dañado o reaccionado (reacción acrosómica “falsa” o por degeneración celular).



**Figura 3.2.** Representación de los patrones observados en citometría de flujo de la tinción del espermatozoide con PI / Fitc-PSA. Estos mismos patrones pueden ser aplicados para la tinción PI/Fitc-PNA, en función de la presencia o no de PI y/o lectina-Fitc.

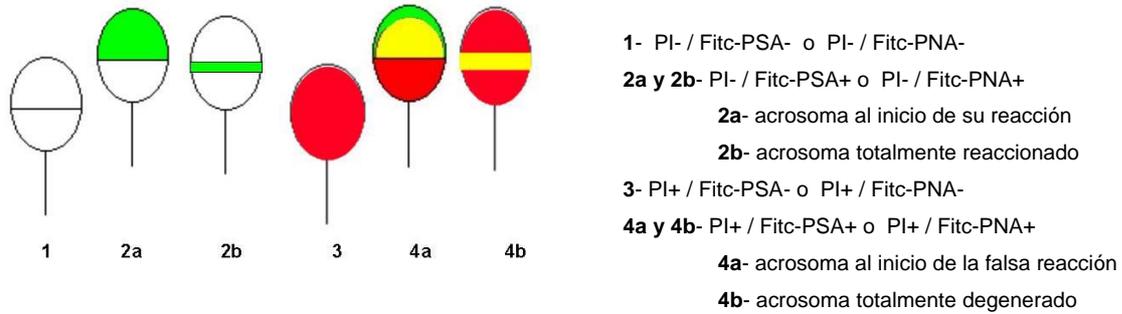
En el experimento 2 y 4 del estudio, para ratificar la presencia de las poblaciones observadas mediante la citometría, se toma simultáneamente una alícuota de 5 $\mu$ L de algunas de las muestras teñidas para observar bajo microscopio de fluorescencia. Dicha muestra se coloca sobre un porta y se cubre con una gota similar de medio de *montaje* y *anti-fading* Vectashield<sup>®</sup>, se tapa con un cubre de 18x18, se comprime para extender la gota y eliminar el exceso y se sella alrededor con laca transparente de uñas; observándose la presencia de células teñidas por uno o los dos fluorocromos, a continuación. Se ha tenido en cuenta que sin usar un contraste fluorescente no es posible distinguir fácilmente las células vivas con acrosoma intacto mediante microscopía de fluorescencia, motivo por el cual no se realizaron recuentos. Se ha trabajado a 400 aumentos bajo aceite de inmersión.



**Fotografía 3.6.** Espermatozoides muertos con acrosoma dañado (PI+ PSA+). (Tomado de Peña y col., 2001).

La microscopía de fluorescencia permite observar un mayor número de patrones (Fig. 3.3), y dado que ambas lectinas se caracterizan por la pérdida gradual de la fluorescencia según se va produciendo la reacción acrosómica, cuando ésta es completa

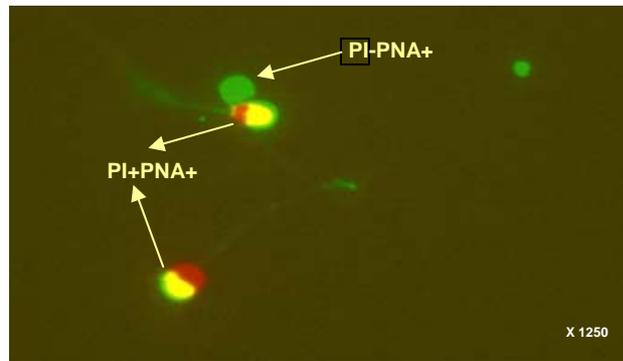
únicamente es posible observar una pequeña zona fluorescente en el área ecuatorial (Cross y col., 1986; Köhn y col., 1997; Patrat y col., 2000).



**Figura 3.3.** Representación de los patrones de tinción observados bajo microscopio de fluorescencia de la tinción del espermatozoide con PI/ Fitc-PSA o PI/Fitc-PNA.



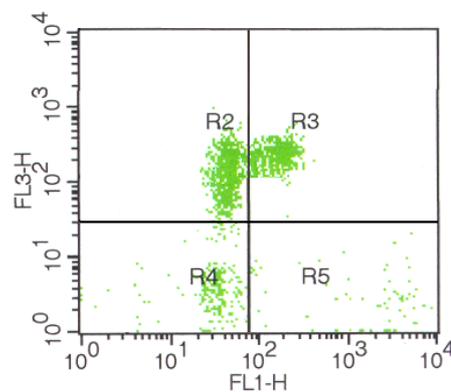
**Fotografía 3.7.** Microscopía de fluorescencia (PI-PNA). Espermatozoide vivo en fase de reacción acrosómica con cierta pérdida del material acrosomal (izq., PI-PNA+) y muerto con acrosoma intacto (dcha., PI+PNA-).



**Fotografía 3.8.** Microscopía de fluorescencia (PI-PNA). Espermatozoides muertos con reacción acrosómica falsa (PI+PNA+) y espermatozoide vivo con acrosoma al inicio de la reacción acrosómica verdadera (PI-PNA+).



**Fotografía 3.9** Microscopía de fluorescencia (PI-PNA). Espermatozoide muerto con reacción acrosómica completa (PI+PNA+): obsérvese una única banda fluorescente de color amarillo en la línea ecuatorial.



**Fotografía 3.10.** Dot-plot de la tinción PI/Fitc-PSA. Los cuadrantes representan: **R2=** PI+PSA- , **R3=** PI+PSA+ , **R4=** PI-PSA- , **R5=** PI-PSA+.

### 3.3.2.5.4.2. Evaluación simultánea de la viabilidad y actividad mitocondrial con Rodamina 123-PI

Las muestras han sido procesadas principalmente según la técnica de Graham y *col.*, (1990) y de Papaioannou y *col.* (1997), en la cual hemos introducido algunas alteraciones. Para ello, se ha tomado una alícuota de 400  $\mu\text{L}$  de semen descongelado diluido y filtrado a través de un filtro de 34  $\mu\text{m}$  a la cual se añaden 3  $\mu\text{L}$  de R123 (0,1 mg/mL). Se incuba durante 25 minutos a 38°C y finalmente, las alícuotas son centrifugadas a 400 g durante 5 minutos siendo el *pellet* reconstituido a los 400  $\mu\text{L}$  con PBS. Se añaden 3  $\mu\text{L}$  de PI (0,1mg/mL) y tras un periodo de incubación de 5 minutos la muestra es filtrada en filtro de 34  $\mu\text{L}$  y analizada mediante citometría de flujo.

De igual modo que con los marcadores PI-PSA o PI-PNA, también con la R123 se repitieron los análisis por citometría, en todas las muestras, tras 1h 30 min de incubación a 38°C, como se detalló previamente en cada experimento.

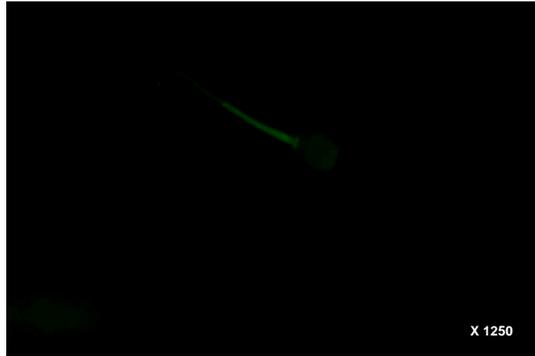
En el experimento 3 del estudio, se realiza la comparación de los resultados obtenidos por citometría y por microscopía de fluorescencia de cada una de las alícuotas mezcladas al 50% de muestra viva y muerta. Se emplean una longitud de onda de 488nm, 400 aumentos y aceite de inmersión. La lectura bajo microscopía de fluorescencia se realiza inmediatamente a su lectura en el citómetro y a partir del sobrante de la misma, se toma una muestra para su recuento bajo microscopía de fluorescencia. Así, se coloca una alícuota de 5 $\mu\text{L}$  en un porta y se cubre con una gota similar de Vectashiel<sup>®</sup>, se tapa con un cubre de 18x18, se comprime para extender la gota y eliminar el exceso y se sella alrededor con laca transparente de uñas, finalmente se hace recuento del porcentaje de células teñidas o no por PI y/o Rodamina. Se cuentan 100 células en dos portas, por muestra.

El uso combinado de PI y R123 permite la detección de las siguientes poblaciones (Papaioannou y *col.*, 1997):

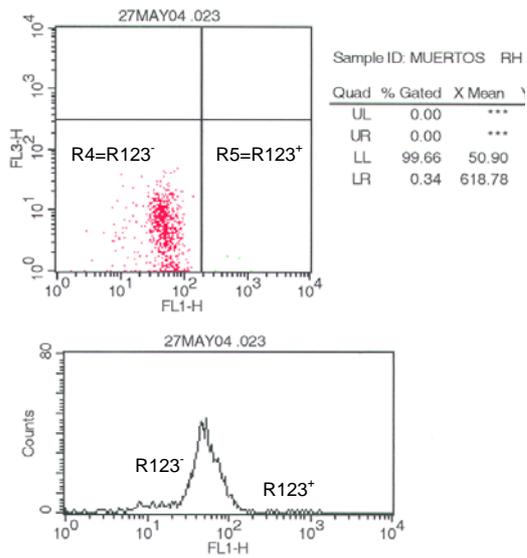
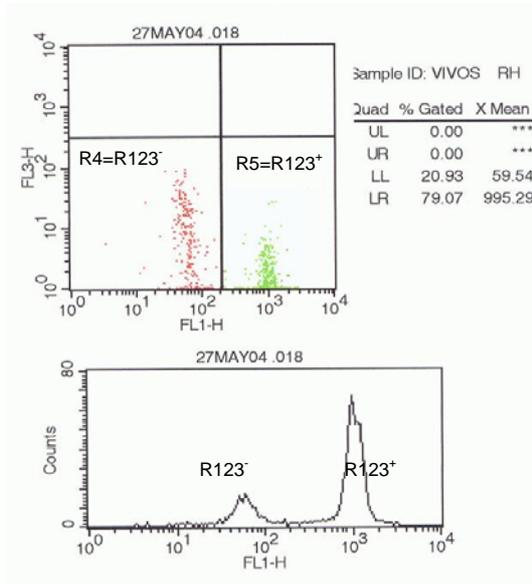
- 1) **R123<sup>-</sup>PI<sup>+</sup>**: células muertas;
- 2) **R123<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>**: células vivas con actividad mitocondrial elevada
- 3) **R123<sup>-</sup>PI<sup>-</sup>**: células vivas con actividad mitocondrial mínima
- 4) **R123<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>**: células muertas con actividad mitocondrial (células moribundas)



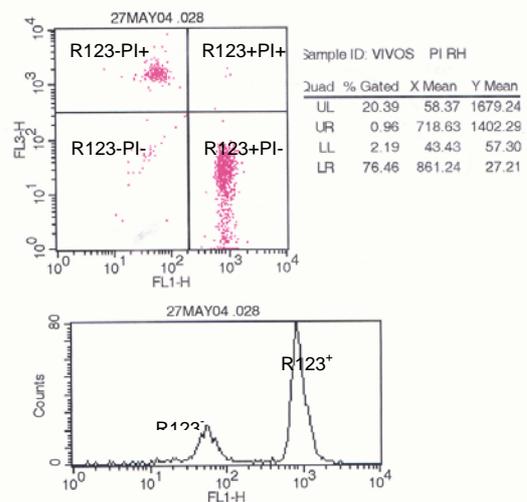
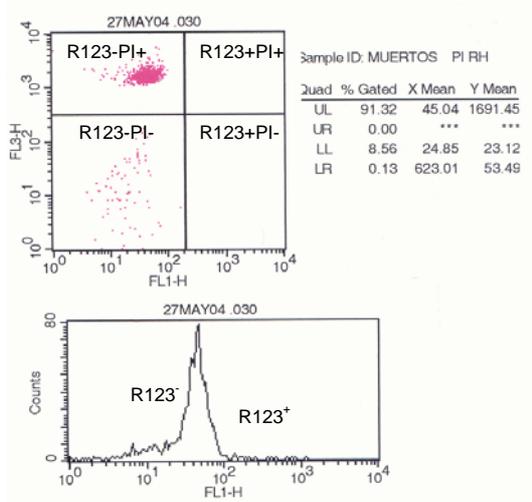
Fotografía 3.11. Espermatozoide muerto marcado con R123-PI.



Fotografía 3.12. Espermatozoide vivo marcado con R123. Fluorescencia óptima de la pieza intermedia.



Fotografía 3.13. Dot-plot e histograma correspondientes a una tinción con Rodamina. Izda: alícuota 100% muestra viva, el 79% de las células presentan alta intensidad de rodamina (LR o R5). Dcha: alícuota 100% muestra muerta, únicamente un 0,34% de células que tiñen con una alta intensidad de rodamina (LR o R5).



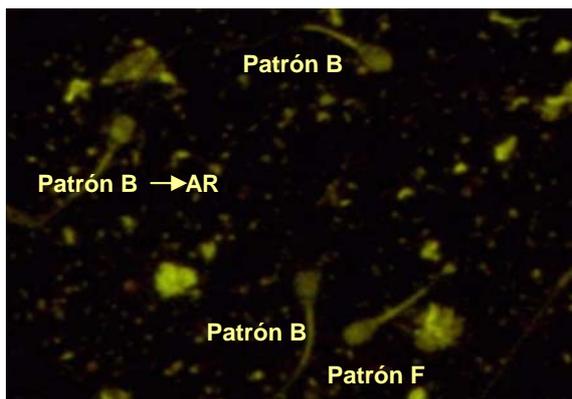
Fotografía 3.14. Dot-plot e histograma correspondientes a una tinción con Rodamina-PI. Izda: alícuota 100% muestra muerta, donde se observa únicamente un 0,13% de células vivas que tiñen con una alta intensidad de rodamina (LR o R5). Dcha: alícuota 100% muestra viva, donde el 76,46% de las células vivas presentan alta intensidad de rodamina sin estar teñidas por PI, lo que indica que son células viables con una alta actividad mitocondrial (LR o R5); mientras que el histograma en FL1 solo presenta el porcentaje de células que no tienen (pico izdo) o si tienen (pico dcho) alta intensidad de tinción por rodamina.

### 3.3.2.6. Pruebas funcionales

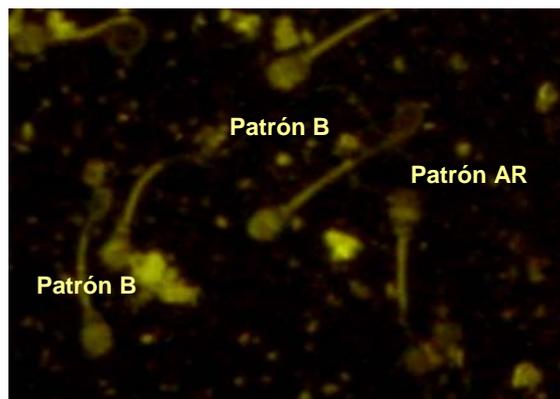
#### 3.3.2.6.1. Valoración del estado de capacitación mediante marcaje con clortetraciclina

Este examen ha sido realizado de acuerdo con el protocolo de Guérin y col. (1999) para el espermatozoide de perro. En resumen, las suspensiones de semen han sido centrifugadas a 300g durante 5 min, siendo una alícuota de 5  $\mu$ L mezclada con 5  $\mu$ L de solución CTC en un porta limpio. Tras 30 segundos fue adicionada 0,2  $\mu$ L de solución de paraformaldehído, en solución tampón Tris (pH 7.4) y después 5  $\mu$ L de solución de glicerol en PBS 9:1 (v/v), para atenuar el *fading* de la fluorescencia. El porta ha sido cubierto con un cubre comprimiendo la muestra para eliminar el exceso de fluido. El cubre fue sellado con barniz de uñas transparente, y el porta envuelto en papel de aluminio y conservado a 4°C, aproximadamente 24 horas, hasta la observación microscópica. El patrón de capacitación ha sido examinado en un microscopio de fluorescencia Olympus BH2 que trabaja a 530 nm de longitud de onda a 400X de ampliación. Han sido contadas un total de 100 células en 2 portas y por muestra. Los espermatozoides han sido incluidos en una de las siguientes categorías (Guérin y col., 1999):

- Patrón **F** (fluorescencia brillante y uniforme por la cabeza del espermatozoide, representativa del estado de no-capacitación y acrosoma intacto),
- Patrón **B** (fluorescencia tenue en la región post-acrosómica y brillante en la región acrosomal, representativo del estado de capacitación pero sin reacción acrosómica),
- Patrón **AR** (fluorescencia tenue en toda la cabeza, excepto en el segmento ecuatorial, en el que existe una banda fluorescente brillante, indicativo de capacitación y de reacción acrosómica).



**Fotografía 3.15.** Espermatozoide preservado de perro- patrones de coloración con CTC.



**Fotografía 3.16.** Espermatozoide preservado de perro- patrones de coloración con CTC.

### 3.3.2.6.2. Inducción de la reacción acrosómica mediante el uso de Ionóforo de calcio A23187

Este experimento se ha realizado basándonos en los protocolos de Guérin y cols. (1999), Januskauskas y cols. (2000) y Gómez-Cuétara Aguilar (2000).

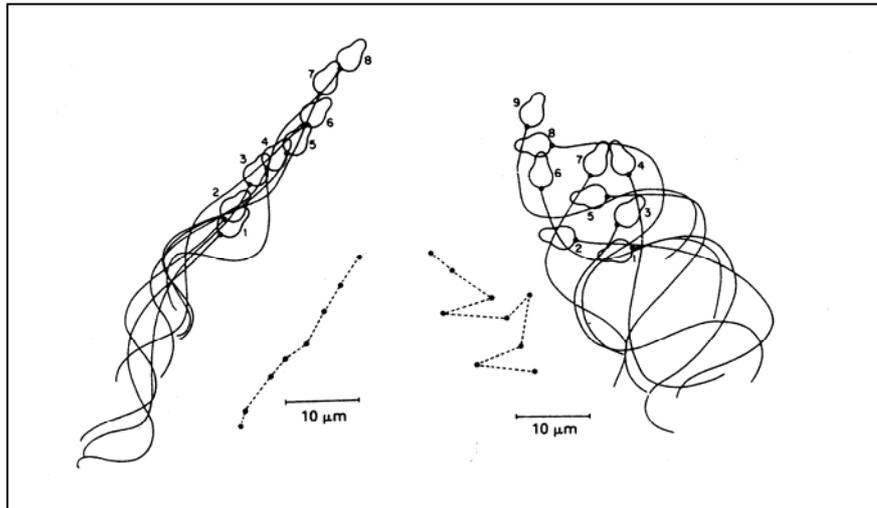
Una pajuela con 0,4 mL de semen congelado en cada medio fue previamente descongelada a 70°C durante 8 sg y filtrada en filtro de 34  $\mu\text{m}$ . Tras colocarlo rápidamente en un tubo con 600 $\mu\text{L}$  de CCM que está en baño María a 38°C, lo que supone una dilución aproximada de 10 millones de espermatozoides/mL, se valora inmediatamente su motilidad (MT0). A continuación, se protege de la luz y se deja incubar 20 min.

Este periodo fue seleccionado basándonos en el tiempo empleado por Gómez-Cuétara Aguilar (2000) como periodo de capacitación para semen descongelado de caballo y tras ensayos previos en los que observamos un inicio de cambio en el patrón de motilidad de los espermatozoides que comenzaban a mostrar mayor amplitud de movimiento (apreciación visual), aunque no alcanzaron el patrón característico (Figura 3.4). En estos ensayos previos también pudimos observar que concentraciones de ionóforo de 0,1 y 1 $\mu\text{M}$  se mostraron insuficientes para inducir la reacción acrosómica, mientras que concentraciones de 2,5 y 10 $\mu\text{M}$  resultaron eficaces, para este tiempo de incubación de los espermatozoides en CCM.

Tras los 20 min de incubación se toma otra medición de la motilidad (MT20). En el baño María, se tienen otros tubos conteniendo alícuotas de la solución de trabajo de

ionóforo de calcio de 0, 1,2 y 5 $\mu$ L. Inmediatamente a la medición MT20, se añadirán 240, 240 y 242 $\mu$ L del semen incubado en CCM, para llegar a las soluciones finales de ionóforo de 0, 2,5 y 10 $\mu$ M, respectivamente.

Transcurridos 5, 15 y 30 minutos se toman muestras de 40 $\mu$ L de semen tratado y se llevan a tubos con 360 $\mu$ L PBS en baño María a 38 $^{\circ}$ C, para teñir sistemáticamente con PI/Fitc-PNA y algunas muestras también con PI/Fitc-PSA; como se describe en epígrafes anteriores, que serán analizadas mediante citometría de flujo. Además, de algunas de las muestras e inmediatamente a la lectura por el citómetro de flujo, se toman 5 $\mu$ L del sobrante y se montan para ser observadas en microscopia de fluorescencia bajo Vectashiel<sup>®</sup>, en el acto y poder confirmar los patrones esperados de tinción, pero sin hacer recuentos.



**Figura 3.4.** Patrón de movimiento espermático característico de hiperactivación (dcha) en el espermatozoide humano, caracterizado por una mayor amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza y por una trayectoria menos lineal así como por una mayor curvatura del flagelo (Adaptado de Morales y *col.*, 1988).

### 3.3.3. Procesado del semen

#### 3.3.3.1. Dilución del semen

Tras la recolección de los eyaculados y la formación de los pools estos han sido diluidos *in situ* y a la temperatura ambiente en las alícuotas de igual volumen. El transporte del semen hasta el laboratorio se realizó en 15 minutos. Durante el transporte, así como en la recogida del semen, los choques térmicos han sido evitados.

### 3.3.3.2. Refrigeración del semen

Se prepara una dilución final que suele ser de 1:5 v/v (semen:diluyente). Tras aproximadamente 20 minutos de equilibrio a la temperatura ambiente, las muestras pasan a cámara frigorífica a 4°C, donde permanecerán hasta el final de cada experimento.

### 3.3.3.3. Congelación del semen

Tras diluir el semen a 50 millones de espermatozoides por mL en el experimento 2 y 80 millones por mL en el experimento 4, se procede al protocolo de congelación. Cuando se emplea el diluyente **Noruego** como base, la técnica de congelación consiste en la refrigeración gradual del semen diluido en la nevera durante 2 horas, hasta alcanzar una temperatura de 4°C. Tras este periodo, el semen es empaquetado en pajuelas de 0,5 mL y congeladas en vapores de nitrógeno líquido, colocándolas en posición horizontal sobre una raqueta de congelación a 4 cm de distancia de la superficie del nitrógeno líquido durante 10 minutos, y a la continuación son transferidas al contenedor de nitrógeno líquido donde se almacenan hasta su descongelación.

Sin embargo, la congelación con diluyentes que contienen **Equex-STM Paste®** comprende 2 etapas (Linde-Forsberg, 2002). En la primera etapa, la fracción espermática es diluida a temperatura ambiente en la fracción A (ver ítem 3.2.3.2, diluyentes de congelación), es decir, la fracción sin Equex. A continuación, el semen diluido es refrigerado durante 1h y 50 min a 4°C. El mismo volumen de la fracción B es igualmente refrigerado a 4°C debiendo ser adicionado, al semen diluido, al final del periodo de refrigeración (en la segunda etapa), inmediatamente antes de rellenar las pajuelas. De igual modo, se procede a la congelación en vapores de nitrógeno durante 10 minutos, tras los cuales las pajuelas son almacenadas en tanques de nitrógeno líquido a -196°C.

### 3.3.3.4. Descongelación del semen

Las pajuelas se descongelaron sistemáticamente a 70°C durante 8 seg (Linde-Forsberg, 2002)

### **3.4. Análisis estadístico**

El proceso estadístico de los datos obtenidos en este estudio ha sido realizado mediante el programa **SPSS** versión **11.0** (Álvarez-Santos, 2001).



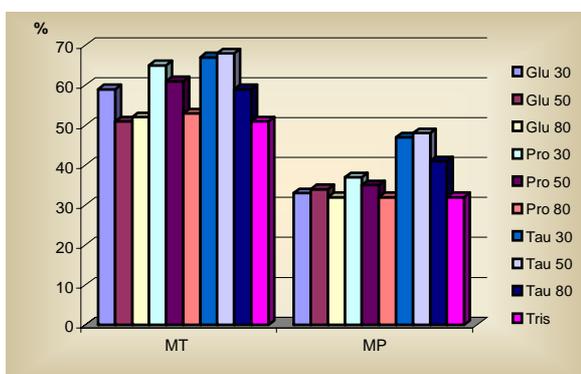
## **4. RESULTADOS**



#### 4.1. Experimento 1. Efectos de la adición de aminoácidos en las características del semen refrigerado en el diluyente Tris-fructosa-ácido cítrico

4.1.1. Experimento 1.1. Estudio preliminar: efectos en la motilidad de la suplementación en glutamina, prolina y taurina (Martins y col., 2002). Los eyaculados examinados visualmente, *in situ*, presentaban una motilidad progresiva entre 75 y 90%, las formas anormales oscilaron entre el 7 y el 20 % y la concentración entre 650 y 1200×10<sup>6</sup> espermatozoides por eyaculado. Los resultados medios de la motilidad total (MT) y motilidad progresiva (MP) observados de modo visual tras la refrigeración a las 24, 48, 72, 96 y 168 horas (7 días) se presentan en la tabla 4.1.

Gráfica 4.1 - Motilidad total y progresiva tras 7 días en refrigeración a 4°C



Basados en los resultados obtenidos tras 7 días en refrigeración, se deduce que los mejores valores de MT ( $p=0.031$ ) y MP ( $p=0.04$ ) se obtienen para Tau 30 y 50 por lo que se decidió continuar el estudio con taurina a 30 y 50 mM, manteniendo el grupo control.

Tabla 4.1 - Motilidad total y progresiva (Media (%) ± Desv. Típica (n=3))

		24h	48h	72h	96h	68h
Glu 30	MT	92,61±5,89	89,87±9,34	86,57±8,60	74,57±10,99	59,86±4,38 <sup>abc</sup>
	MP	65,07±17,57	56,70±10,54	48,98±6,62	46,01±6,31	33,13±3,76 <sup>a</sup>
Glu 50	MT	85,50±7,47	82,67±5,69	76,37±10,42	69,60±14,17	51,33±9,54 <sup>a</sup>
	MP	66,33±5,51	55,70±7,30	44,17±16,63	43,47±15,37	34,02±9,32 <sup>a</sup>
Glu 80	MT	89,07±10,13	86,80±10,27	82,30±8,68	72,33±10,79	52,6±4,86 <sup>a</sup>
	MP	73,77±15,31	61,07±12,44	51,77±15,31	41,67±8,13	32,37±9,51 <sup>a</sup>
Pro 30	MT	92,61±6,64	88,33±7,67	85,95±2,23	83,57±0,93	65,33±4,02 <sup>bc</sup>
	MP	68,85±3,93	63,00±9,35	57,46±5,18	46,52±9,21	37,9±6,60 <sup>ab</sup>
Pro 50	MT	90,20±5,20	88,23±3,40	82,83±4,37	79,12±12,00	61,10±10,26 <sup>abc</sup>
	MP	65,47±18,26	50,83±10,13	46,07±11,92	47,54±10,77	37,90±6,7 <sup>ab</sup>
Pro 80	MT	91,40±3,55	88,60±4,92	83,68±5,21	81,77±9,00	53,90±8,88 <sup>ab</sup>
	MP	65,87±1,50	51,52±2,23	48,20±4,06	42,64±3,13	32,30±2,50 <sup>a</sup>
Tau 30	MT	88,94±3,94	86,17±4,67	82,33±2,52	80,40±4,68	67,70±8,01 <sup>c</sup>
	MP	67,59±8,85	61,60±10,94	59,30±7,73	55,78±5,87	47,73±8,03 <sup>d</sup>
Tau 50	MT	90,80±1,30	86,30±3,39	83,37±6,07	78,32±4,96	68,90±3,54 <sup>c</sup>
	MP	72,47±3,07	68,68±5,88	62,10±4,03	57,61±3,98	48,38±4,54 <sup>d</sup>
Tau 80	MT	84,85±8,13	79,94±5,91	79,02±8,04	73,85±11,15	59,93±8,66 <sup>abc</sup>
	MP	76,22±9,74	68,99±5,60	56,58±7,56	49,14±6,15	41,25±8,83 <sup>ab</sup>
Tris (control)	MT	92,07±3,50	84,93±8,63	80,68±2,39	67,51±4,52	51,33±5,13 <sup>a</sup>
	MP	59,97±9,59	49,92±13,98	35,76±17,65	27,89±10,61	32,00±2,00 <sup>a</sup>



#### **4.1.2. Experimento 1.2. Efectos de la suplementación con taurina en las características de motilidad, integridad de la membrana y del acrosoma del espermatozoide refrigerado con distintas proporciones de yema**

En este experimento hemos valorado las características del semen refrigerado en el diluyente Tris-fructosa-ácido cítrico tras la adición del aminoácido taurina, realizándose 5 réplicas. Se pretende también establecer si el diluyente con menor concentración de yema y de Taurina puede tener un comportamiento similar al control, Tris 20, durante un periodo de tiempo suficiente. La influencia de la taurina y del porcentaje de yema en los diferentes parámetros de calidad espermática evaluados diariamente o a cada dos días en el semen diluido y refrigerado, se encuentran analizados comparando los resultados de los distintos diluyentes mediante el análisis de varianza factorial y la prueba post hoc (test de Duncan). Se analizó además la influencia de la taurina y de la concentración de yema por separado -independientemente del diluyente- por los mismos tests estadísticos.

A lo largo del trabajo, el número de muestras de los diluyentes ha sufrido una disminución gradual, principalmente a partir del día 8 ya que cuando la motilidad visual de una muestra se acercaba al 0% de motilidad, dejaba de ser analizada; del mismo modo se dejaban de realizar para dicha muestra el test de endósmosis y el estudio de los acrosomas. Así, estos datos “perdidos” han sido considerados estadísticamente como tales, habiendo una reducción en el número del  $n$ . Por ese motivo, a partir de un determinado día del experimento, el día 8 para los datos visuales, test de endósmosis y integridad acrosomal, y el día 6 para los computerizados las pruebas post hoc dejaron de realizarse para los distintos diluyentes. Las medias están presentadas hasta que alguno de los diluyentes utilizado tuvo un  $n=2$ , o hasta un máximo de 12 días, cuando dejaron de realizarse los análisis computerizados, el test de endósmosis y el estudio de los acrosomas. En la comparación según la concentración de yema o la concentración de taurina, el número de datos permitió la realización de las pruebas post hoc hasta el mismo día 12, ya que los medios se agrupaban de 3 en 3 en función de la concentración. Las gráficas representan datos con  $n \geq 2$ . A partir de éste momento, se continuó observando diariamente la motilidad visual para poder establecer la duración máxima en días del semen diluido con cada diluyente, hasta que dicha motilidad se acercaba a 0. Se consideran las diferencias como estadísticamente significativas siempre que  $p < 0,05$ .

#### 4.1.2.1. Características del semen fresco

En este experimento hemos utilizado 10 eyaculados de semen de perro para constituir 5 pools. Las características de los pools en fresco se encuentran resumidas en la tabla 4.2, donde se presentan los valores de las medias y sus desviaciones. La motilidad ha sido estimada por examen visual.

**Tabla 4.2** - Características de los pools frescos

Parámetro	Media
<b>Motilidad (%)</b>	86,00±4,18
<b>Motilidad Progresiva (%)</b>	76,00±4,18
<b>Concentración (<math>\times 10^6</math>/mL)</b>	538,40±155,66
<b>Teste endosmósis positivo (%)</b>	95,63±1,38
<b>Morfología</b>	
Espermatozoides normales (%)	93,20±2,36
<b>Anomalías morfológicas</b>	
Cabeza (%)	0,50±0,50
Cuello (%)	4,30±1,10
Pieza intermedia (%)	0,40±0,42
Cola (%)	1,60±1,47
<b>Acrosomas</b>	
Acrosomas normales (%)	81,70±4,24
Acrosomas alterados (%)	17,20±3,65
Sin acrosoma (%)	1,00±0,61

Media  $\pm$  desviación típica (n=5)

El nombre de los diluyentes sera abreviado para facilitar las tablas y gráficas (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3** - Diluyentes evaluados en el experimento 1.2.

Diluyentes de refrigeración	Abreviatura
Tris-fructosa-ácido cítrico-5% yema	<b>TRIS 5</b>
Tris-fructosa-ácido cítrico-10% yema	<b>TRIS 10</b>
Tris-fructosa-ácido cítrico-20% yema (Control)	<b>TRIS 20</b>
Tris-fructosa-ácido cítrico-aurina 30mM-5% yema	<b>TAU 30 5</b>
Tris-fructosa-ácido cítrico-aurina 30mM-10% yema	<b>TAU 30 10</b>
Tris-fructosa-ácido cítrico-aurina 30mM-20% yema	<b>TAU 30 20</b>
Tris-fructosa-ácido cítrico-aurina 50mM-5% yema	<b>TAU 50 5</b>
Tris-fructosa-ácido cítrico-aurina 50mM-10% yema	<b>TAU 50 10</b>
Tris-fructosa-ácido cítrico-aurina 50mM-20% yema	<b>TAU 50 20</b>

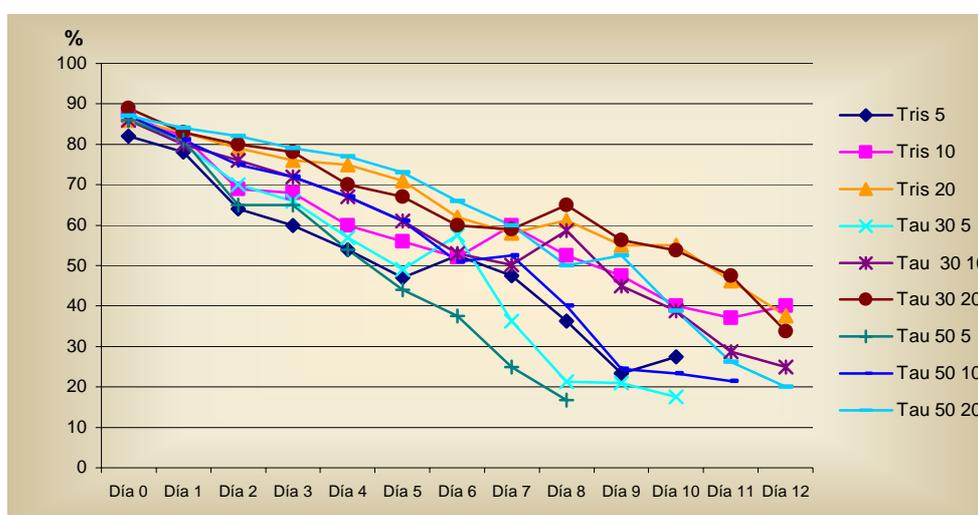
#### 4.1.2.2. Características del semen preservado por refrigeración- Comparación de los distintos diluyentes utilizados, con diferentes concentraciones de aminoácido y de yema de huevo

##### 4.1.2.2.1. Efectos de los aminoácidos y de la yema de huevo en la motilidad

#### Estimación subjetiva de la motilidad espermática

##### a. Motilidad total visual (MTV)

Gráfica 4.2 - Motilidad total visual



Para este parámetro ha sido posible observar algunas diferencias significativas (Tabla 4.4). En el **día 2** se observan diferencias significativas ( $p=0,024$ ), obteniéndose los peores resultados con los medios Tris 5 y Tau 50 5 que presentan claras diferencias con el diluyente control; la comparación de concentraciones de yema permitió observar mejores resultados cuando la concentración de yema era del 20% (20% vs 10% vs 5%,  $p<0,001$ ). El **día 3** presenta los peores resultados para el diluyente Tris 5 ( $p=0,027$ ) con diferencia claramente significativa frente al medio control y frente a los demás diluyentes con 20% de yema (20% vs 10% vs 5%,  $p<0,001$ ). Entre los **días 4 a 7**, no existen diferencias significativas entre los distintos diluyentes, pero sí entre la concentración de yema los días 4, 5 y 7 ( $p=0,003$ ;  $0,002$  y  $0,016$ ) mostrándose similitud entre los medios con 10 y 20% vs 5% de yema. El **día 8** se observan de nuevo diferencias significativas entre los distintos diluyentes ( $p=0,035$ ) donde los peores resultados los muestra el diluyente Tau 50 5 y los mejores Tris 20, Tau 30 10 y Tau 30 20; a partir de este momento se observan diferencias significativas entre Tris 20 y Tau 30 5. También se observan diferencias estadísticamente significativas entre las distintas concentraciones

Tabla 4.4 - Motilidad total visual

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12
Tris 5	82,00± 8,37	78,00± 4,47	64,00± 11,4 <sup>a</sup>	60,00± 15,80 <sup>a</sup>	54,00± 18,51	47,00± 21,10	52,50± 9,60	47,50±12,60	36,20± 24,20 <sup>abc</sup>	23,30± 23,60	27,50±31,80 (n=2)	30,00	
Tris 10	87,00± 4,47	82,00± 2,74	69,00± 5,48 <sup>ab</sup>	68,00± 4,72 <sup>abc</sup>	60,00± 17,32	56,00± 20,74	52,00± 24,90	60,00± 17,32	52,50± 20,20 <sup>bc</sup>	47,50± 18,90	40,00± 24,50	37,00± 28,04	40,00± 17,32
Tris 20	86,00± 5,48	83,00± 2,74	79,00± 8,22 <sup>b</sup>	76,00± 8,22 <sup>bc</sup>	75,00± 10,00	71,00± 13,42	62,00± 24,90	58,00± 23,88	61,30± 20,90 <sup>c</sup>	55,00± 20,41	55± 20,41 17,50±17,68	46,25± 21,36	37,50± 17,08
Tau 30 5	88,00± 4,47	80,00± 6,12	70,00± 17,68 <sup>ab</sup>	66,00± 11,40 <sup>abc</sup>	57,00± 21,68	49,00± 25,59	57,50± 9,60	36,0± 17,90	21,20± 20,2 <sup>ab</sup>	21,00± 18,52	(n=2)	30,00	20,00
Tau 30 10	86,00± 5,48	80,00± 6,12	76,00± 4,18 <sup>ab</sup>	72,00± 7,58 <sup>abc</sup>	67,00± 9,75	61,00± 12,45	53,00± 25,40	50,20± 26,70	58,70± 16,50 <sup>c</sup>	45,00± 20,82	38,75± 19,31	28,75± 23,23	25,00± 8,66
Tau 30 20*	89,00± 2,24	83,00± 2,74	80,00± 6,12 <sup>b</sup>	78,00± 4,47 <sup>bc</sup>	70,00± 10,00	67,00± 12,04	60,00± 23,18	59,00± 25,35	65,00± 16,83 <sup>c</sup>	56,20± 21,40	53,75± 21,36	47,50± 18,93	33,70± 20,56
Tau 50 5	86,00± 5,48	81,00± 6,52	65,00± 11,18 <sup>a</sup>	65,00± 11,18 <sup>ab</sup>	54,00± 19,01	44,00± 20,74	37,50±20,60	25,00± 21,21	16,70±20,21 <sup>a</sup>	40,00	20,00	20,00	20,00
Tau 50 10	87,00± 4,47	81,00± 2,24	75,00± 5 <sup>ab</sup>	72,00± 5,70 <sup>abc</sup>	67,00± 12,04	61,00± 18,17	51,00± 26,32	52,50± 9,57	40,00± 14,20 <sup>abc</sup>	24,50± 19,40	23,33± 17,56	21,50±16,16 (n=2)	40,00
Tau 50 20	87,00± 4,47	84,00± 2,24	82,00± 2,74 <sup>b</sup>	79,00± 5,48 <sup>c</sup>	77,00± 5,70	73,00± 10,95	66,00± 20,74	60,00± 23,45	50,00± 28,50 <sup>abc</sup>	52,50± 20,20	38,75± 19,31	26,25± 24,96	20,00±18,03
<b>p</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,024	0,027	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,035				
5% yema	85,30±6,40	79,70±5,50	66,30±13,02 <sup>a</sup>	63,70±12,32 <sup>a</sup>	55,13±18,40 <sup>a</sup>	46,70±21,10 <sup>a</sup>	49,20±15,60	36,20±18,60 <sup>a</sup>	25,50±21,40 <sup>a</sup>	24,70±18,30 <sup>a</sup>	22,00±18,90 <sup>a</sup>	26,67±5,80	20,00±0 (n=2)
10% yema	86,70±4,50	81,00±3,90	73,70±5,60 <sup>b</sup>	70,70±5,56 <sup>b</sup>	64,70±12,80 <sup>ab</sup>	59,30±16,50 <sup>b</sup>	52,00±23,60	53,90±20,10 <sup>b</sup>	50,40±17,50 <sup>b</sup>	39,00±20,80 <sup>ab</sup>	35,00±20,20 <sup>ab</sup>	30,80±23,30	33,57±13,75
20% yema	87,30±4,30	83,30±2,00	80,30±5,80 <sup>c</sup>	77,67±7,90 <sup>c</sup>	74,00±8,70 <sup>b</sup>	70,30±11,60 <sup>b</sup>	62,70±21,40	59,00±22,45 <sup>b</sup>	58,10±22,30 <sup>b</sup>	54,60±18,70 <sup>b</sup>	49,17±19,98 <sup>b</sup>	40,00±22,25	16,82±5,97
<b>p</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<0,001	0,001	0,003	0,002	<i>ns</i>	0,016	0,001	0,011	0,042	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Tau 0 mM	85,00±6,26	81,00±3,87	70,70±10,32	68,00±11,92	63,00±17,19	58,00±20,16	55,70±20,60	55,40±17,10	50,00±22,56	43,60±22,92	43,50±23,92	40,56±22	38,57±15,73
Tau 30 mM	87,70±4,20	81,00±5,07	75,33±11,10	72,00±9,22	64,70±14,90	59,00±18,24	56,80±19,80	49,30±24,10	48,33±25,80	42,55±23,50	40,50±22,54	37,22±20,78	28,75±15,29
Tau 50 mM	86,70±4,50	82,00±4,14	74,00±9,85	72,00±9,41	66,10±15,70	59,30±20,10	52,50±24,50	46,90±23,70	38,33±24,80	38,70±22,15	30,63±18,01	24,00±20,80	24,00±15,57
<b>p</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

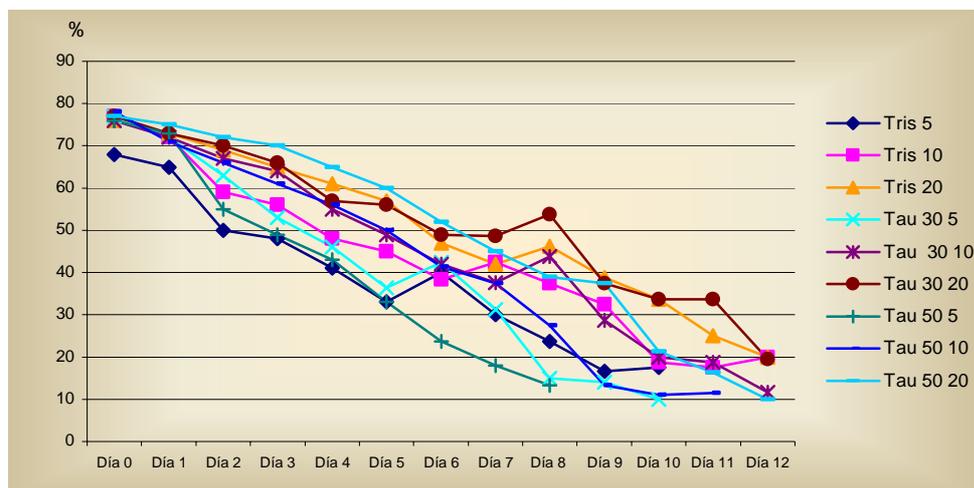
Media ± desviación típica (%). \* en el pool 4, el semen diluido con este medio alcanzó una supervivencia de hasta 22 días. ns- no significativo.

Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

de yema, de modo que el **día 8** se establecen entre 10 y 20% vs 5% y en el **día 9 y 10** entre 20% vs 5%. La concentración de aminoácido no ha mostrado diferencias significativas a lo largo de los días, aunque las muestras con 30 y 50 mM de taurina presentan una MTV ligeramente superior al control en los primeros 5 días. Comparando el medio control con el medio que presenta menor concentración de taurina y de yema, Tris 20 vs Tau 30 5, no se observan diferencias significativas para MTV hasta el día 8 en el cuál también se establecen diferencias con Tau 50 5. Sin embargo, el medio control presenta claras diferencias significativas frente a Tris 5 y Tau 50 5 ya el día 2 y con tris 5 el día 3.

### b. Motilidad progresiva visual (MPV)

Gráfica 4.3 - Motilidad progresiva visual



A partir del **día 1**, es posible observar diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,005$ ), presentando los valores mas bajos el medio Tris 5 (Tabla 4.5). Los medios con 20% de yema presentan en general la mejor MP ( $p=0,039$ ) al igual que en el **día 2** ( $p<0,001$ ), cuando los resultados son peores para el diluyente Tris 5 ( $p=0,01$ ), mientras los mejores resultados los presenta Tau 50 20 ( $p=0,002$ ). Para el **día 3**, los resultados también presentan diferencias significativas ( $p=0,05$ ), el medio Tris 5 arroja los peores resultados y Tau 30 20 y Tau 50 20 los mejores; la concentración de yema también presenta diferencias ( $p=0,001$ ) 5% vs 10 y 20%. En el día 4 no se observan diferencias entre diluyentes, pero los que contienen 20% de yema vs 5% presentan mejores motilidades progresivas ( $p=0,005$ ). El **día 5**, los mejores resultados se observan con el medio Tau 50 20 ( $p=0,035$ ); existiendo además diferencias entre 5% vs 10 y 20% de yema ( $p<0,001$ ). En el **día 8**, también es posible observar diferencias significativas

**Tabla 4.5 - Motilidad progresiva visual**

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12
<b>Tris 5</b>	68,00± 4,47	65,00± 6,20 <sup>a</sup>	50,00± 9,35 <sup>a</sup>	48,00± 16,43 <sup>a</sup>	41,00± 20,13	33,00± 17,18 <sup>a</sup>	40,00± 8,17	30,00± 8,17	23,75± 14,90 <sup>ab</sup>	16,67± 16,07	17,50±17,68(n=2)	20,00	
<b>Tris 10</b>	77,00± 4,47	72,00± 2,74 <sup>b</sup>	59,00± 5,48 <sup>abcd</sup>	56,00± 5,48 <sup>abc</sup>	48,00± 16,43	45,00± 17,32 <sup>abc</sup>	38,40± 21,97	42,50± 8,66	37,5± 16,58 <sup>abc</sup>	32,50± 15,00	18,75± 10,31	17,50± 10,41	20,00± 10,00
<b>Tris 20</b>	76,00± 5,48	73,00± 2,74 <sup>b</sup>	69,00± 8,22 <sup>cd</sup>	65,00±7,07 <sup>abc</sup>	61,00± 8,94	57,00± 10,95 <sup>bc</sup>	47,00± 21,68	42,00± 19,24	46,25±18,88 <sup>bc</sup>	38,75±16,52	33,75± 18,88	25,00± 15,81	20,00± 10,80
<b>Tau 30 5</b>	77,00± 6,71	72,00± 4,47 <sup>b</sup>	63,00± 16,05 <sup>bcd</sup>	53,00± 17,18 <sup>abc</sup>	46,00± 20,74	36,40± 19,87 <sup>ab</sup>	42,50± 5,00	31,25± 13,15	15,00± 16,83 <sup>a</sup>	14,00± 14,42	10,00±7,07 (n=2)	15,00	5,00
<b>Tau 30 10</b>	76,00± 5,48	72,00± 2,74 <sup>b</sup>	67,00± 2,74 <sup>cd</sup>	64,00± 4,18 <sup>abc</sup>	55,00± 10	49,00± 11,40 <sup>abc</sup>	42,00± 21,97	37,6± 21,59	43,75± 14,93 <sup>bc</sup>	28,75± 16,52	20± 13,54	18,75± 15,48	11,67± 7,64
<b>Tau 30 20</b>	77,00± 4,47	73,00± 2,74 <sup>b</sup>	70,00± 5,00 <sup>cd</sup>	66,00± 4,18 <sup>bc</sup>	57,00± 6,71	56,00± 10,84 <sup>bc</sup>	49,00± 22,47	48,60± 23,34	53,75± 16,01 <sup>c</sup>	37,50± 16,58	33,75± 14,93	33,75± 14,90	19,50± 15,42
<b>Tau 50 5</b>	76,00±5,48	73,00± 2,74 <sup>b</sup>	55,00± 11,18 <sup>ab</sup>	49,00± 23,02 <sup>ab</sup>	43,00± 21,68	33,00±17,18 <sup>a</sup>	23,75± 14,93	18,00± 17,87	13,33± 14,43 <sup>a</sup>	20,00	10,00	10,00	5,00
<b>Tau 50 10</b>	78,00± 5,70	71,00± 2,24 <sup>b</sup>	66,00± 4,18 <sup>bcd</sup>	61,00± 7,4 <sup>abc</sup>	56,00± 11,40	50,00± 17,32 <sup>abc</sup>	41,40± 22,69	37,50± 9,57	27,50± 12,58 <sup>abc</sup>	13,25± 11,64	11,00± 7,94	11,50±12,02(n=2)	20,00
<b>Tau 50 20</b>	77,00± 4,47	75,00± 0,5 <sup>b</sup>	72,00± 2,74 <sup>d</sup>	70,00± 3,54 <sup>c</sup>	65,00± 6,12	60,00± 9,35 <sup>c</sup>	52,00± 19,24	45,00± 20,62	39± 21,91 <sup>bc</sup>	37,50± 15,55	21,25±13,15	16,25± 16,52	10± 8,66(n=2)
<b>p</b>	<i>ns</i>	<i>0,005</i>	<i>0,002</i>	<i>0,05</i>	<i>ns</i>	<i>0,047</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>0,029</i>				
<b>5% yema</b>	73,67±6,80	70,57±5,81 <sup>a</sup>	56,00±12,84 <sup>a</sup>	50,00±17,80 <sup>a</sup>	43,30 ±19,40 <sup>a</sup>	34,13 ±16,86 <sup>a</sup>	35,20± 12,7	23,33±13,03 <sup>a</sup>	17,73±14,7 <sup>a</sup>	16,00±12,66 <sup>a</sup>	13,00±10,37 <sup>a</sup>	15,00±5,00	5,00±0 (n=2)
<b>10% yema</b>	77,00±4,90	71,66±2,44 <sup>ab</sup>	64,00±5,41 <sup>b</sup>	60,33±6,40 <sup>b</sup>	53,00±12,50 <sup>ab</sup>	48,00±14,6 <sup>b</sup>	40,80±20,24	39,08±14,23 <sup>b</sup>	36,25±15,1 <sup>b</sup>	24,83±15,80 <sup>ab</sup>	17,09±10,7 <sup>ab</sup>	16,80±11,80	16,43±8,50
<b>20% yema</b>	76,67±4,49	73,67±2,3 <sup>b</sup>	70,33±5,49 <sup>b</sup>	67,00±5,27 <sup>b</sup>	61,00±7,60 <sup>b</sup>	57,67±9,79 <sup>b</sup>	49,33±19,72	45,77±18,80 <sup>b</sup>	45,77±18,8 <sup>b</sup>	37,92±14,68 <sup>b</sup>	29,58±15,58 <sup>b</sup>	25,00±16,09	16,82±11,46
<b>p</b>	<i>ns</i>	<i>0,039</i>	<i>&lt;0,001</i>	<i>0,002</i>	<i>0,005</i>	<i>&lt;0,001</i>	<i>ns</i>	<i>0,005</i>	<i>0,001</i>	<i>0,011</i>	<i>0,031</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<b>Tau 0 mM</b>	73,67±6,11	70,00±5,34	59,33±10,84	56,33±12,31	50,00±17,00	45,00±17,52	42,14±17,51	38,46±13,9	35,83±18,07	30,45±16,95	24,50±15,89	21,11±12,19	20,00±9,57
<b>Tau 30 mM</b>	76,67±5,23	72,33±3,19	66,67±9,57	61,00±11,37	52,67±13,74	47,13±15,93	44,64±17,91	36,86±21,89	37,50±22,41	27,91±17,35	23,50±15,28	25,00±15,60	14,38±11,47
<b>Tau 50 mM</b>	77,00±4,92	73,00±2,53	64,33±9,79	60,00±15,81	54,67±16,42	47,67±18,11	40,14±21,47	34,62±19,20	28,75±19,02	24,78±17,08	16,00±11,12	14,00±12,98	11,00±8,21
<b>p</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Media ± desviación típica (%). ns-no significativo.  
Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ).

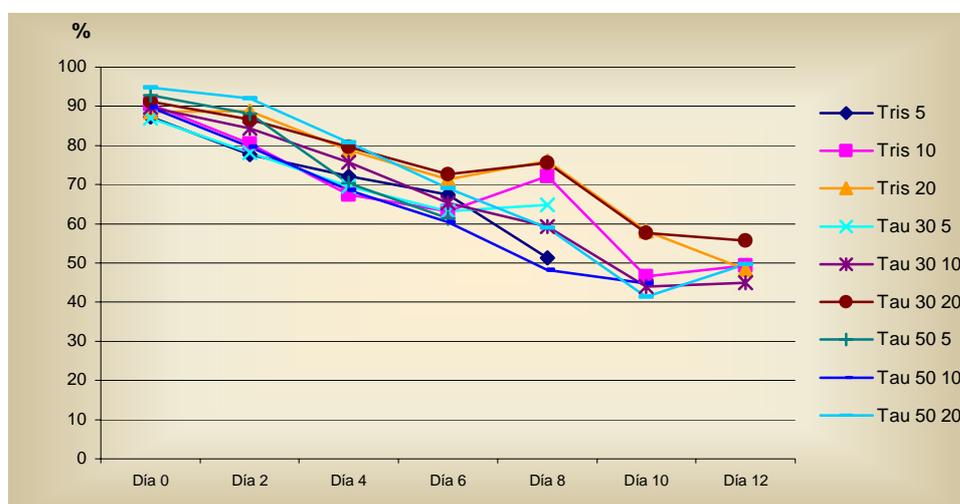
entre los diluyentes ( $p=0,027$ ), siendo el medio Tau 30 20 el que mejores resultados obtiene y el diluyente Tau 30 5 el que presenta los peores resultados. En cuanto a la concentración de yema, los **días 7 y 8**, se presentan diferencias altamente significativas entre 5% vs 10 y 20% ( $p=0,005$  y  $0,001$ , respectivamente) y los **días 9 y 10** entre 5 vs 20% ( $p=0,011$  y  $0,031$ ), respectivamente. El medio Tau 50 20 es el que mejor mantiene la MPV hasta el día 8 en refrigeración y tampoco se establecen diferencias entre el control (tris 20) y Tau 30 5 hasta dicho día 8. La concentración de yema que numéricamente tuvo mejores valores de MP es 20%, sin embargo, las diferencias con 10% no han sido estadísticamente significativas a lo largo del experimento.

### Análisis computerizado de la motilidad (CASA)

En el análisis computerizado de la motilidad no han existido diferencias significativas en los distintos parámetros estudiados para los distintos diluyentes, con excepción de algunas diferencias puntuales en el ALH.

#### a. Motilidad total (MTC)

Gráfica 4.4 - Motilidad total



Pese a la inexistencia de diferencias estadísticamente significativas entre diluyentes y concentraciones de yema y aminoácido, la MT de los diluyentes con 20% de yema es, numéricamente, superior a la de 10 y 5%. Sin embargo, el medio control, no presenta diferencias estadísticamente significativas frente al medio Tau 30 5.

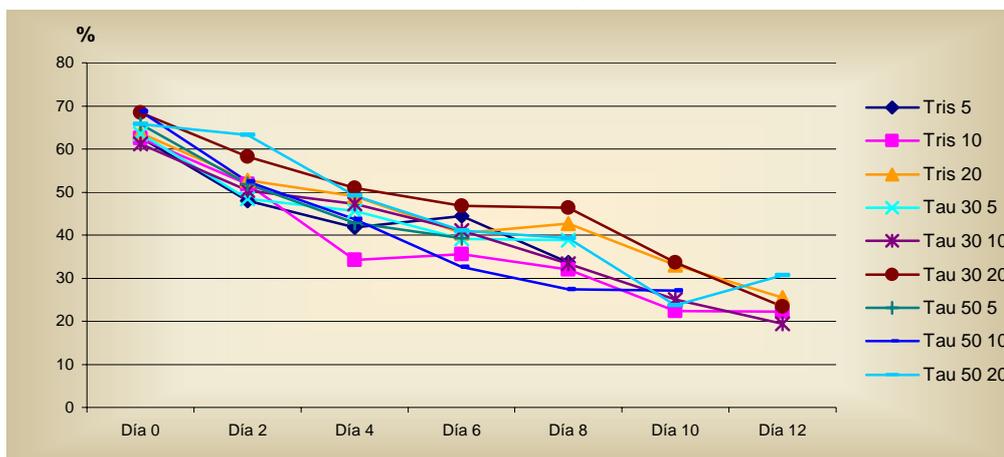
Tabla 4.6 - Motilidad total

	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10	Día 12
<b>Tris 5</b>	87,28± 10,77	77,74± 17,63	72,10± 24,08	67,35± 13,73	51,33± 22,47	56,80	
<b>Tris 10</b>	90,5± 7,04	80,52± 17,88	67,46± 22,99	63,18± 28,72	72,20± 13,26	46,60± 21,04	49,37± 20,10
<b>Tris 20</b>	88,54± 4,68	88,70± 8,95	78,80± 9,29	71,30± 18,08	76,00± 11,56	58,07±12,96	48,35± 19,77
<b>Tau 30 5</b>	87,04± 5,49	78,16± 25,56	69,56± 24,06	63,18± 7,07	64,77± 4,45	42,00	34,00
<b>Tau 30 10</b>	89,68± 3,24	84,40±8,36	75,70± 16,35	65,34± 24,09	59,25± 14,31	43,90± 19,35	45,00± 17,32
<b>Tau 30 20</b>	91,20± 13,72	86,62± 6,80	79,64± 8,96	72,58± 22,09	75,65± 16,97	57,60± 25,89	55,73± 35,25
<b>Tau 50 5</b>	92,90± 4,13	88,18± 8,30	70,40±21,99	61,38± 11,76	72,00	46,00	27,00
<b>Tau 50 10</b>	89,66± 9,63	79,62± 6,56	68,60± 16,19	60,48± 27,44	48,13± 14,04	44,80± 35,50 (n=2)	64,00
<b>Tau 50 20</b>	94,72± 4,51	92,00± 4,99	80,76± 13,69	69,00± 20,53	59,00± 14,58	41,30± 23,43	49,65± 11,41 (n=2)
<b>p</b>	ns	ns	ns	ns			
<b>5% yema</b>	89,04±7,33	81,36±17,89	70,68±21,70	63,97±10,47	60,10±15,80	48,27±7,65	31,30±4,80 (n=2)
<b>10% yema</b>	89,95±6,62	81,51±11,32	70,58±17,78	61,98±24,40	59,85±16,20	45,20±20,35	49,58±16,73
<b>20% yema</b>	91,49±5,93	89,11±6,96	79,73±10,1	70,96±18,54	70,40±15,40	51,49±19,84	45,25±21,11
<b>p</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Tau 0 mM</b>	88,74±7,39	82,32±15,04	72,78±19,09	67,27±20,26	67,89±17,60	52,83±16,25	48,78±18,18
<b>Tau 30 mM</b>	89,31±5,57	83,06±15,28	74,96±16,82	67,30±18,57	66,72±14,39	48,66±19,24	41,18±20,46
<b>Tau 50 mM</b>	92,43±6,47	86,60±8,23	73,25±17,24	62,69±19,68	55,90±14,98	42,97±22,11	47,8±18,94
<b>p</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Media ± Desv. Tip. (%). ns- no significativo.

### b. Motilidad progresiva (MPC)

Gráfica 4.5 - Motilidad progresiva



No se verificaron diferencias significativas entre los distintos diluyentes ni la adición de yema afectó significativamente, pese a que la MP de los diluyentes con el 20% de yema ha sido algo superior. Se destaca del conjunto la MP de Tau 50 20 en los primeros días y de Tau 30 20 después del día 4. El medio control por tanto, tampoco presenta diferencias estadísticamente significativas frente al medio Tau 30 5. En general la adición de taurina presenta, numericamente, una mayor MP, en los primeros días.

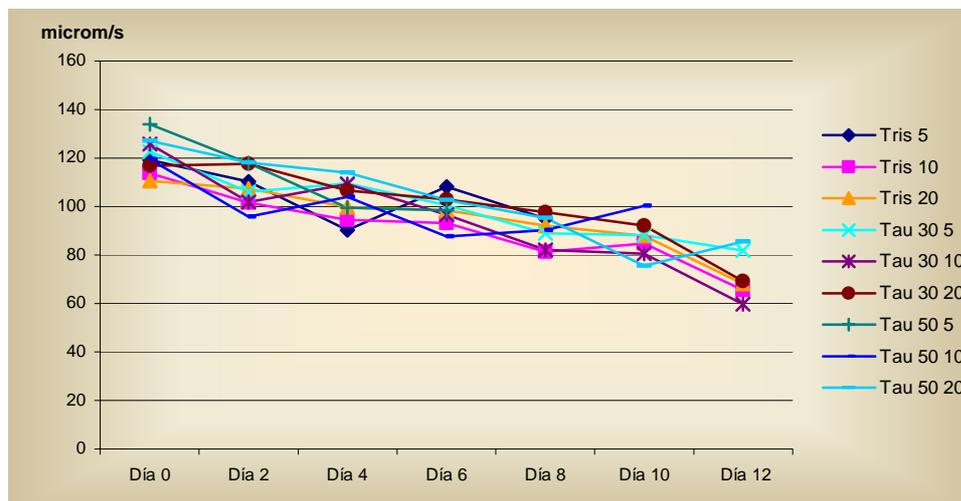
Tabla 4.7 - Motilidad progresiva

	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10	Día 12
Tris 5	62,70± 20,95	47,98± 20,10	41,84±6,82	44,45± 17,41	33,70± 18,50	35,60	
Tris 10	62,54± 6,95	51,78± 19,36	34,20± 10,64	35,56± 16,68	31,95± 3,06	22,30± 16,72	22,23± 17,02
Tris 20	63,76± 7,31	52,76± 15,00	49,04± 13,84	40,46± 14,69	42,65±16,95	33,00 ± 13,62	25,53± 13,9
Tau 30 5	63,50± 11,41	48,4± 20,94	45,66± 17,58	39,13± 12,05	38,77± 14,95	23,00	20,00
Tau 30 10	61,20± 10,79	50,36± 12,45	47,30± 16,30	40,98± 19,49	33,27± 19,04	25,10± 16,01	19,47± 15,27
Tau 30 20	68,38± 12,38	58,26± 12,69	51,02± 8,14	46,80± 17,83	46,35± 14,07	33,65± 18,53	23,43± 20,91
Tau 50 5	65,74± 12,41	51,80± 10,77	42,84± 27,55	39,30± 17,49	34,20	29,20	10,40
Tau 50 10	68,70± 13,82	52,48± 16,38	43,64± 19,01	32,54± 16,25	27,38± 9,69	27,05± 19,73(n=2)	42,00
Tau 50 20	65,80± 13,51	63,20± 13,19	49,12± 8,53	41,10± 16,93	39,22± 10,71	23,75± 18,16	30,70± 1,84(n=2)
<i>p</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>			
5% yema	63,98±14,40	49,40±16,60	42,25±19,29	41,80±14,02	35,90±13,90	29,26±6,30	15,20±6,78 (n=2)
10% yema	64,17±10,65	51,54±15,13	41,70±15,60	36,36±16,60	30,87±11,57	32,37±20,90	23,87±15,50
20% yema	67,31±10,16	58,07±13,39	49,66±9,73	42,80±15,59	42,74±13,14	30,14±16,02	25,72±14,77
<i>p</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Tau 0 mM	63,00±12,43	50,84±17,06	40,49±13,64	40,56±14,97	36,32±13,53	37,42±18,95	24,11±14,00
Tau 30 mM	64,36±11,12	52,34±15,33	47,93±13,69	42,54±16,12	39,53±15,72	28,67±15,75	21,51±16,07
Tau 50 mM	68,11±11,79	55,83±13,73	45,20±18,68	37,53±15,98	33,40±10,65	25,48±15,32	28,45±13,20
<i>p</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Media ± Desv. Tip. (%). ns- no significativo.

### c. Velocidad curvilínea (VCL)

Gráfica 4.6 - Velocidad curvilínea



No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la velocidad curvilínea (VCL) de los distintos diluyentes. Ha existido una mejor manutención de la VCL en los diluyentes Tau 50 5, Tau 50 20, Tris 5 y Tau 30 20. Sin que exista, por tanto, diferencia significativa entre el medio control y tau 30 5. El factor yema, así como el factor aminoácido tampoco han mostrado diferencia significativa alguna.

**Tabla 4.8 - Velocidad curvilínea**

	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10	Día 12
<b>Tris 5</b>	119,32± 16,68	110,38± 28,57	90,20± 35,58	108,08± 19,10	95,07± 15,93	104,90	
<b>Tris 10</b>	113,60± 16,44	101,52± 16,18	94,48± 12,22	93,10± 40,23	81,23± 13,13	84,85± 25,46	65,43± 34,22
<b>Tris 20</b>	110,50± 13,04	107,44± 19,46	99,66± 5,56	98,48± 23,08	92,03± 21,91	87,9± 16,04	68,13± 12,58
<b>Tau 30 5</b>	122,74± 21,09	106,14± 29,81	109,46± 20,79	100,50± 24,39	88,90± 6,65	88,10	81,90
<b>Tau 30 10</b>	125,72± 20,97	101,94± 10,79	109,26± 17,43	96,66± 24,88	82,08± 21,66	80,40± 30,20	59,63± 28,09
<b>Tau 30 20</b>	116,9± 19,61	117,52± 8,45	106,66± 5,04	103,02± 27,98	97,53± 21,31	92,2± 28,86	69,10± 20,29
<b>Tau 50 5</b>	133,88± 14,1	117,80± 22,41	99,46± 23,26	98,43± 27,11	95,40	87,00	60,70
<b>Tau 50 10</b>	119,36± 17,15	95,74± 15,80	103,90± 24,16	87,65± 24,44	90,30± 20,55	100,30± 19,66 (n=2)	104,10
<b>Tau 50 20</b>	127,18± 15,67	118,24± 13,89	114,04± 13,21	102,60± 29,54	95,33± 18,18	75,45± 31,82	85,60± 2,12(n=2)
<b>p</b>	ns	ns	ns	ns			
<b>5% yema</b>	125,31±17,45	111,44±25,60	99,71±26,57	102,30±21,92	92,47±10,51	93,33±10,03	71,30±14,90(n=2)
<b>10% yema</b>	119,56±17,70	99,73±13,70	102,55±18,33	92,44±28,72	84,50±17,55	86,16±24,9	68,47±30,14
<b>20% yema</b>	118,19±16,70	114,4±14,48	106,78±10,14	101,36±25,09	94,95±18,72	84,35±24,19	72,01±15,55
<b>p</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Tau 0 mM</b>	114,47±14,82	106,45±20,75	94,78±20,72	99,30±28,01	88,93±16,89	88,43±19,49	66,97±21,71
<b>Tau 30 mM</b>	121,78±19,41	108,53±18,81	108,46±14,80	100,03±24,01	89,55±18,27	86,50±18,27	67,15±21,43
<b>Tau 50 mM</b>	126,81±15,77	110,59±19,7	105,80±20,27	96,04±25,84	93,10±17,01	82,77±25,02	84,00±17,85
<b>p</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Media± Desv. Tip. (µm/s). ns- no significativo.

**d. Velocidad rectilínea (VSL)**

No han sido verificadas diferencias significativas entre la velocidad rectilínea de los distintos diluyentes. Destacan algunos diluyentes como Tau 50 20 y Tris 5; siendo el Tau 30 20 y Tau 30 5, el que mantienen valores mas constantes.

**Gráfica 4.7 - Velocidad rectilínea**

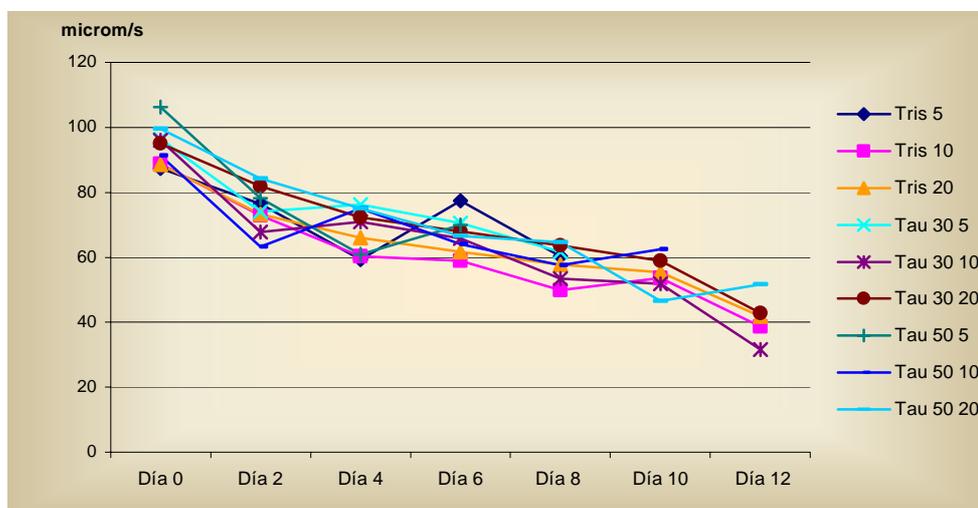


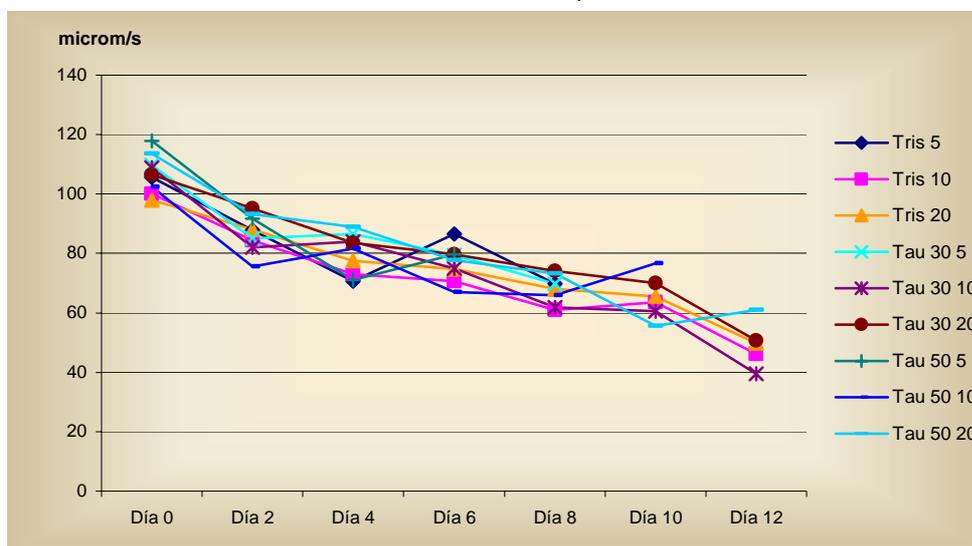
Tabla 4.9 - Velocidad rectilínea

	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10	Día 12
<b>Tris 5</b>	87,46± 25,80	76,34± 25,39	59,22± 23,12	77,35± 13,82	60,23± 8,34	75,20	
<b>Tris 10</b>	88,84± 15,25	72,9± 15,37	60,20± 3,49	58,94± 25,65	49,83± 3,57	53,60± 15,83	38,73± 22,91
<b>Tris 20</b>	88,52± 11,00	73,2± 16,91	65,98± 7,27	61,60± 17,38	57,73± 18,75	55,48± 9,36	41,83± 6,87
<b>Tau 30 5</b>	96,36± 26,67	73,96± 22,79	76,22± 17,59	70,45± 17,49	61,60± 2,43	54,50	55,20
<b>Tau 30 10</b>	96,02± 21,95	67,80± 13,92	70,86± 9,46	65,74± 16,52	53,35± 14,77	51,90± 18,91	31,67± 16,38
<b>Tau 30 20</b>	95,06± 18,56	81,86± 10,79	72,18± 6,72	67,90± 16,71	63,55± 17,18	58,98± 15,64	42,75± 10,44
<b>Tau 50 5</b>	106,18± 21,16	78,26± 16,48	60,86± 29,26	69,83± 21,52	56,20	54,50	39,80
<b>Tau 50 10</b>	91,28± 23,59	63,20± 9,45	75,06± 2,92	64,04± 22,02	57,46± 13,75	62,55± 1,91(n=2)	64,10
<b>Tau 50 20</b>	99,6± 17,61	84,24± 13,00	74,98± 8,33	66,54± 20,19	64,63± 13,74	46,63± 19,33	51,65± 1,49(n=2)
<b>p</b>	ns	ns	ns	ns			
<b>5% yema</b>	96,67± 24,16	76,18± 20,33	65,43± 23,4	72,54± 16,56	60,24± 5,36	61,40± 11,95	47,5± 10,80 (n=2)
<b>10% yema</b>	94,38± 19,50	67,96± 12,85	68,70± 14,00	62,91± 20,33	53,55± 11,19	54,71± 14,85	39,33± 19,90
<b>20% yema</b>	93,39± 15,61	79,76± 13,68	71,04± 7,93	65,34± 17,04	61,96± 15,42	53,69± 14,89	44,16± 8,25
<b>p</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Tau 0 mM</b>	88,27± 17,07	74,15± 18,33	61,80± 13,45	65,15± 20,12	55,54± 12,03	56,83± 13,23	40,50± 14,18
<b>Tau 30 mM</b>	95,81± 20,97	74,54± 16,50	73,08± 11,50	67,85± 15,63	59,30± 13,34	55,33± 15,44	40,15± 13,80
<b>Tau 50 mM</b>	101,35± 19,7	75,23± 15,34	70,30± 20,90	66,58± 19,67	60,51± 12,53	52,30± 15,64	51,80± 9,96
<b>p</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Media± Desv. Tip. (µm/s). ns- no significativo.

## e. Velocidad promedio (VAP)

Gráfica 4.8 - Velocidad promedio



De igual modo que los parámetros anteriores tampoco se han observado diferencias significativas en la velocidad de promedio de los diferentes diluyentes.

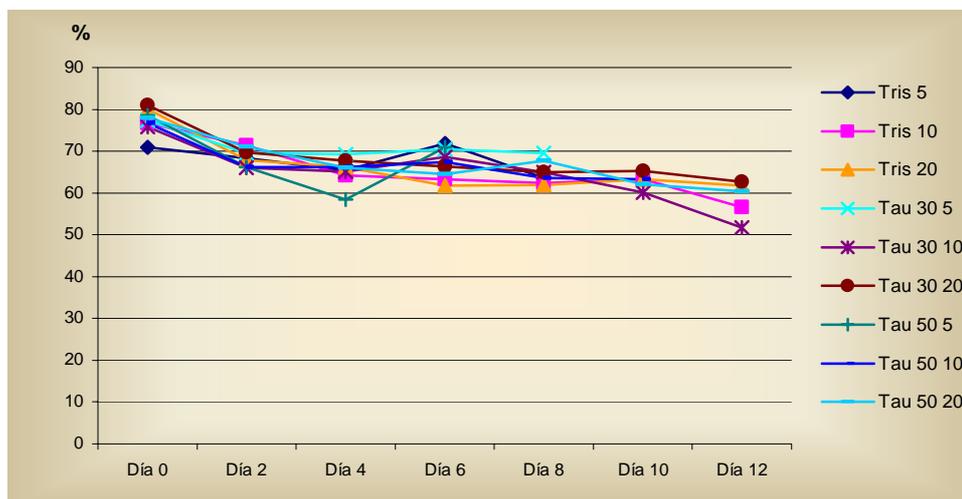
Tabla 4.10 - Velocidad promedio

	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10	Día 12
<b>Tris 5</b>	105,74± 14,07	87,80± 25,86	70,64± 26,30	86,50± 14,83	69,87± 7,84	83,00	
<b>Tris 10</b>	100,14± 15,19	84,28± 14,84	72,92± 6,99	70,64± 30,85	61,05± 7,16	63,63± 18,26	46,23± 25,80
<b>Tris 20</b>	97,92± 12,22	88,04± 17,26	77,52± 6,83	74,82± 21,22	68,05± 19,07	65,40± 12,00	49,83± 8,05
<b>Tau 30 5</b>	109,82± 20,63	85,12± 25,40	86,50± 19,63	79,48± 18,29	69,83± 2,71	64,00	61,40
<b>Tau 30 10</b>	108,94± 22,46	82,12± 11,34	84,04± 14,18	74,84± 18,31	61,85± 16,19	60,50± 22,02	39,60± 19,29
<b>Tau 30 20</b>	106,50± 16,62	95,12± 7,75	83,60± 6,19	79,66± 18,35	74,08± 18,98	70,03± 19,79	50,63± 15,17
<b>Tau 50 5</b>	117,84± 15,85	91,76± 17,02	71,16± 28,84	79,68± 22,19	72,30	65,40	46,30
<b>Tau 50 10</b>	102,32±18,2	75,50± 11,78	81,70± 19,18	66,94± 18,33	65,90± 15,06	76,75± 13,36(n=2)	80,10
<b>Tau 50 20</b>	113,58± 15,59	93,22± 11,05	88,82± 11,77	77,80± 23,00	73,15± 15,13	55,55± 24,07	60,9± 0,71 (n=2)
<b>p</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>			
<b>5% yema</b>	111,10±16,64	88,22±21,5	81,88±17,24	70,20±4,80	71,06±11,04	53,85±10,68	53,85±10,67 (n=2)
<b>10% yema</b>	103,80±17,87	80,65±12,41	79,55±14,18	70,80±21,79	62,90±12,34	65,00±18,25	48,23±23,54
<b>20% yema</b>	105,98±15,32	92,13±12,11	83,31±9,31	77,43±19,5	71,76±16,35	63,65±18,54	52,36±10,87
<b>p</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<b>Tau 0 mM</b>	101,27±13,29	86,70±14,5	73,69±15,28	76,66±22,95	66,00±12,35	66,65±14,87	48,28±16,06
<b>Tau 30 mM</b>	108,41±18,62	87,45±16,47	84,71±13,42	77,88±17,01	68,47±14,79	65,12±18,75	47,84±16,25
<b>Tau 50 mM</b>	111,25±16,79	86,85±15,03	80,56±20,94	74,46±20,35	69,83±13,59	63,01±20,5	62,05±13,86
<b>P</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Media± Desv. Tip. (µm/s). ns- no significativo.

## f. Índice de linealidad (LIN)

Gráfica 4.9 - Índice de linealidad



No existieron diferencias significativas en el índice de linealidad (LIN) de los distintos diluyentes, de hecho, la diferencia entre éstos fue bastante poco marcada a lo largo del experimento. Aunque el día 6 es posible observar diferencias ( $p=0,026$ ) entre las concentraciones de yema del 5 vs el 20%, en el cual la linealidad presenta mejores resultados a la concentración de 5%.

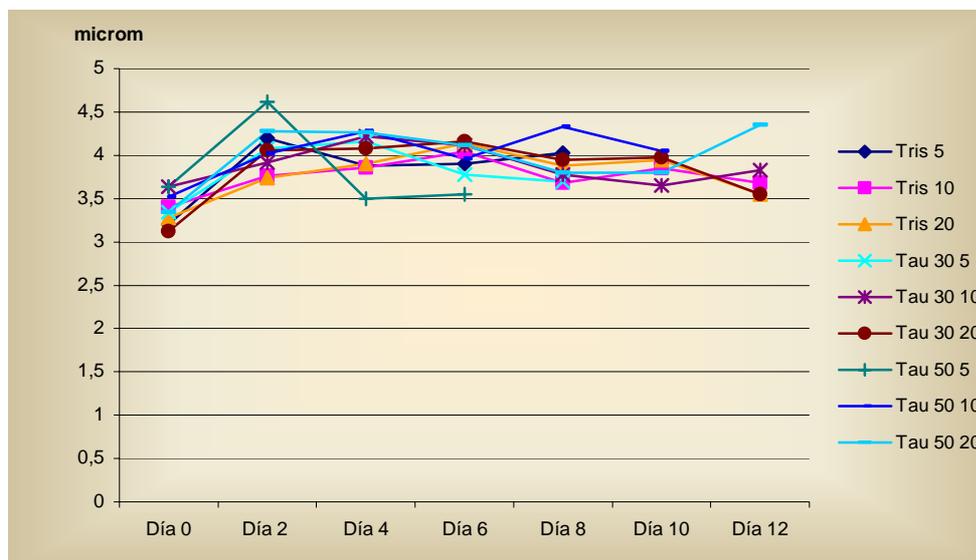
Tabla 4.11 - Índice de linealidad

	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10	Día 12
<b>Tris 5</b>	70,96± 14,32	68,28± 6,40	65,44± 2,74	71,80± 6,31	63,60± 3,54	71,70	
<b>Tris 10</b>	76,80± 3,66	71,42± 3,56	64,28± 6,15	63,36± 6,28	62,35± 8,43	63,30± 5,20	56,57± 8,44
<b>Tris 20</b>	80,12± 3,12	67,88± 5,23	66,2± 6,09	61,82± 6,00	61,90± 5,30	63,28± 3,80	61,83± 7,6
<b>Tau 30 5</b>	77,36± 9,9	69,52± 4,55	69,24± 4,86	70,45± 7,76	69,53± 4,71	61,90	67,50
<b>Tau 30 10</b>	75,78± 8,62	66,10± 7,18	65,18± 4,76	68,64± 7,96	65,03± 5,06	60,15± 11,22	51,77± 4,21
<b>Tau 30 20</b>	81,02± 2,52	69,66± 7,28	67,78± 6,74	66,40± 3,23	65,00± 6,27	65,25± 7,03	62,73± 7,74
<b>Tau 50 5</b>	78,62± 8,80	66,18± 3,82	58,48± 19,37	70,93± 9,78	58,90	62,60	65,60
<b>Tau 50 10</b>	76,7± 4,58	66,20± 4,74	66,18± 9,26	67,50± 4,40	63,68± 6,47	63,35± 10,54(n=2)	61,60
<b>Tau 50 20</b>	77,94±4,45	71,06± 4,10	66,04± 6,47	64,50± 4,57	67,78± 5,77	62,10± 7,45	60,35± 0,21(n=2)
<b>p</b>	ns	ns	ns	ns			
<b>5% yema</b>	75,64±10,9	67,99±4,87	64,38±11,72	71,05±7,32 <sup>b</sup>	65,47±5,36	66,55±1,34	87,78±12,56 (n=2)
<b>10% yema</b>	76,43±5,59	67,90±5,60	66,21±6,83	63,50±6,35 <sup>a</sup>	63,68±6,25	62,05±8,12	55,23±6,60
<b>20% yema</b>	79,70±3,46	69,53±5,44	66,67±6,01	64,24±4,80 <sup>ab</sup>	64,89±5,80	63,54±5,86	61,89±6,33
<b>p</b>	ns	ns	ns	0,026	ns	ns	ns
<b>Tau 0 mM</b>	75,96±8,97	69,19±5,08	65,31±4,92	65,22±7,17	62,53±5,72	64,22±4,83	59,57±7,78
<b>Tau 30 mM</b>	78,05±7,49	68,43±6,22	67,40±5,40	68,36±6,28	66,24±5,32	62,61±8,50	59,21±8,45
<b>Tau 50 mM</b>	77,75±5,87	67,81±4,58	64,57±12,85	67,40±6,44	64,97±6,13	62,53±6,80	61,97±2,50
<b>p</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Media± Desv. Tip. (%). ns- no significativo.

### g. Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH)

Gráfica 4.10 - Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza



Del día 0 al día 2 la ALH de todos los diluyentes exhibieron aumentos, en algunos de ellos el aumento se mantiene en el día 4 y 6. Existen diferencias significativas en el día 2, en que el valor para ALH del diluyente Tau 50 5 es significativamente superior a la del Tris 10 y 20 y a la de todos los diluyentes Tau 30 ( $p=0,037$ ), presentando el mayor

valor frente a todos los diluyentes del experimento. En cuanto a la concentración de yema se observan diferencias significativas ( $p=0,020$ ) entre el 5 y el 20%, también en el día 2, al igual que sucede con la concentración de aminoácido ( $p=0,016$ ) donde se constatan diferencias entre 50mM vs 0 y 30mM que presentan valores mas bajos. Así la unión en un diluyente de la mas baja concentración de yema (5%) y la mas alta de taurina (50mM) induce a una mayor precocidad frente a los otros medios en mostrar una alteración de uno de los parámetros de motilidad mas relacionados con la capacitación espermática y el deterioro celular (Yunes, 2003). Para este parámetro destacamos que a pesar de existir algunas diferencias significativas entre diluyentes no existen dichas diferencias entre Tris 20 y Tau 30 5.

**Tabla 4.12** - Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza

	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10	Día 12
<b>Tris 5</b>	3,20± 0,69	4,20± 0,40 <sup>abc</sup>	3,88± 0,89	3,90± 0,45	4,03± 0,60	4,10	
<b>Tris 10</b>	3,40± 0,29	3,76± 0,18 <sup>a</sup>	3,86± 0,50	4,04± 1,29	3,68± 0,42	3,85± 0,48	3,68± 0,64
<b>Tris 20</b>	3,28± 0,22	3,74± 0,45 <sup>a</sup>	3,90± 0,33	4,14± 0,46	3,88± 0,50	3,95± 0,24	3,55± 0,76
<b>Tau 30 5</b>	3,34± 0,59	4,08± 0,31 <sup>ab</sup>	4,16± 0,51	3,78± 1,02	3,70± 0,27	4,40	4,10
<b>Tau 30 10</b>	3,64± 0,31	3,92± 0,13 <sup>ab</sup>	4,22± 0,32	4,12± 0,70	3,78± 0,59	3,65± 0,82	3,83± 0,45
<b>Tau 30 20</b>	3,12± 0,62	4,06± 0,38 <sup>ab</sup>	4,08± 0,28	4,16± 1,16	3,95± 0,78	3,98± 0,79	3,55± 0,57
<b>Tau 50 5</b>	3,64± 0,09	4,62± 0,53 <sup>c</sup>	3,50± 1,48	3,55± 0,72	4,10	3,60	3,50
<b>Tau 50 10</b>	3,52± 0,33	4,02± 0,30 <sup>ab</sup>	4,28± 0,88	3,96± 1,06	4,33± 0,75	4,05± 0,78 (n=2)	4,40
<b>Tau 50 20</b>	3,34± 0,20	4,28± 0,30 <sup>bc</sup>	4,26± 0,47	4,12± 0,73	3,80± 0,50	3,80± 0,74	4,35± 0,07 (n=2)
<b>p</b>	ns	0,037	ns	ns			
<b>5% yema</b>	3,39±0,50	4,30±0,45 <sup>a</sup>	3,84±1,00	3,75±0,70	3,90±0,42	4,03±0,40	3,80±0,42 (n=2)
<b>10% yema</b>	3,50±0,30	3,90±2,23 <sup>ab</sup>	3,98±0,59	4,04±0,97	3,90±0,62	3,81±0,63	3,80±0,50
<b>20% yema</b>	3,24±0,37	4,02±0,41 <sup>b</sup>	4,08±0,37	4,14±0,77	3,80±0,55	3,90±0,58	3,70±0,64
<b>p</b>	ns	0,020	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Tau 0 mM</b>	3,29±0,42	3,90±0,40 <sup>a</sup>	3,88±0,57	4,04±0,79	3,84±0,47	3,90±0,34	3,60±0,65
<b>Tau 30 mM</b>	3,36±0,53	4,02±0,28 <sup>a</sup>	4,15±0,36	4,03±0,91	3,80±0,55	3,87±0,74	3,70±0,49
<b>Tau 50 mM</b>	3,50±0,25	4,30±0,44 <sup>b</sup>	3,88±1,00	3,90±0,83	4,06±0,60	3,80±0,63	4,15±0,44
<b>p</b>	ns	0,016	ns	ns	ns	ns	ns

Media ± desviación típica ( $\mu\text{m}$ ). ns- no significativo. Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ).

#### 4.1.2.2.2. Efectos de los aminoácidos y de la yema de huevo en la longevidad de la motilidad

Gráfica 4.11 - Duración longevidad espermática (días)

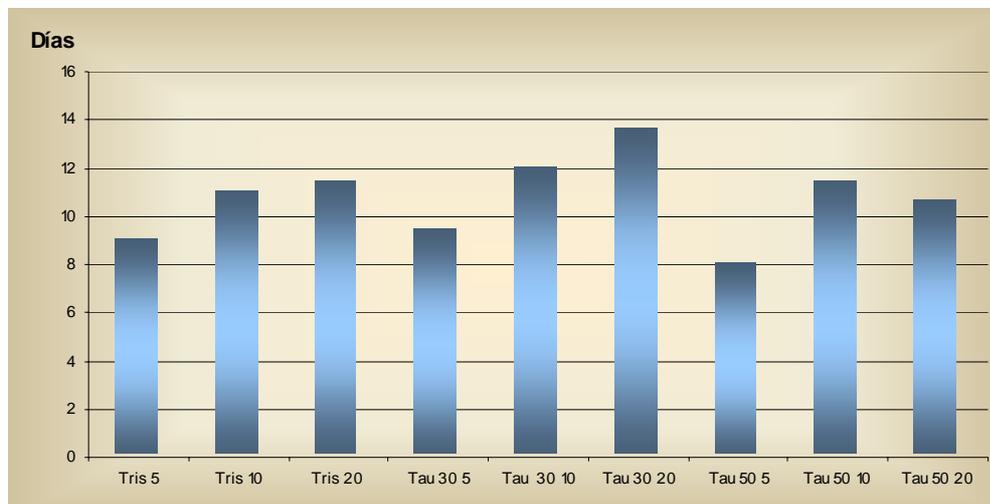


Tabla 4.13 - Duración de la longevidad

Taurina	Duración de la longevidad
TRIS 5	9,00±4,47
TRIS 10	11,00±3,74
TRIS 20	11,40±3,64
TAU 30 5	9,40±3,16
TAU 30 10	12,00±4,16
TAU 30 20	13,60±5,40
TAU 50 5	8,00±3,46
TAU 50 10	11,40±2,97
TAU 50 20	10,64±3,89
<i>p</i>	<i>ns</i>
5% yema	8,80±3,80 <sup>a</sup>
10% yema	11,00±3,34 <sup>ab</sup>
20% yema	12,13±3,98 <sup>b</sup>
<i>p</i>	0,055 > 0,05
Tau 0mM	10,47±3,83
Tau 30mM	11,67±4,45
Tau 50mM	9,80±3,34
<i>p</i>	<i>ns</i>

Media ± desviación típica (días). ns- no significativo.

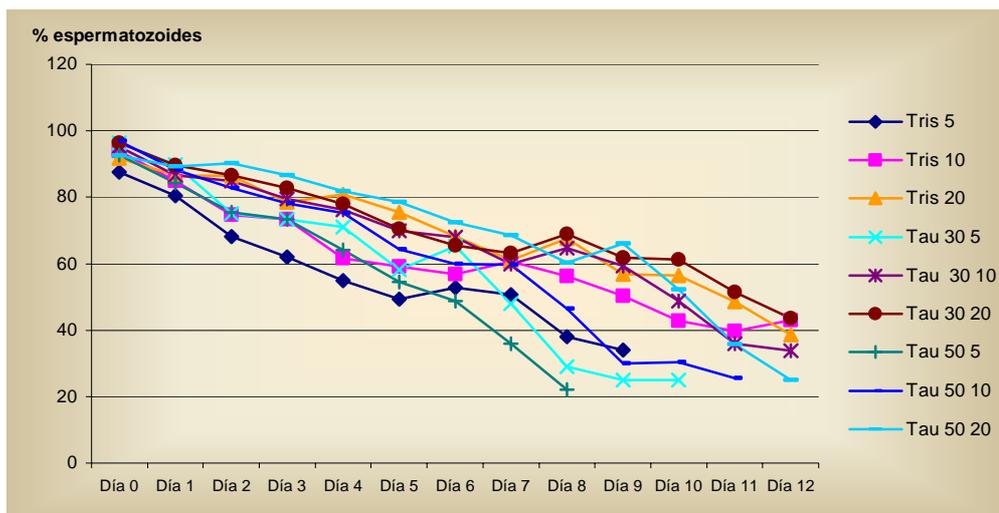
No existieron diferencias significativas entre los distintos diluyentes para el número de días hasta los cuales los espermatozoides exhibieron motilidad. En relación al porcentaje de yema, las diferencias entre 5 % vs 20% son prácticamente significativas ( $p=0,055$ ). Sin embargo, la ANOVA tampoco establece para este parámetro diferencias significativas entre Tris 20 y Tau 30 5. A pesar de la inexistencia de diferencias

significativas, los medios que mayor longevidad mantuvieron en condiciones de refrigeración fueron Tau 30 10 y Tau 30 20.

#### 4.1.2.2.3. Efectos de los aminoácidos y de la yema de huevo en la integridad de la membrana

Este parámetro fue evaluado diariamente mediante la realización del test de endosmósis (TE) (Tabla 4.14). En los primeros días del experimento no existen diferencias marcadas entre la respuesta al TE de los distintos diluyentes, pero existen en los **días 2 y 3** ( $p=0,039$  y  $0,033$ ) en que los valores mas altos los presentan tau 30 10 y 20, tris 20 y Tau 50 20, los valores mas bajos se presentan con el medio Tris 5; y en el **día 8**, tris 20 junto con tau 30 10 y tau 30 20 obtienen los resultados mas altos a diferencia del diluyente tau 50 5 que presenta los mas bajos ( $p=0,024$ ). En los **días 2 a 5 y 7 a 9** existen diferencias significativas en la concentración de yema ( $p<0,001$  a  $p=0,045$ ), destacando que no existen diferencias significativas entre el 10 y el 20%. La concentración de taurina presenta diferencias significativas el **día 0** ( $p=0,039$ ) entre 0 y 30mM, siendo esta última la que presenta mayor porcentaje; en el **día 1**, aunque la diferencia no es significativa ( $p=0,069$ ) se mantiene la misma tendencia. Destacamos que para este parámetro tampoco existen diferencias significativas entre Tris 20 y Tau 30 5 hasta el día 8.

Gráfica 4.12 - Test de endósmosis positivo



**Tabla 4.14 - Test de endósmosis positivo**

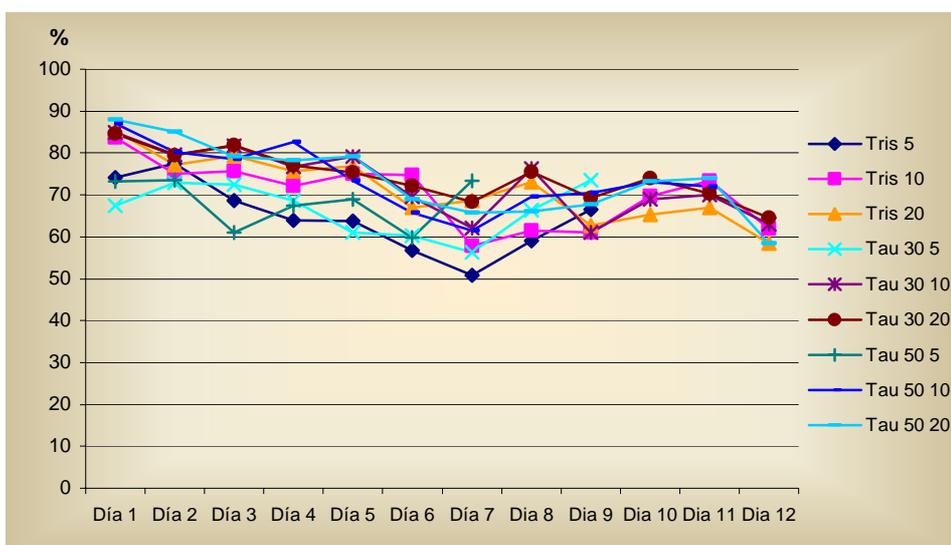
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12
<b>Tris 5</b>	87,60± 10,41	80,50± 4,35	68,20± 15,84 <sup>a</sup>	62,00± 14,67 <sup>a</sup>	55,00± 18,71	49,40± 20,92	52,75±8,85	50,75±11,93	38,00±23,49 <sup>abc</sup>	34,00±23,06	52,00	43,00	
<b>Tris 10</b>	93,80± 4,38	84,80± 3,27	74,60±4,16 <sup>ab</sup>	73,40±7,41 <sup>ab</sup>	61,60± 19,80	59,20±26,76	56,80± 30,31	60,75±9,46	56,25±16,34 <sup>bc</sup>	50,25±19,10	42,75±21,73	39,75±27,94	43,00±19,05
<b>Tris 20</b>	91,80± 4,97	86,60± 4,98	86,40±10,33 <sup>b</sup>	78,60± 7,54 <sup>b</sup>	80,80± 9,91	75,50± 12,78	68,20± 26,18	61,00± 29,14	67,50±20,22 <sup>c</sup>	56,75±20,45	56,50±22,71	48,63±20,18	38,50±16,90
<b>Tau 30 5</b>	96,40±2,07	89,80± 6,22	75,00± 17,89 <sup>ab</sup>	73,40± 12,74 <sup>ab</sup>	71,00± 26,12	58,20± 28,77	65,25±9,43	48,00±15,12	29,00±21,23 <sup>ab</sup>	25,00± 19,52	25,00± 24,04 (n=2)	34,00	26,00
<b>Tau 30 10</b>	95,20± 2,59	86,60±8,88	84,80 ± 6,72 <sup>b</sup>	79,40±10,74 <sup>b</sup>	76,20± 13,86	69,90± 16,22	68,00±28,26	60,00± 25,5	64,75±16,56 <sup>c</sup>	59,25±18,54	48,75±22,38	36,00±23,24	33,77±10,97
<b>Tau 30 20</b>	96,40± 2,07	89,60± 2,93	86,60±4,72 <sup>b</sup>	82,80± 7,69 <sup>b</sup>	78,00± 15,36	70,50± 16,09	65,40± 24,21	63,20± 26,38	69,00± 17,64 <sup>c</sup>	61,75±23,03	61,25± 24,17	51,50± 25,62	43,50±23,16
<b>Tau 50 5</b>	92,80± 6,38	84,20± 7,70	75,40± 16,12 <sup>ab</sup>	73,40± 12,62 <sup>ab</sup>	64,20± 19,82	54,60± 19,91	48,75±20,90	36,00±24,04	22,00±19,15 <sup>a</sup>	42,00	31,00	29,00	21,00
<b>Tau 50 10</b>	97,00± 1,00	88,40± 2,61	82,80± 2,50 <sup>ab</sup>	78,20± 6,46 <sup>b</sup>	75,20± 14,15	64,40± 20,46	60,00± 27,80	59,75± 9,91	46,50± 16,22 <sup>abc</sup>	30,00±18,64	30,33±16,86	24,50 ± 21,90(n=2)	46,00
<b>Tau 50 20</b>	92,60± 5,27	89,20± 4,87	90,20± 3,43 <sup>b</sup>	86,60± 6,27 <sup>b</sup>	81,80± 17,14	78,60± 12,54	72,40± 21,29	68,60± 21,43	60,20±25,58 <sup>bc</sup>	66,00±18,01	52,25±22,90	35,75±25,53	25,00±15,52 (n=2)
<b>p</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>0,039</i>	<i>0,033</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>0,024</i>				
<b>5% yema</b>	92,27±7,60	84,83±6,90	72,86±15,78 <sup>a</sup>	69,70±13,53 <sup>a</sup>	63,40±21,28 <sup>a</sup>	54,06±22,10 <sup>a</sup>	55,60±14,80 (n=2)	44,92±7,60 <sup>a</sup>	84,80±6,90 <sup>a</sup>	31,28±18,60 <sup>a</sup>	33,25±18,89	35,33±7,09	23,50±3,50 (n=2)
<b>10% yema</b>	95,33±3,08	86,60±5,46	80,73±6,36 <sup>b</sup>	77,00±8,23 <sup>ab</sup>	71,00±16,48 <sup>a</sup> b	65,80±20,57 <sup>a</sup> b	61,60±27,11	60,15±16,24 <sup>ab</sup>	55,83±16,73 <sup>b</sup>	46,50±21,24 <sup>ab</sup>	41,55±20,19	35,20±22,99	39,43±13,83
<b>20% yema</b>	88,47±4,27	87,73±6,60	82,66±7,47 <sup>b</sup>	80,20±90,98 <sup>b</sup>	74,90±13,31 <sup>b</sup>	68,66±22,39 <sup>b</sup>	64,26±24,15	64,27±24,15 <sup>b</sup>	65,15±20,37 <sup>b</sup>	61,50±19,04 <sup>b</sup>	56,66±21,39	45,29±22,7	36,63±18,85
<b>p</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>0,002</i>	<i>0,004</i>	<i>0,029</i>	<i>0,017</i>	<i>ns</i>	<i>0,045</i>	<i>&lt;0,001</i>	<i>0,011</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<b>Tau 0 mM</b>	91,07±7,12 <sup>a</sup>	83,97±4,74 <sup>a</sup>	76,40±12,96	71,40±11,98	65,80±19,19	61,36±22,37	59,71±23,61	57,77±19,09	53,92±22,27	48,18±20,8	49,88±20,45	44,05±21,57	40,43±16,42
<b>Tau 30 mM</b>	96,00±2,17 <sup>b</sup>	88,67±6,19 <sup>b</sup>	82,13±11,77	78,53±10,60	75,07±18,06	66,23±20,50	57,71±22,57	57,77±2,17	54,25±25,17	50,81±24,79	49,00±24,91	42,67±22,78	37,62±17,60
<b>Tau 50 mM</b>	94,13±4,90 <sup>ab</sup>	87,27±5,54 <sup>a</sup> b	82,80±10,88	79,40±10,03	73,73±15,07	67,20±19,53	61,21±23,97	55,84±22,94	46,08±25,00	47,33±24,08	41,37±21,00	31,57±20,86	28,40±14,84
<b>p</b>	<i>0,039</i>	<i>0,069&gt;0,05</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Media ± desviación típica (%). ns- no significativo.  
Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2.2.4. Efectos de los aminoácidos y de la yema de huevo en la integridad del acrosoma

**Espermatozoides con acrosomas intactos (AN):** A pesar de no observarse diferencias significativas entre los diluyentes utilizados ni en la concentración de Taurina, si se han verificado diferencias en la concentración de yema en los **días 1** (5% vs 10 y 20%;  $p=0,03$ ) y **día 10** (20% vs 10 y 5%;  $p=0,032$ ) (Tabla 4.15).

Gráfica 4.13 - Espermatozoides con acrosomas intactos



**Espermatozoides con acrosomas alterados (AA):** Este parámetro no ha permitido observar diferencia alguna entre los distintos diluyentes, entre las diferentes concentraciones de yema utilizadas, ni entre las concentraciones de Taurina (Tabla 4.16).

Gráfica 4.14 - Espermatozoides con acrosomas alterados

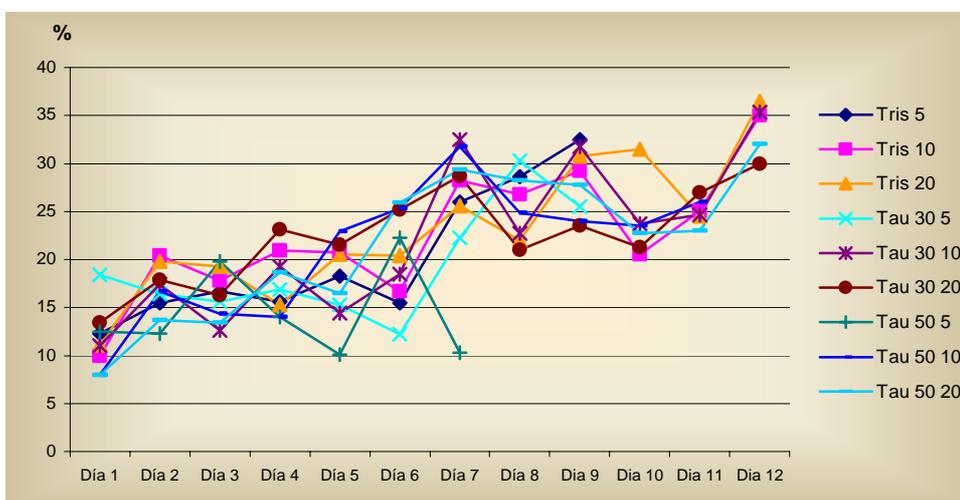


Tabla 4.15 - Espermatozoides con acrosomas intactos

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12
<b>Tris 5</b>	74,10± 10,51	77,50± 12,93	68,70± 15,88	63,90± 23,14	63,70± 18,96	56,80± 25,88	50,80± 13,55	59,00± 37,99 (n=2)	66,50±34,64 (n=2)	80,00	93,00	
<b>Tris 10</b>	83,70± 7,71	75,10± 17,42	75,60± 20,03	72,10± 9,02	75,10± 13,37	74,70±15,0	57,80± 12,84	61,50± 24,28	61,00±16,27	69,75±7,09	73,33±18,23	62,00±28,51
<b>Tris 20</b>	85,40± 9,69	77,20± 14,29	79,30± 11,49	75,70± 7,14	76,90± 5,64	66,90±13,69	68,60± 15,26	73,00± 19,98	62,75±16,07	65,25±20,52	67,00±18,77	58,50±7,55
<b>Tau 30 5</b>	67,50± 21,24	72,90± 20,98	72,40± 19,50	68,70± 24,77	61,10± 29,10	60,30± 26,97	56,30± 16,7	66,30± 30,27	73,50±20,50 (n=2)	95,00	92,00	88,00
<b>Tau 30 10</b>	85,00± 8,21	79,60± 14,33	81,70± 13,84	76,70± 8,71	79,20± 13,31	69,50± 17,36	62,10± 14,59	76,25± 13,96	61,00±16,62	69,00±13,44	70,00±17,09	63,00±29,51
<b>Tau 30 20</b>	84,60± 11,72	79,50± 7,70	81,90± 10,15	77,00± 8,15	75,40± 9,61	72,20± 14,58	68,30± 21,16	75,50± 14,62	69,25±9,95	74,00±10,98	70,25±14,91	64,50±21,42
<b>Tau 50 5</b>	73,20± 21,44	73,50± 19,53	61,10± 27,62	67,50± 28,64	68,90± 24,29	59,75±13,62	73,30± 2,52	90,00	94,00	98,00	94,00	92,00
<b>Tau 50 10</b>	87,00± 9,14	80,20± 16,95	78,54± 13,65	82,60± 10,55	73,40± 13,40	65,80± 19,98	61,50± 21,17	69,63± 20,01	70,50±23,33	73,00±8,49	72,00±28,28 (n=2)	87,00
<b>Tau 50 20</b>	88,00± 7,45	85,10± 8,07	79,20± 18,24	78,20± 6,87	79,10± 7,92	69,10± 18,53	65,80± 19,44	66,00± 22,23	67,75±18,75	73,25±9,03	74,00±16,52	58,50±40,30 (n=2)
<b>p</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>				
<b>5% yema</b>	71,60±17,34 <sup>a</sup>	74,63±16,90	67,40±20,55	66,70±23,81	64,57±22,90	58,90±20,83	58,90±15,22	66,57±30,11	74,80±23,08	91,00±9,64 <sup>a</sup>	58,90±15,20	90,00±2,82 (n=2)
<b>10% yema</b>	85,23±7,87 <sup>b</sup>	78,30±15,26	78,61±15,14	77,13±9,82	75,90±12,62	70,00±16,70	60,57±15,10	69,12±19,04	63,25±15,98	70,10±9,35 <sup>a</sup>	71,75±17,17	66,00±25,44
<b>20% yema</b>	86,00±9,17 <sup>b</sup>	80,60±10,27	80,13±12,8	76,96±6,93	77,13±7,47	69,40±14,43	67,56±14,43	71,50±17,84	66,58±14,20	70,83±13,67 <sup>b</sup>	70,09±15,34	60,90±10,02
<b>p</b>	0,03	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,032	<i>ns</i>	<i>ns</i>						
<b>Tau 0 mM</b>	81,07±10,09	76,60±13,93	74,53±15,65	70,57±14,72	71,90±14,12	66,78±18,34	79,77±10,09	76,60±13,93	74,53±15,65	70,57±14,72	71,90±14,12	66,78±18,34
<b>Tau 30 mM</b>	79,03±16,08	77,33±14,55	78,66±14,62	74,13±15,22	71,90±19,59	67,82±18,76	62,64±17,0	73,27±18,05	67,15±13,96	74,11±13,44	72,87±15,44	66,87±22,78
<b>Tau 50 mM</b>	82,73±14,82	79,60±15,29	72,94±21,01	76,10±17,96	73,80±16,01	65,25±16,81	66,25±16,81	70,28±19,83	72,28±18,97	76,71±11,87	76,67±18,50	74,00±29,43
<b>p</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Media± Desv. Tip. (%). ns- no significativo.

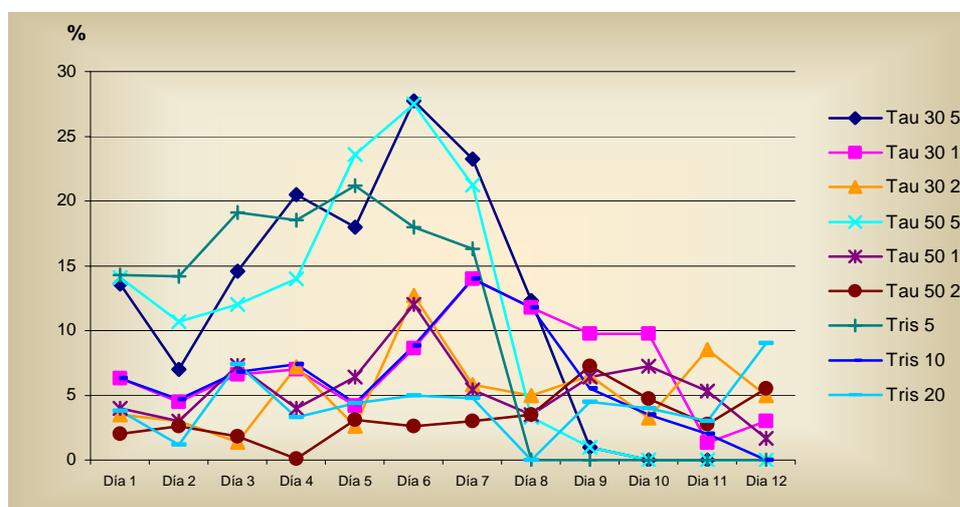
**Tabla 4.16 - Espermatozoides con acrosomas alterados**

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12
<b>Tris 5</b>	12,30±6,52	15,50± 10,68	16,70± 12,16	15,60± 9,15	18,30± 8,48	15,50± 11,03	26,00± 20,94	28,67± 21,83	32,50±36,06 (n=2)	9,00	4,00	
<b>Tris 10</b>	10,00± 5,88	20,40± 15,04	17,80±19,92	20,90± 8,86	20,70± 12,88	16,70± 10,73	28,25± 13,33	26,75± 23,92	29,25±22,47	20,50±13,60	25,03±18,01	35,00±27,51
<b>Tris 20</b>	11,10± 6,31	19,80± 15,99	19,30± 11,97	15,30± 5,87	20,50± 4,56	20,40± 11,06	25,60± 15,14	22,00± 17,65	30,75±18,82	31,50±21,83	24,50±18,08	36,50±8,89
<b>Tau 30 5</b>	18,40± 18,39	16,40± 14,64	15,60± 7,57	16,90± 8,07	15,30± 7,69	12,25±3,95	22,25± 16,54	30,33± 28,57	25,50±21,92 (n=2)	4,00	3,00	12,00
<b>Tau 30 10</b>	11,00±6,48	17,40± 14,59	12,60± 9,21	19,30± 2,54	14,40± 10,16	18,50± 7,23	32,50± 14,38	22,75± 17,95	31,75±22,78	23,75±16,32	24,67±20,53	35,33±27,01
<b>Tau 30 20</b>	13,40± 10,5	17,90± 8,6	16,30± 9,5	23,10± 8,55	21,50± 8,23	25,20± 15,10	28,70± 21,66	21,00± 14,10	23,50±13,48	21,25±14,84	27,00±16,79	30,00±20,31
<b>Tau 50 5</b>	12,50± 9,34	12,30± 11,38	19,80± 8,27	14,00± 7,25	10,10± 7,39	22,25± 10,81	10,33± 15,62	2,00	5,00	2,00	2,00	2,00
<b>Tau 50 10</b>	8,00± 5,83	16,70± 17,49	14,34± 10,09	14,00± 5,66	22,90± 12,63	25,30± 15,60	31,75± 26,40	24,88± 19,34	24,00±28,28	23,50±13,45	26,00±31,10 (n=2)	11,00
<b>Tau 50 20</b>	8,00± 5,24	13,70± 7,59	13,40± 12,26	18,70 ± 4,99	16,50± 7,04	25,90± 17,88	29,40± 20,51	28,25± 20,47	27,75±20,99	22,75±11,08	23,00±19,08	32,00±3,50 (n=2)
<b>p</b>	<i>ns</i>											
<b>5% yema</b>	14,40±11,90	14,70±11,58	17,36±9,03	15,50±7,68	14,56±8,08	16,66±9,39	20,36±17,58	25,57±23,22	24,20±23,90	5,00±3,60	3,00±1,00	7,00±7,07 (n=2)
<b>10% yema</b>	9,80±5,60	18,17±14,68	14,90±13,10	18,07±6,50	19,33±11,67	20,16±11,28	30,96±17,06	24,79±18,67	29,20±20,95	22,40±13,15	25,25±18,75	31,71±24,06
<b>20% yema</b>	10,90±7,43	17,13±10,80	16,33±10,76	19,03±6,98	19,50±0,00	23,80±1,06	27,9±16,96	23,75±16,26	27,33±16,61	25,16±15,67	25,00±16,07	33,00±17,67
<b>p</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>								
<b>Tau 0 mM</b>	11,13±5,86	18,57±13,24	17,93±14,06	17,27±7,95	19,83±8,67	17,68±10,28	26,54±15,23	25,54±19,20	30,50±20,80	24,11±17,62	22,25±16,95	35,86±17,10
<b>Tau 30 mM</b>	14,27±12,26	17,23±11,98	14,83±8,31	19,77±6,94	17,07±8,74	19,10±10,89	28,28±16,97	24,18±18,32	27,20±17,40	20,44±14,90	23,12±17,57	29,75±21,06
<b>Tau 50 mM</b>	9,70±6,70	14,23±11,98	15,85±10,00	15,56±6,04	16,50±10,22	24,64±14,06	25,33±21,77	23,83±19,16	23,43±20,56	20,00±12,43	20,50±20,58	19,25±25,43
<b>p</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>								

Media± Desv. Tip. (%). ns- no significativo.

**Espermatozoides sin acrosoma (SA):** En el análisis diario comparativo entre diluyentes solo se verificaron diferencias significativas en el **día 7** ( $p=0,037$ ), en que el diluyente tris 5 tuvo un porcentaje significativamente superior a tau 30 10, tau 30 20, tau 50 10, tau 50 20, tris 20 (Tabla 4.17). La concentración de yema presenta diferencias significativas los **días 1 y 4 a 7** ( $p=0,001-0,047$ ), donde puede observarse una mejor conservación del acrosoma en los espermatozoides diluidos en medios con 10 y 20% de yema de huevo vs 5%. La concentración de Taurina no presenta significación alguna para este parámetro. Sin embargo, la ausencia de acrosoma tampoco presenta diferencias estadísticamente significativas entre Tris 20 y Tau 30 5 hasta el día 8.

**Gráfica 4.15 - Espermatozoides sin acrosoma**



#### 4.1.2.3. Correlaciones entre los diferentes parámetros evaluados

Los distintos parámetros de calidad espermáticos han sido correlacionados entre sí, mediante un análisis global (días 0 a 12) (Tabla 4.18), y, por otra parte, un análisis seriado, día a día (Tabla 4.19).

##### **a. Análisis global**

Como puede observarse en la tabla 4.18, existe una correlación positiva y altamente significativa ( $p<0,01$ ) entre todos los parámetros de motilidad total y progresiva (tanto visual como computerizada), la respuesta positiva al test de endósmosis y al % de espermatozoides con acrosoma intacto, cuando se analizan los datos obtenidos para cada parámetro de forma global.

Tabla 4.17 - Espermatozoides sin acrosoma

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12
<b>Tau 30 5</b>	13,60±13,05	7,00± 7,68	14,60± 18,38	20,50± 27,39	18,00±22,42	27,75±30,26	23,25± 14,34 <sup>a</sup>	12,33± 18,77	1,00±1,41 (n=2)	11,00	3,00	
<b>Tau 30 10</b>	6,30±5,63	4,50±3,55	6,60± 4,89	7,00± 7,14	4,20±5,26	8,60± 9,59	14,00± 4,69 <sup>abc</sup>	11,75± 13,23	9,75±8,99	9,75±9,54	1,33±2,31	3,00±2,00
<b>Tau 30 20</b>	3,50±4,61	3,00±2,34	1,40±0,65	7,20± 8,35	2,60± 1,95	12,70± 13,66	5,80±5,07 <sup>ab</sup>	5,00±3,37	6,50±4,73	3,25±3,20	8,50±15,02±	5,00±2,94
<b>Tau 50 5</b>	14,10± 24,58	10,70± 20,96	12,00±16,63	14,00± 21,47	23,60± 30,70	27,50± 29,46	21,25± 23,2 <sup>bc</sup>	3,30±2,52	1,00±1,41	1,00	5,00	0,00
<b>Tau 50 10</b>	4,00± 6,86	3,00± 1,23	7,30± 10,39	4,00±7,80	6,40± 6,27	12,00± 13,64	5,40± 5,41 <sup>ab</sup>	3,50±2,38	6,38±7,18	7,25±4,35	5,33±4,16	1,67±2,89
<b>Tau 50 20</b>	2,00± 2,00	2,60±2,20	1,80± 1,10	0,10±0,22	3,10±1,95	2,60±1,82	3,00±3,32 <sup>a</sup>	3,50±2,89	7,25±5,32	4,75±4,79	2,75±2,87	5,50±4,76
<b>Tris 5</b>	14,30± 25,62	14,20± 22,50	19,10± 25,22	18,50± 24,45	21,20± 27,48	18,00 ±16,83	16,33±13,32 <sup>ab</sup>	8,00	1,00	0,00	4,00	6,00
<b>Tris 10</b>	6,30± 5,63	4,70± 3,23	6,80± 9,73	7,40±6,66	4,40± 5,08	8,80± 9,39	14,00±4,69 <sup>ab</sup>	11,75± 13,23	5,50±4,95 (n=2)	3,50±4,95 (n=2)	2,00±2,83(n=2)	2,00
<b>Tris 20</b>	3,80± 4,76	1,20±1,64	7,40±14,41	3,30±4,99	4,40± 4,16	5,00±2,92	4,80± 4,50 <sup>a</sup>	5,70± 7,57	4,50±7,68	4,00±5,42	3,00±2,65	9,00±4,24 (n=2)
<b>p</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,037	<i>ns</i>				
<b>5% yema</b>	14,00±20,20 <sup>a</sup>	10,63±17,20	15,23±19,10	17,80±22,8 <sup>b</sup>	20,90±25,20 <sup>b</sup>	24,40±24,20 <sup>b</sup>	20,60±16,34 <sup>b</sup>	7,85±11,82	1,00±1,00	4,00±6,1	4,00±1,00	3,00±4,24 (n=2)
<b>10% yema</b>	4,96±6,35 <sup>ab</sup>	3,50±2,80	7,00±10,9	4,80±6,70 <sup>a</sup>	4,76±5,14 <sup>a</sup>	9,83±10,38 <sup>a</sup>	8,46±6,19 <sup>a</sup>	6,90±8,29	7,55±7,11	7,50±6,70	3,00±3,38	2,28±2,13
<b>20% yema</b>	3,10±3,80 <sup>b</sup>	2,67±2,05	3,53±8,23	3,53±6,00 <sup>a</sup>	3,67±2,70 <sup>a</sup>	6,75±8,75 <sup>a</sup>	4,50±4,20 <sup>a</sup>	4,80±3,50	6,08±5,60	4,00±4,17	4,90±8,92	6,00±3,80
<b>p</b>	0,047	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,015	0,004	0,012	0,001	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<b>Tau 0 mM</b>	7,80±9,12	4,80±4,97	7,53±12,49	11,56±17,07	8,26±14,27	15,53±19,08	13,69±11,04	9,45±11,78	6,70±6,78	7,00±7,12	5,12±10,56	4,14±2,60
<b>Tau 30 mM</b>	6,70±14,74	5,43±11,92	7,03±11,35	6,16±13,72	11,03±19,18	13,07±19,10	9,07±14,19	3,45±2,33	5,60±5,74	5,44±4,47	4,00±3,20	3,75±4,17
<b>Tau 50 mM</b>	7,56±15,34	6,17±13,56	11,20±18,28	8,40±15,59	9,76±17,22	10,10±11,20	8,33±8,51	5,88±4,10	4,28±5,99	3,28±4,57	2,80±2,23	6,50±4,12
<b>p</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Media ± desviación típica (%) (los datos con valor 0 para éste parámetro han sido tomados en cuenta ya que forman parte de la suma entre AN + AA + SA para obtener el porcentaje total de acrosomas). ns- no significativo. Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Tabla 4.18 - Coeficientes de correlación - análisis global

	MTV	MPV	MTC	MPC	TE	AN
<b>MTV</b>		0,960**	0,859**	0,726**	0,976**	0,189**
n	492	492	252	252	491	430
<b>MPV</b>	0,960**		0,833**	0,703**	0,942**	0,226**
n	492	492	252	252	491	430
<b>MTC</b>	0,859**	0,833**		0,848**	0,855**	0,198**
n	252	252	252	252	252	207
<b>MPC</b>	0,726**	0,703**	0,848**		0,734**	0,216**
n	252	252	252	252	252	207
<b>TE</b>	0,976**	0,942**	0,855**	0,734**		0,166**
n	491	491	252	252	491	430
<b>AN</b>	0,189**	0,226**	0,198**	0,216**	0,166**	
n	430	430	207	207	430	430

\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

### b. Análisis seriado

Hemos establecido las correlaciones entre los porcentajes de motilidad y la respuesta positiva al test de endósmosis (Tabla 4.19). Se observa una elevada correlación entre los mencionados parámetros con excepción del **día 0**, en que la motilidad total computerizada no presenta correlación con los parámetros visuales ni con el test de endósmosis. Además, en este mismo día, en el **día 2** y en el **día 10**, tampoco hay correlación entre ambas motilidades progresivas. El resto de los días existe una alta correlación significativa entre los parámetros mencionados. No se han observado correlaciones entre los acrosomas normales y el resto de los parámetros.

Tabla 4.19 - Coeficientes de correlación - análisis seriado

	MTV.0	MPV.0	MTC.0	MPC.0	TE.0
<b>MTV.0</b>		0,830**	-,058	0,371**	0,608**
n	45	45	45	45	45
<b>MPV.0</b>	0,830**		,100	,247	0,464**
n	45	45	45	45	45
<b>MTC.0</b>	-,058	,100		0,561**	-,049
n	45	45	45	45	45
<b>MPC.0</b>	0,371**	,247	0,561**		0,318**
n	45	45	45	45	45
<b>TE.0</b>	0,608**	0,464**	-,049	0,318**	
n	45	45	45	45	45
	MTV.1	MPV.1	TE.1		
<b>MTV.1</b>		0,644**	0,733**		
n	45	45	45		
<b>MPV.1</b>	0,644**		0,329*		
n	45	45	45		
<b>TE.1</b>	0,733**	0,329*			
n	45	45	45		

Tabla 4.19 - Coeficientes de correlación - análisis seriado (cont.)

	MTV.2	MPV.2	MTC.2	MPC.2	TE.2
MTV.2		0,980**	0,482**	0,321*	0,935**
n	45	45	45	45	45
MPV.2	0,980**		0,433**	,247	0,930**
n	45	45	45	45	45
MTC.2	0,482**	0,433**		0,783**	0,578**
n	45	45	45	45	45
MPC.2	0,321*	,247	0,783**		0,400**
n	45	45	45	45	45
TE.2	0,935**	0,930**	0,578**	0,400**	
n	45	45	45	45	45
	MTV.3	MPV.3	TE.3		
MTV.3		0,894**	0,897**		
n	45	45	45		
MPV.3	0,894**		0,850**		
n	45	45	45		
TE.3	0,897**	0,850**			
n	45	45	45		
	MTV.4	MPV.4	MTC.4	MPC.4	TE.4
MTV.4		0,970**	0,784**	0,557**	0,944**
n	45	45	45	45	45
MPV.4	0,970**		0,737**	0,534**	0,917**
n	45	45	45	45	45
MTC.4	0,784**	0,737**		0,818**	0,773**
n	45	45	45	45	45
MPC.4	0,557**	0,534**	0,818**		0,613**
n	45	45	45	45	45
TE.4	0,944**	0,917**	0,773**	0,613**	
n	45	45	45	45	45
	MTV.5	MPV.5	TE.5		
MTV.5		0,974**	0,968**		
n	45	45	45		
MPV.5	0,974**		0,947**		
n	45	45	45		
TE.5	0,968**	0,947**			
n	45	45	45		
	MTV.6	MPV.6	MTC.6	MPC.6	TE.6
MTV.6		0,968**	0,825**	0,576**	0,968**
n	42	42	42	42	42
MPV.6	0,968**		0,761**	0,532**	0,941**
n	42	42	42	42	42
MTC.6	0,825**	0,761**		0,874**	0,831**
n	42	42	42	42	42
MPC.6	0,576**	0,532**	0,874**		0,596**
n	42	42	42	42	42
TE.6	0,968**	0,941**	0,831**	0,596**	
n	42	42	42	42	42
	MTV.7	MPV.7	TE.7		
MTV.7		0,958**	0,965**		
n	40	40	40		
MPV.7	0,958**		0,934**		
n	40	40	40		
TE.7	0,965**	0,934**			
n	40	40	40		
	MTV.8	MPV.8	MTC.8	MPC.8	TE.8
MTV.8		0,965**	0,643**	0,543**	0,983**
n	36	36	31	31	36
MPV.8	0,965**		0,585**	0,433*	0,957**
n	36	36	31	31	36
MTC.8	0,643**	0,585**		0,741**	0,598**
n	31	31	31	31	31
MPC.8	0,543**	0,433*	0,741**		0,496**
n	31	31	31	31	31
TE.8	0,983**	0,957**	0,598**	0,496**	
n	36	36	31	31	36

Tabla 4.19 - Coeficientes de correlación - análisis seriado (cont.)

	MTV.9	MPV.9	TE.9		
<b>MTV.9</b>		0,958**	0,957**		
<b>n</b>	31	31	31		
<b>MPV.9</b>	0,958**		0,915**		
<b>n</b>	31	31	31		
<b>TE.9</b>	0,957**	0,915**			
<b>n</b>	31	31	31		
	MTV.10	MPV.10	MTC.10	MPC.10	TE.10
<b>MTV.10</b>		0,846**	0,880**	0,463*	0,963**
<b>n</b>	28	28	25	25	27
<b>MPV.10</b>	0,846**		0,745**	0,285	0,820**
<b>n</b>	28	28	25	25	27
<b>MTC.10</b>	0,880**	0,745**		0,547**	0,844**
<b>n</b>	25	25	25	25	25
<b>MPC.10</b>	0,463*	0,285	0,547**		0,452*
<b>n</b>	25	25	25	25	25
<b>TE.10</b>	0,963**	0,820**	0,844**	0,452*	
<b>n</b>	27	27	25	25	27
	MTV.11	MPV.11	TE.11		
<b>MTV.11</b>		0,875**	0,958**		
<b>n</b>	25	25	25		
<b>MPV.11</b>	0,875**		0,844**		
<b>n</b>	25	25	25		
<b>TE.11</b>	0,958**	0,844**			
<b>n</b>	25	25	25		
	MTV.12	MPV.12	MTC.12	MPC.12	TE.12
<b>MTV.12</b>		0,912**	0,911**	0,795**	0,958**
<b>n</b>	20	20	19	19	20
<b>MPV.12</b>	0,912**		0,817**	0,656**	0,909**
<b>n</b>	20	20	19	19	20
<b>MTC.12</b>	0,911**	0,817**		0,903**	0,881**
<b>n</b>	19	19	19	19	19
<b>MPC.12</b>	0,795**	0,656**	0,903**		0,804**
<b>n</b>	19	19	19	19	19
<b>TE.12</b>	0,958**	0,909**	0,881**	0,804**	
<b>n</b>	20	20	19	19	20

\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

\* La correlación es significante al nivel 0,05 (bilateral)



#### **4.1.3. Experimento 1.3. Evaluación del estado de capacitación de los espermatozoides a lo largo del periodo de refrigeración en el diluyente suplementado por taurina 30 y 50 mM, mediante la prueba de tinción con clortetraciclina**

Hemos seleccionado del experimento anterior los diluyentes suplementados con 20% de yema, porque a pesar de no mostrar diferencias significativas entre sí, cuando se estudiaron los parámetros de motilidad mediante medición computerizada, proporcionaron los mejores resultados en los experimentos anteriores. El diluyente Tris-20% yema se mantuvo como control. Los resultados obtenidos tras la tinción con CTC del semen refrigerado se presentan en la tabla 4.21; mientras que en la tabla 4.22. se presentan los resultados de los parámetros de motilidad.

Se utilizaron 6 eyaculados que analizados visualmente, *in situ*, presentaban una motilidad progresiva entre 75 y 85%, las formas anormales oscilaron entre el 12 y el 17 % y la concentración entre 800 y 1100×10<sup>6</sup> espermatozoides por eyaculado. Los eyaculados de menor concentración se unieron 2 a 2 con otros de mayor concentración para constituir 3 pools.

Los resultados del test de CTC son presentados en función de los distintos patrones de distribución de la CTC fluorescente; Patrón F: espermatozoide no capacitado con acrosoma intacto; Patrón B: espermatozoide capacitado con acrosoma intacto y Patrón AR: espermatozoide capacitado con acrosoma reactivo (Ward y Storey, 1984; DasGupta y *col.*, 1993).

En esta prueba se observaron diferencias significativas (Tablas 4.20 y 4.22) en el patrón B del día 9, en el que Tau 30 presenta porcentajes significativamente mayores que Tris y en el patrón AR de los días 3 y 9, en los que Tau 30 (día 3), Tau 50 y Tris (día 9) presentan porcentajes significativamente superiores a los demás. Los resultados de esta prueba evidencian que el patrón F disminuye a lo largo del experimento en todas las muestras, mientras que los patrones B y AR evidencian un aumento. Sin embargo, el patrón AR que aumenta gradualmente a lo largo del experimento demuestra un descenso del día 6 al día 9, en incremento del patrón B.

Tabla 4.20 - Resultados del test de CTC

		Patrón F	Patrón B	Patrón AR
<b>Día 0</b>	Tris	58,33±4,04	37,33±3,21	4,33±3,21
	Tau 30	62,00±1,73	35,33±1,15	2,67±0,58
	Tau 50	62,33±8,33	31,67±5,51	6,00±3,61
<b>Día 3</b>	Tris	23,00±1,00	67,00±3,00	10,00±2,65 <sup>ab</sup>
	Tau 30	24,67±5,51	60,67±7,51	14,67±2,08 <sup>b</sup>
	Tau 50	31,00±2,00	62,67±3,06	6,33±1,15 <sup>a</sup>
<b>Día 6</b>	Tris	6,67±2,52	72,67±9,45	21,00±10,54
	Tau 30	6,00±3,61	71,33±8,39	22,67±6,51
	Tau 50	6,00±4,36	73,33±8,50	20,67±7,09
<b>Día 9</b>	Tris	4,67±2,52	78,67±6,43 <sup>a</sup>	16,67±4,51 <sup>b</sup>
	Tau 30	2,67±0,58	89,67±1,53 <sup>b</sup>	7,67±1,15 <sup>a</sup>
	Tau 50	4,33±0,58	83,33±0,58 <sup>ab</sup>	12,33±0,58 <sup>ab</sup>

Media ± Desviación típica (n=3). Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

A pesar de no existiren diferencias significativas en los parámetros de motilidad estudiados, la motilidad total del día 6 para Tau 30 presenta valores casi significativamente superiores a Tau 50 ( $p=0,054$ ), y la MP del mismo día presenta valores para Tris y Tau 30 casi significativamente superiores a Tau 50 ( $p= 0,055$ ). A pesar de la ausencia de significación estadística, del día 6 y al día 9 parece presentarse un incremento de los valores para la mayor parte de parámetros, excepto para MT que presenta los peores valores para Tau 50 y los mejores para Tris. La MT resulta ligeramente superior para Tau30. Por otra parte, también podemos observar que en este día la VCL y ALH son más elevadas para Tau 50 e inferiores para Tris, a diferencia de lo que sucede con VSL, LIN y VAP (Tablas 4.21 y 4.23).

Tabla 4.21 - Parámetros de motilidad del semen refrigerado

		Día 0	Día 3	Día 6	Día 9
<b>MT</b>	Tris	90,10±9,20	71,17±9,60	68,60±10,23 <sup>ab</sup>	75,83±7,92
	Tau 30	88,63±6,57	73,77±8,74	74,77±9,29 <sup>b</sup>	81,07±3,61
	Tau 50	88,43±6,09	71,27±21,06	53,20±5,89 <sup>a</sup>	73,00±10,60
<b>MP</b>	Tris	80,43±6,33	58,87±13,70	55,27±14,15 <sup>b</sup>	37,40±4,79
	Tau 30	81,93±5,74	63,13±9,32	55,73±5,61 <sup>b</sup>	34,23±6,69
	Tau 50	75,33±3,72	58,07±20,24	34,47±6,37 <sup>a</sup>	28,87±3,84
<b>VCL</b>	Tris	157,53±14,01	142,23±10,07	142,27±20,31	142,50±10,54
	Tau 30	169,27±16,93	112,07±24,88	117,90±36,55	146,50±6,12
	Tau 50	148,23±22,71	138,03±2,11	112,27±9,81	152,93±12,65
<b>VSL</b>	Tris	139,43±18,08	102,47±11,73	107,37±21,60	111,60±8,87
	Tau 30	152,57±17,06	93,93±17,97	89,10±31,09	105,63±9,05
	Tau 50	129,17±24,76	99,43±10,17	75,17±2,84	106,30±2,07
<b>VAP</b>	Tris	146,57±16,32	111,67±11,13	115,63±22,24	120,97±7,27
	Tau 30	158,83±18,00	99,00±18,74	95,47±31,33	118,70±1,73
	Tau 50	135,30±24,31	108,47±8,22	84,27±1,72	116,40±2,88
<b>LIN</b>	Tris	88,37±5,28	71,93±3,30	75,20±6,49	78,33±3,25
	Tau 30	90,07±1,54	75,37±8,57	74,80±6,16	72,20±6,75
	Tau 50	86,80±3,32	71,97±6,68	67,37±7,33	69,83±6,38
<b>ALH</b>	Tris	3,20±0,30	4,53±0,42	4,27±0,46	4,10±0,44
	Tau 30	3,30±0,10	3,60±0,92	4,10±0,92	4,37±0,21
	Tau 50	3,30±0,10	4,50±0,53	4,37±0,60	4,93±0,99

Media ± Desviación típica (n=3). \*ver tabla 4.23.

Tabla 4.22 - Diferencias significativas (ANOVA)

Parámetro	Día	p
Patrón AR	3	0,007
Patrón B	9	0,034
Patrón AR	9	0,019

(n=3)

4.23 - Diferencias casi significativas (ANOVA)

Parámetro	Día	p
MT	6	0,054>0,05
MP	6	0,055>0,05

(n=3)

### a. Correlaciones

Se presentan las correlaciones entre parámetros de motilidad computerizada y los patrones de fluorescencia de la CTC (análisis globales, sin tener en cuenta el día, n=36).

Tabla 4.24 - Coeficientes de correlación

	Patrón F	Patrón B	Patrón AR	MT	MP	VCL	VSL	VAP	LIN	ALH	
Patrón F	r		-0,953	-0,656	0,457	0,8	0,408	0,636	0,602	0,687	0,559
	p		<0,001	<0,001	0,003	<0,001	0,014	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Patrón B	r	-0,953		0,398	-0,358	-0,793	-0,300	-0,573	-0,522	-0,712	0,585
	p	<0,001		0,016	0,032	<0,001	0,075	<0,001	0,001	<0,001	<0,001
Patrón AR	r	-0,656	0,398		-0,551	-0,449	-0,488	-0,499	-0,523	-0,310	0,235
	p	<0,001	0,016		0,001	0,006	0,003	0,002	0,001	0,066	0,168

(n=36) r= correlación de Pearson p= significación (bilateral)

De resaltar la significativa correlación entre el patrón B (capacitación y acrosoma intacto) y el parámetro de motilidad ALH ( $p < 0,001$ ), mientras que con los restantes parámetros de motilidad la correlación es negativa.



## 4.2. Experimento 2. Estudio del empleo de etilenglicol como crioprotector en la congelación del espermatozoide de perro

### 4.2.1. Características del semen fresco

Para esta experiencia se procesaron 13 eyaculados procedentes de 10 perros. Las características de los pools de semen fresco se encuentran en la siguiente tabla:

**Tabla 4.25** - Características de los pools frescos

Parámetro	Media
Volumen (mL)	2,90±1,55
Motilidad Total (%)	85,83±4,07
Motilidad progresiva (%)	75,83±3,76
Concentración ( $\times 10^6$ )	379,27±168,11
Morfología normal (%)	89,10±3,50

Media±Desviación típica (n=5)

### 4.2.2 Características tras la descongelación

Dos pajuelas de cada uno de los diluyentes han sido descongeladas, una para realizar el estudio de la motilidad y otra, para análisis por citometría de flujo y tinción con eosina-azul de anilina. Alícuotas de cada pajuela han sido analizadas para la motilidad inmediatamente tras la descongelación y cada 30 minutos de incubación mediante examen visual y por analizador computerizado (SCA<sup>®</sup>). La integridad de la membrana plasmática y acrosomal fue medida inmediatamente a la descongelación y tras 1h:30' de incubación en el baño maría a 38°C, mediante citometría de flujo. Paralelamente, también se realizaron extensiones teñidas con eosina-azul de anilina que fueron posteriormente analizadas para determinar el porcentaje de células vivas, es decir, con membrana plasmática íntegra.

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza factorial (ANOVA) y la prueba post hoc (de comparaciones múltiples de Duncan) para  $p < 0,05$ . Solo fue posible la realización de las pruebas post-hoc hasta las 2h:30' postdescongelación, ya que a partir de este momento disminuía el número de muestras de algunos diluyentes.

Abreviaremos el nombre de los distintos diluyentes en numeración romana (Tabla 4.26).

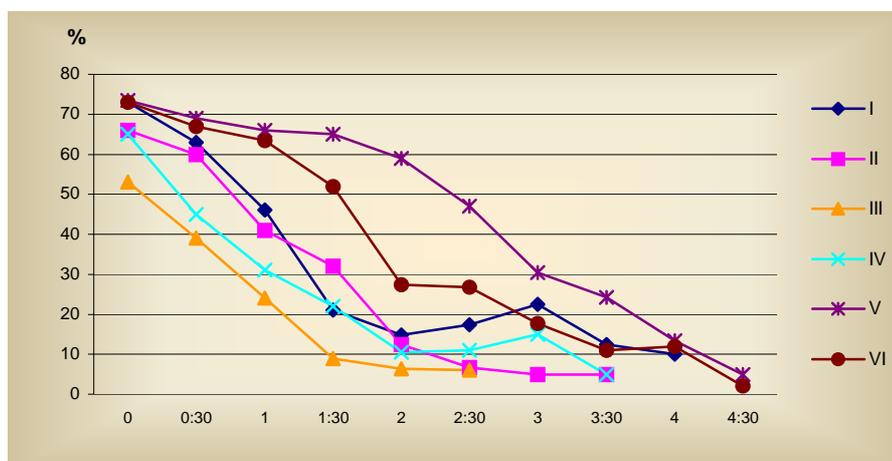
**Tabla 4.26** - Diluyentes de congelación utilizados en el experimento 2

Diluyentes	Abreviatura
Tris-Yema-Ácido Cítrico-8% Glicerol (Noruego)	I
Tris-Yema-Ácido Cítrico-4% Etilenglicol	II
Tris-Yema-Ácido Cítrico-8% Etilenglicol	III
Tris-Yema-Ácido Cítrico- 4% Glicerol + 4% Etilenglicol	IV
Tris-Yema-Ácido Cítrico-5% Glicerol + 0,5% Equex (Uppsala-Equex II)	V
Tris-Yema-Ácido Cítrico-5% Etilenglicol + 0,5% Equex	VI

Tanto el diluyente I como el V se han considerado controles en este experimento. Los resultados para cada parámetro se pueden observar en las siguientes tablas y graficas.

#### 4.2.2.1. Estimación subjetiva de la motilidad

##### a. Motilidad total visual

**Gráfica 4.16** - Motilidad total visual

El diluyente que mejor mantuvo la motilidad total visual (MTV) fue el V, seguido del VI, que no presenta diferencias significativas con el primero hasta las 2h ( $p < 0,001$ ). El diluyente III fue el que peor mantuvo la MTV, seguido del IV. Los diluyentes I y II presentan un comportamiento semejante entre sí. Los diluyentes I, II, V y VI no presentan diferencias entre sí hasta que no se mantienen 1h en incubación.

Tabla 4.27 - Motilidad total visual

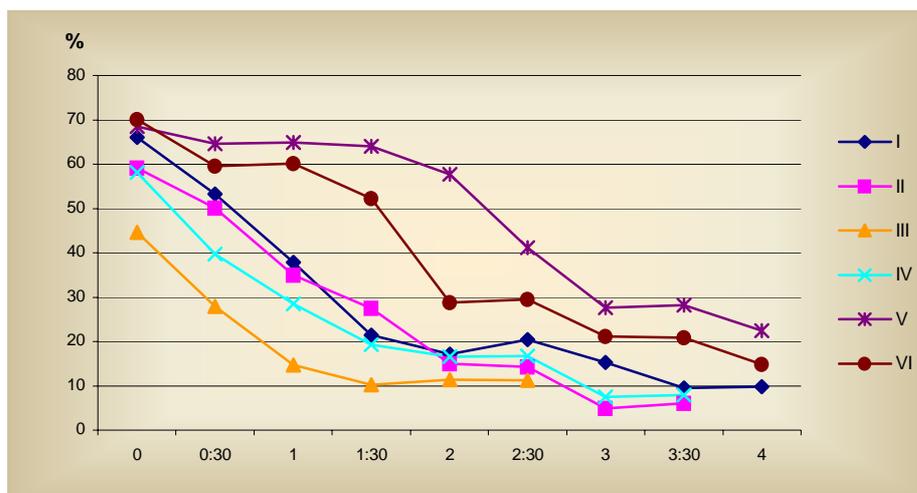
Diluyente	MTV 0	MTV 0:30	MTV 1	MTV 1:30	MTV 2	MTV 2:30
I	73,00±2,74 <sup>b</sup>	63,00±6,71 <sup>b</sup>	46,00±7,42 <sup>bc</sup>	21,00±17,73 <sup>ab</sup>	14,80±14,69 <sup>a</sup>	17,33±16,62 <sup>a</sup>
II	66,00±9,62 <sup>b</sup>	60,00±11,18 <sup>b</sup>	41,00±21,33 <sup>ab</sup>	32,00±18,23 <sup>b</sup>	12,50±9,57 <sup>a</sup>	6,68±4,16 <sup>a</sup>
III	53,00±13,96 <sup>a</sup>	39,00±10,84 <sup>a</sup>	24,00±18,84 <sup>a</sup>	9,00±10,83 <sup>a</sup>	6,33±7,50 <sup>a</sup>	6,00±5,66a (n=2)
IV	65,00±10,00 <sup>b</sup>	45,00±10,61 <sup>a</sup>	31,00±11,94 <sup>ab</sup>	22,00±7,58 <sup>ab</sup>	10,50±10,21 <sup>a</sup>	11,00±12,73a(n=2)
V	73,40±5,50 <sup>b</sup>	69,00±7,42 <sup>b</sup>	66,00±4,18 <sup>d</sup>	65,00±5,00 <sup>c</sup>	59,00±11,40 <sup>b</sup>	47,00±14,83 <sup>b</sup>
VI	73,00±5,70 <sup>b</sup>	67,00±8,37 <sup>b</sup>	63,40±11,84 <sup>cd</sup>	52,00±16,81 <sup>c</sup>	27,40±25,13 <sup>a</sup>	26,75±22,11 <sup>ab</sup>
p	0,008	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,022

Media(%)±Desviación típica. Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ).

#### 4.2.2.2. Análisis computerizado de la motilidad (CASA)

##### a. Motilidad total

Gráfica 4.17 - Motilidad total



Hemos observado diferencias significativas entre los distintos diluyentes, presentando los diluyentes V y VI las mejores motilidades, con excepción de la MT2 donde el V es significativamente superior al VI. El diluyente III fue el que peor mantuvo la MT en todos los momentos analizados. Los diluyentes I y II presentan motilidades bastante semejantes y el IV tiene comportamiento intermedio entre el III y éstos últimos. Al igual que en la apreciación visual de la motilidad, los diluyentes I, II, V y VI tampoco presentan diferencias entre sí hasta que no se mantienen 1h en incubación.

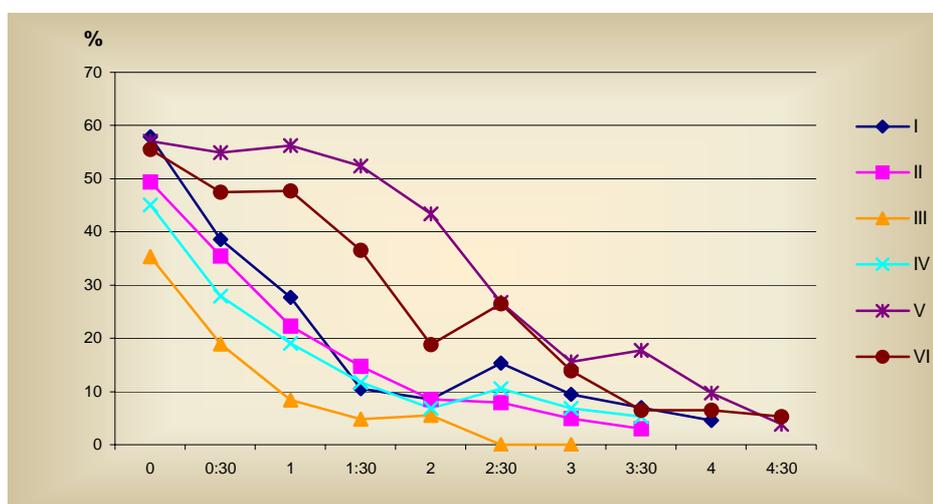
Tabla 4.28 - Motilidad total

	MT 0	MT 0:30	MT 1	MT 1:30	MT 2	MT 2:30
I	66,08±7,53 <sup>b</sup>	53,24±12,59 <sup>bc</sup>	37,80±8,36 <sup>b</sup>	21,40±12,69 <sup>a</sup>	17,06±10,68 <sup>a</sup>	20,40±9,81
II	59,10±12,64 <sup>ab</sup>	50,06±12,74 <sup>bc</sup>	34,92±16,73 <sup>b</sup>	27,54±16,07 <sup>a</sup>	14,95±9,42 <sup>a</sup>	14,30±7,80
III	44,62±11,65 <sup>a</sup>	27,92±13,66 <sup>a</sup>	14,70±9,40 <sup>a</sup>	10,28±7,61 <sup>a</sup>	11,33±9,78 <sup>a</sup>	11,20±7,35(n=2)
IV	58,20±18,15 <sup>ab</sup>	39,66±14,84 <sup>ab</sup>	28,42±9,56 <sup>ab</sup>	19,34±7,93 <sup>a</sup>	16,60±10,98 <sup>a</sup>	16,65±8,41(n=2)
V	68,48±9,56 <sup>b</sup>	64,62±19,81 <sup>c</sup>	64,96±15,36 <sup>c</sup>	63,96±12,63 <sup>b</sup>	57,66±19,99 <sup>b</sup>	41,08±20,99
VI	70,02±5,35 <sup>b</sup>	59,64±15,38 <sup>bc</sup>	60,10±13,19 <sup>c</sup>	52,16±20,60 <sup>b</sup>	28,74±19,55 <sup>a</sup>	29,47±16,60
P	0,044	0,007	<0,001	<0,001	0,001	ns

Media(%)±Desviación típica. ns- no significativo. Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ).

### b. Motilidad progresiva

Gráfica 4.18 - Motilidad progresiva



Si siguiendo la tendencia de la MT, los diluyentes que mejor mantienen la MP han sido el V, seguido del VI. A la 1h:30' y a las 2h la MP del diluyente V es significativamente superior a los restantes diluyentes. La MP del diluyente III fue sistemáticamente la más baja.

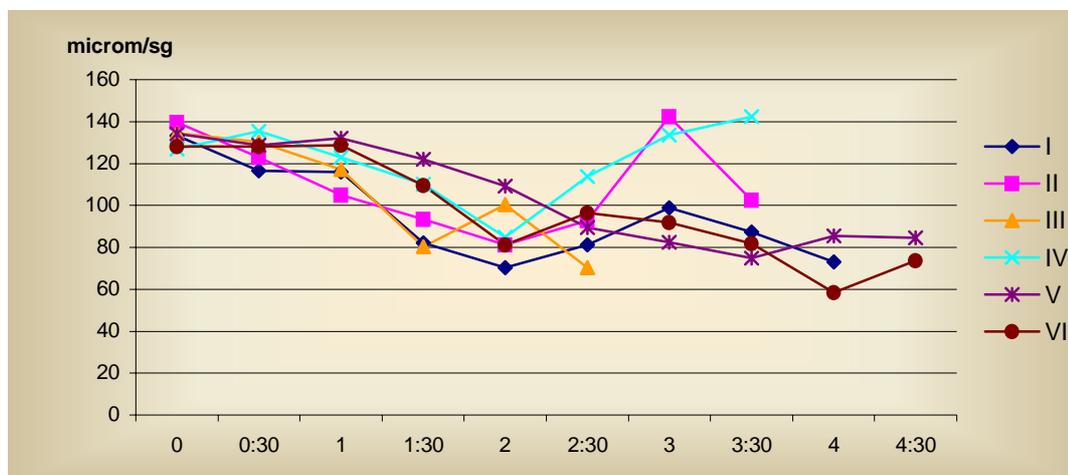
Tabla 4.29 - Motilidad progresiva

	MP 0	MP 0:30	MP 1	MP 1:30	MP 2	MP 2:30
I	57,84±10,65 <sup>b</sup>	38,62±14,58 <sup>abc</sup>	27,66±9,59 <sup>b</sup>	10,68±8,52 <sup>a</sup>	8,48±7,94 <sup>a</sup>	15,35±5,44 (n=2)
II	49,38±14,5 <sup>ab</sup>	35,44±14,18 <sup>abc</sup>	22,32±13,07 <sup>ab</sup>	14,76±8,75 <sup>a</sup>	8,50±6,25 <sup>a</sup>	7,90±5,54
III	35,38±14,42 <sup>a</sup>	18,98±8,66 <sup>a</sup>	8,34±7,54 <sup>a</sup>	7,50±7,33 <sup>a</sup>	4,77±3,57 <sup>a</sup>	5,50±6,08 (n=2)
IV	45,02±14,02 <sup>ab</sup>	27,87±13,88 <sup>ab</sup>	19,08±6,04 <sup>ab</sup>	11,70±4,98 <sup>a</sup>	6,83±5,44 <sup>a</sup>	10,50±4,80 (n=2)
V	57,00±12,65 <sup>b</sup>	54,88±18,61 <sup>c</sup>	56,20±16,02 <sup>c</sup>	52,44±12,29 <sup>c</sup>	43,44±19,77 <sup>b</sup>	26,72±18,04
VI	55,54±6,13 <sup>b</sup>	47,50±18,27 <sup>bc</sup>	47,76±15,43 <sup>c</sup>	36,50±15,38 <sup>b</sup>	18,78±16,89 <sup>a</sup>	26,43±4,05
p	0,062	0,012	<0,001	<0,001	0,002	ns

Media(%)±Desviación típica. ns- no significativo. Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ).

### c. Velocidad curvilínea

Gráfica 4.19 - Velocidad curvilínea



No se han observado diferencias estadísticamente significativas en la motilidad curvilínea (VCL) de los distintos diluyentes ( $p > 0,05$ ).

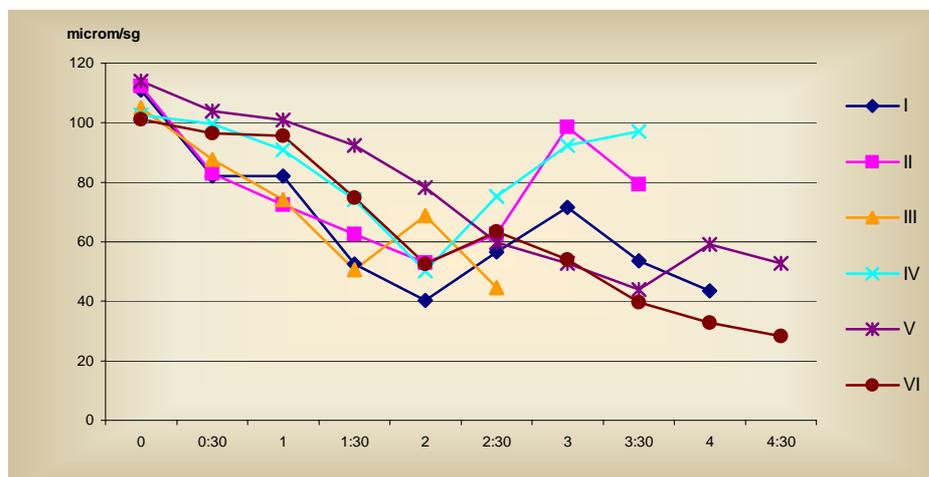
Tabla 4.30 - Velocidad curvilínea

	VCL 0	VCL 0:30	VCL 1	VCL 1:30	VCL 2	VCL 2:30
I	133,24±16,80	116,48±20,98	115,94±18,27	82,18±44,24	70,12±45,94	81,338±58,43
II	139,68±16,89	123,04±17,97	104,94±20,40	93,36±26,81	81,07±44,09	92,70±63,06
III	134,54±14,64	130,24±18,84	117,08±39,44	80,18±40,45	100,43±47,84	70,35±32,17 (n=2)
IV	126,96±14,89	135,44±19,41	123,04±24,01	109,98±20,05	84,85±42,31	113,75±5,44 (n=2)
V	134,26±18,87	128,68±9,87	132,04±10,90	121,84±15,56	109,30±24,91	89,34±24,28
VI	128,14±17,96	128,06±23,55	128,52±23,45	109,48±32,79	81,08±54,95	96,45±58,63

Media( $\mu\text{m/s}$ )±Desviación típica

### d. Velocidad rectilínea

Gráfica 4.20 - Velocidad rectilínea



Tampoco se han observado diferencias estadísticamente significativas en la velocidad rectilínea (VSL) de los distintos diluyentes.

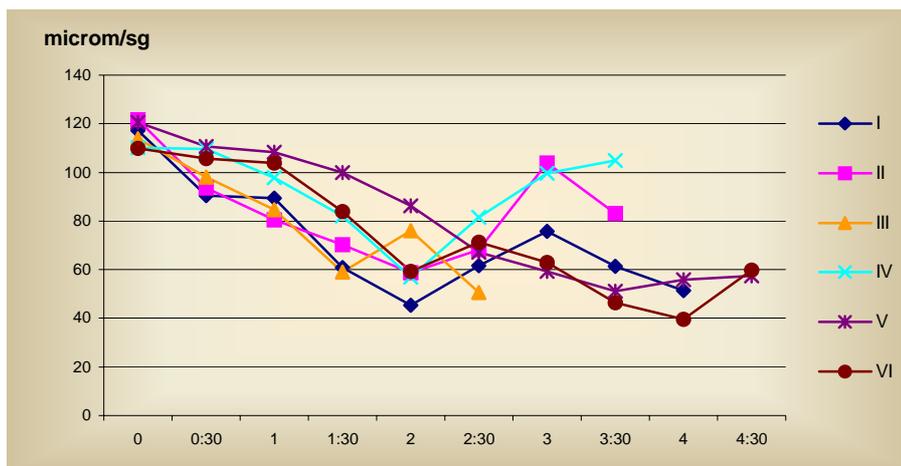
**Tabla 4.31 - Velocidad rectilínea**

	VSL 0	VSL 0:30	VSL 1	VSL 1:30	VSL 2	VSL 2:30
I	111,10±18,14	82,02±18,18	82,10±15,91	52,60±34,1	40,36±34,03	56,67±48,92
II	112,22±24,43	82,86±14,80	72,38±16,14	62,54±26,74	52,95±38,27	62,60±48,16
III	105,08±15,15	87,66±17,46	74,16±30,33	50,52±36,37	68,7±41,48	44,50±24,18 (n=2)
IV	102,74±16,38	99,70±18,14	90,84±20,29	74,24±16,08	50,08±27,5	75,20±11,45 (n=2)
V	113,98±21,66	103,84±11,87	100,98±9,92	92,26±17,64	78,26±23,82	59,86±24,78
VI	101,18±18,74	96,42±20,74	95,50±21,10	74,76±31,96	52,40±40,46	63,45±43,92

Media(µm/s)±Desviación típica

**e. Velocidad promedio**

**Gráfica 4.21 - Velocidad promedio**



La motilidad de promedio (VAP) de los distintos diluyentes, tampoco ha presentado diferencias significativas entre los distintos diluyentes.

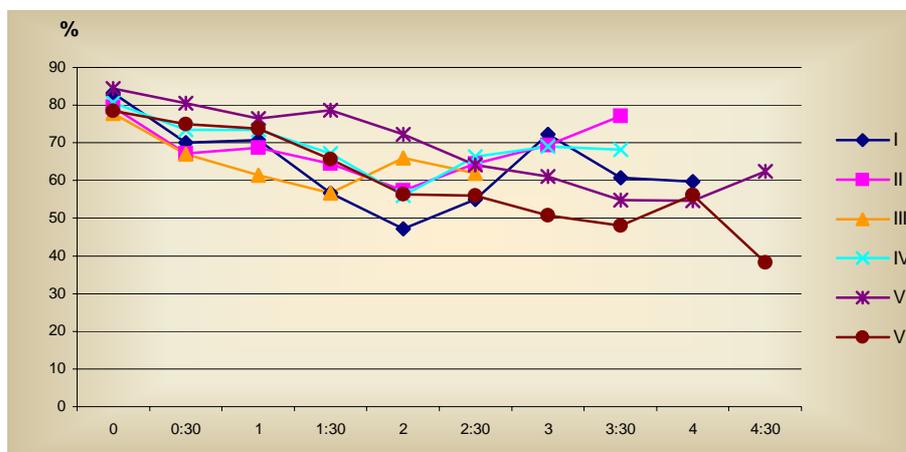
**Tabla 4.32 - Velocidad promedio**

	VAP 0	VAP 0:30	VAP 1	VAP 1:30	VAP 2	VAP 2:30
I	117,06±17,10	90,58±18,35	89,48±15,76	60,90±38,77	45,32±35,76	61,63±50,75
II	121,60±19,05	93,56±15,19	80,58±16,75	70,32±27,09	58,75±39,58	68,23±50,93
III	113,68±14,85	98,04±15,98	84,78±31,55	59,03±37,68	76,10±37,26	50,50±25,46 (n=2)
IV	110,14±14,92	109,68±17,94	97,78±20,67	81,96±14,83	56,83±29,94	81,55±7,99 (n=2)
V	120,58±19,80	110,58±10,32	108,20±9,09	99,98±15,42	86,36±22,56	67,10±24,55
VI	109,98±18,58	105,64±19,49	103,72±20,58	84,02±30,00	59,34±43,89	71,30±47,13

Media(µm/s)±Desviación típica

## f. Índice de linealidad

Gráfica 4.22 - Índice de linealidad



Si se han encontrado diferencias significativas en el índice de linealidad (LIN) a las 0h:30' y 1h postdescongelación, siendo los diluyentes V y VI los que mantuvieron mejor índice de linealidad a las 0h:30' y el V tras 1h.

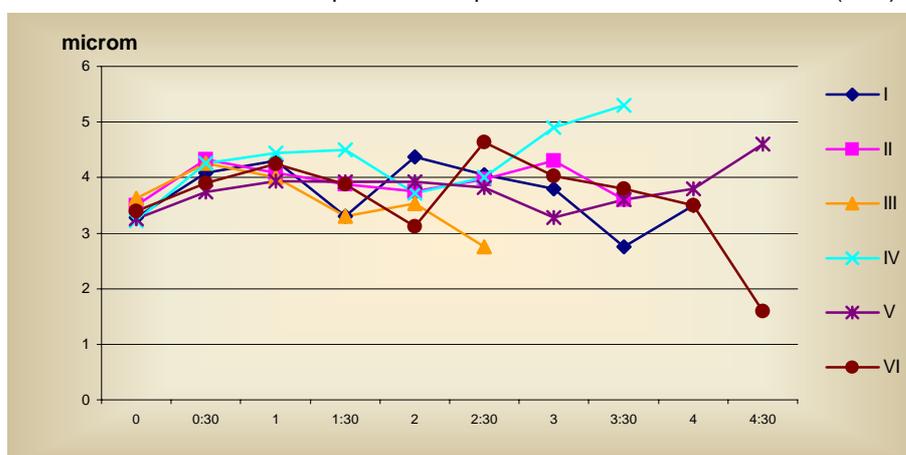
Tabla 4.33 - Índice de linealidad

	LIN 0	LIN 0:30	LIN 1	LIN 1:30	LIN 2	LIN 2:30
I	83,16±4,87	70,04±4,63 <sup>ab</sup>	70,68±7,22 <sup>bc</sup>	56,72±20,54 <sup>ab</sup>	47,12±22,39	55,00±30,80
II	79,56±8,04	67,18±3,46 <sup>a</sup>	68,70±3,43 <sup>b</sup>	64,42±11,75 <sup>ab</sup>	57,43±20,76	64,43±8,00
III	77,88±3,46	66,94±5,47 <sup>a</sup>	61,42±8,94 <sup>a</sup>	56,72±17,58 <sup>a</sup>	65,90±8,00	61,90±6,15 (n=2)
IV	80,72±5,54	73,40±5,78 <sup>ab</sup>	73,48±2,79 <sup>bc</sup>	67,18±2,71 <sup>ab</sup>	55,97±14,30	66,40±13,29 (n=2)
V	84,42±4,55	80,54±4,06 <sup>c</sup>	76,40±1,61 <sup>c</sup>	78,66±9,83 <sup>c</sup>	72,28±10,59	64,12±13,26
VI	78,56±3,86	74,86±4,05 <sup>bc</sup>	73,82±3,40 <sup>bc</sup>	65,66±11,74 <sup>ab</sup>	56,26±19,33	55,92±22,26
<i>p</i>	<i>ns</i>	0,001	0,003	0,097	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Media(%)±Desviación típica. ns- no significativo.

## g. ALH

Gráfica 4.23 - Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH)



No existieron diferencias significativas entre los distintos diluyentes para este parámetro a lo largo de la incubación, tras la descongelación.

Tabla 4.34 - ALH

	ALH 0	ALH 0:30	ALH 1	ALH 1:30	ALH 2	ALH 2:30
I	3,28±0,37	4,08±0,36	4,30±0,63	3,26±1,71	4,38±3,12	4,05±0,07 (n=2)
II	3,50±0,10	4,32±0,22	4,08±0,33	3,88±0,60	3,38±2,11	3,97±0,96
III	3,62±0,26	4,26±0,46	4,00±0,97	3,30±1,09	3,53±1,40	2,75±0,21 (n=2)
IV	3,22±0,24	4,26±0,39	4,44±0,52	4,50±0,59	3,72±1,92	4,00±1,55 (n=2)
V	3,26±0,00	3,74±0,23	3,94±0,29	3,92±0,32	3,92±0,64	3,82±0,80
VI	3,40±0,31	3,90±0,57	4,24±0,11	3,88±0,96	3,12±2,18	4,63±0,51

Media( $\mu$ m)±Desviación típica

#### 4.2.2.3. Longevidad de la motilidad

El diluyente V ha sido el que mantuvo, significativamente, mayor longevidad tras la descongelación ( $p < 0,05$ ), seguido del diluyente VI y este por el I. Los diluyentes II y IV tuvieron una duración semejante, mientras que el diluyente III fue el que tardó menos tiempo en perder su motilidad.

Gráfica 4.24 - Longevidad de la motilidad tras la descongelación en minutos

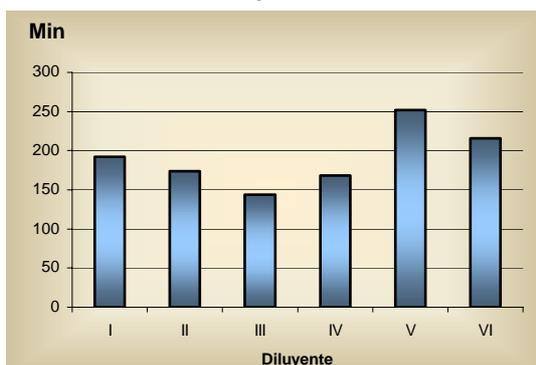


Tabla 4.35 - Longevidad de la motilidad tras la descongelación en minutos

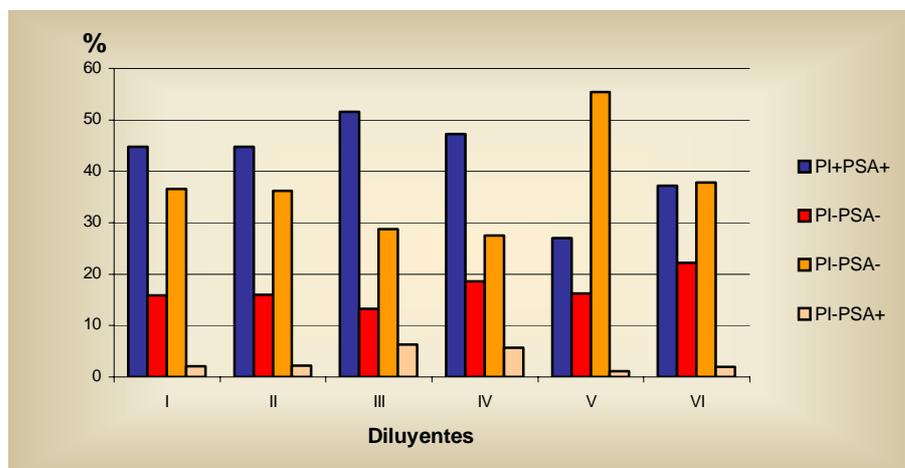
Diluyente	Duración
I	186,00±65,04 <sup>ab</sup>
II	168,00±50,20 <sup>a</sup>
III	144,00±39,12 <sup>a</sup>
IV	168,00±45,50 <sup>a</sup>
V	252,00±40,30 <sup>b</sup>
VI	216,00±57,70 <sup>ab</sup>
<b>p</b>	<b>0,031</b>

Media±Desviación típica(n=5). Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2.4. Viabilidad e integridad del acrosoma determinada mediante citometría de flujo

La integridad de las membranas plasmática y acrosómica ha sido evaluada mediante marcaje con los fluorocromos PI-Fitc-PSA.

**Gráfica 4.25** - Porcentaje de espermatozoides según la viabilidad e integridad del acrosoma (T0)



Tras la descongelación (T0) el diluyente que menor número de espermatozoides muertos con acrosoma dañado (PI<sup>+</sup>PSA<sup>+</sup>) presentó fue el V ( $p=0,018$ ), seguido del VI. Tras 1h30' (T1:30) de incubación no se observaron diferencias significativas entre los distintos diluyentes. En cuanto al mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática y del acrosoma (PI<sup>-</sup>PSA<sup>-</sup>), han existido diferencias estadísticamente significativas en T0 ( $p=0,014$ ), el diluyente V con mayor número de espermatozoides vivos y acrosoma intacto *versus* los demás. A T1:30 no se observaron diferencias significativas.

No existieron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma intacto, pero sí en los vivos con acrosoma reaccionado o dañado por el proceso de congelación-descongelación (diluyentes III y IV con mayor porcentaje) en ambos tiempos estudiados ( $p<0,001$  y  $0,05$ , respectivamente). El porcentaje de células vivas (PI<sup>-</sup>) resulta con diferencias casi significativas ( $p=0,06$ ) entre el diluyente V y los demás a T0.

**Tabla 4.36** - Porcentaje de espermatozoides en relación con su viabilidad y estado acrosomal, en función de la preservación de sus membranas

Diluyente	PI+PSA+		PI+PSA-		PI-PSA-		PI-PSA+		TOTAL PI-	
	T 0	T 1:30	T 0	T 1:30	T 0	T 1:30	T 0	T 1:30	T 0	T 1:30
I	44,8±5,2 <sup>b</sup>	42,6±9,1	15,9±3,5	22,8±13,4	36,5±12,1 <sup>a</sup>	30,3±12,9	2,1±1,0 <sup>a</sup>	2,8±2,2 <sup>ab</sup>	38,6±11,9	33,1±12,5
II	44,7±11,7 <sup>b</sup>	46,1±10,6	15,9±4,2	20,5±3,6	36,1±11,9 <sup>a</sup>	28,8±11,9	2,2±0,8 <sup>a</sup>	3,0±0,8 <sup>ab</sup>	38,3±13,3	31,8±11,6
III	51,6±19,3 <sup>b</sup>	53,8±19,4	13,2±6,4	14,4±6,8	28,7±14,3 <sup>a</sup>	25,9±19,2	6,3±1,9 <sup>b</sup>	4,7±2,3 <sup>b</sup>	35,0±15,6	30,6±18,7
IV	47,2±7,7 <sup>b</sup>	46,3±8,8	18,6±0,6	22,7±4,3	27,5±8,6 <sup>a</sup>	26,4±7,9	5,7±2,2 <sup>b</sup>	3,1±1,4 <sup>ab</sup>	33,2±7,4	29,5±8,7
V	27,0±5,9 <sup>a</sup>	33,6±5,3	16,3±4,0	21,0±3,5	55,4±10,9 <sup>b</sup>	43,3±6,6	1,2±0,6 <sup>a</sup>	1,5±1 <sup>a</sup>	56,9±10,7	44,8±6,7
VI	37,2±6,3 <sup>ab</sup>	41,2±6,2	22,2±4,9	24,7±6,1	37,8±11,0 <sup>a</sup>	31,2±9,6	2,0±0,9 <sup>a</sup>	2,0±0,1 <sup>a</sup>	39,9±10,9	33,3±10,1
<b>P</b>	<b>0,018</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>	<b>ns</b>	<b>0,014</b>	<b>ns</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,05</b>	<b>0,06&gt;0,05</b>	<b>ns</b>

Media(%)±Desviación típica (n=5). ns- no significativo. *Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ).*

#### 4.2.2.5. Porcentaje de espermatozoides vivos mediante tinción con eosina-azul de anilina

El mayor porcentaje de espermatozoides vivos, en ambos tiempos analizados, fue observado en los espermatozoides que habían sido previamente congelados con el diluyente V; sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas con los demás grupos ( $p=0,094>0,05$  a T0).

Gráfica 4.26 - Espermatozoides vivos

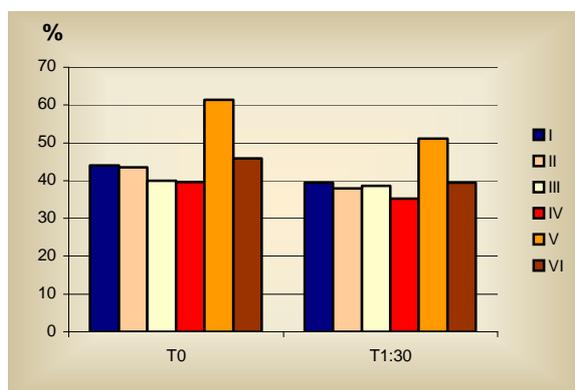


Tabla 4.37 - Espermatozoides vivos

Diluyente	Vivos- Eosina AA (%)	
	T 0*	T 1:30
I	44,00±11,28	31,40±10,98
II	43,60±11,90	38,00±10,18
III	40,00±15,30	38,60±15,33
IV	39,60±7,06	35,20±8,01
V	61,40±8,68	51,10±5,73
VI	45,80±9,66	39,40±9,09
<i>p</i>	0,094>0,05	ns

Media (%)±Desviación típica (n=5). ns- no significativo.

#### 4.2.2.6. Correlaciones entre los parámetros evaluados

##### a. Motilidad visual y computerizada

Han existido correlaciones altas y significativas entre la MTV y la MTcompt (determinada por analizador computerizado) y entre MTcompt y MPcompt.

Tabla 4.38 - Coeficientes de correlación entre MTV y MTcompt

MTV con MT	T0	T0:30	T1	T1:30	T2	T2:30
n	30	30	30	29	26	19
r	0,906*	0,909*	0,915*	0,942*	0,956**	0,901*

Tabla 4.39 - Coeficiente de correlación entre MT compt y MP compt

MT con MP	T0	T0:30	T1	T1:30	T2	T2:30
n	30	30	30	28	25	17
r	0,934*	0,961*	0,972*	0,948*	0,975*	0,955*

\*Correlación significativa al nivel 0,01\*\* Correlación significativa al nivel 0,05

**b. Vivos determinados por eosina-azul anilina y por citometría de flujo**

La correlación entre los porcentajes de células vivas obtenidos por citometría de flujo y por eosina-azul de anilina fue elevada y significativa en ambos los tiempos analizados.

**Tabla 4.40** - Coeficientes de correlación entre % vivos obtenidos por CF y % vivos obtenidas por E-AA

<b>T0</b>	Vivos (eosina)	<b>T1:30</b>	Vivos (eosina)
Vivos (PI-)	0,992*	Vivos (PI-)	0,986*

\*Correlación significativas al nivel 0,01; n=30



### 4.3. Experimento 3. Interrelaciones entre la evaluación de la funcionalidad espermática mediante marcaje con Rodamina-PI y los parámetros clásicos de evaluación de la calidad espermática

En este experimento se examinó la interrelación entre las evaluaciones por citometría de flujo de la calidad espermática utilizando marcadores de viabilidad y funcionalidad mitocondrial (PI asociado a la Rodamina 123) y los parámetros de calidad espermática utilizados por rutina.

#### 4.3.1. Características del semen fresco

Para la realización de este experimento hemos procesado 10 eyaculados provenientes de 8 perros, agrupados de 2 en 2 para constituir 5 pools; cada uno de los cuales fue dividido en 3 alícuotas para obtener los estados de muestra viva, muestra muerta y muestra 50% viva-50% muerta.

**Tabla 4.41** - Características de los pools frescos

Parámetro	Media
Volumen (mL)	2,03±1,27
Motilidad total (%)	84,30±4,04
Motilidad progresiva (%)	77,10± 2,10
Concentración ( $\times 10^6$ )	485,41±91,56
Morfología normal (%)	87,50±5,30

Media  $\pm$  desviación típica (n=5)

#### 4.3.2. Características de las distintas alícuotas en función de su motilidad y de las tinciones realizadas para observar su vitalidad y su estado mitocondrial

Hemos realizado un marcaje de cada alícuota con los fluorocromos PI, Rodamina y su asociación, evaluadas por citometría de flujo; así como, el examen visual de la motilidad y la vitalidad (% de células vivas) mediante tinción con eosina-nigrosina. Los análisis de citometría de flujo evidencian que las muestras de semen *100% muestra viva* presentan elevados porcentajes de membranas plasmáticas intactas y mitocondrias funcionales y a su vez, reducidos porcentajes de espermatozoides muertos con mitocondrias no funcionales. Lo inverso ocurre con muestras de semen *100% muestra muerta* (Tabla 4.42).

#### 4.3.2.1. Características de motilidad, viabilidad y de actividad mitocondrial según las tinciones realizadas (ANOVA)

El estado de las muestras espermáticas supone diferencias altamente significativas para los distintos tipos de tinción realizada y la motilidad visual (Tabla 4.43); habiendo solo semejanzas para R<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> y para R<sup>-</sup>PI<sup>-</sup> entre muestra viva y muestra mezcla al 50% de vivos y muertos.

**Tabla 4.42** - Características de motilidad, viabilidad y actividad mitocondrial

Estado de las muestras	Motilidad		Eosina-aa		PI		R123		R123/PI			
	+	-	+	-	PI <sup>+</sup>	PI <sup>-</sup>	R123 <sup>+</sup>	R123 <sup>-</sup>	R <sup>-</sup> PI <sup>+</sup>	R <sup>+</sup> PI <sup>+</sup>	R <sup>-</sup> PI <sup>-</sup>	R <sup>+</sup> PI <sup>-</sup>
100% V	73,00± 2,74 <sup>c</sup>	27,00± 2,74 <sup>a</sup>	21,60± 2,41 <sup>a</sup>	78,40± 2,41 <sup>c</sup>	22,50± 2,05 <sup>a</sup>	77,52± 2,05 <sup>c</sup>	79,82± 0,37 <sup>a</sup>	20,10± 0,42 <sup>c</sup>	19,74± 1,98 <sup>c</sup>	1,14± 0,47 <sup>b</sup>	1,87± 0,69 <sup>a</sup>	77,25± 1,75 <sup>c</sup>
50% V+ 50% M	39,00± 2,24 <sup>b</sup>	61,00± 2,37 <sup>b</sup>	49,70± 2,86 <sup>b</sup>	50,30± 2,86 <sup>b</sup>	48,84± 1,60 <sup>b</sup>	51,16± 1,60 <sup>b</sup>	48,53± 3,52 <sup>b</sup>	51,44± 3,39 <sup>b</sup>	48,31± 2,85 <sup>b</sup>	0,83± 0,55 <sup>b</sup>	2,89± 1,31 <sup>a</sup>	47,88± 1,98 <sup>b</sup>
100% M	0,50± 0,58 <sup>a</sup>	99,60± 0,58 <sup>c</sup>	92,50± 0,87 <sup>c</sup>	7,50± 0,87 <sup>a</sup>	92,14± 1,15 <sup>c</sup>	7,98± 1,24 <sup>a</sup>	1,38± 1,34 <sup>c</sup>	98,63± 1,34 <sup>a</sup>	93,86± 1,11 <sup>a</sup>	0,17± 0,14 <sup>a</sup>	5,07± 2,12 <sup>b</sup>	0,87± 0,97 <sup>a</sup>
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,010	0,015	<0,001

Media(%) ± desviación típica (\*n=5); V-vivos, M-muertos. Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

La comparación de la lectura del citómetro (C) y de la lectura visual por medio de microscopio de fluorescencia (F) fue realizada en alícuotas con 50% de muestra viva y 50% de muestra muerta (Tabla 4.43).

**Tabla 4.43** - Porcentaje de células teñidas con marcadores fluorescentes según recuento por citometría (C) y por fluorescencia

	R123-PI+ C	R123-PI+ F	R123+ PI+ C	R123+ PI+ F	R123- PI- C	R123- PI- F	R123+ PI- C	R123+ PI- F
50% V+ 50% M	48,31±2,85	49,2±2,77	0,83±0,55	1,00±0,71	2,89±1,31	1,20±0,84	47,88±1,98	48,60±2,07

Media(%) ± desviación típica (\*n=5); V-vivos, M-muertos

#### 4.3.2.2. Dot-plots e histogramas

La fluorescencia verde (R123) fue capturada en el sensor FL-1, mientras que la fluorescencia roja (PI) fue capturada en el sensor FL-3. En todas las muestras han sido obtenidos "dot-plots", que nos indican la distribución relativa de las distintas poblaciones para FL-1 y FL-3 e histogramas para FL1.

Los histogramas para FL1 representan la distribución de la intensidad de fluorescencia para la población con fluorescencia verde en unidades arbitrarias y de la población con ausencia de dicha fluorescencia. En el histograma el eje horizontal representa la intensidad de fluorescencia de R123, mientras que el eje vertical representa los eventos o células contadas, también en unidades arbitrarias.

Las regiones de los dot-plots que definen sub-poblaciones de espermatozoides han sido establecidas utilizando muestras individuales que han resultado positivas o negativas para PI y R123, como quedó expuesto en el capítulo de Material y Métodos. Si con la tinción sencilla con PI o con R123 se obtienen 2 poblaciones distintas,  $PI^+$  (R2) y  $PI^-$  (R3) o  $R123^+$  (R5) y  $R123^-$  (R4), respectivamente; recordamos que con la doble tinción de los espermatozoides R123-PI son identificadas 4 poblaciones en los cuadrantes del dot-plot:

**$PI^+R123^-$**  -células muertas con actividad mitocondrial mínima (Cuadrante R2)

**$PI^+R123^+$**  -células muertas con actividad mitocondrial máxima (Cuadrante R3)

**$PI^-R123^-$**  -células vivas con actividad mitocondrial mínima (Cuadrante R4)

**$PI^-R123^+$**  -células vivas con actividad mitocondrial máxima (Cuadrante R5)

#### 4.3.2.3. Intensidad de fluorescencia de los fluorocromos en la tinción Rodamina-PI

La siguiente tabla presenta las diferencias estadísticas para la intensidad de fluorescencia de las tinciones realizadas en las distintas alícuotas según los distintos estatus celulares; habiendo solo semejanzas para la intensidad baja de rodamina ( $R123^-$ ).

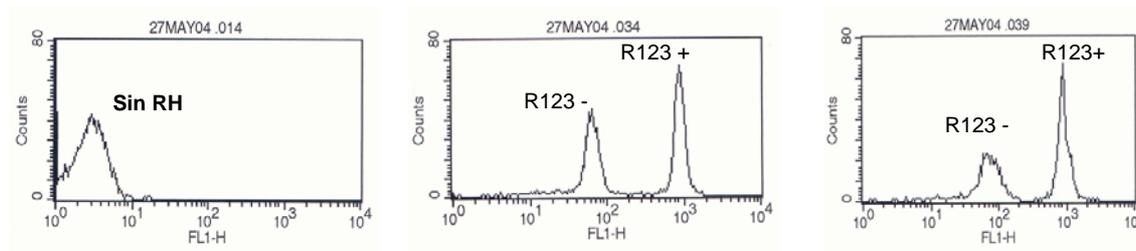
Como se puede observar en la tabla 4.44, tanto las poblaciones R123 negativas como las  $PI^-$  presentan alguna intensidad de fluorescencia, lo que puede atribuirse a que las células presenten una baja intensidad, a la intensidad de tinción del diluyente o bien a la presencia de restos celulares que puedan haberse teñido con uno u otro marcador fluorescente.

**Tabla 4.44** - Intensidad obtenida (unidades arbitrarias) para el fluorocromo en la tinción con R123, PI y R123-PI

Intensidad de rodamina (eje x; FL1)			Intensidad de PI (eje Y; FL3)		
<b>R123+ (R5)</b>	muertos	616,56±1,45 <sup>a</sup>	<b>PI+ (R2)</b>	muertos	1722,40±11,61 <sup>ab</sup>
	mezcla	850,55±17,66 <sup>b</sup>		mezcla	1794,21±35,80 <sup>4b</sup>
	vivos	962,54±48,35 <sup>c</sup>		vivos	1661,89±104,44 <sup>a</sup>
	<b>p</b>	<b>&lt;0,001</b>		<b>p</b>	<b>0,022</b>
<b>R123- (R4)</b>	muertos	49,18±1,70	<b>PI- (R3)</b>	muertos	19,20±3,60 <sup>a</sup>
	mezcla	59,06±11,51		mezcla	62,14±1,93 <sup>b</sup>
	vivos	57,96±8,10		vivos	64,54±104,44 <sup>b</sup>
	<b>p</b>	<b>0,155</b>		<b>p</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>PI+R123- (R2)</b>	muertos	52,60±8,88 <sup>a</sup>	<b>PI+R123- (R2)</b>	muertos	1740,82±49,48 <sup>b</sup>
	mezcla	74,55±10,82 <sup>b</sup>		mezcla	1723,60±59,48 <sup>b</sup>
	vivos	58,93±5,85 <sup>a</sup>		vivos	1660,11±91,67 <sup>a</sup>
	<b>p</b>	<b>0,005</b>		<b>p</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>PI+R123+ (R3)</b>	muertos	516,56±1,45 <sup>a</sup>	<b>PI+R123+ (R3)</b>	muertos	1772,40±11,61 <sup>c</sup>
	mezcla	774,48±77,84 <sup>b</sup>		mezcla	1596,93±138,88 <sup>b</sup>
	vivos	754,43±91,28 <sup>b</sup>		vivos	1222,40±139,91 <sup>a</sup>
	<b>p</b>	<b>&lt;0,001</b>		<b>p</b>	<b>0,003</b>
<b>PI-R123- (R4)</b>	muertos	26,78±1,93 <sup>a</sup>	<b>PI-R123- (R4)</b>	muertos	24,52±1,41 <sup>a</sup>
	mezcla	34,74±2,49 <sup>b</sup>		mezcla	31,61±3,47 <sup>a</sup>
	vivos	37,74±4,59 <sup>b</sup>		vivos	47,46±8,63 <sup>b</sup>
	<b>p</b>	<b>&lt;0,001</b>		<b>p</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>PI-R123+ (R5)</b>	muertos	548,81±73,81 <sup>a</sup>	<b>PI-R123+ (R5)</b>	muertos	60,51±7,02 <sup>b</sup>
	mezcla	893,90±27,16 <sup>b</sup>		mezcla	24,90±3,48 <sup>a</sup>
	vivos	934,52±99,00 <sup>b</sup>		vivos	20,01±8,29 <sup>a</sup>
	<b>p</b>	<b>&lt;0,001</b>		<b>p</b>	<b>&lt;0,001</b>

Media(%) ± desviación típica (n=5). Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

Los histogramas representan la intensidad (en unidades arbitrarias) con la que los fluorocromos marcan las células. Estos datos de intensidad se refieren a los que se contabilizan en el eje X ((FL1) relacionado con la tinción verde positiva o negativa a rodamina 123 (Fig. 4.1)) o bien, a los que se contabilizan en el eje Y ((FL3) relativo a la fluorescencia roja por la tinción positiva o negativa correspondiente a PI). Así, la intensidad RH+ en FL1 para una doble tinción incluye tanto a las células PI+RH+ como a las células PI-RH+.



**Figura 4.1** - Histogramas de alícuotas diferentes de 50% muestra viva y 50% muerta. Imagen izda: teñido con PI; imagen central: teñida con R123; imagen dcha.: teñido con PI y con R123.

### 4.3.3. Correlaciones

La proporción de espermatozoides en función del estado de la membrana plasmática y de la presencia o ausencia de la actividad mitocondrial ha sido correlacionada con el porcentaje de motilidad y de vitalidad mediante la coloración eosina-nigrosina (Tablas 4.45, 4.46 y 4.47).

**Tabla 4.45** - Coeficientes de correlación entre células vivas, con actividad mitocondrial máxima y mótiles, para la totalidad de células estudiadas e independientemente del estado de viabilidad de las muestras

Total células	PI-	R123+	R123+ PI-	Vivos-eosina	Móviles
PI-		0,997**	0,998**	0,999**	0,992**
R123+	0,997**		0,998**	0,994**	0,993**
R123+ PI-	0,998**	0,998**		0,997**	0,995**
Vivos-eosina	0,999**	0,994**	0,997**		0,994**
Móviles	0,992**	0,993**	0,995**	0,994**	
<i>n</i>	15	15	15	15	15

\*\*Correlación significativa para  $p < 0,01$

**Tabla 4.46** - Coeficientes de correlación entre células muertas, con actividad mitocondrial mínima y estáticas, para la totalidad de células estudiadas e independientemente del estado de viabilidad de las muestras

Total células	PI+	R123-	R123-PI+	Muertos eosina	Estáticos
PI+		0,997**	0,996**	0,999**	0,992**
R123-	0,997**		0,998**	0,994**	0,993**
PI+	0,996**	0,998**		0,994**	0,994**
Muertos Eosina	0,999**	0,994**	0,994**		0,994**
Estáticos	0,992**	0,993**	0,994**	0,994**	
<i>n</i>	15	15	15	15	15

\*\*Correlación significativa para  $p < 0,01$

**Tabla 4.47**- Coeficientes de correlación entre la ausencia de vitalidad y de actividad mitocondrial mínima en el grupo de muestras *100% muestra muerta*

100% M	PI+	R123-	R123- PI+
PI+		-995*	-998**
R123-	-995**		998**
R123-PI+	-998**	998**	
<i>n</i>	5	5	5

\*\*Correlación significativa para  $p < 0,01$

Las correlaciones entre la lectura por microscopía de fluorescencia (F) y por citometría de flujo (C) valorado en las alícuotas 50% vivas y 50% muertas para los distintos patrones de tinción son elevadas y altamente significativas (Tabla 4.48).

**Tabla 4.48** - Coeficientes de correlación obtenidos entre la lectura por citometría (C) y fluorescencia (F)

	<b>R123-PI+ C</b>	<b>R123-PI+ F</b>						
<b>R123-PI+ C</b>		0,998						
<b>R123-PI+ F</b>	0,998		<b>R123+PI+ C</b>	<b>R123+PI+ F</b>				
		<b>R123+PI+ C</b>		0,996				
		<b>R123+PI+ F</b>	0,996		<b>R123-PI- C</b>	<b>R123-PI- F</b>		
				<b>R123-PI- C</b>		0,880		
				<b>R123-PI- F</b>	0,880		<b>R123+PI- C</b>	<b>R123+PI- F</b>
						<b>R123+PI- C</b>		0,996
						<b>R123+PI- F</b>	0,996	
<b>n</b>	5	5	5	5	5	5	5	5

Correlación significativa para  $p < 0,01$

#### 4.4. Experimento 4. Efectos de la suplementación del diluyente de congelación Uppsala-Equex con los aminoácidos taurina e hipotaurina

##### 4.4.1. Experimento 4.1. Efectos en la motilidad, longevidad, viabilidad, integridad del acrosoma y actividad mitocondrial del espermatozoide descongelado

Estudiamos el efecto de la adición de los aminoácidos taurina o hipotaurina, en distintas proporciones, al diluyente Uppsala-Equex II dado que con él se obtuvieron los mejores resultados en el experimento 2.

##### 4.4.1.1. Características de los pools frescos

En este experimento se procesaron 15 eyaculados agrupados en 5 pools. Las características de los pools de semen fresco se encuentran en la siguiente tabla:

**Tabla 4.49** - Características de los pools frescos

Parámetro	Media
Volumen (mL)	2,92±0,48
Motilidad total (%)	85,00±3,78
Motilidad progresiva (%)	77,00±1,59
Concentración ( $\times 10^6$ )	469,82±115,70
Morfología normal (%)	89,00±6,60

Media±Desviación típica (n=5)

##### 4.4.1.2. Características tras la descongelación- comparación de las distintas concentraciones de Taurina e Hipotaurina

Para el análisis de las características postdescongelación de la motilidad hemos descongelado una pajuela de cada diluyente. A continuación, alícuotas de cada pajuela han sido analizadas visualmente y por el analizador computerizado, inmediatamente tras la descongelación y a intervalos de 30 minutos durante su incubación en baño maría a 38°C.

La integridad postdescongelación de las membranas plasmática y acrosomal ha sido evaluada, tras descongelar otra pajuela por diluyente, mediante citometría de flujo y marcaje con los fluorocromos PI/Fitc-PSA a tiempo 0 y tras 1h:30' de incubación a 38°C. La actividad mitocondrial también fue evaluada en los mismos momentos mediante

citometría de flujo tras marcaje con PI-Rodamina; además, se tomaron de nuevo valores de la motilidad visual -para intentar constatar la posible relación entre ésta, las células vivas que mostraban tinción positiva con rodamina y con eosina-azul de anilina.

Los resultados obtenidos fueron comparados mediante ANOVA y prueba post hoc de comparaciones múltiples de Duncan). Los nombres de los diluyentes serán abreviados, para facilitación en las tablas y gráficos (Tabla 4.50).

**Tabla 4.50** - Diluyentes de congelación utilizados en el experimento 4

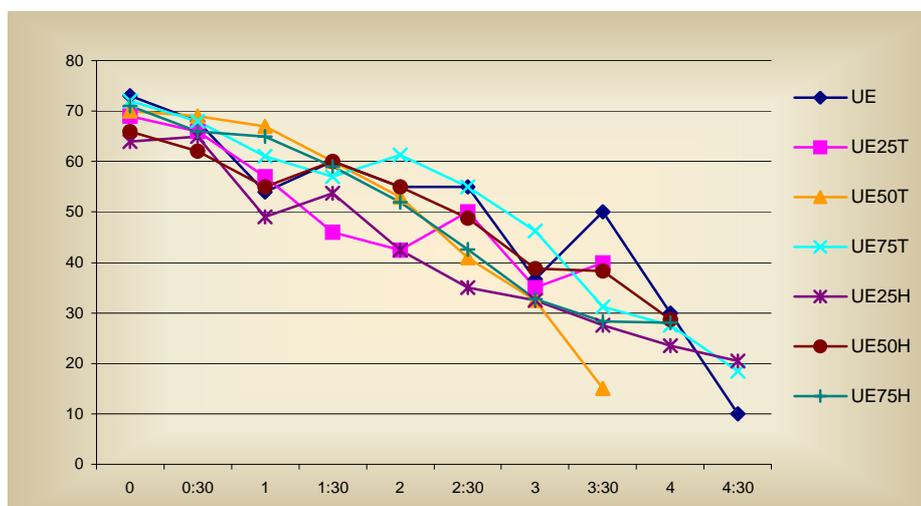
Diluyentes de congelación	Abreviatura
1. Uppsala-Equex II (Control)	UE
2. Uppsala-Equex II + 25 mM Taurina	UE 25T
3. Uppsala-Equex II + 50 mM Taurina	UE 50T
4. Uppsala-Equex II + 75 mM Taurina	UE 75T
5. Uppsala-Equex II + 25 mM Hipotaurina	UE 25H
6. Uppsala-Equex II + 50 mM Hipotaurina	UE 50H
7. Uppsala-Equex II + 75 mM Hipotaurina	UE 75H

#### 4.4.1.2.1. Efectos de los aminoácidos en la motilidad

##### 4.4.1.2.1.1. Estimación subjetiva de la motilidad espermática

###### a. Motilidad total visual (MTV)

**Gráfica 4.27** - Motilidad total visual



No se han observado diferencias significativas en la motilidad total visual de los distintos diluyentes en los momentos evaluados.

**Tabla 4.51 - Motilidad total visual**

	MTV 0	MTV 0:30	MTV 1	MTV 1:30	MTV 2	MTV 2:30	MTV 3	MTV 3:30
<b>UE</b>	73,00±2,74	68,00±7,58	54,00±25,84	60,00±10,00	55,00±5,00	55,00±5,00	36,67±23,63	50,00±7,07(n=2)
<b>UE 25T</b>	69,00±7,42	66,00±4,18	57,00±10,37	46,00±19,81	42,50±25,98	50,00±13,23	35,00±22,91	40,00±28,28(n=2)
<b>UE 50T</b>	70,00±6,12	69,00±5,48	67,00±6,71	60,00±12,25	53,00±20,49	41,00±19,17	32,50±23,98	15,00±0,00(n=2)
<b>UE 75T</b>	72,00±5,70	68,00±4,47	61,00±9,62	57,00±12,55	61,25±2,50	55,00±7,07	46,25±2,50	31,25±11,09
<b>UE 25H</b>	64,00±7,42	65,00±7,91	49,00±20,74	53,75±11,09	42,50±9,57	35,00±8,66	32,50±10,61(n=2)	27,50±17,68(n=2)
<b>UE 50H</b>	66,00±9,62	62,00±10,37	55,00±23,18	60,00±7,07	55,00±9,13	48,75±17,97	38,75±21,75	38,33±25,66
<b>UE 75H</b>	71,00±8,94	66,00±10,84	65,00±11,73	59,00±17,46	52,00±24,14	42,60±23,00	32,75±22,14	28,33±25,17

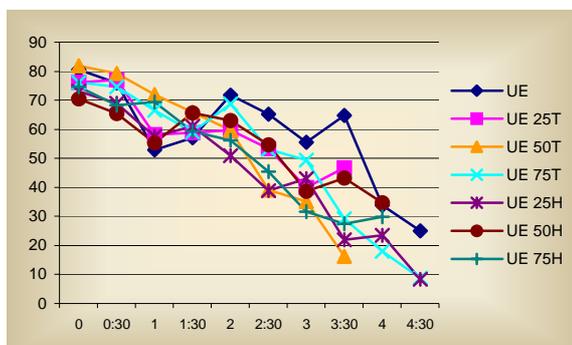
Media (%) ± Desviación típica

#### 4.4.1.2.1.2. Análisis computerizado de la motilidad (CASA)

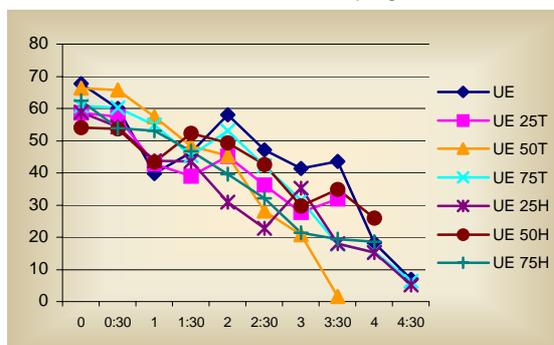
Ninguno de los parámetros estudiados mediante análisis informático ha presentado diferencias significativas entre diluyentes, con excepción del parámetro ALH.

##### a. Motilidad total (MT) y progresiva (MP)

**Gráfica 4.28 - Motilidad total**



**Gráfica 4.29 - Motilidad progresiva**



**Tabla 4.52 - Motilidad total**

	MT 0	MT 0:30	MT 1	MT 1:30	MT 2	MT 2:30	MT 3	MT 3:30
<b>UE</b>	80,48±6,07	75,86±6,54	52,90±29,99	57,13±21,11	71,80±8,58	65,13±15,75	55,57±9,24	64,65±6,72(n=2)
<b>UE 25T</b>	76,08±5,35	76,98±6,99	58,24±21,26	58,76±26,13	59,70±6,22	53,37±16,55	39,97±29,73	46,85±41,51(n=2)
<b>UE 50T</b>	81,82±6,18	79,24±5,69	71,92±13,12	65,84±16,21	59,74±19,54	39,02±23,95	35,03±27,81	16,25±6,72(n=2)
<b>UE 75T</b>	76,20±9,64	74,60±6,48	66,48±24,28	58,96±20,90	68,75±10,18	53,18±13,28	49,48±11,48	29,18±14,21
<b>UE 25H</b>	73,16±10,89	68,90±11,78	57,50±30,22	61,00±14,61	50,88±19,28	38,87±9,53	43,10±30,26(n=2)	21,85±12,23(n=2)
<b>UE 50H</b>	70,44±19,85	65,48±17,85	55,38±27,18	65,60±18,11	62,90±14,36	54,73±21,95	38,65±26,12	43,27±33,55
<b>UE 75H</b>	74,74±8,75	68,34±10,53	69,36±10,97	59,34±18,28	56,12±24,41	45,46±25,78	31,70±20,98	27,37±25,99

Media (%) ± Desviación típica

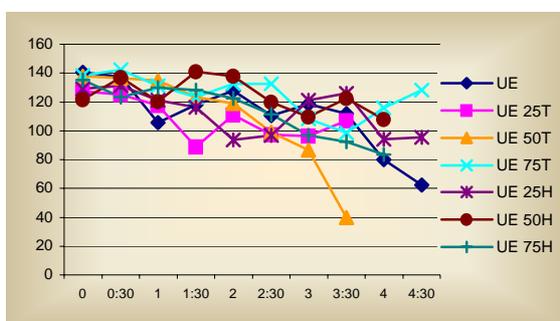
**Tabla 4.53 - Motilidad progresiva**

	MP 0	MP 0:30	MP 1	MP 1:30	MP 2	MP 2:30	MP 3	MP 3:30
UE	67,66±6,75	59,94±11,31	39,86±29,1	46,43±16,69	58,00±3,93	47,03±13,62	41,30±8,61	43,50±15,42(n=2)
UE 25T	58,68±5,32	57,40±5,49	42,70±15,83	39,08±30,05	45,13±14,32	36,33±25,75	27,77±21,20	31,95±35,29(n=2)
UE 50T	66,40±4,76	65,68±4,13	57,48±10,81	48,24±18,90	45,36±16,94	28,10±21,29	20,83±23,21	1,55±0,21(n=2)
UE 75T	60,74±9,65	60,16±6,69	54,88±20,48	45,36±19,68	53,15±6,58	42,25±12,22	31,55±8,45	17,75±11,84
UE 25H	58,74±11,12	54,28±15,39	43,68±25,25	43,60±11,11	30,95±21,93	22,7±15,10	35,25±23,12(n=2)	17,95±10,82(n=2)
UE 50H	53,98±18,32	53,58±14,99	43,40±24,94	52,33±19,80	49,38±14,13	42,48±25,97	29,68±24,86	34,83±30,17
UE 75H	62,44±7,27	53,86±16,48	53,06±9,70	46,8±19,40	39,58±20,93	32,12±18,68	21,45±19,71	19,47±22,97

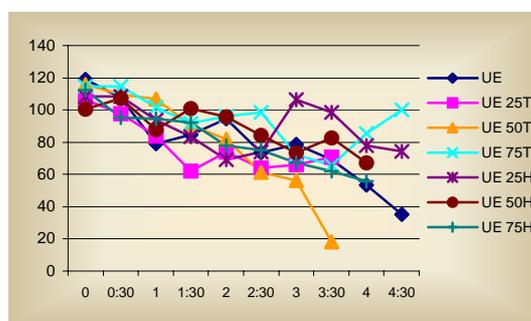
Media (%) ± Desviación típica

**b. Velocidad curvilínea (VCL) y Velocidad rectilínea (VSL)**

**Gráfica 4.30 - Velocidad curvilínea**



**Gráfica 4.31 - Velocidad rectilínea**



**Tabla 4.54 - Velocidad curvilínea**

	VCL 0	VCL 0:30	VCL 1	VCL 1:30	VCL 2	VCL 2:30	VCL 3	VCL 3:30
UE	140,62±6,10	137,46±10,89	105,54±41,06	118,20±9,01	127,87±6,20	110,43±6,70	118,60±14,08	111,65±1,91(n=2)
UE 25T	127,26±14,41	125,10±9,07	117,38±7,97	88,64±49,60	110,93±27,26	97,27±45,33	96,40±29,72	107,15±13,79(n=2)
UE 50T	137,94±12,89	136,48±6,96	134,74±17,19	123,18±38,88	118,84±25,48	98,98±20,37	86,55±35,64	39,65±5,87(n=2)
UE 75T	138,38±21,79	142,30±22,53	131,42±21,56	123,12±37,70	132,50±6,39	132,48±10,60	108,48±28,69	98,65±32,19
UE 25H	129,10±7,56	131,48±5,54	120,90±25,71	116,28±7,40	93,85±31,09	96,87±46,39	121,20±1,13(n=2)	125,85±9,55(n=2)
UE 50H	121,44±4,69	136,82±7,04	120,26±31,4	140,95±6,95	137,70±15,03	119,70±40,62	109,43±51,78	122,47±22,65
UE 75H	135,30±3,95	123,36±19,45	129,86±10,70	128,02±14,27	122,32±16,10	111,30±27,42	96,70±40,81	92,30±55,06

Media(μm/s) ± Desviación típica

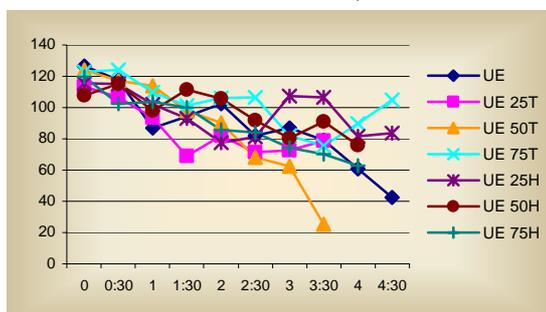
**Tabla 4.55 - Velocidad rectilínea**

	VSL 0	VSL 0:30	VSL 1	VSL 1:30	VSL 2	VSL 2:30	VSL 3	VSL 3:30
UE	118,94±8,95	107,40±15,81	78,98±37,22	84,77±9,73	94,43±0,95	73,60±7,35	78,73±78,73	69,15±1,91(n=2)
UE 25T	106,34±16,19	97,82±10,53	83,78±12,07	61,94±42,81	73,97±29,64	64,10±37,68	65,90±28,91	70,65±26,52(n=2)
UE 50T	115,68±11,20	109,44±9,60	106,86±24,31	90,42±38,07	81,86±28,67	61,16±19,92	56,00±28,22	18,3±5,23(n=2)
UE 75T	114,50±21,45	114,56±20,32	101,54±22,16	91,76±30,75	96,18±10,29	98,53±16,38	72,45±25,47	65,65±26,49
UE 25H	108,44±9,12	108,34±6,98	93,90±22,56	83,33±13,72	69,20±33,02	73,83±46,27	106,25±3,89(n=2)	98,45±17,89(n=2)
UE 50H	100,48±7,02	107,04±9,15	87,60±23,85	100,68±16,9	95,75±22,78	84,20±35,00	73,63±38,01	82,77±17,93
UE 75H	112,28±8,44	95,16±19,89	94,52±12,22	92,34±10,00	77,82±26,26	75,00±18,77	67,25±31,27	62,00±45,05

Media(μm/s) ± Desviación típica

### c) Velocidad promedio (VAP) e Índice de linealidad (LIN)

Gráfica 4.32 - Velocidad promedio



Gráfica 4.33 - Índice de linealidad

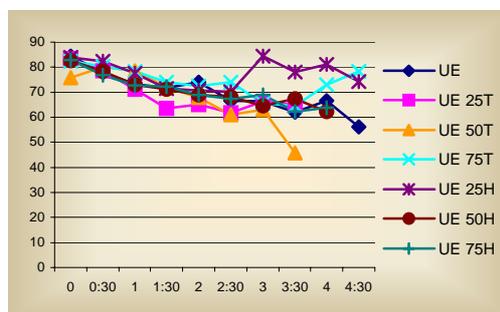


Tabla 4.56 - Velocidad promedio

	VAP 0	VAP 0:30	VAP 1	VAP 1:30	VAP 2	VAP 2:30	VAP 3	VAP 3:30
<b>UE</b>	126,66±7,63	117,58±11,30	86,94±36,78	94,43±9,09	102,33±1,37	81,93±7,40	8,00±11,53	79,25±0,35(n=2)
<b>UE 25T</b>	113,30±15,30	106,44±9,30	93,64±9,34	68,98±43,71	82,23±30,13	71,63±38,86	72,60±28,87	78,65±23,83(n=2)
<b>UE 50T</b>	123,92±12,50	117,00±8,35	114,00±22,18	98,00±37,66	90,08±29,58	68,02±19,73	62,30±27,72	25,35±7,28(n=2)
<b>UE 75T</b>	122,76±21,90	124,24±22,11	109,80±24,18	101,16±33,70	106,18±10,68	106,43±16,38	82,08±25,86	75,58±27,73
<b>UE 25H</b>	115,58±9,90	115,28±6,22	101,86±22,86	92,95±10,83	77,58±29,45	81,37±46,34	107,55±1,34(n=2)	106,50±17,40(n=2)
<b>UE 50H</b>	107,72±5,83	115,16±8,66	97,78±23,06	111,55±12,52	105,90±18,27	91,90±33,92	80,38±40,23	90,97±17,65
<b>UE 75H</b>	119,44±5,83	102,40±19,68	103,52±11,34	99,84±10,05	85,78±28,20	84,10±21,41	74,43±33,98	70,40±47,67

Media (%) ± Desviación típica

Tabla 4.57 - Índice de linealidad

	LIN 0	LIN 0:30	LIN 1	LIN 1:30	LIN 2	LIN 2:30	LIN 3	LIN 3:30
<b>UE</b>	84,50±2,95	77,92±7,21	73,24±9,13	71,73±5,90	73,97±4,36	66,53±3,61	66,30±3,55	61,95±0,63(n=2)
<b>UE 25T</b>	83,28±3,86	78,52±5,94	71,28±8,07	63,54±15,82	64,97±15,65	61,83±16,72	66,33±12,19	64,90±16,40(n=2)
<b>UE 50T</b>	75,88±17,10	80,12±4,56	78,54±9,11	72,04±10,46	67,78±11,73	60,90±8,23	62,93±12,55	45,80±6,36(n=2)
<b>UE 75T</b>	82,48±3,80	80,42±4,07	78,30±3,43	73,96±4,30	72,53±5,50	74,05±6,92	65,58±8,49	64,63±9,83
<b>UE 25H</b>	83,94±3,66	82,38±3,03	77,50±6,65	71,53±9,49	70,58±16,31	70,13±19,67	84,30±2,26(n=2)	77,95±8,27(n=2)
<b>UE 50H</b>	82,66±2,71	78,24±5,39	73,04±8,99	71,25±9,29	68,80±9,15	68,13±8,88	64,58±10,56	67,30±2,44
<b>UE 75H</b>	82,92±4,65	76,8±7,25	72,72±6,57	72,22±4,98	68,82±5,64	67,28±3,66	68,8±6,11	62,37±16,08

Media (%) ± Desviación típica

### d) Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH)

Para este parámetro existieron diferencias estadísticamente significativas a las 2h, en las que el diluyente UE 25H presentó valores significativamente inferiores a los demás.

Gráfica 4.34 - Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza

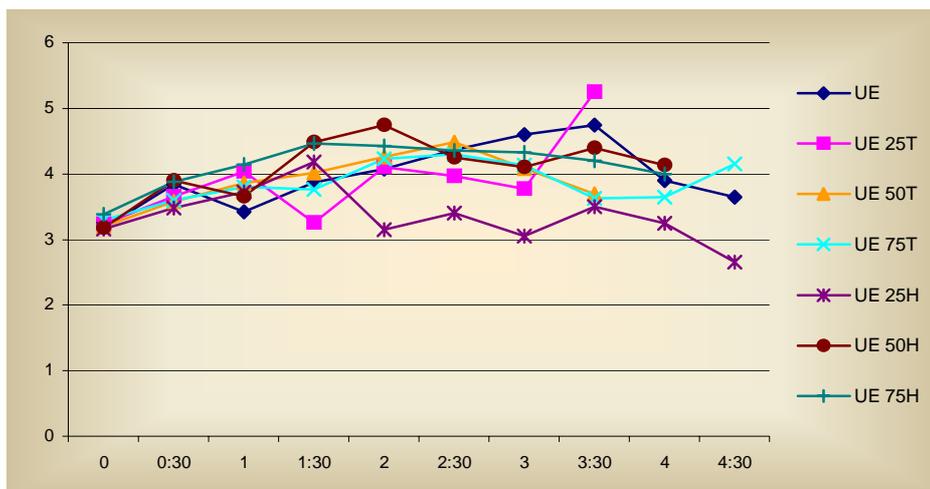


Tabla 4.58 - Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza

	ALH 0	ALH 0:30	ALH 1	ALH 1:30	ALH 2*	ALH 2:30	ALH 3	ALH 3:30
UE	3,18±0,19	3,84±0,43	3,42±1,04	3,87±0,35	4,07±0,25 <sup>b</sup>	4,37±0,12 <sup>b</sup>	4,60±0,36	4,75±0,07(n=2)
UE 25T	3,24±0,10	3,66±0,34	4,04±0,58	3,26±1,23	4,10±0,85 <sup>b</sup>	3,97±0,46 <sup>ab</sup>	3,77±0,76	5,25±1,63(n=2)
UE 50T	3,20±0,19	3,58±0,37	3,86±0,59	4,02±0,50	4,26±0,58 <sup>b</sup>	4,48±0,43 <sup>b</sup>	4,08±0,76	3,70±0,57(n=2)
UE 75T	3,30±0,37	3,6±0,43	3,80±0,41	3,76±0,69	4,23±0,45 <sup>b</sup>	4,3±0,48 <sup>a</sup>	4,13±0,73	3,63±0,80
UE 25H	3,16±0,29	3,48±0,30	3,72±0,63	4,18±0,83	3,15±0,75 <sup>a</sup>	3,40±0,40 <sup>b</sup>	3,05±0,358(n=2)	3,50±0,71(n=2)
UE 50H	3,18±0,18	3,90±0,42	3,66±1,65	4,48±0,90	4,75±0,40 <sup>b</sup>	4,25±0,47 <sup>b</sup>	4,10±1,03	4,40±0,46
UE 75H	3,38±0,29	3,88±0,38	4,14±0,34	4,46±0,56	4,42±0,40 <sup>b</sup>	4,36±0,50 <sup>b</sup>	4,33±0,39	4,20±0,71(n=2)
<b>p</b>	ns	ns	ns	ns	0,021	0,07>0,05	ns	ns

Media(µm/s)±Desviación típica. ns- no significativo. \* Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

#### 4.4.1.2.2. Efectos de los aminoácidos en la longevidad de la motilidad post-descongelación

Gráfica 4.35- Duración de la longevidad post-descongelación

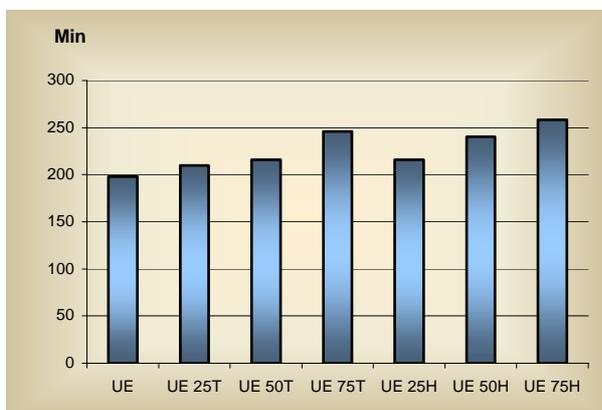


Tabla 4.59 - Duración de la longevidad post-descongelación

Duración (min)	
UE (Control)	198
UE 25T	210
UE 50T	216
UE 75T	246
UE 25H	216
UE 50H	240
UE 75H	258

Media (min) ±Desviación típica

Los diluyentes con aminoácidos tienden a presentar longevidades gradualmente más largas, pero las diferencias no han sido estadísticamente significativas.

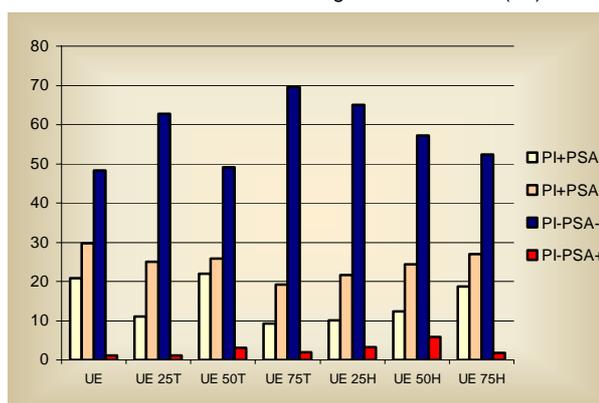
#### 4.4.1.2.3. Efectos de los aminoácidos en la viabilidad e integridad del acrosoma determinada mediante citometría de flujo

Cada pajuela fue diluida vol:vol en PBS y tras 5min en equilibrio, se tomó una muestra para tinción a T0 y posteriormente otra muestra para tinción a T1:30.

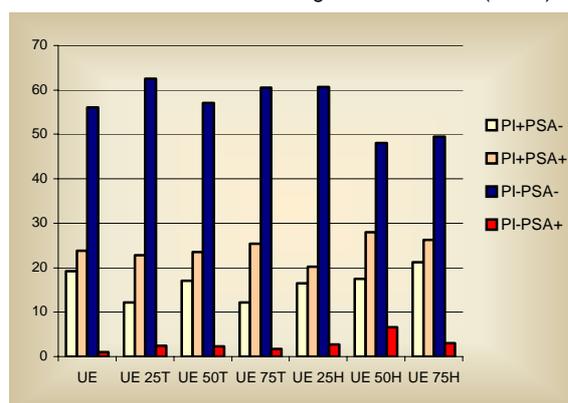
Pese a la existencia de algunas diferencias aparentes entre los distintos diluyentes, que parecen sugerir algún efecto protector de los aminoácidos en T0, no se han encontrado diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (PI<sup>-</sup>PSA<sup>-</sup>) y muertos con el acrosoma dañado (indicativo de reacción acrosómica por degeneración celular, PI<sup>+</sup>PSA<sup>+</sup>) en ambos los momentos analizados.

Sin embargo, han existido diferencias en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma dañado (indicativo de la reacción acrosómica verdadera o espontánea, PI<sup>-</sup>PSA<sup>+</sup>) a pesar del bajo número de células que reaccionan, entre 0,47 y 10; en ambos momentos analizados, el diluyente UE 50H presenta porcentajes significativamente superiores a los demás ( $p < 0,001$ ), que no tienen diferencias entre ellos.

Gráfica 4.36 - Viabilidad e integridad acrosomal (T0)



Gráfica 4.37 - Viabilidad e integridad acrosomal (T1:30)



**Tabla 4.60** - Resultados tras marcaje con PI-PSA (T0 y T1:30): células muertas

Diluyentes	PI <sup>+</sup> PSA <sup>-</sup>		PI <sup>+</sup> PSA <sup>+</sup>	
	T0*	T1:30	T0	T1:30
UE	20,87±3,50	19,17±6,69	29,76±8,76	23,74±7,44
UE 25T	11,07±3,77	12,20±5,12	25,00±26,71	22,82±11,13
UE 50T	21,97±13,9	17,03±11,47	25,78±6,90	23,52±15,24
UE 75T	9,33±2,97	12,22±4,06	19,11±8,07	25,40±11,49
UE 25H	10,05±5,17	16,50±5,99	21,64±3,74	20,18±7,10
UE 50H	12,39±6,29	17,44±5,93	24,40±12,24	28,02±14,20
UE 75H	18,78±12,50	21,24±14,6	27,04±8,90	26,21±5,86
<i>p</i>	0,064>0,05	ns	ns	ns

Media(%)±Desviación típica (n=5). ns- no significativo.

**Tabla 4.61** - Resultados tras marcaje con PI-PSA (T0 y T1:30): células vivas

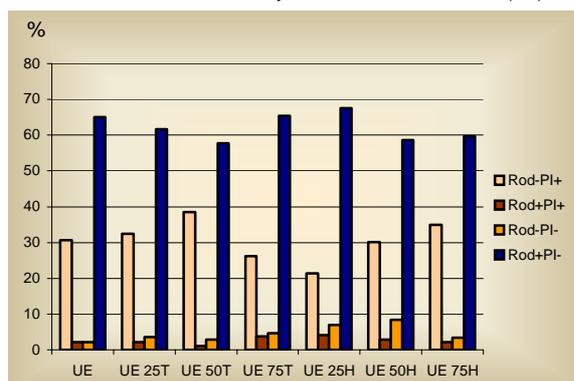
Diluyentes	PI <sup>-</sup> PSA <sup>-</sup>		PI <sup>-</sup> PSA <sup>+</sup>		Total PI <sup>-</sup>	
	T0	T1:30	T0	T1:30	T0	T1:30
UE	48,27±11,46	56,03±13,25	1,08±0,57 <sup>a</sup>	1,06±0,52 <sup>a</sup>	49,37±11,38	57,01±13,12
UE 25T	62,80±27,40	62,49±15,91	1,13±0,94 <sup>a</sup>	2,49±0,94 <sup>a</sup>	65,93±23,55	64,97±15,25
UE 50T	49,17±18,49	57,16±21,27	3,08±1,21 <sup>a</sup>	2,29±1,29 <sup>a</sup>	52,24±19,62	59,45±21,11
UE 75T	69,64±7,49	60,60±11,94	1,93±0,81 <sup>a</sup>	1,77±0,86 <sup>a</sup>	71,57±6,95	62,37±11,15
UE 25H	65,06±4,68	60,64±9,21	3,25±2,30 <sup>a</sup>	2,68±2,02 <sup>a</sup>	68,31±6,15	63,32±9,13
UE 50H	57,27±17,80	47,99±18,42	5,93±2,76 <sup>b</sup>	6,54±3,02 <sup>b</sup>	63,21±18,20	54,54±19,73
UE 75H	52,36±20,58	49,55±18,99	1,83±0,94 <sup>a</sup>	3,00±0,79 <sup>a</sup>	54,19±20,10	52,54±19,09
<i>p</i>	ns	ns	<0,001	<0,001	ns	ns

Media(%)±Desviación típica (n=5). ns- no significativa. Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

#### 4.4.1.2.4. Efectos de los aminoácidos en la viabilidad y actividad mitocondrial

No han existido diferencias significativas a nivel de porcentaje de espermatozoides vivos (PI<sup>-</sup>Rod<sup>+</sup>) y de muertos (PI<sup>+</sup>Rod<sup>-</sup>). Sin embargo, los porcentajes de espermatozoides vivos con actividad mitocondrial mínima (PI<sup>-</sup>Rod<sup>-</sup>) son significativamente superiores con el diluyente UE 25H y UE 50H.

**Gráfica 4.38** - Viabilidad y actividad mitocondrial (T0)



**Gráfica 4.39** - Viabilidad y actividad mitocondrial (T1:30)

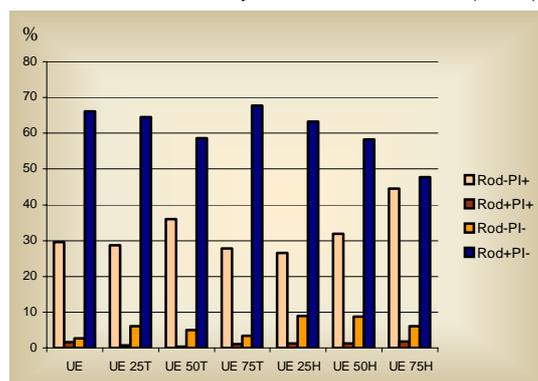


Tabla 4.62 - Resultados tras marcaje de los espermatozoides con Rodamina-PI: células muertas

	PI+ Rod-		PI+ Rod+	
	T0	T1:30	T0	T1:30
UE	30,58±11,27	29,49±9,02	2,21±0,83	1,60±0,69 <sup>bc</sup>
UE 25T	32,51±14,25	28,77±15,16	2,13±1,59	0,64±0,41 <sup>ab</sup>
UE 50T	38,42±21,51	35,92±26,10	1,08±0,49	0,40±0,06 <sup>a</sup>
UE 75T	26,22±9,35	27,74±5,86	3,71±2,10	1,12±0,68 <sup>abc</sup>
UE 25H	21,41±7,49	26,53±9,97	4,18±3,28	1,31±1,00 <sup>abc</sup>
UE 50H	30,10±18,59	31,85±20,43	2,89±2,06	1,18±0,69 <sup>abc</sup>
UE 75H	34,89±25,93	44,51±23,65	2,09±1,37	1,76±0,98 <sup>c</sup>
<i>p</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,058>0,05

Media(%)±Desviación típica (n=5). ns- no significativo.

Tabla 4.63 - Resultados tras marcaje con Rodamina-PI: células vivas

	PI-Rod-		PI- Rod+		Total vivos (PI-)	
	T0	T1:30	T0	T1:30	T0	T1:30
UE	2,10±0,80 <sup>a</sup>	2,68±1,71 <sup>a</sup>	65,1±11,68	66,02±9,57	67,20±11,15	68,70±8,87
UE 25T	3,63±1,66 <sup>a</sup>	6,13±4,05 <sup>ab</sup>	61,73±15,11	64,46±13,95	65,36±14,91	70,59±15,51
UE 50T	2,78±0,88 <sup>a</sup>	5,05±1,52 <sup>a</sup>	57,76±21,44	58,63±25,41	60,54±21,64	63,68±21,15
UE 75T	4,6±2,69 <sup>ab</sup>	3,44±0,96 <sup>a</sup>	65,46±10,17	67,69±6,80	70,06±10,88	71,13±6,19
UE 25H	6,94±1,08 <sup>bc</sup>	8,83±3,78 <sup>b</sup>	67,47±8,2	63,28±7,97	74,41±9,16	72,11±10,84
UE 50H	8,44±3,59 <sup>c</sup>	8,73±2,84 <sup>b</sup>	58,57±17,70	58,24±19,38	67,01±18,74	66,98±20,71
UE 75H	3,30±0,79 <sup>a</sup>	6,01±1,18 <sup>ab</sup>	59,72±26,86	47,73±23,41	63,02±26,15	53,74±23,06
<i>p</i>	<0,001	0,004	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Media(%)±Desviación típica (n=5). ns- no significativo. Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ).

#### 4.4.1.2.5. Efectos de los aminoácidos en la integridad de la membrana plasmática: evaluación mediante coloración con eosina-azul de anilina.

Hemos observado diferencias significativas a T0, en que el porcentaje de espermatozoides vivos fue inferior con el diluyente control y con 50 mM de taurina. A la T1:30 no existieron diferencias significativas.

Gráfica 4.40 - Espermatozoides vivos

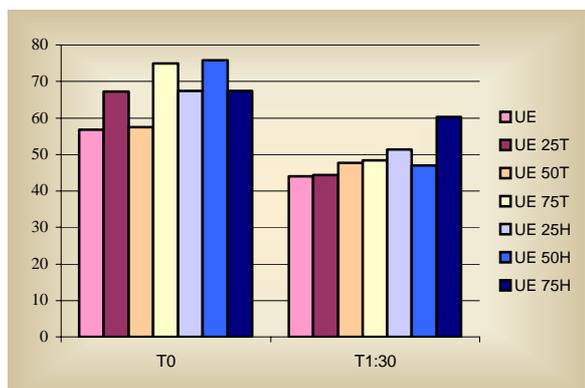


Tabla 4.64 - Espermatozoides vivos tras tinción con E-AA

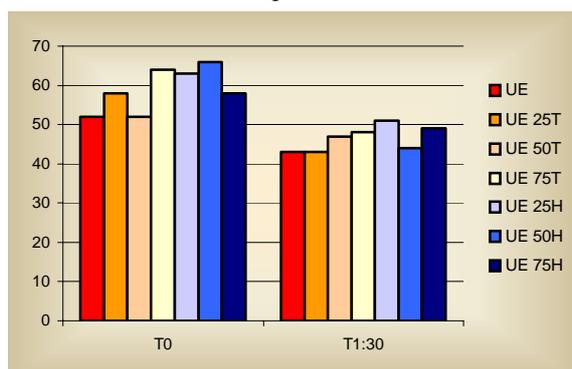
	Vivos Eosina-AA	
	T0	T1:30
UE	56,80±3,49 <sup>a</sup>	44,00±5,15
UE 25T	65,20±10,64 <sup>ab</sup>	44,40±14,74
UE 50T	57,40±12,52 <sup>a</sup>	47,60±19,15
UE 75T	75,00±10,91 <sup>b</sup>	48,40±5,32
UE 25H	67,40±7,77 <sup>ab</sup>	51,40±2,30
UE 50H	75,80±10,71 <sup>b</sup>	47,00±6,56
UE 75H	67,40±14,55 <sup>ab</sup>	60,20±12,68
<i>p</i>	0,045	<i>ns</i>

Media(%)±Desviación típica (n=5). Ns- no significativo. Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ).

#### 4.4.1.2.6. Efectos de los aminoácidos en la motilidad, estimada subjetivamente, tras la descongelación (T0) y tras 1h:30' en incubación (T1:30)

A pesar de algunas diferencias entre diluyentes, en la motilidad observada inmediatamente a la descongelación y tras 1h:30' en incubación, éstas no han sido estadísticamente significativas.

**Gráfica 4.41** - Motilidad visual a T0 y T1:30 tras descongelación



**Tabla 4.65** - Motilidad visual a T0 y T1:30

	Motilidad	
	T0	T1:30
UE	52,00±4,47	43,00±2,74
UE 25T	58,00±13,04	43,00±14,83
UE 50T	52,00±16,05	47,00±18,90
UE 75T	64,00±10,84	48,00±5,70
UE 25H	63,00±9,08	51,00±2,24
UE 50H	66,00±17,82	44,00±8,22
UE 75H	58,00±24,90	49,00±23,60

Media±Desviación típica (n=5)

#### 4.4.1.3. Correlaciones entre los distintos parámetros estudiados

##### a. Citometría de flujo-eosina azul de anilina-motilidad

Se ha analizado la correlación entre porcentaje de espermatozoides vivos y con actividad mitocondrial máxima detectados por citometría de flujo (marcaje con PI/Fitc-PSA y PI/Rodamina123), vivos según tinción con eosina-azul de anilina y motilidad (Tabla 4.66).

Tras la descongelación (T0), la correlación entre espermatozoides vivos detectados por eosina-azul de anilina, y los vivos con actividad mitocondrial máxima detectados mediante citometría de flujo, con ambos marcadores es significativa ( $r= 0,624-0,744$ ). Tras 1h:30' de incubación (T1:30) a 38°C la correlación continúa siendo significativa ( $r= 0,490$  a  $0,528$ ).

Por otra parte, la correlación entre vivos, PI<sup>-</sup>, detectados por marcaje PI/Fitc-PSA ( $r=0,810$  y  $0,871$ , respectivamente para T0 y T1:30). También se observan altas correlaciones entre los marcajes PI<sup>-</sup> y la motilidad. La correlación entre espermatozoides vivos marcados con rodamina (R<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>) y mótil es elevada a T0 ( $r=0,861$ ) y algo inferior a T1:30 ( $r=0,726$ ). Todas las correlaciones han sido altamente significativas ( $p=0,01$ ).

**Tabla 4.66** - Coeficientes de correlación (células vivas) entre PI<sup>-</sup> (tinción PI/PSA<sup>(1)</sup>; tinción Rodamina/PI<sup>(2)</sup>), eosina/aa negativo, R<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> y motilidad

<b>T0</b>	<b>Total PI-<sup>(1)</sup></b>	<b>Total PI-<sup>(2)</sup></b>	<b>Eosina/aa -</b>	<b>R+PI-</b>	<b>Motilidad</b>
Total PI- <sup>(1)</sup>		0,810	0,744	0,771	0,792
Total PI- <sup>(2)</sup>	0,810		0,699	0,985	0,903
Eosina/aa -	0,744	0,699		0,624	0,889
R+PI-	0,771	0,985	0,624		0,861
Motilidad	0,792	0,903	0,889	0,861	
<b>T1:30</b>	<b>Total PI-<sup>(1)</sup></b>	<b>Total PI-<sup>(2)</sup></b>	<b>Eosina/aa-</b>	<b>R+PI-</b>	<b>Motilidad</b>
Total PI- <sup>(1)</sup>		0,871	0,511	0,881	0,692
Total PI- <sup>(2)</sup>	0,871		0,528	0,982	0,746
Eosina/aa -	0,511	0,528		0,491	0,882
R+PI-	0,881	0,982	0,491		0,726
Motilidad	0,692	0,746	0,882	0,726	

\*\*Correlaciones significativas para p=0,01 (n=35)



#### 4.4.2. Experimento 4.2. Inducción de la reacción acrosómica con el Ca<sup>2+</sup> ionóforo A23187

En este experimento se han utilizado pajuelas, congeladas en experimento 4.1, con la intención de poder valorar la capacidad del semen congelado con cada diluyente para presentar capacitación y reacción acrosómica, *in vitro*, tras la incubación con calcio ionóforo a distintas concentraciones: 0, 2,5 y 10  $\mu$ M. Para ello, se procesó una pajuela de cada diluyente para cada uno de los 5 pools. Cada pajuela ha sido directamente diluida en el Canine Capacitation Medium (CCM) para su capacitación en baño a 38°C e incubada durante 20 min tras los cuales, fue añadido el Ca<sup>2+</sup> ionóforo.

La integridad de las membranas plasmática y acrosomal han sido evaluadas, tras ser teñidas con los fluorocromos PI/Fitc-PNA en distintos momentos de incubación con ionóforo (5, 15 y 30 minutos), mediante citometría de flujo. En algunas de las alícuotas con concentración de ionóforo de 10  $\mu$ M también se procedió a marcaje con PI/Fitc-PSA a los 15 y 30 min. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante ANOVA y test de Duncan ( $p < 0,05$ ).

##### 4.4.2.1. Inducción de la reacción acrosómica

##### 4.4.2.1.1. 0 $\mu$ M de Ca ionóforo

Gráfica 4.42 - Porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados (0  $\mu$ M de Ca<sup>2+</sup>-ionóforo)

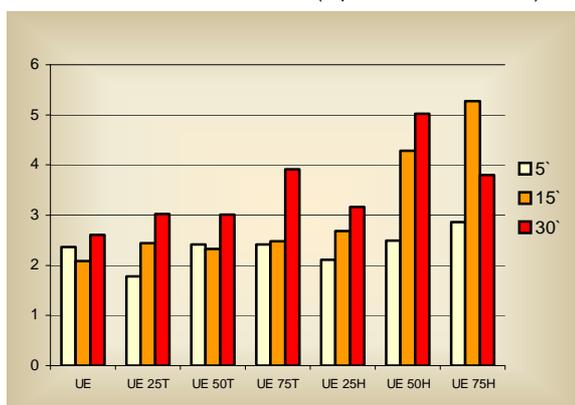


Tabla 4.67 - Porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados (0  $\mu$ M de Ca<sup>2+</sup>-ionóforo)

PI/PNA <sup>+</sup> Diluyente	Tiempo de incubación (min)		
	5'	15'	30'
UE	2,37±0,95	2,08±0,24	2,60±1,12
UE 25T	1,78±0,80	2,44±1,58	3,02±1,13
UE 50T	2,41±0,86	2,32±0,81	3,01±1,53
UE 75T	2,42±1,24	2,48±1,35	3,92±3,12
UE 25H	2,11±0,94	2,68±0,93	3,17±0,85
UE 50H	2,49±1,32	4,29±2,76	5,02±3,15
UE 75H	2,86±1,01	5,28±4,22	3,80±1,70

Media(%) $\pm$  desviación típica (n=5)

Estadísticamente no se observan diferencias significativas en el porcentaje de células que presentan reacción acrosómica espontánea (Tabla 4.67) entre los distintos

medios tras 20 minutos de incubación en CCM, ni tampoco a lo largo de 30 min de incubación en un medio sin ionóforo. Sin embargo, transcurridos 15 min en incubación son los medios con hipotaurina los que muestran un mayor número de células vivas en estado de reacción acrosómica.

Como podemos observar en las siguientes tablas (4.68, 4.69 y 4.70) tampoco se observan diferencias significativas para los demás patrones de tinción evaluados mediante citometría.

**Tabla 4.68** - Porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto ( $0 \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ -ionóforo)

PI/PNA <sup>-</sup> Diluyente	Tiempo de incubación (min)		
	5'	15'	30'
EU	56,28±17,98	58,51±15,13	52,15±17,31
UE 25T	53,37±19,47	53,63±21,05	53,18±24,26
UE 50T	59,62±6,52	59,26±6,13	54,92±8,27
UE 75T	51,02±16,64	46,76±18,50	45,35±13,87
UE 25H	55,43±19,70	51,34±16,71	48,38±17,17
UE 50H	57,75±11,23	55,75±11,73	48,64±16,18
UE 75H	68,62±5,78	62,55±10,02	57,91±17,38

Media(%)± desviación típica (n=5)

**Tabla 4.69** - Porcentaje de espermatozoides muertos reaccionados ( $0 \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ -ionóforo)

PI*PNA <sup>+</sup> Diluyente	Tiempo de incubación (min)		
	5'	15'	30'
UE	19,89±8,30	18,22±7,34	20,22±7,27
UE 25T	22,78±12,36	22,13±11,97	22,59±14,39
UE 50T	17,90±1,61	19,18±2,27	20,02±4,20
UE 75T	27,32±9,51	25,30±10,05	24,68±6,65
UE 25H	22,94±9,76	25,14±8,29	25,02±10,65
UE 50H	21,34±9,20	21,72±9,35	23,19±13,89
UE 75H	15,26±4,08	16,55±6,80	20,85±12,25

Media(%)± desviación típica (n=5)

**Tabla 4.70** - Porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma intacto ( $0 \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ -ionóforo)

PI*PNA <sup>-</sup> Diluyente	Tiempo de incubación (min)		
	5'	15'	30'
UE	19,80±10,29	20,80±8,58	26,64±11,59
UE 25T	18,60±7,56	21,30±10,01	20,58±9,28
UE 50T	19,65±5,27	18,76±7,99	21,45±7,67
UE 75T	18,75±7,87	24,96±10,94	25,27±10,38
UE 25H	19,31±10,40	18,29±10,26	22,80±6,43
UE 50H	17,90±6,02	17,38±4,66	18,95±11,00
UE 75H	12,70±3,90	14,67±2,80	17,76±4,98

Media(%)± desviación típica (n=5)

Si establecemos las diferencias para la reacción acrosómica espontánea (PI-PNA+) entre los distintos diluyentes suplementados con aminoácidos y el diluyente control (tabla 4.72), tampoco se observan diferencias significativas. No obstante, el diluyente **UE75H** es el que presenta una mayor capacidad frente al medio control para permitir la reacción acrosómica en ausencia de ionóforo de calcio, pasados 15 min de incubación; sin embargo, cuando se alcanzan los 30 min es el medio **UE50H** el que presenta mayor capacidad de reacción acrosómica espontánea frente al medio control.

**Tabla 4.71** - Diferencias para medias de RA entre los distintos diluyentes y el diluyente control (0  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ -ionóforo)

Diferencias entre diluyentes	Tiempo de incubación (min)		
	5'	15'	30'
UE 25T - UE	-0,59±0,87	0,36±1,74	0,36±0,93
UE 50T - UE	-0,04±1,29	0,24±0,99	0,35±1,28
UE 75T - UE	0,05±1,84	0,40±1,98	1,26±3,91
UE 25H - UE	-0,26±1,44	0,60±2,14	0,51±0,52
UE 50H - UE	0,12±1,91	2,21±0,92	2,36±3,02
UE 75H - UE	0,49±1,38	3,20±4,31	

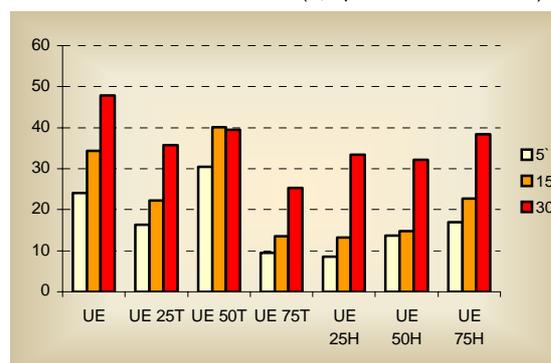
#### 4.4.2.1.2. 2,5 $\mu\text{M}$ de Ca ionóforo

Ha sido posible observar diferencias estadísticamente significativas a los 15 minutos de incubación en un medio con calcio ionóforo a concentración de 2,5 $\mu\text{M}$  ( $p=0,05$ ). El porcentaje de células vivas reaccionadas fue superior para el diluyente **UE 50T** seguido del medio control **UE**. Los diluyentes UE 75T, UE 25H y UE 50H han dado lugar al mas bajo número de espermatozoides reaccionados. Si bien a los 30 min de incubación no se han encontrado diferencias significativas, nos parece interesante resaltar que el mayor porcentaje de reacción acrosómica se observa también en los espermatozoides que fueron congelados en los medios de dilución UE y UE 50T, respectivamente; siendo también el medio UE 75T el que presenta el porcentaje mas bajo.

**Tabla 4.72** - Porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados (2,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ -ionóforo)

Diluyente	Tiempos de incubación (min)		
	5'	15'	30'
UE	24,11±17,28	34,40±19,53 <sup>ab</sup>	47,93±15,65
UE 25T	16,38±10,05	22,25±13,76 <sup>ab</sup>	35,70±11,09
UE 50T	30,43±17,98	40,16±25,08 <sup>b</sup>	39,48±18,91
UE 75T	9,50±5,25	13,55±6,45 <sup>a</sup>	25,39±15,78
UE 25H	8,58±2,92	13,25±6,88 <sup>a</sup>	33,38±17,18
UE 50H	13,72±10,47	14,71±10,94 <sup>a</sup>	32,19±16,84
UE 75H	17,01±13,26	22,72±15,44 <sup>ab</sup>	38,39±18,80
<i>P</i>	<i>ns</i>	0,05	<i>ns</i>

Media (%)± desviación típica (n=5). ns- no significativo.  
\*Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ).

**Gráfica 4.43** - Porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados (2,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ -ionóforo)

A pesar de la inexistencia de diferencias estadísticamente significativas para el resto de los patrones de tinción, el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma

intacto es algo superior para los diluyentes suplementados con hipotaurina e inferior para UE50T y UE (Tabla 4.73).

**Tabla 4.73** - Porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (2,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ -ionóforo)

PI*PNA <sup>-</sup> Diluyente	Tiempo de incubación (min)		
	5'	15'	30'
UE	42,80±19,87	34,15±17,21	15,09±5,23
UE 25T	50,70±21,67	39,30±26,30	22,96±9,85
UE 50T	35,78±14,72	23,65±22,38	19,96±15,60
UE 75T	47,07±13,68	40,44±20,35	24,55±14,27
UE 25H	59,70±12,80	52,74±16,48	25,01±14,22
UE 50H	50,82±12,95	49,93±10,99	30,06±11,51
UE 75H	60,33± 16,60	50,64±15,01	32,85±14,82

Media(%)±desviación típica (n=5)

Resulta también evidente que, a los distintos tiempos de incubación con ionóforo, el mayor porcentaje de espermatozoides muertos reaccionados se presenta con el diluyente UE75T (Tabla 4.74).

**Tabla 4.74** - Porcentaje de espermatozoides muertos reaccionados (2,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ -ionóforo)

PI*PNA <sup>+</sup> Diluyente	Tiempo de incubación (min)		
	5'	15'	30'
UE	15,46±5,94	16,93±7,19	22,23±8,52
UE 25T	18,28±8,81	22,52±12,67	25,69±12,14
UE 50T	18,83±2,77	20,84±2,21	23,37±2,82
UE 75T	25,45±7,12	27,84±11,38	30,25±7,17
UE 25H	17,91±5,59	20,69±9,13	27,83±15,81
UE 50H	20,31±5,95	18,55±5,38	21,38±9,49
UE 75H	13,44±4,70	14,75±2,73	17,31±1,75

Media(%)±desviación típica (n=5)

**Tabla 4.75** - Porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma intacto (2,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ -ionóforo)

PI*PNA <sup>-</sup> Diluyente	Tiempo de incubación (min)		
	5'	15'	30'
UE	14,38±6,57	14,33±9,20	17,43±8,74
UE 25T	14,64±4,87	15,54±4,12	15,64±6,00
UE 50T	14,94±4,80	15,34±5,18	17,18±8,09
UE 75T	17,97±6,84	18,16±6,25	20,20±8,70
UE 25H	13,82±7,57	13,32±6,43	13,65±6,30
UE 50H	15,29±7,83	16,8±8,90	16,37±7,84
UE 75H	9,81±1,86	11,87±3,19	11,57±4,63

Media(%)±desviación típica (n=5)

En cuanto al porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma intacto, éste fue mayor para el diluyente UE75T y menor para UE75H (Tabla 4.75).

Al establecer las diferencias entre la reacción acrosómica obtenida en células vivas entre los distintos diluyentes suplementados con aminoácidos y el diluyente control (Tabla 4.76), no se han encontrado diferencias significativas para éste parámetro entre los diluyentes utilizados. Las mayores diferencias han sido encontradas en los diluyentes UE75T, UE25H y UE50H a los 15' y UE75T a los 30'.

**Tabla 4.76-** Diferencias entre RA de los distintos diluyentes y el diluyente control (2,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ -ionóforo)

Diferencias entre Diluyentes Respecto al Control (UE)	Tiempo de incubación (min)		
	5'	15'	30'
2 UE 25T - UE	-7,74 $\pm$ 11,52	-12,15 $\pm$ 12,76	-12,24 $\pm$ 21,71
3 UE 50T - UE	6,32 $\pm$ 19,10	5,76 $\pm$ 30,34	-8,45 $\pm$ 25,63
4 UE 75T - UE	-14,61 $\pm$ 15,69	-20,85 $\pm$ 17,44	-22,54 $\pm$ 21,76
5 UE 25H - UE	-15,53 $\pm$ 16,60	-21,15 $\pm$ 15,92	-14,56 $\pm$ 24,43
6 UE 50H - UE	-10,39 $\pm$ 7,87	-19,68 $\pm$ 10,27	-15,74 $\pm$ 9,50
7 UE 75H - UE	-7,10 $\pm$ 16,77	-11,68 $\pm$ 23,13	-9,54 $\pm$ 23,22

Media(%) $\pm$  desviación típica (n=5)

#### 4.4.2.1.3. 10 $\mu\text{M}$ de Ca ionóforo

No han existido diferencias estadísticamente significativas entre la respuesta a la inducción de reacción acrosómica de los distintos diluyentes en los tiempos estudiados. Si bien, incluso a esta concentración de ionóforo de calcio sigue siendo el medio **UE 75T** el que permite una menor reacción acrosómica y el tiempo de 15 min el que da lugar a los porcentajes mas elevados; por otra parte, y a este mismo tiempo, son el diluyente control **UE** y el **UE 75H** los que permiten una mayor reacción acrosómica inducida, con medias muy similares (Tabla 4.77).

**Gráfica 4.44 -** Porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados (10  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ -ionóforo)

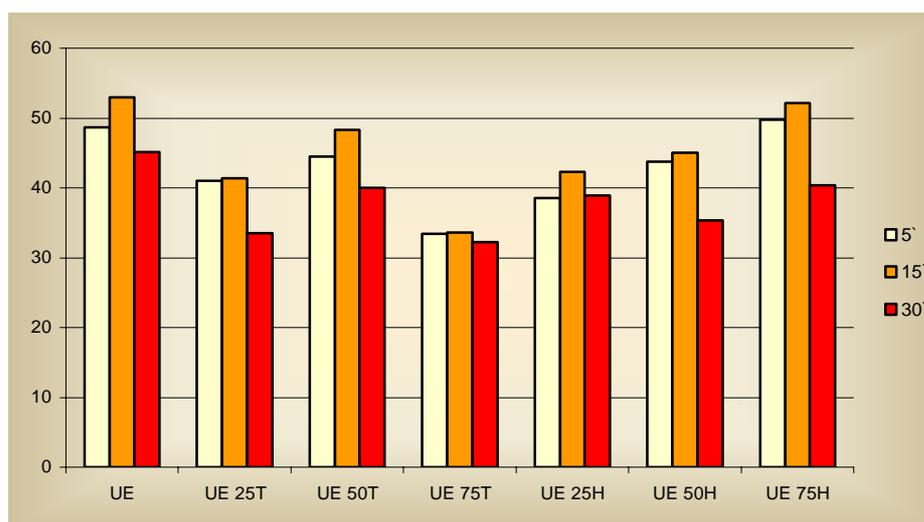


Tabla 4.77- Porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados (10  $\mu$ M de  $Ca^{2+}$ -ionóforo)

PI-PNA+	PNA			PSA	
	Tiempo de incubación (min)				
Diluyente	5'	15'	30'	15'	30'
UE	48,71 $\pm$ 14,75	52,95 $\pm$ 16,18	45,14 $\pm$ 19,19	65,93 (n=1)	43,61 $\pm$ 34,84 (n=2)
UE 25T	40,97 $\pm$ 13,10	41,35 $\pm$ 11,75	33,48 $\pm$ 7,51	29,33 $\pm$ 17,58(n=2)	28,28 $\pm$ 9,36 (n=3)
UE 50T	44,44 $\pm$ 15,53	48,31 $\pm$ 17,49	39,96 $\pm$ 20,73	30,05 $\pm$ 1,39(n=2)	21,45 $\pm$ 9,86(n=2)
UE 75T	33,39 $\pm$ 16,79	33,63 $\pm$ 17,67	32,22 $\pm$ 15,56	21,49 (n=1)	14,48 $\pm$ 8,44 (n=2)
UE 25H	38,56 $\pm$ 14,88	42,24 $\pm$ 20,31	38,94 $\pm$ 18,48	38,41 $\pm$ 17,82 (n=2)	34,33 $\pm$ 15,75 (n=3)
UE 50H	43,74 $\pm$ 18,43	45,00 $\pm$ 18,88	35,37 $\pm$ 19,08	51,92 (n=1)	32,08 $\pm$ 21,30 (n=3)
UE 75H	49,79 $\pm$ 20,06	52,17 $\pm$ 19,12	40,33 $\pm$ 16,04	33,1 $\pm$ 12,93 (n=2)	27,70 $\pm$ 15,51(n=2)

Media  $\pm$  desviación típica (\*n=5)Tabla 4.78 - Porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (10  $\mu$ M de  $Ca^{2+}$ -ionóforo)

PI-PNA-	PNA			PSA	
	Tiempo de incubación (min)				
Diluyente	5'	15'	30'	15'	30'
UE	15,22 $\pm$ 6,37	10,32 $\pm$ 4,78	14,34 $\pm$ 10,58	13,14 (n=1)	16,06 $\pm$ 4,95 (n=2)
UE 25T	18,83 $\pm$ 9,26	14,55 $\pm$ 8,55	18,89 $\pm$ 13,67	13,72 $\pm$ 14,18 (n=2)	21,42 $\pm$ 12,37 (n=3)
UE 50T	19,27 $\pm$ 14,93	13,22 $\pm$ 11,11	18,67 $\pm$ 15,52	22,48 $\pm$ 2,47 (n=2)	28,18 $\pm$ 12,22 (n=2)
UE 75T	21,81 $\pm$ 21,00	19,64 $\pm$ 19,47	15,74 $\pm$ 13,57	18,63 (n=1)	26,17 $\pm$ 11,48 (n=2)
UE 25H	23,34 $\pm$ 10,34	16,14 $\pm$ 10,85	14,20 $\pm$ 1,23	25,51 $\pm$ 4,26 (n=2)	29,18 $\pm$ 6,84 (n=3)
UE 50H	18,11 $\pm$ 7,15	14,26 $\pm$ 9,42	17,53 $\pm$ 11,76	13,28 (n=1)	11,39 $\pm$ 3,62 (n=3)
UE 75H	20,79 $\pm$ 16,3	15,70 $\pm$ 13,28	20,79 $\pm$ 10,61	20,99 $\pm$ 13,03 (n=2)	26,13 $\pm$ 6,12 (n=2)

Media  $\pm$  desviación típica (\*n=5)

En el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto, muertos con acrosoma degenerado y muertos con acrosoma intacto no se observó diferencia significativa alguna entre diluyentes (Tablas 4.78, 4.79 y 4.80, respectivamente).

Tabla 4.79 - Porcentaje de espermatozoides muertos reaccionados (10  $\mu$ M de  $Ca^{2+}$ -ionóforo)

PI+PNA+	PNA			PSA	
	Tiempo de incubación (min)				
Diluyente	5'	15'	30'	15'	30'
EU	22,12 $\pm$ 8,17	23,21 $\pm$ 8,85	24,06 $\pm$ 9,48	14,00 (n=1)	18,75 $\pm$ 10,58 (n=2)
EU 25T	26,55 $\pm$ 8,87	30,07 $\pm$ 12,42	31,6 $\pm$ 12,98	38,00 $\pm$ 4,91 (n=2)	29,31 $\pm$ 11,78 (n=3)
EU 50T	20,99 $\pm$ 2,85	24,2 $\pm$ 5,22	25,47 $\pm$ 6,86	27,83 $\pm$ 10,25 (n=2)	25,21 $\pm$ 18,31 (n=2)
EU 75T	30,68 $\pm$ 6,93	31,03 $\pm$ 6,81	34,05 $\pm$ 4,79	42,36 (n=1)	29,21 $\pm$ 4,55 (n=2)
EU 25H	27,66 $\pm$ 15,45	29,64 $\pm$ 13,68	32,45 $\pm$ 11,18	23,26 $\pm$ 8,05 (n=2)	21,11 $\pm$ 5,05 (n=3)
EU 50H	23,45 $\pm$ 7,47	25,85 $\pm$ 9,01	27,03 $\pm$ 8,67	25,31 (n=1)	30,15 $\pm$ 3,24 (n=3)
UE 75H	19,72 $\pm$ 2,61	22,32 $\pm$ 5,65	24,4 $\pm$ 6,04	24,54 $\pm$ 0,50 (n=2)	28,88 $\pm$ 1,64 (n=2)

Media(%) $\pm$  desviación típica (n=5)

**Tabla 4.80** - Porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma intacto (10  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ -ionóforo)

PI+PNA- Diluyente	PNA			PSA	
	Tiempo de incubación (min)				
	5'	15'	30'	15'	30'
UE	13,95±6,92	13,52±8,08	16,45±9,91	6,93(n=1)	21,56±19,28 (n=2)
UE 25T	13,65±5,07	14,04±3,03	16,01±4,98	18,95±1,51 (n=2)	20,98±2,28 (n=3)
UE 50T	15,30±5,24	14,21±4,95	16,70±8,01	19,63±6,4 (n=2)	25,16±15,95 (n=2)
UE 75T	16,11±8,89	17,69±8,37	20,39±8,89	17,53 (n=1)	30,14±1,50 (n=2)
UE 25H	10,44±4,60	11,97±5,52	14,40±6,41	12,57±5,85 (n=2)	19,10±6,41 (n=3)
UE 50H	1,70±7,53	14,89±6,32	20,07±11,22	19,24±13,79 (n=1)	26,13±15,92 (n=3)
UE 75H	9,64±4,52	9,80±3,37	14,47±7,64	11,14±0,4 (n=2)	17,84±10,24 (n=2)

Media(%)± desviación típica (n=5)

Los datos de las diferencias entre significativas entre estos medios la reacción acrosómica obtenida en suplementados. células vivas cuando ésta se induce utilizando una concentración de ionóforo de 10  $\mu\text{M}$  y el diluyente control (Tabla 4.81), sigue evidenciando una menor porcentaje de los medios que contienen aminoácidos, a pesar de que tampoco se presentan diferencias

**Tabla 4.81** - Diferencias para RA entre los distintos diluyentes y el diluyente control (UE) (10  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ -ionóforo)

Diferencias	Tiempo de incubación (min)		
	5'	15'	30'
UE 25T - UE	-7,74±24,08	-11,61±23,39	-11,66±22,94
UE 50T - UE	-4,27±23,36	-4,63±21,24	-5,18±20,77
UE 75T - UE	-15,32±16,32	-19,32±17,09	-12,92±19,42
UE 25H - UE	-10,15±23,24	-10,71±26,99	-6,20±30,54
UE 50H - UE	-4,97±14,80	-7,95±11,99	-9,77±8,70
UE 75H - UE	1,08±18,28	-0,78±16,81	-4,81±16,10

#### 4.4.2.1.4. Diferencias entre los distintos diluyentes, según los porcentajes de reacción acrosómica inducida con las concentraciones de ionóforo de 2,5 y 10 $\mu\text{M}$ y tiempo de exposición al mismo frente a las reacciones espontáneas (0 $\mu\text{M}$ ionóforo)

El incremento de reacciones acrosómicas obtenidas con 2,5 $\mu\text{M}$  de ionóforo frente a 0 $\mu\text{M}$ , para los diferentes diluyentes utilizados, solamente presenta significación estadística a los 15 min de incubación, destacando el diluyente UE 50T en comparación con los diluyentes UE 75T, UE 25H y UE50H (Tabla 4.82).

**Tabla 4.82** - Diferencias entre RA inducida con 2,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ -ionóforo y RA espontánea

2,5-0 $\mu\text{M}$	Tiempos de incubación (min)		
	5'	15'	30'
UE	21,54 $\pm$ 16,58	32,32 $\pm$ 19,55 <sup>ab</sup>	45,27 $\pm$ 14,76
UE 25T	14,6 $\pm$ 9,64	19,8 $\pm$ 13,5 <sup>ab</sup>	32,67 $\pm$ 11,64
UE 50T	28,02 $\pm$ 17,89	37,84 $\pm$ 24,96 <sup>b</sup>	36,47 $\pm$ 17,70
UE 75T	7,08 $\pm$ 5,83	11,07 $\pm$ 7,37 <sup>a</sup>	21,47 $\pm$ 17,85
UE 25H	6,47 $\pm$ 3,12	10,57 $\pm$ 7,00 <sup>a</sup>	30,20 $\pm$ 17,63
UE 50H	11,23 $\pm$ 10,47	10,42 $\pm$ 11,13 <sup>a</sup>	27,17 $\pm$ 16,33
UE 75H	14,15 $\pm$ 13,42	17,44 $\pm$ 15,28 <sup>ab</sup>	34,56 $\pm$ 19,77
<i>p</i>	<i>ns</i>	0,039	<i>ns</i>

Media(%) $\pm$  desviación típica (n=5). ns- no significativo. \*Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Por el contrario, el incremento de reacciones acrosómicas obtenidas con 10 $\mu\text{M}$  de ionóforo frente a 0 $\mu\text{M}$ , fue similar para todos los diluyentes empleados, no existiendo diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4.83).

**Tabla 4.83** - Diferencias entre RA inducida con 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ -ionóforo y RA espontánea

10-0 $\mu\text{M}$	Tiempos de incubación (min)		
	5'	15'	30'
UE	46,30 $\pm$ 14,10	50,87 $\pm$ 16,16	42,48 $\pm$ 18,22
UE 25T	39,18 $\pm$ 12,60	38,9 $\pm$ 11,87	30,46 $\pm$ 7,05
UE 50T	42,03 $\pm$ 15,53	45,99 $\pm$ 17,46	36,95 $\pm$ 19,35
UE 75T	30,97 $\pm$ 17,42	31,15 $\pm$ 18,25	28,29 $\pm$ 17,84
UE 25H	36,45 $\pm$ 14,68	39,56 $\pm$ 19,78	35,77 $\pm$ 18,75
UE 50H	41,25 $\pm$ 17,87	40,70 $\pm$ 18,23	30,35 $\pm$ 17,51
UE 75H	46,93 $\pm$ 20,53	46,89 $\pm$ 19,03	36,50 $\pm$ 16,70

Media(%) $\pm$  desviación típica (n=5)

Si consideramos simultáneamente tanto la concentración como el tiempo de incubación, sin tener en cuenta los distintos diluyentes, podemos observar diferencias significativas, en el porcentaje de PIPNA<sup>+</sup>, entre la incubación durante 5 vs 30', cuando son utilizadas concentraciones de 0 y 2,5  $\mu\text{M}$  ( $p=0,027$ ,  $p < 0,001$ , respectivamente), por el contrario, cuando empleamos concentraciones de 10 $\mu\text{M}$  no existen diferencias en las reacciones conseguidas, a los tiempos estudiados y a lo largo del periodo de incubación; para 10 $\mu\text{M}$  parece ser el tiempo de 15' el que permite un mayor porcentaje de RA. Por otra parte, existen siempre diferencias altamente significativas ( $p < 0,001$ ) a los distintos tiempos empleados, para las distintas concentraciones de ionóforo, aunque a los 30 min de incubación se observa un comportamiento similar entre 2,5 y 10 $\mu\text{M}$ , como puede observarse en la siguiente tabla.

**Tabla 4.84** - Porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados (todos los diluyentes)

PI-PNA+	Tiempo de incubación			p	
	Concentración ionóforo	5'	15'		30'
0 $\mu\text{M}$		2,35 $\pm$ 0,99 <sup>a a</sup>	3,08 $\pm$ 2,23 <sup>a ab</sup>	3,52 $\pm$ 1,97 <sup>a b</sup>	0,027
2,5 $\mu\text{M}$		17,10 $\pm$ 13,31 <sup>b a</sup>	23,00 $\pm$ 17,13 <sup>b ab</sup>	36,07 $\pm$ 16,36 <sup>b b</sup>	<0,001
10 $\mu\text{M}$		42,80 $\pm$ 15,80 <sup>c</sup>	45,09 $\pm$ 17,14 <sup>c</sup>	37,92 $\pm$ 16,12 <sup>b</sup>	ns
p		<0,001	<0,001	<0,001	

Media(%)  $\pm$  Desviación típica (n=35) (azul-concentración de ionóforo, rojo-tiempo de incubación)  
Ns- no significativo. \*Diferentes superíndices en la misma columna o línea indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

El porcentaje de células vivas, es decir que no captan PI, no presenta diferencias significativas ni entre los tiempos de incubación (5, 15 y 30 min) ni entre las concentraciones de ionóforo (0, 2,5 y 10  $\mu\text{M}$ ), sin diferenciar diluyentes.

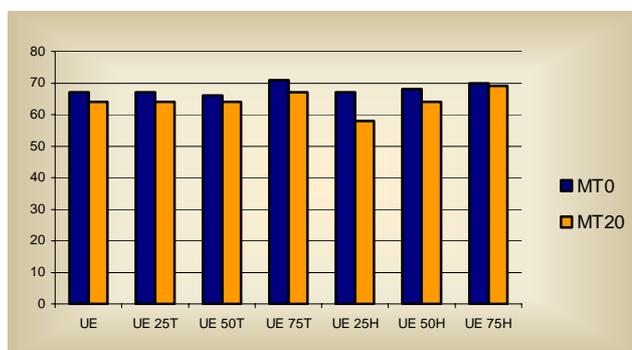
**Tabla 4.85** - Porcentaje de células vivas (PI-) según la concentración de ionóforo

PI- (células vivas)	Tiempo de incubación			
	Conc. Ionóforo	5'	15'	30'
0 $\mu\text{M}$		60,24 $\pm$ 14,56	58,48 $\pm$ 14,71	55,02 $\pm$ 15,79
2,5 $\mu\text{M}$		66,70 $\pm$ 11,73	64,56 $\pm$ 12,75	60,44 $\pm$ 13,92
10 $\mu\text{M}$		62,43 $\pm$ 11,71	60,57 $\pm$ 13,37	56,14 $\pm$ 15,08

Media(%)  $\pm$  Desviación típica (n=35)

#### 4.4.2.2 Estimación subjetiva de la motilidad espermática

La motilidad total visual de cada pajuela ha sido determinada tras la descongelación (MT0) y tras 20 min (MT20) de incubación en CCM, inmediatamente antes de la incubación con Ca ionóforo. No se han encontrado diferencias significativas entre los distintos diluyentes en ambas las motilidades.

**Gráfica 4.45** - Motilidad total postdescongelación**Tabla 4.86** - Motilidad total postdescongelación

Diluyente	Motilidades	
	MT0	MT20
UE	67,00 $\pm$ 4,47	64,00 $\pm$ 8,22
UE 25T	67,00 $\pm$ 7,58	64,00 $\pm$ 10,84
UE 50T	66,00 $\pm$ 10,24	64,00 $\pm$ 12,94
UE 75T	71,00 $\pm$ 5,47	67,00 $\pm$ 4,47
UE 25H	67,00 $\pm$ 6,71	58,00 $\pm$ 10,37
UE 50H	68,00 $\pm$ 7,58	64,00 $\pm$ 10,84
UE 75H	70,00 $\pm$ 9,35	69,00 $\pm$ 11,40

Media (%)  $\pm$  desviación típica (n=5)

#### 4.4.2.3 Correlaciones

**.MT y respuesta a la inducción de la RA** obtenido una muy elevada y significativa correlación (Tabla 4.88).

No existe correlación entre la motilidad y la reacción acrosómica espontánea en células vivas valoradas por citometría y mediante la tinción con fluorocromos (PI/PNA<sup>+</sup>); es decir, cuando la concentración de ionóforo es 0 μM. Sin embargo, existen correlaciones positivas para 2,5 y 10 μM (Tabla 4.87).

**Tabla 4.87** - Coeficiente de correlación entre acrosomas reaccionados y motilidad

Acrosomas reaccionados y motilidad	2,5 μM		10 μM	
	MT0	MT20	MT0	MT20
r	0,197	0,248	0,459	0,486
n	105			
P	<0,05		<0,001	

**.Correlaciones entre marcaje con PNA y con PSA para las células vivas que sufren reacción acrosómica inducida**

Comparado en las alícuotas sometidas a 10 μM de ionóforo, se ha

**Tabla 4.88** - Coeficiente de correlación entre marcaje con PNA y con PSA

PNA (PI/PNA <sup>+</sup> ) y PSA (PI/PNA <sup>+</sup> )	
r	0,982**
n	28
p	<0,001

## **5. DISCUSIÓN**



### 5.1. Experimento 1. Efectos de la adición de aminoácidos en las características del semen refrigerado en el diluyente Tris-fructosa-ácido cítrico

En este trabajo hemos valorado los efectos de la suplementación con Taurina, del diluyente para refrigeración del semen de perro. Previamente, discriminamos el grado de influencia, a distintas concentraciones, de los aminoácidos, glutamina, prolina y taurina en la conservación del semen de perro a 4°C; según la observación subjetiva de la motilidad. Son muy raros los trabajos relativos al impacto de la suplementación de los diluyentes de refrigeración con aminoácidos; Ijaz y Ducharme (1995) han obtenido buenos resultados incluyendo 70-100mM de taurina en el diluyente para refrigeración del semen de caballo. Sin embargo, son más frecuentes las referencias bibliográficas que sugieren el valor crioprotector de aminoácidos en condiciones de congelación; así Sánchez-Partida y col (1997; 1998) han obtenido buenos resultados con la adición de 25 y 50mM de taurina, y también con la adición de 53-54mM de prolina y glicina para el semen de morueco. Trimeche y col. (1999) han demostrado los efectos beneficiosos del empleo de glutamina y prolina, a concentraciones de 30 al 50mM, para el semen de caballo.

A lo largo de esta investigación se han mantenido una serie de constantes. Así, hemos agrupado el semen de diferentes machos en un *pool*, procedimiento utilizado con frecuencia en los estudios del semen humano (Bielfeld y col., 1990) y de perro (Silva y Verstegen, 1995; Peña y col., 1998b; Peña y Linde-Forsberg, 2000; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001), con el fin de proporcionar el volumen y concentración necesarios para cada experimento. Siendo las alícuotas derivadas del mismo *pool* procesadas de igual modo, las diferencias observadas entre los grupos experimentales deben atribuirse, por tanto, a las diferencias existentes entre los diluyentes (Silva y Verstegen, 1995; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001a). No han existido diferencias significativas entre las características en fresco de los diferentes *pools* obtenidos, estando éstas dentro de los valores referidos para el perro (England y Ponzio, 1996).

Solamente ha sido utilizada la fracción rica en espermatozoides del eyaculado. Para ello, en la recogida se evitó la mezcla con la fracción prostática (primera y tercera fracciones), conocida por sus efectos nocivos en la calidad seminal tras un prolongado contacto con los espermatozoides (Aalseth y Saacke, 1985). No obstante, ha sido publicado que en refrigeración y en presencia del diluyente apropiado, la existencia de fluido prostático en baja concentración no afecta a la motilidad, la viabilidad espermática ni a la integridad del acrosoma (Sirivaidyapong y col., 2001a). Sin embargo, la presencia de fluido prostático tiene efectos perjudiciales para la calidad seminal en la congelación

(Sirivaidyapong y col., 2001a). En la refrigeración, su utilización como diluyente sin previa dilución es perjudicial a la integridad del acrosoma, habiendo sido observada la hinchazón de esta estructura en el espermatozoide de bóvido (Aalseth y Saacke, 1985). En el espermatozoide de perro, la utilización de plasma seminal como diluyente de refrigeración se reveló inapropiada en el mantenimiento de la motilidad, velocidad e integridad de las membranas plasmática y del acrosoma (Rota y col., 1995).

La proporción de dilución para los pools en refrigeración ha sido de 1:5 v/v (semen/ diluyente), tal como preconizan varios trabajos de semen refrigerado (Linde-Forsberg, 1995; England y Ponzio, 1996), puesto que demasiada dilución ejerce un impacto negativo en la motilidad (Linde-Forsberg, 1995). El diluyente-base utilizado en este trabajo ha sido el Tris-fructosa-ácido cítrico, generalmente utilizado en clínica y en investigación, siendo conocido por proporcionar razonables tasas de fecundidad (Linde-Forsberg, 1995) y un buen mantenimiento de la motilidad y longevidad *in vitro*, cuando es comparado con otros diluyentes de refrigeración (Rota y col., 1995). A ello puede contribuir el hecho de que el diluyente contenga una baja concentración de calcio, y, de este modo, puede ser capaz de retrasar la aparición de reacciones acrosómicas y aumentar la longevidad de los espermatozoides (Sirivaidyapong y col., 2000).

En el estudio preliminar, el **experimento 1.1**, el aminoácido y las concentraciones a ser investigados en pormenor en el experimento principal fueron seleccionados con base en la motilidad progresiva tras 168h de refrigeración. La glutamina fue descartada ya que sus efectos beneficiosos han sido bastante más discretos que los de la taurina, si bien en la bibliografía son referidos efectos beneficiosos para la motilidad con la incorporación de la glutamina a los diluyentes de congelación de espermatozoides de otras especies (Renard y col., 1996; Trimeche y col., 1999; Kundu y col., 2001). Esta diferencia de resultados podría deberse a características de especie y quizá a que la interacción de este aminoácido con la membrana del espermatozoide sea diferente en condiciones de refrigeración. A este aminoácido le son atribuidas funciones protectoras, metabólicas (Renard y col., 1996) y osmóticas, ejerciendo estas funciones a nivel extracelular y a través de interacción con receptores situados en la membrana del espermatozoide, dada su imposibilidad de atravesar la membrana (Trimeche y col., 1999). También se descartó la prolina porque tenía valores algo inferiores a la taurina y porque ya había sido probada, con éxito, en el semen de perro bajo condiciones de congelación (Peña y col., 1998a). Además, la concentración de 80 mM de Taurina resultó algo menos eficaz que las concentraciones de 30 y 50 mM, a diferencia de lo observado para el caballo (Ijaz y Ducharme, 1995); de modo que se seleccionaron las

concentraciones de 30 y 50mM de Taurina para los siguientes experimentos a realizar bajo condiciones de refrigeración.

Los resultados del **experimento 1.2** permiten observar que los diluyentes Tris 10, Tau 30 10, Tau 30 20 y Tau 50 10 no presentan diferencia significativa alguna frente al diluyente control, Tris 20. Los diluyentes restantes presentan las siguientes diferencias: - Tris 5 para la estimación visual de la motilidad total los días 2 y 3, progresiva los días 1,2 y 5, para el test de endósmosis los días 2 y 3 y finalmente el día 7 en el % de células que han perdido el acrosoma, el cual resulta superior frente al diluyente control; -Tau 50 5 para la motilidad total los días 2 y 8, la motilidad progresiva los días 2, 5 y 8 estimadas visualmente, ALH el día 2 y test de endósmosis el día 8; y -Tau 30 5 para la estimación visual de la motilidad total y progresiva y test de endósmosis únicamente en el día 8; -Tau 50 20 para ALH en el día 2. Las muestras refrigeradas con Tau 30 20 alcanzaron una mayor duración media de la motilidad frente al medio control (13,6 días *versus* 11,4), aunque sin diferencias estadísticas.

Independientemente del diluyente en cuestión, el porcentaje de yema empleado ha sido el factor que más significativamente afectó a las motilidades total y progresiva, estimadas mediante observación visual, y la integridad de la membrana plasmática y del acrosoma. Así, el análisis estadístico por porcentaje de yema evidencia la ventaja del 20% en diferentes parámetros frente al 5% a lo largo del experimento y solamente los días 2 y 3 frente al 10%; diferencia inexistente cuando el análisis de la motilidad se realiza por sistema informático. Algunos diluyentes con el 5% de yema mantuvieron valores de MTV y MPV bastante inferiores, empezando las diferencias a ser evidentes a partir de las 48 horas de refrigeración y que se acentúan a lo largo del experimento. Por ejemplo, ya en el día 2, Tris 5 presenta una MPV media del 65%, mientras que Tau 50 20 alcanza el 75%; el día 8 la MPV para Tris 5 ha disminuido al 23,75% pero Tau 50 5 presenta MPV de solo el 18%, mientras la de Tau 50 20 se sitúa en el 39%. Los diluyentes que presentan mejor motilidad progresiva visual en este mismo día son Tau 30 20 (53,65%) y Tris 20 (46,25%), ambos sin diferencia estadística entre ellos.

Los efectos beneficiosos de la yema contra el choque térmico están plenamente comprobados en la refrigeración y congelación del semen de perro y de otras especies domésticas. Sin embargo, los complejos mecanismos envueltos en esta protección están siendo sistemáticamente objeto de investigación (Manjunath *y col.*, 2002). Nuestros resultados corroboran la importancia que tiene la presencia de yema en el diluyente de refrigeración del semen de perro, dados sus beneficios en la preservación de la motilidad

y de la longevidad *in vitro* y en la estabilización de la membrana; esenciales para la manutención de una buena fertilidad *in vivo*. Por otra parte, nos hacen pensar que resulta innecesario el uso de niveles tan altos como el 20%; pudiendo utilizarse un 10% o mismo un 5% al menos para una preservación menor de 48h o mayor de 72h.

Comparativamente a los efectos de la yema, los efectos de los aminoácidos han sido más moderados. Los resultados evidencian discretos efectos beneficiosos del aminoácido Taurina en ambas concentraciones en la MTV y MPV hasta el día 5, y hasta el día 4/6 en la motilidad y velocidad computerizadas. Sin embargo, hemos observado que la adición de 30mM de Taurina permite rebajar al 5% la concentración de yema del diluyente, sin que se presente un detrimento de la motilidad en comparación con el medio control (Noruego con 20% de yema), antes de los 7 días en refrigeración; hecho que nos ha permitido alcanzar el objetivo propuesto. Adicionalmente, los resultados indican que la inclusión de Taurina a 30 y 50 mM preserva favorablemente las calidades espermáticas. Sin embargo, sus efectos en la capacidad de fecundación del espermatozoide conservado por refrigeración necesitan ser investigados.

El examen visual del porcentaje de espermatozoides móviles es la prueba laboratorial de la calidad del semen más comúnmente utilizada (Budworth y *col.*, 1988). Sin embargo, adicionalmente al examen visual, la motilidad también ha sido determinada por el analizador computerizado CASA. La utilización de estos sistemas, aplicados en el análisis del semen humano y de algunas especies domesticas, facilita una correcta evaluación de la eficacia de los métodos de preservación del semen de perro y permite la comparación de resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación (Günzel-Apel y *col.*, 1993). Están publicados diversos trabajos en los cuales los sistemas computerizados han sido aplicados en la determinación de los parámetros de motilidad del semen de perro (Günzel-Apel y *col.*, 1993; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001b; Peña y *col.*, 2003a; Ponglowhapan, 2003).

Una de las limitaciones reconocidas en la utilización de estos analizadores es que las partículas de yema pueden ser consideradas como espermatozoides, puesto que estos sistemas se basan en las características de la imagen, en su tamaño, forma y su tonalidad (escala de grises) (Budworth y *col.*, 1988); además, su exactitud se ve afectada por variados factores técnicos, como las condiciones de medición, de las cuales destacan la temperatura, el tipo de cámara y su profundidad y el medio de suspensión (Davis y Siemers, 1995). Como algunos de los diluyentes contenían 20% de yema, se ha pretendido reducir la presencia de las partículas por medio de centrifugación y filtración.

También está recomendada la decantación, aunque todos estos procedimientos no eliminan, en absoluto, los “falsos espermatozoides” (Budworth y col., 1988). Por otra parte y para mejorar la exactitud del análisis, hemos impuesto un umbral de velocidad mínima variable entre 10 y 20  $\mu\text{m}/\text{seg}$  para permitir una correcta discriminación entre espermatozoides móviles y no-móviles.

En el análisis computerizado de motilidad -que presenta de un modo global correlaciones altas y significativas ( $r$  entre 0,703 y 0,859;  $p < 0,01$ ) con los datos del examen visual- se confirman en la MT los buenos resultados del diluyente Tau 50 20, hasta el día 4 y para el Tau 30 20 hasta el día 8 y 12. Fue notoria, en este experimento, la ausencia de diferencias significativas para los distintos parámetros de motilidad y velocidad computerizadas, excepto para el factor AHL y LIN. En el día 2 ( $p = 0,037$ ), ALH resulta significativamente mayor para el diluyente Tau 50 5 frente al resto de los diluyentes; también el diluyente Tau 50 20 presenta diferencias significativas frente al diluyente Tris 20 (control) y el diluyente Tris 10. Por otra parte, ALH es significativamente mayor para la presencia del 5% de yema vs 20% ( $p = 0,020$ ) y para la presencia de 50mM vs 0 y 30mM de taurina ( $p = 0,016$ ). Para LIN, el día 6, ha sido posible observar valores superiores y estadísticamente significativos ( $p = 0,026$ ) únicamente para el porcentaje del 5% de yema vs el 20%.

La viscosidad del medio diluyente influye en las características de motilidad (Amann, 1989), por eso, la presencia de yema en el diluyente hace que aumente la viscosidad del medio y que se reduzca la velocidad del espermatozoide, como ha sido observado en el eyaculado bovino (Amann y Hammerstedt, 1980; Hirai y col., 1997). Para el semen de perro, Rota y col. (1995) desaconsejaron el análisis de la motilidad por técnicas objetivas cuando se utilizan diluyentes compuestos con leche y crema. Es posible que en nuestro trabajo la motilidad y velocidad, estimadas mediante sistema informático, para los diluyentes con 20% de yema estén “artefactualmente” disminuidas en comparación con las del 5%, pese a la previa centrifugación y filtración de los diluyentes. Ésto nos sugiere que cuando se comparan diluyentes con distintos porcentajes de yema y diferentes viscosidades, mediante examen computerizado de la motilidad, sea en la actualidad difícil establecer diferencias para el programa informático y, por tanto, no se deba excluir el examen visual de la motilidad total y progresiva.

En el día 0 del experimento y aunque sin que se produzcan diferencias significativas, VCL, VSL y VAP de los diluyentes a 5% de yema presentan valores más elevados que los de 20% a diferencia de lo que ocurre con LIN. Del mismo modo, la

adición del 50mM de Taurina presenta también un incremento de VCL, VSL y VAP frente a 30mM y ambas concentraciones frente a 0mM; para el factor LIN la ausencia de aminoácidos presenta valores inferiores que su presencia. En este día, MT y MP resultaban superiores para con el incremento del porcentaje de yema y la concentración de taurina. Aunque los resultados del día 0, no están influidos por el aumento de detritus celulares si pueden estarlo por el fenómeno de equilibrio entre las células y el diluyente a la temperatura ambiente; ya que son datos previos al proceso de refrigeración.

Para ALH, todos los diluyentes exhibieron aumentos desde el día 0 al día 2, y algunos incluso del día 2 al día 4. Este hecho también ha sido observado por Tardif y col. (1997) en el semen bovino conservado a 5°C. Siendo el ALH una medida de las desviaciones laterales de la cabeza del espermatozoide sobre su trayecto medio de progresión y que aumenta durante la hiperactivación (Robertson y col., 1988; Yunes, 2003), es esperado que también aumente, en alguna proporción, en la refrigeración, puesto que está probada la ocurrencia de alguna capacitación en la refrigeración del semen de perro (Rota y col., 1999a) y de cerdo (Watson, 1996). Destaca el valor de ALH en los diluyentes suplementados con taurina en el día 2, en que tau 50 mM presenta diferencias significativas frente a las otras concentraciones, mas bajas. Siendo estadísticamente mas evidente en un diluyente con la mas baja concentración de yema (5%) y la mas alta de taurina (50mM) donde se induce a una mayor precocidad frente a los otros medios en mostrar un aumento de uno de los parámetros de motilidad mas relacionados con la capacitación espermática y el deterioro celular. La adición de taurina a 30 mM ha beneficiado numéricamente la longevidad espermática, aunque sin diferencias estadísticas, principalmente para el diluyente Tau 30 20.

La ventaja de utilizar porcentajes más bajos de yema está principalmente relacionada con algunas evidencias que indican a la yema como un posible substrato para la peroxidación lipídica en la refrigeración (Shannon y Curson, 1972; Maxwell y Stojanov, 1996). De hecho, la yema de huevo es conocida por aumentar indirectamente el llamado "efecto tóxico del semen muerto" ya que aumenta el substrato para la enzima oxidasa, aumentando el peróxido, responsable de dicho efecto sobre otros espermatozoides (Shannon y Curson, 1972). Por otra parte, como hemos visto, la yema puede interferir en el análisis computerizado de la motilidad, pudiendo ser confundida con espermatozoides estáticos y/ o bajando la velocidad espermática.

Nuestros resultados en parte coinciden con lo que había sido constatado en trabajos previos sobre la inclusión de los aminoácidos prolina, taurina y glicina-betaina en

el diluyente de congelación para semen ovino, donde sin yema o glicerol en el diluyente de congelación los efectos protectores de los aminoácidos no son observados, por lo que podrían ser disminuidos aunque nunca abolidos (Sánchez-Partida y col., 1992; 1997; 1998). Se ha postulado que los fosfolípidos de la yema interactúan con la membrana plasmática (Quinn y col., 1980) y que las características protectoras de los aminoácidos contra el choque térmico se basan en la interacción con los fosfolípidos de membrana (Sánchez-Partida y col., 1998), de modo que el efecto de uno dependería del efecto del otro; hecho que estaría de acuerdo con nuestros datos, al no encontrar diferencias significativas entre las motilidades observadas visualmente para los diluyentes Tau 30 con 5% de yema y Tris con 20% de yema, durante 7 días en refrigeración.

A la taurina se le han atribuido efectos significativamente beneficiosos en la preservación de la motilidad subjetiva y en la supervivencia espermática pos-refrigeración (Ijaz y Ducharme, 1995) cuando se adiciona a concentraciones entre 70 y 100mM al semen de caballo; probablemente debidos a mecanismos de estabilización de la membrana, inhibición de la peroxidación lipídica y modulación enzimática con aumento de las concentraciones celulares de  $K^+$ . Nuestros resultados sugieren que la adición de taurina a 30 y a 50 mM al diluyente de refrigeración Tris-fructosa-ácido cítrico-yema mantiene favorablemente la motilidad y la longevidad del semen de perro, pero no la supera significativamente frente al diluyente control.

En los últimos días del experimento se observó un aumento en el valor de la media en algunos parámetros de motilidad. Tal aumento fue observado tanto en la MT y MP visuales como computerizadas, entre el día 6/7 y 8 de algunos diluyentes. Este hecho, que no corresponde a una "mejora" real de la calidad espermática, puede atribuirse al hecho de que a lo largo de los días las muestras con motilidad próxima a cero son eliminadas, quedando las alícuotas que poseen motilidades superiores. Así, la disminución del número de muestras hace aumentar, por artefacto, el valor de la media.

Durante este trabajo fue evidente una disminución gradual de la concentración de células (datos no mostrados). La disminución aparente de la población de células puede estar asociada a la muerte celular con pérdida total o parcial de la integridad de la membrana y agregación de los espermatozoides muertos en *clusters*, aparentando así una disminución del número de espermatozoides. Tardif y col. (1997) han constatado un declive en la concentración de las muestras refrigeradas durante la preservación de 4 días, atribuyendo este hecho a la adhesión de los espermatozoides a las paredes de los recipientes, aunque también que el diluyente empleado podría influir. Las aglutinaciones

entre espermatozoides parecen indicar alteraciones acrosomales y de la membrana plasmática susceptibles de afectar la capacidad fecundante del semen (Rota y col., 1998). También parece influir la ausencia de plasma seminal, al ser éste sustituido por los medios diluyentes (Harrison y col., 1978).

La integridad de la membrana ha sido evaluada mediante la realización la prueba de endósmosis (TE), que evalúa la capacidad del espermatozoide para hincharse en presencia de medio hipo-osmótico, respuesta indicativa de la integridad de la membrana y de una actividad funcional normal (Jeyendran y col., 1984). Los resultados de este test reflejan con mayor exactitud el potencial fertilizante de la muestra que las pruebas convencionales (Van Der Ven y col., 1986).

Nuestros resultados para el TE demuestran elevadas y significativas correlaciones con las motilidades visuales y computerizadas, coincidiendo con lo referido por otros autores (Kumi-Diaka y Badtram, 1994) y coincidiendo también con que la integridad de membrana es el requerimiento mínimo para que el espermatozoide sea móvil (De Leeuw y col., 1991). Sin embargo, los trabajos de Jeyendran y col. (1984) han constatado una mayor correlación entre la respuesta al TE y la capacidad de penetración de ovocitos que con la motilidad o la morfología. Según estos autores, esta diferencia podría residir en el hecho de que el TE es indicativo de la integridad y de la función de transporte de membrana, mientras que la motilidad depende no solamente de dicho transporte sino también de un mayor número de funciones bioquímicas. Tampoco England y Plummer (1993) encontraron correlación entre TE y motilidad y otras pruebas convencionales. Nuestras correlaciones entre TE e integridad acrosomal tampoco han sido elevadas, pese que estas han sido positivas y significativas.

En la evaluación de la calidad seminal además del examen de la motilidad deben ser utilizados otros criterios. Así, las características de **integridad del acrosoma** también han sido evaluadas diariamente mediante la coloración específica Spermac<sup>®</sup>, colorante con especial afinidad para el acrosoma (Oettlé, 1986b). La utilización de esta coloración permite la correcta diferenciación del acrosoma, debido a sus propiedades metacromáticas, que confieren al acrosoma y a la zona ecuatorial distintos tonos de verde, y a la región pos-acrosómica un tono rojo (Oettlé, 1986a). En nuestro experimento esta técnica ha permitido observar diferencias entre las distintas concentraciones de yema para el porcentaje de acrosomas normales y sin acrosoma. Sin embargo, los diluyentes con 20% de yema presentaban, a partir del día 9, un porcentaje inferior de acrosomas normales que los diluyentes con 5%; probablemente debido a la existencia de

un elevado porcentaje de yema en los primeros, que puede haber interferido con la coloración, impidiendo así una correcta diferenciación del acrosoma. Por otra parte, el prolongado tiempo de preservación de los espermatozoides en algunos de los diluyentes originó algún deterioro de la calidad de la muestra, con presencia de *detritus* del fondo de las preparaciones, factor que dificultó también el examen del acrosoma. Además, como en el resto de las valoraciones realizadas, la disminución del número de muestras origina una mejora por artefacto de los datos.

Los análisis estadísticos efectuados, para evaluar el impacto del porcentaje de yema y de la concentración de aminoácido, fueron realizados hasta que el número de alícuotas de un determinado diluyente era  $\geq 2$ , aunque la motilidad visual de las alícuotas fue examinada hasta que era próxima a 0; sorpresivamente una de las muestras refrigerada en el diluyente Tau 30 20, sobrevivió hasta el día 22. En la bibliografía, solo se encuentran publicados dos trabajos recientes sobre refrigeración con monitorización de la calidad hasta semejantes fechas de preservación; incluyendo análisis de motilidad y viabilidad hasta el día 23 (Ponglowhapan, 2003) y evaluando motilidad y *estado* de capacitación hasta el día 16 (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001a).

En el **experimento 1.3.** se ha pretendido conocer el **estado de capacitación** de los espermatozoides. Algunos autores preconizan la previa incubación con calcio ionóforo antes del marcaje con la CTC para promover la capacitación y reacción acrosómica (Hewitt y England, 1998), paso no efectuado en nuestro experimento, ya que esta descrita la existencia de alguna capacitación en el transcurso de la refrigeración (Watson, 1995); siendo nuestra intención valorar la influencia de la concentración de Taurina, en diluyentes con 20% de yema, sobre la posible capacitación originada durante la refrigeración y no a su capacidad de ser inducida mediante otros factores.

Hemos constatado que con el tiempo de conservación ha aumentado la proporción de células que exhiben el patrón B y AR de fluorescencia por tinción con CTC, representativo de células capacitadas sin reacción acrosómica y de células con reacción acrosómica, respectivamente. Desde el punto de vista práctico este hecho implica que para una inseminación exitosa, con semen refrigerado, ésta deba ser realizada estrictamente en el momento de máxima fecundidad de la hembra, puesto que la desestabilización inducida por la preservación puede originar la pérdida, *in vivo*, de su capacidad fecundante antes de alcanzar el lugar de fecundación, disminuyendo la proporción de espermatozoides disponibles para la fecundación (Rota y *col.*, 1999a; Pommer y *col.*, 2002). Han existido algunas diferencias significativas puntuales en el

patrón B (día 9) y AR (día 3 y 9, destacando el diluyente Tau 30 y el control, respectivamente).

Fue constatado, en el análisis de las correlaciones entre los patrones observados con CTC y los parámetros de motilidad computerizada, que el patrón B se correlaciona negativamente con todos los parámetros de motilidad, excepto con ALH. La existencia de una correlación significativa y positiva entre ALH y el patrón B para la tinción con CTC coincide con lo que fue observado por otros autores quienes defienden que el ALH es un parámetro de motilidad asociado a la hiperactivación (Robertson y *col.*, 1988; Bailey y *col.*, 1994).

## 5.2. Experimento 2. Estudio del empleo de etilenglicol como crioprotector en la congelación del espermatozoide de perro

Este experimento fue diseñado con el objetivo de determinar si el etilenglicol (EG) podría ser utilizado efectivamente como crioprotector del semen canino, en comparación con los medios diluyentes Noruego y Uppsala-Equex. Para ello, hemos comparado su eficacia *in vitro* a distintas concentraciones: 4% y 8%, 4% asociado al glicerol a la misma concentración y 5% asociado a 0,5% de Pasta Equex.

Entre los factores que afectan a la supervivencia pos-descongelación del espermatozoide destacan la concentración de crioprotector y los ritmos de congelación y descongelación (Mazur, 1984). El glicerol es el crioprotector más frecuentemente utilizado en la criopreservación del semen de perro. Sin embargo, la conocida toxicidad de los crioprotectores más utilizados y el hecho de que no proporcionen una protección sensiblemente mayor al 50% de los espermatozoides sigue estimulando la investigación en nuevos crioprotectores (Watson, 1995). La sensibilidad a la toxicidad del glicerol varía entre las especies, al mismo tiempo que proporciona crioprotección, ésta puede afectar adversamente a las membranas del espermatozoide, afectando así su fertilidad (Watson, 1979). Los principales efectos perjudiciales del glicerol implican alteraciones en la organización y viscosidad del citoplasma y en la permeabilidad y estabilidad de la membrana plasmática (Hammerstedt y Graham, 1992). La estructura de la membrana se ve afectada en la organización de los fosfolípidos y las proteínas (Amann y Pickett, 1987).

De un modo general, se considera que la concentración óptima de glicerol para la criopreservación de semen es inferior a 1-2M, pese a que en los últimos años las concentraciones más estudiadas están alrededor de 0,5M, debido a los efectos perjudiciales de concentraciones superiores (Watson, 1995). Tras la publicación de los primeros trabajos en inseminación artificial con semen descongelado de perro (Andersen, 1975), en los que fue preconizado el 8% de glicerol, se ha estudiado el efecto de otras concentraciones de glicerol en la calidad pos-descongelación del semen de perro; los resultados de estos estudios varían con el diluyente e indican el 5% (Rota y *col.*, 1998), el 2-4% (Olar y *col.*, 1989), el 8% (Mayenco y Gómez-Cuétara, 1996; Peña y *col.*, 1998b), o el 4-6-8% (Cardoso y *col.*, 2003), como las concentraciones de glicerol más favorables a la motilidad y supervivencia pos-descongelación. En el espermatozoide de perro están descritos algunos efectos nocivos del glicerol, como la inferior unión del espermatozoide a ovocitos homólogos (Hay y *col.*, 1997a).

La incorporación de otros crioprotectores intra-celulares en los diluyentes de congelación del semen de perro como el DMSO ha sido también descrita (Olar y col., 1989), mostrando poca eficacia en la mantención de la motilidad y supervivencia pos-descongelación. Resultados similares se obtuvieron en la congelación del eyaculado de morueco (Molinia y col., 1994).

Mientras, el EG es un crioprotector utilizado con éxito en la congelación de tejido ovárico (Rodrigues y col., 2004; Newton y col., 1996) y embriones de diversas especies como roedores (Nowshari y Brem, 2001), caprino (Le Gal y col., 1993), vacuno y ovino (Massip, 2001). El amplio uso del EG en la criopreservación de embriones está justificado por su baja toxicidad y elevada permeabilidad en el embrión (Massip, 2001). Su aplicación en la criopreservación de semen de especies domésticas parece producir resultados semejantes, o, en algunos aspectos, incluso mejores a los del glicerol. Alvarenga y col. (2000) observaron en la presencia de 5% EG diferencias significativas en la motilidad del semen descongelado de caballo en comparación con el glicerol a la misma concentración. Sin embargo, en la segunda parte del experimento, pusieron de manifiesto que la motilidad pos-descongelación con los mismos diluyentes no había variado con el tipo de crioprotector, sino con el tipo de empaquetamiento utilizado; concluyendo que el EG tenía calidades crioprotectoras semejantes al glicerol. Moraes y col. (1998) refieren para el semen de morueco resultados en la motilidad y vigor con EG a 0,5M semejantes al glicerol a 0,72M, pero el EG demostró una mejor preservación del acrosoma ( $p < 0,05$ ).

En los trabajos de Henry y col. (2002) el EG a 5% presentó mejor MP del espermatozoide descongelado de caballo que el glicerol en la misma concentración pero sin que sea una diferencia significativa. En la segunda parte del trabajo ocurrió el inverso. Mantovani y col. (2002) encontraron en la misma especie resultados peores con EG a 3% que con el glicerol en la misma concentración pero tras 12h de incubación a 21°C los resultados se igualaron. Molinia y col. (1994) observaron en la congelación del espermatozoide de morueco resultados semejantes con EG a 3% que con 6% de glicerol.

En la congelación del semen de perro, los estudios son todavía escasos. Estos estudios destacan que el EG puede tener una acción semejante o superior al del glicerol (Santos y col., 2001), semejante (Soares y col., 2002), o peor (Cavalcanti y col., 2002) en la preservación de la motilidad, vigor y morfología espermática tras la descongelación.

De acuerdo con nuestros resultados y basándonos en las concentraciones estudiadas, el 5% de EG puede ser considerado como la concentración adecuada para la protección del espermatozoide de perro contra los daños de la criopreservación; mientras que el 8% probó ser el nivel que peor mantuvo la motilidad, linealidad y rectitud, integridad de la membrana plasmática y acrosomal y longevidad pos-descongelación.

Además, nuestros resultados evidencian que el EG al 5% asociado al detergente Equex<sup>®</sup> (diluyente VI) proporciona mejores resultados en la motilidad ( $p < 0,05$ ), velocidad, linealidad y rectitud que el diluyente Noruego (diluyente I). En la motilidad, las diferencias significativas han sido a nivel de la MTV (1h30), MT (1h y 1h30) y MP (1h y 1h30). El diluyente VI también presenta menor porcentaje de espermatozoides muertos con el acrosoma dañado (determinado mediante marcaje con PI/PSA) y mayor longevidad pos-descongelación que diluyente I, pero sin diferencias significativas.

Por otra parte, el glicerol a 5% asociado al Equex<sup>®</sup> (diluyente V) fue superior al EG asociado al mismo (diluyente VI), con diferencias significativas para: MTV (a las 2h), MT (2h) y MP (1h30 y 2h). En los parámetros de velocidad no hemos observado diferencias significativas. La integridad de la membrana (PI-PSA) fue mejor mantenida con el diluyente V, significativamente superior ( $p = 0,014$ ) a los demás diluyentes. En la longevidad tras la descongelación, el diluyente V fue significativamente superior a los diluyentes II, III y IV ( $p = 0,031$ ).

El diluyente III ha proporcionado resultados inferiores al glicerol en la misma concentración (diluyente I), siendo el diluyente que peor mantuvo la calidad espermática tras la descongelación. Sin embargo, el EG utilizado a la mitad de esta concentración, 4% (diluyente II) ha proporcionado resultados muy semejantes al diluyente I en los distintos parámetros estudiados.

Como hemos observado en nuestros datos, cuando el EG es utilizado a la misma concentración del glicerol no posee la misma eficacia de éste, permitiendo sugerir que el mecanismo de actuación en la célula espermática no sea el mismo. Es probable que la menor eficacia del diluyente VI comparativamente al V se deba a un ligero exceso de concentración, evidenciándose sus efectos tóxicos. El estudio de una concentración ligeramente inferior, como el 3 o 4%, asociada al Equex permitiría aclarar esta hipótesis.

Nuestros datos están en concordancia con los resultados descritos por otros autores en distintas especies, destacando que se obtienen mejores resultados cuando el EG se emplea con la mitad de la concentración que el glicerol, es decir, 4 y 8%

respectivamente. Cavalcanti y col. (2002) no han obtenido con el EG a 7% la eficacia en la congelación de semen de perro que obtuvieron con el glicerol en la misma concentración. Los trabajos de Soares y col. (2002), en la misma especie, refieren peores resultados con EG a 1M y glicerol a 0,8M a nivel del vigor espermático que con el EG a 0,5 y 0,25M. Moraes y col. (1998), así como Brisola y col. (1999), encontraron con el EG a 0,5M resultados semejantes y en algunos parámetros, incluso superiores, que con el glicerol a 0,72M en la congelación de semen de morueco. Por el contrario, estamos en desacuerdo con los resultados de Santos y col. (2001) quienes refieren, para la congelación del espermatozoide de perro, una eficacia semejante en la utilización de EG y de glicerol, ambos a la misma concentración (5%) en la motilidad, vigor y preservación de la morfología.

La asociación 4% glicerol con 4% EG (diluyente IV) ha funcionado algo peor en la motilidad, vitalidad (evaluación por eosina-azul de anilina) y longevidad que los diluyentes I y II, pese que las diferencias significativas solo han existido en la MTV 0:30 ( $p=0,000$ ). En los restantes parámetros (velocidades, linealidad, ALH, vitalidad e integridad del acrosoma mediante marcaje con PI-PSA), no han existido diferencias especiales. El hecho de que la asociación de crioprotectores no ha resultado especialmente bien en el eyaculado de perro, confirma los resultados reportados por otros autores. En el eyaculado de morueco, la asociación de glicerol con EG tampoco ha revelado efectos beneficiosos e incluso han sido perjudiciales para la motilidad pos-descongelación e integridad acrosomal del espermatozoide de morueco (Molinia y col., 1994). La menor eficacia de esta asociación de crioprotectores puede atribuirse a la toxicidad de la combinación de los crioprotectores, lo que impediría la protección completa de los diluyentes, y que, adicionalmente, causaría lesiones en el espermatozoide (Molinia y col., 1994). En el espermatozoide equino los resultados son distintos ya que la asociación de 1% glicerol con 4% EG funcionó de modo semejante al del glicerol a 5% o del EG a la misma concentración, sin embargo, la MP con esta combinación ha sido significativamente mejor que en la combinación 2% glicerol y 3% EG (Henry y col., 2002).

En cuanto a los métodos empleados en este trabajo, hemos realizado el examen de la motilidad visualmente y por analizador computerizado ambas con intervalo de 30 minutos, vitalidad e integridad del acrosoma mediante marcaje con citometría de flujo y vitalidad mediante coloración con eosina-azul de anilina de todas las muestras al T0 y T1:30. Dado que usando en combinación los métodos de evaluación *in vitro*, para valorar algunos de los atributos de los espermatozoides, es posible aumentar la exactitud de la estimativa de las funciones espermáticas (Amann y Hammerstedt, 1993).

Las características de la motilidad espermática determinadas por sistemas computerizados reflejan indirectamente la integridad de la membrana del espermatozoide y la actividad metabólica celular (Gil y col., 2000). La motilidad (Kjaestad y col., 1993) y la velocidad (Bongso y col., 1989; Kjaestad y col., 1993) son algunos de los parámetros espermáticos que más significativamente correlacionados se encuentran con la fertilidad. Budworth y col. (1988) concretizan que, además del porcentaje de espermatozoides móviles, la VAP y la VSL son los parámetros que presentan mayor correlación con la fertilidad.

Los resultados de los trabajos anteriormente publicados sobre la utilización de EG como crioprotector en la congelación de semen de perro (Santos y col., 2001; Cavalcanti y col., 2002; Soares y col., 2002), están basados en la evaluación subjetiva de la motilidad y en el análisis morfológico. A pesar que la evaluación visual de la motilidad sea rápida y de fácil realización, su propia naturaleza subjetiva excluye la comparación entre distintos investigadores (Watson, 1979). En el presente trabajo, la evaluación de la motilidad ha sido complementada con el uso del sistema computerizado SCA que nos permitió la evaluación más objetiva y precisa de la motilidad teniendo en cuenta 7 parámetros distintos (MT, MP, VCL, VSL, VAP, LIN y ALH). El análisis objetivo de las características de motilidad del espermatozoide descongelado bajo condiciones *in vitro* asimiladas a las condiciones *in vivo* permite contribuir a la valoración de los parámetros que pueden estar asociados a la fertilidad (Sánchez-Partida y col., 1999).

Los parámetros que han proporcionado mejor detección de diferencias entre los distintos diluyentes han sido: motilidad total visual, motilidad total y progresiva computerizadas, índice de linealidad e integridad de la membrana mediante marcaje con PI/Fitc-PSA. El parámetro ALH y la vitalidad, mediante coloración con eosina-aa, no ha mostrado diferencias significativas entre los distintos diluyentes. La menor eficacia del diluyente III no fue tampoco evidente para los parámetros de velocidad. Por otra parte, la buena mantención de la motilidad y de las otras características pos-descongelación observadas en el diluyente V no se han reflejado en el aumento significativo de los parámetros de velocidad ni por disminución del ALH, en contraposición con lo que observaron para este diluyente Peña y Linde-Forsberg (2000), cuando lo compararon con el diluyente equivalente pero sin Equex<sup>®</sup>.

La viabilidad e integridad de la membrana fueron evaluadas por 2 métodos distintos: marcaje con PI-Fitc-PSA y citometría de flujo y mediante coloración con eosina-azul de anilina. El marcaje con los fluorocromos PI-Fitc-PSA permite valorar más

exactamente la integridad del acrosoma, estructura fundamental en el desarrollo de la reacción acrosómica y particularmente afectada en la congelación (Oettlé, 1986a). El marcaje con PI-Fitc-PSA permitió encontrar diferencias significativas entre los distintos diluyentes tras la descongelación (T0), a nivel del porcentaje de espermatozoides muertos con el acrosoma dañado (PI+PSA+). El porcentaje de células vivas reaccionadas (PI-PSA+) fue estadísticamente significativo tanto a T0 como a T1:30 ( $p < 0,001$  y  $0,05$ ) siendo los diluyentes con pasta Equex (V y VI), seguidos de los medios con 8% de glicerol y 4% de EG (I y II), los que presentan un menor número de acrosomas alterados. El elevado número de espermatozoides que es posible evaluar mediante citometría de flujo para la integridad acrosomal es particularmente significativo y necesario; puesto que para que se pueda establecer una estimativa algo exacta entre integridad acrosomal y la fertilidad es necesario que el número de espermatozoides examinados por muestra sea considerable, debiendo superar los 200 por muestra (Kjaestad y col., 1993). No se han producido diferencias significativas en el porcentaje de células vivas que no incorporaron PI ( $p = 0,06$ ), ni en las que no incorporaron eosina (0,094), aunque de nuevo el medio V (con Equex<sup>®</sup> y glicerol) obtuvo los mejores resultados.

Según Storey y col., (1998) las estructuras químicas del EG y del glicerol son bastante semejantes. La *ratio* entre los átomos de carbón y los grupos hidroxilo existentes en la molécula del crioprotector (*ratio* C/OH) es considerado un indicador de la lipofilia. Una *ratio* elevado indica baja hidrofilia y alta lipofilia. Para estos autores la *ratio* C/OH del glicerol es 1, al igual que el del EG.

El hecho de que el EG pueda, presumiblemente, proteger al espermatozoide de las lesiones de la criopreservación por mecanismos similares a los del glicerol, no permite justificar que se obtengan distintos grados de crioprotección con la utilización de estos diluyentes (Molinia y col., 1994). Existen todavía pocos datos relativos a la toxicidad del EG en la célula espermática (Alvarenga y col., 2000; Mantovani y col., 2002), no existiendo por eso la posibilidad de diferenciar si las lesiones celulares son provocadas por la criopreservación propiamente dicha o por el crioprotector (Alvarenga y col., 2000). Sin embargo, la comparación realizada en nuestro estudio con la misma concentración de glicerol y EG ha permitido excluir los daños causados por el proceso de criopreservación; posiblemente los peores resultados obtenidos con EG al 8% frente al glicerol a la misma concentración son debidos a alguna acción tóxica, ya que el empleo al 4% de EG presenta resultados semejantes a los obtenidos por el empleo de glicerol al 8%. Ha sido demostrado que el EG provocó, en el espermatozoide humano, efectos nocivos en la motilidad de muestras frescas y descongeladas, al contrario que otros polioles, como el

eriteritol, ribitol y el sorbitol que han sido igualmente efectivos que el glicerol (Alvarez y Storey, 1993).

El hecho de que el EG posea un peso molecular inferior al glicerol (Molinia y *col.*, 1994; Massip, 2001), hace deducir que este pueda atravesar la membrana plasmática con mayor facilidad, penetrando y abandonando la célula espermática con mayor rapidez (Santos y *col.*, 2001). Para estos autores, el EG podría minimizar los efectos perjudiciales de la deshidratación y rehidratación del espermatozoide en los procesos de congelación y descongelación. De igual modo que Santos y *col.* (2001), Ball y Vo (2001) también observaron en el espermatozoide equino una mayor tolerancia osmótica en la rápida adición y remoción con el EG que con el glicerol, DMSO o propilenglicol, consubstanciado por un efecto perjudicial más reducido en la motilidad y la viabilidad. Guthrie y *col.* (2002) también observaron en el espermatozoide bovino que la adición y remoción de EG parece minimizar las alteraciones de volumen celular comparativamente al DMSO y glicerol, evidenciando un efecto menos depresor en la motilidad.

En el espermatozoide canino, esa característica beneficiosa del EG puede no observarse tan fácilmente ya que se constató que el glicerol penetraba rápidamente en el espermatozoide, pudiendo ser adicionado al diluyente de criopreservación inmediatamente antes de su empaquetamiento en las pajuelas (Peña y *col.*, 1998b). En el espermatozoide de cerdo, el glicerol penetra rápidamente en la célula (Almlid y Johnson, 1988) consiguiéndose el equilibrio en poco tiempo (menos de 30 segundos). Molinia y *col.* (1994) encontraron mejor protección con el glicerol solo que en conjunto con otros compuestos, defendiendo la probabilidad que este crioprotector posea una afinidad superior para el agua que otros crioprotectores que estudiaron (DMSO, propanodiol y EG), o que la fuerte interacción entre el glicerol y la membrana plasmática contribuya a un efecto protector más efectivo.

En nuestro estudio destacan las altas y significativas correlaciones entre las pruebas utilizadas para evaluar la viabilidad; mediante PI con citometría de flujo y eosina bajo microscopio óptico, tal como encontró Peña y *col.* (1998d). Asimismo, entre el examen visual y computerizado de la motilidad las correlaciones son altamente significativas, al igual que han encontrado otros autores (Bongso y *col.*, 1989).



### 5.3. Experimento 3. Interrelaciones entre la evaluación de la funcionalidad espermática mediante marcaje con Rodamina-PI y los parámetros clásicos de evaluación de la calidad espermática

Este experimento fue realizado con el objetivo de comparar la utilización del fluorocromo Rodamina 123 (R123) asociado al yoduro de *propidium* (PI) en combinación con la citometría de flujo (CF) con los exámenes “clásicos” utilizados en la evaluación de la calidad del semen de perro. Para tal, la viabilidad fue medida por la exclusión del PI y la función mitocondrial por la presencia de la fluorescencia de la R123 y estos exámenes han sido correlacionados con la motilidad y la tinción con eosina-nigrosina.

En el proceso de fertilización están implicados múltiples orgánulos del espermatozoide como es el caso del acrosoma, la mitocondria y el flagelo (Ericsson y *col.*, 1993). El *estatus* funcional de los distintos compartimentos del espermatozoide puede ser evaluado mediante tinción con el fluorocromo apropiado. La evaluación simultánea del estado funcional de compartimentos como las mitocondrias y la membrana plasmática está justificado en el hecho de que, para mantener su capacidad fertilizante, el espermatozoide debe ser viable y mótil (Papaioannou y *col.*, 1997) y mantener la integridad de las membranas (Fraser y *col.*, 2002). Además, pueden ser utilizadas determinadas combinaciones de fluorocromos para evaluar la integridad estructural y funcional de distintas membranas simultáneamente, lo que aumenta la probabilidad de predecir la capacidad fertilizante (Ericsson y *col.*, 1993). Ésto también se aplica en la refrigeración y congelación de semen, teniendo en cuenta los efectos adversos de estos procesos de preservación en las distintas membranas del espermatozoide (Fraser y *col.*, 2002).

La CF permite la evaluación de múltiples características en poblaciones celulares y en células individuales. Adicionalmente, la CF examina objetivamente millares de células por muestra; siendo rápido tanto el análisis como la preparación previa de la muestra (Graham y *col.*, 1990). En el espermatozoide de perro la CF ha sido hasta ahora reservada al estudio de la viabilidad y del *estado* del acrosoma; sin embargo, se considera que el uso de la CF debería ser ampliado a la evaluación de otras cualidades espermáticas (Peña y *col.*, 1998d; 1999a).

Las mitocondrias funcionales pueden ser efectivamente identificadas mediante la utilización de la R123, de modo que las alteraciones de la actividad mitocondrial están asociadas a las alteraciones en la intensidad de fluorescencia de la R123 (Graham y *col.*,

1990). La fluorescencia de la R123 representa un método conveniente de precisar el *estatus* metabólico del espermatozoide, dado su rápido transporte a través del espermatozoide metabólicamente activo y siendo un monitor exacto de la integridad y funcionalidad de la mitocondria (Tucker y col., 1986). El análisis de la actividad mitocondrial con la R123 fue validado para el espermatozoide humano (Auger y col., 1993), bovino (Graham y col., 1990) y equino (Papaioannou y col., 1997).

La fluorescencia de R123 esta asociada a la pieza intermedia del espermatozoide e indica la proporción de espermatozoides con potencial de membrana intacto (Karabinus y col., 1991). La capacidad para distinguir espermatozoides que exhiben distintos grados de actividad mitocondrial, y, por tanto, distintos grados de acumulación de R123, es dependiente del uso de apropiadas condiciones de coloración. Así, poca cantidad de marcador o insuficiente tiempo de acumulación conlleva una insuficiente coloración; por otra parte, el exceso de marcador produce coloración generalizada por toda la célula, independientemente del *status* metabólico de la célula y aporta fluorescencia verde al fondo de la preparación (Windsor y White, 1993).

En nuestro trabajo, hemos utilizado protocolos previamente validados para la determinación de la actividad mitocondrial del espermatozoide equino (Graham y col., 1990; Papaioannou y col., 1997). Tras la incubación con R123 hemos sometido las muestras a una centrifugación breve, haciendo un *pellet* de los espermatozoides, a fin de remover el exceso de R123 (O'Connell y col., 2002) y, tras este paso, cuando se trataba de coloración doble, la muestra era teñida con PI y filtrada.

En los ensayos previos a este experimento, hemos comprobado por microscopia de epifluorescencia que la R123 presenta una unión altamente específica y restringida al tracto intermedio del espermatozoide canino, no siendo observado tinción de otros compartimientos del espermatozoide. También comprobamos en dichos ensayos que el uso de R123 en las muestras con células vivas permitió la detección inequívoca del tracto intermedio del espermatozoide.

Tal como fue demostrado para otras especies, la coloración doble PI-R123 permitió la cuantificación de 4 poblaciones. Los patrones de fluorescencia observados en nuestro experimento coinciden con los referenciados en los trabajos de Graham y col. (1990) y de Karabinus y col. (1991). Así, además de los dos patrones con mayor expresión en este experimento, PI-R123+ y PI+R123-, correspondientes a espermatozoides viables con potencial de membrana mitocondrial intacto y muertos sin

funcionalidad mitocondrial, respectivamente, también fue observado el patrón PI+R123+. Este patrón es indicativo que el espermatozoide emite fluorescencia roja y verde simultáneamente y que, presuntamente, está en transición entre la población viable para la no-viable (Karabinus y *col.*, 1991). Estos espermatozoides moribundos o ligeramente dañados han perdido la capacidad de excluir el PI, pero mantuvieron la capacidad de retener la R123 durante los procesos degenerativos o de muerte celular (Fraser y *col.*, 2002). Otro patrón con poca expresión observado en nuestro experimento, PI-R123-, es característico de células viables con función mitocondrial sub-óptima (Graham y *col.*, 1990). Se considera que estas células, a pesar de ser viables, poseen probablemente un número sustancial de mitocondrias dañadas así como un número variable de mitocondrias funcionales (Papaioannou y *col.*, 1997).

Nuestro estudio mostró una fuerte correlación entre el análisis por CF de la integridad de la membrana y funcionalidad mitocondrial y los métodos de evaluación utilizados de modo rutinario en la evaluación de la viabilidad de los espermatozoides. Los porcentajes de espermatozoides vivos y muertos determinados tras tinción con los fluorocromos aisladamente o en conjunto y análisis por CF fueron altamente correlacionados con los respectivos porcentajes determinados por coloración con eosina-nigrosina y con los porcentajes de la motilidad. También existió una inequívoca correlación entre CF y microscopía de fluorescencia (MF) para la población marcada con PI-R123. Es de destacar la gran diferencia entre el número de células examinadas por CF y los restantes métodos de evaluación.

La tinción con R123 presentó un elevado porcentaje de positividad en las muestras vivas, al revés de las muestras muertas, que apenas marcaron en 1,37%. Las correlaciones entre la tinción con R123 y eosina-nigrosina y motilidad han sido elevadas en ambas muestras.

Las muestras que sufrieron congelaciones y descongelaciones sucesivas para inducir la muerte celular mostraron un alto número de espermatozoides muertos que fue constatado por todos los exámenes efectuados (% membrana dañada: 92,14, % eosina-nigrosina positivos: 92,5, y % de estáticos: 99,6). Estas alteraciones han sido constatadas por la disminución de espermatozoides teñidos con R123 y aumento de PI+ ( $p < 0,001$ ).

Esta descrito que la congelación y, en menor grado, el choque térmico inducen lesiones mitocondriales; en concreto en la reducción de la captación de la R123, lo que se refleja en la reducción de la función mitocondrial (Windsor y White, 1995). La R123

acumulada es liberada rápidamente del espermatozoide congelado así como del espermatozoide que sufrió choque térmico (Windsor y White, 1995). También fue evidente, tal como lo encontraron otros autores (Papaioannou y col., 1997), que la inducción de la muerte de los espermatozoides por congelación y descongelación sucesivas han conducido a resultados semejantes en términos de viabilidad y función mitocondrial, independientemente de si la tinción es doble (PI/R123), o única (PI o R123).

En nuestro trabajo es posible observar una sustancial correlación entre motilidad y fluorescencia por R123, tal como lo refieren trabajos realizados en el espermatozoide de otras especies (Evenson y col., 1982; Auger y col., 1989; O'Connell y col., 2002), mientras Ericsson y col. (1993) evidencian existencia de correlación entre R123 con motilidad y morfología. Algunos autores sugieren la posibilidad de que la reducción de la motilidad esté justificada por la reducción de la actividad mitocondrial, que se traduce por un menor número de espermatozoides que mantienen mitocondrias funcionales, y también por una función mitocondrial alterada (O'Connell y col., 2002). Los porcentajes de espermatozoides muertos determinados por la eosina-nigrosina han sido identificados por la CF, ya que estos métodos están altamente correlacionados, tal como lo encontró Graham y col. (1990). Existió una fuerte correlación entre PI+ y estáticos, correlación ya esperada, puesto que los espermatozoides muertos no son móviles. El presente estudio demostró también la existencia de correlación entre el porcentaje de espermatozoides con actividad mitocondrial y el porcentaje de células vivas (PI-,  $r=0,997$ ), tal como lo encontró Papaioannou y col. (1997).

El *estatus* del potencial de la membrana mitocondrial esta considerado un importante componente del metabolismo energético del espermatozoide. En este trabajo se observó que la determinación de la viabilidad celular -medida por la exclusión del PI- y de la funcionalidad mitocondrial -medida por la unión de R123 a la región intermedia y su fluorescencia- asociadas a la CF han sido correlacionadas con los porcentajes determinados por los otros métodos de evaluación laboratoriales utilizados. Pero considerando la importancia de la funcionalidad mitocondrial, la rapidez y exactitud del análisis por CF, el tamaño de muestra analizada y la especificidad de la fluorescencia proporcionada por la R123, se sugiere incorporar este método de evaluación, siempre que sea posible, a las pruebas de viabilidad del espermatozoide de perro. De este modo, sustituiríamos pruebas más morosas y con un menor numero de células examinadas, como sucede con las coloraciones vitales o el uso de la epifluorescencia.

Por otra parte, y teniendo en cuenta las exigencias necesarias a la fusión óvulo-espermatozoide, los estudios en el futuro deben, además de analizar la viabilidad y la funcionalidad mitocondrial, evaluar la integridad del acrosoma, a través del desarrollo de una triple tinción.



#### 5.4. Experimento 4. Efectos de la suplementación del diluyente de congelación Uppsala-Equex con los aminoácidos taurina e hipotaurina

Este estudio compara, en la primera etapa, la capacidad de los aminoácidos taurina y hipotaurina para proteger el espermatozoide canino contra los daños de la congelación, en concreto, en la motilidad, integridad de la membrana plasmática y acrosomal y en la actividad mitocondrial, **experimento 4.1**. En la segunda etapa hemos evaluado la respuesta de los espermatozoides preservados en los distintos diluyentes a la inducción de la reacción acrosómica mediante incubación con calcio ionóforo, **experimento 4.2**. Como medio-base de congelación hemos utilizado el diluyente que mejores resultados obtuvo en el experimento 2, el diluyente Uppsala-Equex, compuesto por 5% de glicerol y 0,5% de Equex-STM Paste (Linde-Forsberg, 2002).

Además de la baja viabilidad pos-descongelación (Watson, 2000), la criopreservación del semen de mamíferos compromete el potencial de fecundación del espermatozoide, debido a las alteraciones en la fisiología y estructura de la célula (Medeiros *y col.*, 2002). Entre los daños causados por la congelación destacan los provocados por los cristales de hielo y las alteraciones intra-celulares derivadas de la deshidratación, asociadas a la formación de hielo durante la congelación (Amann *y Pickett*, 1987).

En los protocolos de congelación, el espermatozoide tiene una breve exposición a los diversos agentes del medio crioprotector antes de la congelación. Sin embargo, cualquier efecto protector para el espermatozoide durante la refrigeración y congelación puede ser beneficioso para éste durante la incubación en el tracto reproductivo de la hembra previamente a la fecundación (Chen *y col.*, 1993). Los efectos beneficiosos de un determinado aditivo pueden no observarse en el momento de la descongelación, pero pueden ser reflejados en el tiempo de supervivencia tras la descongelación (Chen *y col.*, 1993).

Estudios anteriores utilizando semen de mamíferos o otros tipos de células demuestran que varios aminoácidos poseen propiedades crioprotectoras. A fin de minimizar los distintos daños derivados de la congelación, algunos autores sostienen que la adición de determinados aminoácidos puede ser útil en la criopreservación del semen de algunas especies (Kundu *y col.*, 2001); mejorando la motilidad y la fertilidad (Trimeche *y col.*, 1999). En concreto, han sido obtenidos resultados prometedores con la

incorporación de prolina y glicina en el diluyente de congelación del semen de morueco (Sánchez-Partida *y col.*, 1992; 1998), de caballo (Trimeche *y col.*, 1999) y en la congelación del espermatozoide epididimario de macho cabrío (Kundu *y col.*, 2001). La adición de prolina ha aportado efectos beneficiosos en la congelación del espermatozoide de perro (Peña *y col.*, 1998a).

Las lesiones de la criopreservación pueden verse aumentadas por la presencia de radicales libres que pueden inducir la peroxidación lipídica (Alvarez y Storey, 1992). El elevado contenido en ácidos grasos insaturados de las membranas hace al espermatozoide particularmente susceptible a los agentes y a las lesiones peroxidativas (Huxtable, 1992). El efecto protector de algunos compuestos con propiedades antioxidantes contra los daños de la peroxidación lipídica, como la L-arginina y la vitamina E o de proteínas seminales ha sido demostrado en distintas especies (Srivastava *y col.*, 2000; Perez-Pé *y col.*, 2001).

Por su parte, son conocidas las propiedades protectoras de la taurina y de la hipotaurina contra la peroxidación lipídica en el espermatozoide (Alvarez y Storey, 1983). La hipotaurina es además conocida por sus capacidades antioxidantes (Fellman y Roth, 1985), habiéndose sugerido un posible papel protector de los lípidos de la membrana (Huxtable, 1992). A la taurina se le atribuyen también propiedades protectoras contra el choque osmótico, traduciéndose por una mayor viabilidad celular tras la exposición a situaciones de estrés osmótico (Ozasa y Gould, 1982). La taurina mantiene la motilidad y la capacitación (Mrsny *y col.*, 1979); así a la hipotaurina se le reconocen efectos positivos sobre la capacitación (Meizel *y col.*, 1980). Ambas estimulan la fecundación *in vitro* del espermatozoide de hamster (Leibfried y Bavister, 1981).

En nuestro experimento, hemos incorporado al diluyente de congelación base Tris-fructosa-ácido cítrico-glicerol suplementado con 0,5% de SDS, los aminoácidos taurina e hipotaurina a concentraciones de 0, 25, 50 y 75 mM. La actuación de los aminoácidos en el espermatozoide parece ser esencialmente una acción extra-celular, mediante interacción con los receptores en la membrana del espermatozoide (Trimeche *y col.*, 1999). La asociación del SDS con un crioprotector extra-celular ya había producido efectos beneficiosos en el diluyente Tris-ácido cítrico-glucosa en la congelación del semen del macho cabrío (Aboagla y Terada, 2004).

En nuestro trabajo no han sido observadas diferencias significativas en los parámetros de motilidad e integridad de la membrana con la adición de los aminoácidos

taurina e hipotaurina al diluyente de congelación, así como en la actividad mitocondrial. Hecho que no esperábamos, ya que la taurina había mejorado la motilidad pos-descongelación del espermatozoide de morueco (Sánchez-Partida y col., 1997), así como la hipotaurina en el espermatozoide de toro (Chen y col., 1993). Las concentraciones de aminoácidos utilizadas en nuestro trabajo estaban basadas en los trabajos de Sánchez-Partida y col. (1997), que han utilizado, con éxito, 25 y 50 mM de taurina.

Algunas diferencias significativas puntuales a las 2 h en los parámetros de motilidad han tenido lugar en ALH, el UE 25 H tubo la ALH más baja ( $p=0,021$ ), lo que significa que mantiene mejor la motilidad y el movimiento rectilíneo en ese momento, manteniéndose la tendencia lo largo del experimento. También el porcentaje de PI-PSA+ inmediato a la descongelación, T0, y a T1:30 de incubación fueron significativamente elevados en el medio UE 50H frente al resto de los medios, incluyendo el control (cuando fueron diluidos 50:50 en PBS y equilibrados 5min a 38°C antes de proceder a la tinción). Cabe destacar aún en nuestro estudio la existencia de correlaciones positivas y altamente significativas entre el porcentaje de células vivas determinado por los distintos medios de tinción utilizados (CF y eosina), así como con el porcentaje de motilidad a T0 y T1:30.

En la congelación del espermatozoide de toro, la incorporación de 14 y 28 mM de taurina al segundo componente del diluyente de congelación (el componente que contenía glicerol) ha mejorado la motilidad pos-descongelación (Chen y col., 1993), aunque la hipotaurina a 7 mM haya sido menos efectiva. Sin embargo, en este trabajo los autores constataron que la adición de taurina e hipotaurina a ambos componentes del diluyente no aportó mejoras significativas.

Cabe la posibilidad de que las concentraciones utilizadas en nuestro estudio no hayan sido las más óptimas para inducir efectos beneficiosos adicionales. Por otra parte, es posible que éstas sean concentraciones ideales pero que la criopreservación haya inducido daños funcionales que han alterado el metabolismo espermático y, que, de este modo, los aminoácidos no hayan ejercido sus potenciales efectos beneficiosos. Incluso es también posible que el hecho de haberlos adicionado a ambos componentes del diluyente haya disminuido, de alguna manera, su supuesta eficacia.

Además, la inexistencia de efectos marcadamente beneficiosos con la incorporación de taurina y de hipotaurina en la congelación del semen de perro puede deberse a que los niveles de estos aminoácidos existentes en el tracto reproductivo del

perro sean suficientes para proporcionar una adecuada protección contra la peroxidación lipídica. O puede atribuirse a la existencia, en semejanza de la especie humana, de mecanismos protectores preventivos de la peroxidación oxidativa, como es el caso del sistema enzimático glutatión-peroxidasa y glutatión-reductasa resistente al proceso de congelación-descongelación (Alvarez y Storey, 1992), haciendo que la adición de compuestos inhibidores de la oxidación sea superflua (Alvarez y Storey, 1993). Para Sánchez-Partida y col. (1997) y basándose en el hecho que la taurina ha sido beneficiosa en la congelación del espermatozoide de toro, al contrario que la hipotaurina, la acción crioprotectora de la taurina estaría atribuida a sus supuestas propiedades osmoreguladoras más que a sus propiedades antioxidantes.

La existencia de una ratio ácidos grasos insaturados/saturados de los fosfolípidos de la membrana del espermatozoide de perro más reducido en comparación al de cerdo y al de toro y morueco (Darin-Bennett y col., 1974), podría traducirse en una menor predisposición a la peroxidación lipídica, como sucede en el espermatozoide humano. Para Alvarez y Storey (1993), la peroxidación lipídica en el espermatozoide humano no es tan dañina como en otras especies, habiendo observado que las lesiones derivadas de la peroxidación lipídica contribuyen algo menos a los designados “daños subletales” de la criopreservación que el estrés de la membrana; el cual engloba los daños en la membrana durante las transiciones de fases que ocurren en la congelación-descongelación. La incorporación de 1 mM de hipotaurina en los medios de congelación no prolongó la viabilidad pos-descongelación del espermatozoide humano, mientras que trabajos previos de los mismos autores, con los inhibidores de la peroxidación BSA y con la hipotaurina llevados a cabo en el espermatozoide de conejo resultaron exitosos (Alvarez y Storey, 1983). La adición de hipotaurina y de glutatión, igualmente conocido por sus propiedades antioxidantes, en las concentraciones de 5, 10 y 20 mM tampoco aportaron mejoras en la motilidad y en la integridad del ADN del espermatozoide humano (Donnelly y col., 2000). Sin embargo, este estudio puso de manifiesto que estos antioxidantes proporcionaban protección contra las especies reactivas del oxígeno (ERO) y contra el daño provocado en el ADN inducido por el peróxido de oxígeno.

No podemos prever si la taurina y la hipotaurina podrían tener el mismo impacto en el espermatozoide de perro, ya que los estudios de la producción de ERO y de los daños en el ADN derivados de la peroxidación lipídica son todavía escasos en esta especie. Es conocido en otras especies que las ERO son perjudiciales a la supervivencia espermática, estando relacionadas con la ionización y consecuente desactivación de proteínas, daños en el ADN y peroxidación de los lípidos insaturados (Medeiros y col.,

2002). En el perro, la defensa primaria contra la peroxidación lipídica es atribuida a la superóxido-dismutasa, que disminuye sus niveles tras la congelación en el espermatozoide (Erokhin, 2000). Esta pérdida puede representar una reducción de la resistencia del espermatozoide contra el daño oxidativo.

En este trabajo, además del fluorocromo PI asociado a la Fitc-PSA para evaluación de la integridad de la membrana y del acrosoma, también fue utilizado el PI asociado al fluorocromo específico Rodamina 123 para comparar el impacto de los distintos diluyentes en la funcionalidad mitocondrial. Algunos autores opinan que en la selección del diluyente debe considerarse primariamente la protección óptima de la integridad de la membrana plasmática y de la función mitocondrial (Karabinus y col., 1991). El hecho de no haber afectado particularmente la función mitocondrial hace excluir la hipótesis de un papel activo de estos aminoácidos, taurina e hipotaurina, en la recuperación del metabolismo tras la descongelación, como lo sugieren Renard y col. (1996) para la glutamina en el espermatozoide humano. En el gallo, la adición de 0-5 mM/L de taurina al semen fresco incubado a 25 y 40°C no afectó la motilidad *in vitro* (Barna y col., 1998).

Los estudios previos que han conducido a las actuales técnicas de dilución, procesamiento y congelación de semen de perro han resultado en la utilización de concentraciones óptimas de glicerol, yema de huevo y azúcares. Los diluyentes preconizados actualmente para la conservación de semen de perro proporcionan tasas de supervivencia bastante satisfactorios (Linde-Forsberg, 2002). Este hecho permite solo pequeñas mejoras en la estabilización de la membrana y el tiempo de supervivencia post-descongelación.

Sin embargo, la detección de taurina e hipotaurina en tracto reproductivo del perro (Van der Horst y Grooten, 1966), hace sospechar que estos aminoácidos tengan alguna función en la fisiología reproductiva del perro. Aunque su adición a los diluyentes de congelación de semen de perro no parece aportar efectos beneficiosos visibles en la motilidad, aunque a partir de las 2h postdescongelación el medio 25H muestra los menores valores de ALH (estadísticamente significativos).

En la segunda parte del experimento 4 (**experimento 4.2.**) hemos evaluado la respuesta a la inducción de la reacción acrosómica (RA) mediante incubación calcio ionóforo con el fin de detectar la existencia de diferencias en la capacidad de presentar capacitación y reacción acrosómica de los espermatozoides criopreservados en los diluyentes estudiados en la primera parte del experimento.

La capacidad del espermatozoide experimentar una reacción acrosómica completa está significativamente relacionada con el *estado* de fertilidad y se encuentra deprimida o incluso ausente en casos de subfertilidad (Cummins y *col.*, 1991). Estudios con espermatozoides bovinos también encontraron correlación significativa entre la capacidad de reaccionar mediante incubación con calcio ionóforo con la tasa de no retorno al celo después de la inseminación (Whitfield y Parkinson, 1995). En Andrología Humana esta prueba presenta un valor predictivo de la fertilidad comparable al test de penetración de ovocitos de hamster (Cummins y *col.*, 1991).

La disminución de la fertilidad con la utilización del semen preservado puede incluir alteraciones prematuras de tipo-capacitación que pueden disminuir la longevidad espermática por la activación de los procesos metabólicos celulares (Pommer y *col.*, 2002). Los procesos de conservación son, por si mismos, responsables por la inducción de alteraciones en la estabilización de la membrana que cursan con capacitación precoz (Watson, 1995; Cormier y *col.*, 1997). El espermatozoide canino muestra señales de capacitación prematura asociadas a la criopreservación (Rota y *col.*, 1999a).

La evidencia de que la composición del diluyente afecta la incidencia de RA también fue estudiada en el espermatozoide de perro (Sirivaidyapong y *col.*, 2000; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001a); habiendo observado Sirivaidyapong y *col.*, (2000) que, concretamente, los medios diluyentes con elevada concentración de calcio estaban asociados con un mayor porcentaje de RA. También en el caballo fueron identificados diluyentes utilizados en la conservación del semen que pueden contribuir a la reducción de la motilidad, longevidad y fertilidad por inducción de una capacitación precoz (Pommer y *col.*, 2002).

El diluyente base utilizado en este estudio, que contiene fructosa como fuente de energía, tris y ácido cítrico que contribuyen al tamponamiento fisiológico y a la protección celular, es conocido por proporcionar una buena preservación de la estructura acrosomal, probablemente por tratarse de un medio con bajos niveles de calcio (Sirivaidyapong y *col.*, 2000). La presencia de yema en el diluyente presenta un efecto protector adicional, reduciendo las RA (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001a). Los diluyentes del experimento contienen también 0,5% de Equex-STM Paste. Además de las características beneficiosas del Equex en la motilidad y preservación de la longevidad el espermatozoide de perro pos-descongelación, están descritos otros efectos de este compuesto, que incluyen un impacto beneficioso en la capacidad del espermatozoide unirse a la *zona pellucida* (Ström Holst y *col.*, 2000) y el aumento del  $Ca^{2+}$  intra-celular (Peña y *col.*,

2003a,b). Sin embargo, la elevada supervivencia de las muestras hace prever que este aumento de calcio intracelular no resulta nefasto para el espermatozoide, probablemente por no haber conseguido el umbral necesario para la RA o porque el mecanismo de supervivencia esté asociado a otros aspectos (Peña y col., 2003a,b).

Entre los daños inducidos por la criopreservación en el espermatozoide de perro las alteraciones acrosomales son observadas con elevada frecuencia (Oettlé, 1986a), presentando alteraciones en su morfología, pudiendo éste presentarse hinchado y rarefacto y, en algunos casos, con las membranas vesiculadas (Rodríguez-Martínez y col., 1993). La integridad del acrosoma debe ser preservada durante el manejo, previamente y durante la IA o FIV, ya que un acrosoma previamente reaccionado deja de poder penetrar la zona, siendo también cierto que los medios de procesamiento y preservación deben prevenir alteraciones de esta estructura, pero manteniendo la capacidad del espermatozoide de sufrir RA fisiológicas en el momento de la fecundación (Sirivaidyapong y col., 2000).

La RA es un paso esencial a la fecundación, esta reacción implica la fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática; la consecuente liberación de las enzimas acrosomales facilitan el paso del espermatozoide a través de las superficies de la granulosa y la zona pellucida (Bedford, 1970). Esta reacción puede ser inducida *in vitro* a través de la exposición a varios inductores. Así, en distintas especies se ha utilizado dilauroil-fosfatidilcolina (PC12) (Nolan y col., 1992), heparina (Christensen y col., 1996; Pereira y col., 2000; Alm y col., 2001), cafeína (Pereira y col., 2000), calcio ionóforo (Cummins y col., 1991; Whitfield y Parkinson, 1995; Christensen y col., 1996; Januskauskas y col., 2000; Pereira y col., 2000; Alm y col., 2001; Pommer y col., 2002). En comparación con inductores como la cafeína y la heparina, el calcio ionóforo fue el que mejor indujo la RA *in vitro* en espermatozoides descongelados en bovinos y caprinos en los momentos analizados (1, 15 y 30 min de incubación con el calcio) (Pereira y col., 2000). Por otra parte, la integridad de la cromatina espermática queda mejor preservada tras incubación con calcio ionóforo que con heparina, en muestras frescas y criopreservadas (Alm y col., 2001). En el espermatozoide de perro, la heparina no ejerció ninguno efecto capacitante cuando se adicionaba al CCM (Peña y col., 2003b).

El calcio ionóforo es un compuesto que suele ser utilizado para inducir RA no fisiológicas favoreciendo el equilibrio de la concentración intra y extra-celular de calcio (por activación de los canales de calcio en la membrana plasmática) en el espermatozoide (Sirivaidyapong y col., 2001b). En ausencia de calcio en el medio de

incubación no se detectaron RA tras la incubación con el calcio ionóforo; pareciendo necesaria una concentración extracelular de calcio de 0,1 mM para obtener una correcta inducción de la RA con calcio ionóforo, una concentración más elevada parece ser nociva al espermatozoide (Szász y col., 1997).

La inducción exitosa de la RA puede ser valorada por penetración de ovocitos *in vitro* o por la utilización de técnicas diferenciales de tinción (Pereira y col., 2000).

En el espermatozoide de perro, han sido utilizados inductores de la RA como la progesterona (Sirivaidyapong y col., 2001b), CCM (Mahi y Yanagimachi, 1978; Kawakami y col., 1993b), CCM suplementado con fluido del oviducto (Kawakami y col., 1998), solución de bicarbonato de Krebs-Ringer modificada (TYH) (Shimazu y col., 1992), ovocitos o *zona pellucida* homóloga (Kawakami y col., 1993a; Hewitt y England, 1997; Mayenco-Aguirre y Pérez-Cortés, 1998; Sirivaidyapong y col., 2000; Brewis y col., 2001).

En nuestro experimento, el tratamiento del semen descongelado con calcio ionóforo A23178 resultó en aumento significativo ( $p=0,000$ ) del porcentaje de espermatozoides con RA verdadera directamente proporcional a las concentraciones empleadas de ionóforo ( $0\mu\text{M}$  vs  $2,5\mu\text{M}$  vs  $10\mu\text{M}$ ), en los distintos tiempos empleados. Por otra parte, el factor tiempo ha sido también significativo cuando se relaciona con la concentración de ionóforo, para 5 vs 30 min, observándose un incremento significativo del porcentaje de RA verdadera para concentraciones de  $0\mu\text{M}$  ( $p=0,027$ ) y para concentraciones de  $2,5\mu\text{M}$  ( $p=0,000$ ). Para concentraciones de  $10\mu\text{M}$  que si bien obtiene el mayor porcentaje de RA en células vivas, éste no se vé significativamente aumentado con el tiempo de incubación, viéndose incluso disminuido de 15 a 30 min. La tinción simultánea para la viabilidad e integridad acrosomal mediante PI/Fitc-PNA ha permitido determinar si las reacciones acrosómicas son verdaderas o si se deben a pérdida degenerativa del acrosoma por muerte de la célula durante la incubación. La utilización de la citometría de flujo permitió el análisis detallado de eventos en cada célula individualmente (Nolan y col., 1992).

Previamente a la incubación con el calcio ionóforo, la **capacitación** de los espermatozoides fue inducida *in vitro* mediante incubación con medio **CCM** modificado (Mahi y Yanagimachi, 1978; Guérin y col., 1999). El periodo de tiempo seleccionado para inducir el inicio de la capacitación (20 min), fue seleccionado tras observaciones previas en las que se apreciaba una ligera alteración del movimiento celular y coincidiendo con el tiempo elegido por Gómez-Cuétara Aguilar (2000) para el semen equino. Sin embargo,

trabajos en capacitación de semen de perro indican periodos de capacitación más largos (Peña, 2004), e incluso, otros autores no han observado la presencia de un patrón típico de 'hiperactivación' a lo largo del periodo de incubación de semen fresco en el CCM (Guérin y col., 1999). A diferencia de estos trabajos, nosotros hemos realizado esta incubación en tubos colocados en baño de agua y protegidos de la luz, pero sin una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> (Mayenco-Aguirre y Pérez-Cortés, 1998).

Otros autores refieren que la capacitación del semen de perro pos-refrigeración y pos-congelación se inicia más precozmente que la capacitación de semen fresco (Rota y col., 1999a), ocurriendo en las primeras 2 h de incubación en CCM, al revés del semen fresco que tarda 4h (Rota y col., 1999a), 2 y 3h (Mayenco-Aguirre y Pérez-Cortés, 1998; Guérin y col., 1999), e incluso 4-7 h de incubación (Shimazu y col., 1992; Kawakami y col., 1993a). Si ya algunos autores observaron espermatozoides capacitados con 2 horas de incubación para semen fresco, parece bastante razonable que los espermatozoides descongelados necesiten tiempos sensiblemente reducidos.

El porcentaje de espermatozoides móviles, medido visualmente a los 0' y 20' de incubación en CCM no sufrió alteraciones importantes en este periodo. Asimismo, el porcentaje de espermatozoides reaccionados tras la preincubación en CCM e incubados a continuación en 0  $\mu$ M de ionóforo de calcio, durante 5, 15 y 30 minutos más, es bastante reducido, lo que sugiere que el CCM, además de preservar la motilidad, no induce RA espontáneas, ya observado Guérin y col. (1999). Así hemos encontrado un porcentaje de RA al momento "5 minutos" tras descongelación e incubación en CCM con 0  $\mu$ M de ionóforo de calcio bastante reducida en todos los diluyentes, 5%. Otros estudios indican porcentajes algo más elevados; 9% con semen fresco en el momento 0 de incubación en el medio de capacitación TYH (Shimazu y col., 1992), y 14% en el momento 0 de incubación con 5  $\mu$ M de ionóforo, semen fresco de la cola del epidídimo (Sirivaidyapong y col., 2001b). El hecho de haber utilizado el diluyente suplementado con Equex<sup>®</sup> como diluyente-base, conocido por preservar particularmente bien la integridad del acrosoma tras la descongelación (Tsutsui y col., 2000b) puede ser la razón para esta diferencia. Por otra parte, la incubación con ionóforo a tiempo 0 (Sirivaidyapong y col., 2001b) ya supone un tiempo mínimo de 1 a 3 minutos de contacto con el ionóforo, necesario para el simple manejo de tomar la muestra para tinción, que puede incrementar el porcentaje de RA observado frente a semen capacitado que no ha tenido contacto con concentración alguna de ionóforo, y que en nuestro trabajo hemos estimado de 5 minutos.

La RA fue inducida en nuestro trabajo en el espermatozoide descongelado de perro utilizando modificaciones de métodos previamente descritos (Guérin y col., 1999; Januskaukas y col., 2000; Gomez-Cuétara Aguilar, 2000).

La incubación de las muestras con calcio ionóforo se realizó a 38°C ya que esta temperatura resulta más favorecedora a las RA que 20°C (Sirivaidyapong y col., 2001b). La capacitación *in vitro* suele hacerse en ambiente húmedo y en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>, en incubadora (Shimazu y col., 1992; Kawakami y col., 1993a,b; Rota y col., 1999a; Pommer y col., 2002; Peña y col., 2003b). Por otra parte, debido a los efectos perjudiciales que la incubación en bicarbonato de sodio provoca en la motilidad del espermatozoide canino (Guérin y col., 1999), no lo hemos incorporado en el medio, siendo este sustituido por tris; por otra parte, el bicarbonato de sodio parece innecesario cuando no se utiliza incubadora de CO<sub>2</sub> ya que esta describe la unión a zona en ausencia del mismo (Mayenco-Aguirre y Pérez-Cortés, 1998).

La BSA es un componente presente en los medios de capacitación, pero para evitar la intensa coloración del fondo que esta origina en las extensiones, algunos autores optan por remplazarla por alcohol polivinílico (Christensen y col., 1996). En nuestro experimento mantuvimos la concentración de BSA preconizada por Mahi y Yanagimachi (1978).

En los trabajos de Pommer y col. (2002) en la inducción de semen fresco de equino, ha sido utilizado 1 µM de calcio ionóforo, tal como Whitfield y Parkinson (1995) y Januskaukas y col. (2000) en el semen descongelado de toro. Por su parte, Pereira y col. (2000) han utilizado 0,1 mM en el espermatozoide de bovino y caprino.

En el espermatozoide de perro, se encuentra descrita su utilización en la inducción de la RA en semen fresco (Szász y col., 1997), dónde entre las distintas concentraciones de calcio ionóforo estudiadas (0,05, 0,25, 0,5, 1, 2,5 y 5 µM) se observó una buena respuesta con la utilización de 2,5 µM, concentración utilizada en los estudios siguientes de este equipo (Szász y col., 2000b). Mientras, Hewitt y England (1998), tal como Guérin y col. (1999) y Brewis y col. (2001) utilizaron con éxito 10 µM, también con semen fresco. Otro estudio refiere la utilización de 5 µM, con la cual fue obtenida RA en los espermatozoides de la cola del epidídimo (Sirivaidyapong y col., 2001b), mientras que los espermatozoides de origen testicular, de la cabeza y cuerpo del

epidídimo no han exhibido RA, lo que sugiere que el espermatozoide debe obtener un cierto grado de maduración para poder responder al influjo de calcio y sufrir RA.

Cuando es comparado con células control, el tratamiento con el calcio ionóforo suele inducir una marcada y significativa disminución de la motilidad (Pommer y *col.*, 2002) y viabilidad (Christensen y *col.*, 1996). El masivo influjo de calcio puede ser nocivo al espermatozoide descongelado, que ya se encuentra desestabilizado en sus estructuras y funciones por la congelación y descongelación (Alm y *col.*, 2001). Los trabajos de Szász y *col.* (2000b) evidenciaron que el tratamiento con calcio ionóforo resultó en la disminución de la vitalidad del espermatozoide de perro que varió entre 20-70% (n=9), pero bastante más marcada fue la disminución de la motilidad, indicando que la motilidad es más sensible a los tratamientos con calcio ionóforo que propiamente la inducción de la RA. Sin embargo, en la incubación con el medio de bicarbonato de Krebs modificado no ha sido inducida una disminución significativa de la motilidad (Shimazu y *col.*, 1992).

En nuestro trabajo la viabilidad fue mantenida dentro de valores bastante aceptables sin diferencias significativas entre el porcentaje de células teñidas/no teñidas con PI, según la concentración de ionóforo y el tiempo de tratamiento. Sin embargo, las muestras con ionóforo perdían la motilidad casi instantáneamente. Peña y *col.* (2003b; 2004) refieren un efecto letal rápido de las lectinas PSA y PNA en la viabilidad cuando estas son adicionadas a espermatozoides descongelados y capacitados (que han sido previamente centrifugados y rediluidos en CCM). Estos autores desconocen los motivos de este hecho, que, sin embargo, no fue evidenciado en nuestro trabajo, probablemente por haber sometido los espermatozoides a breves periodos de capacitación y de inducción de la RA y no haberlos centrifugado previamente.

En nuestro trabajo, el porcentaje de espermatozoides que sufrieron RA varió con la concentración de ionóforo y la duración de la incubación. La **concentración de calcio ionóforo** que ha inducido mayor proporción de RA “verdaderas” en el experimento fue de 10  $\mu$ M, en especial, a los 15 min de incubación. Sin embargo, a los 30 min de incubación, la proporción de espermatozoides reaccionados fue inferior a la de 15 min, (37,92% *versus* 45,09%; n=35) y incluso de 5 min (42,8%; n=35), lo que sugiere que 15 min de incubación han sido los más adecuados para esta concentración de ionóforo (o que los 30 min hayan sido “excesivos”). Al revés, con 2,5  $\mu$ M de ionóforo la proporción de RA fue aumentando a lo largo de los 30 min de incubación.

Nuestros resultados “máximos” de RA (45,09%, con 10  $\mu$ M de ionóforo, 15 min de incubación) coinciden con los de Christensen y *col.* (1996), que refieren 44 y 45% de RA

tras incubación de semen fresco de equino con 1 y 10  $\mu\text{M}$  de A23187 durante 60 min. Sin embargo, nuestros porcentajes de RA con 10  $\mu\text{M}$  resultaron inferiores a los de Guérin y col. (1999), que obtuvieron 79,6% de RA con 10  $\mu\text{M}$  de ionóforo tras 30 min de incubación y 6 h de capacitación en CCM ( $n=8$ ) y no observaron el declive en el porcentaje de RA a lo largo de la incubación, con esta concentración de ionóforo. Debe tenerse en cuenta que en este experimento se trataba con espermatozoides frescos y además el periodo de capacitación (6h) y el método de detección de la RA fueron distintos (tinción CTC), de modo que la viabilidad del espermatozoide no fue evaluada, ya que la tinción con CTC por sí sola, no permite la evaluación simultánea de la viabilidad. Por otra parte, Alm y col. (2001) constataron un mayor porcentaje de RA con calcio ionóforo en semen fresco que en criopreservado (54,4 *versus* 31,7%, respectivamente), a pesar de que es unánimemente reconocido que los procesos de preservación aceleran la capacitación y la RA (Pérez y col., 1996; Cormier y col., 1997; Rota y col., 1999a); sin embargo, también creemos necesario tener en cuenta que los procesos de congelación y descongelación incrementan el porcentaje de células muertas.

No existen demasiados datos relativos a la respuesta de la inducción a la RA con calcio ionóforo en semen descongelado de perro, lo que dificulta la comparación de los resultados de nuestra investigación. Tan solo hemos encontrado la referencia de Peña y col. (2004) quienes refieren un porcentaje superior al 80% de RA tras 2, 8 y 24 h de incubación en CCM y, a continuación, 20 min con 1 $\mu\text{M}$  de ionóforo, interpretando la detección de RA mediante tinción de eosina-nigrosina; lo que supone condiciones experimentales diferentes a las nuestras. Comparando nuestros resultados con los obtenidos en otras especies, nuestros porcentajes han sido superiores a las que refiere Pereira y col. (2000), que obtuvieron 20 y 24% de RA en espermatozoides descongelados de bovino y caprino tras 30 min de incubación en calcio ionóforo. Alm y col. (2001) obtuvieron 31,7% de RA en el espermatozoide descongelado de caballo.

En general, para ambas concentraciones de calcio ionóforo estudiadas no han existido diferencias entre los distintos diluyentes y el control, lo que sugiere que los aminoácidos no han inducido cambios en el *estado* de capacitación de los espermatozoides criopreservados, excepto en el medio UE 50T ( $p=0,05$ ) a los 15 min de incubación con 2,5  $\mu\text{M}$  de calcio ionóforo, presenta el mayor porcentaje obtenido. El efecto de los aminoácidos en el *estado* de capacitación de espermatozoides descongelados no había sido todavía estudiado, aunque los diversos estudios realizados con estos aminoácidos han sugerido un papel en la manutención y estimulación de la

capacitación y/o la RA (Mrsny y col., 1979; Meizel y col., 1980; Fraser, 1986) y de la fecundación *in vitro* (Leibfried y Bavister, 1981). Estos trabajos se refieren a condiciones de incubación *in vitro* con espermatozoides frescos, sin existencia de previo proceso de conservación. Entre las alteraciones inducidas en las funciones y estructuras del espermatozoide tras la congelación y descongelación (Watson, 1995; 2000), se puede destacar la rápida acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol de los espermatozoides descongelados, debido a una menor eficacia en la capacidad de extrusión (Bailey y col., 1994), lo que puede haber influido en la ausencia de observación de los efectos beneficiosos de los aminoácidos. También puede suceder que los aminoácidos no interfieran particularmente en la movilización de calcio intra-celular de perro, como mostraron Barna y col. (1998) en el espermatozoide de gallo.

Un estudio en el perro refiere que el porcentaje de espermatozoides frescos que sufrieron RA inducida por el calcio ionóforo (durante 60 min) sin capacitación previa presenta una correlación positiva con el porcentaje de espermatozoides con daños acrosomales observados pos-descongelación (Szász y col., 2000b). Ésto sugiere que la descongelación del espermatozoide de perro origina un proceso similar al que sufren los espermatozoides frescos cuando se induce la RA con el ionóforo de calcio. Además en este trabajo, el grado de recuperación de la motilidad tras la criopreservación pudo ser previsto por el grado de deterioro de la membrana plasmática del espermatozoide tras el tratamiento con el ionóforo en el espermatozoide fresco.

En nuestro experimento, tras un breve periodo de capacitación que consideramos se continúa durante el periodo de incubación con ionóforo, hemos constatado que en la incubación con  $0\mu\text{M}$  de calcio ionóforo (control, que nos indica las tasas de RA espontáneas), los diluyentes UE 50H y 75H presentan una mayor tendencia a la RA a lo largo del tiempo, pero sin diferencias significativas. El aumento de calcio intra-celular que el Equex<sup>®</sup> suele inducir naturalmente en el espermatozoide parece así no ser suficiente para inducir la RA, como ya lo señalaron Peña y col. (2003 a,b) que observaron una considerable longevidad en espermatozoides incubados en CCM. Sin embargo, con la incorporación de calcio ionóforo en el medio, el control y diluyentes con aminoácidos reaccionaron de manera semejante; aunque observamos que el medio UE 50T a 15 min de incubación con  $2,5\mu\text{M}$  presentó el mayor porcentaje de RA ( $p=0,05$ ). Además de los factores ya citados que pueden justificar la ausencia de diferencias estadísticas entre la RA obtenida con los distintos diluyentes, puede existir la posibilidad de que en presencia de una mayor cantidad de calcio intra-celular inducida por el calcio ionóforo a dosis

elevadas, el diluyente control que hasta un cierto umbral no induce RA, puede dar lugar a una considerable tasa de RA verdaderas.

A pesar de no existir diferencias significativas con el medio control, podemos observar una menor tendencia a la RA en algunos medios con determinadas concentraciones de aminoácidos tras la inducción con ionóforo de calcio. Con excepción del diluyente UE 50 T a los 5 y 15 min de incubación con 2,5 $\mu$ M de ionóforo de calcio presenta alrededor de un 5% más de RA que el grupo control, el resto de los diluyentes presentan un porcentaje algo menor de células vivas reaccionadas con relación al grupo control; alcanzándose una reducción del 19-21% para los espermatozoides congelados con los diluyentes UE 75T, UE 25H y UE 50H a los 15 min y del 22% en el diluyente UE 75T pasados 30 minutos.

Cabe destacar, por último, que hemos obtenido en nuestro trabajo correlaciones positivas y significativas entre la motilidad espermática durante el período de capacitación y la respuesta a la reacción acrosómica inducida por el ionóforo de calcio. Por otra parte, existió elevada correlación para el marcaje con 2 lectinas distintas (PNA y PSA).

## **6. CONCLUSIONES**



## Conclusiones

1. La suplementación con taurina al medio tris-yema, bajo condiciones de refrigeración para el semen canino, proporciona solo ligeras mejoras de la motilidad espermática. La adición de 30mM de Taurina ha permitido rebajar al 5% el porcentaje de yema, sin diferencias significativas con el medio control hasta el día 7. Solamente se han observado diferencias significativas entre los diluyentes que contienen un 20 y un 10% de yema, para la motilidad total estimada visualmente los días 2 y 3.

2. El marcaje con clortetraciclina permite establecer diferencias estadísticas para el patrón AR de espermatozoides refrigerados en diluyentes con 20% de yema y 0, 30 y 50mM de Taurina, siendo el diluyente con 30mM el que induce mayor porcentaje en menor tiempo (14,67%, el día 3).

3. La utilización como crioprotector, para la congelación del semen canino, de etilenglicol al 4% presenta resultados similares de motilidad a los obtenidos con 8% de glicerol; sin embargo, resulta perjudicial cuando se emplea al 8%. La adición de Equex STM Paste<sup>®</sup> a un diluyente con 5% de etilenglicol mejora los resultados frente al 4% de etilenglicol o el 8% de glicerol. Sin embargo, el uso de etilenglicol no obtuvo mejores resultados que el diluyente Uppsala Equex, el cuál permite una mayor supervivencia celular post-descongelación.

4. La valoración de la actividad mitocondrial del espermatozoide canino mediante Citometría de Flujo tras tinción con Rodamina 123 asociada al Yoduro de *propidium*, ha permitido establecer altas correlaciones con la valoración de la vitalidad por tinción con eosina-nigrosina y con la estimación subjetiva de la motilidad. Esta prueba puede considerarse como un valioso indicador de la viabilidad del semen.

5. La adición de Taurina o Hipotaurina al medio de congelación Uppsala Equex, no ha influido significativamente en la motilidad espermática; sin embargo, la adición de 25mM de hipotaurina ha presentado un valor significativamente menor del factor ALH tras 2h en incubación a 38°C, mientras que la adición de 50mM de hipotaurina dio lugar a un mayor % de células espontáneamente reaccionadas (PI-PSA+) inmediatamente a la descongelación y tras 1h:30' en incubación a 38°C.

6. La adición de 2,5 y 10  $\mu\text{M}$  de calcio ionóforo al semen canino descongelado e incubado durante 20min en CCM a 38°C permitió inducir un incremento de la reacción acrosómica verdadera (PI-PNA+) tras 5, 15 y 30 minutos mas en incubación, frente a 0 $\mu\text{M}$ .

7. Fue posible observar diferencias en el porcentaje de reacciones acrosómicas a los 15min de incubación con 2,5 $\mu\text{M}$  de ionóforo, del diluyente con 50mM-Taurina, que alcanzó el mayor porcentaje, frente a los diluyentes con 75mM-Taurina, 25 y 50mM-Hipotaurina y sin diferencias frente al diluyente control. Sin embargo, estos diluyentes presentaban una reducción del 19 al 21% en la reacción acrosómica con relación al diluyente control; además para el diluyente UE 75T pasados 30 minutos, esta reducción alcanzaba el 22%.

## **7. RESUMEN**



## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue valorar los efectos que sobre la motilidad, integridad de la membrana plasmática y acrosomal, grado de capacitación, reacción acrosómica y actividad mitocondrial, presenta la incorporación de distintos crioprotectores a los diluyentes de refrigeración y congelación del semen canino.

Para este fin se realizaron 4 experimentos, en los que los espermatozoides preservados por refrigeración y congelación fueron analizados mediante métodos convencionales y, dependiendo del experimento, pruebas complementarias de valoración de la funcionalidad del espermatozoide, incluyéndose: -motilidad determinada mediante el sistema informático SCA<sup>®</sup>2002, -integridad de la membrana plasmática determinada por test de endósmosis o por tinción con el fluorocromo yoduro de *propidium* (PI) y tinciones de eosina, -integridad del acrosoma determinada mediante la tinción específica Spermac<sup>®</sup> o las lectinas fluorescentes de *Pisum sativum* (PSA) y de *Arachis hypogea* (PNA), -estado de capacitación con clortetraciclina (CTC), -actividad mitocondrial por tinción con Rodamina123 (R123) y -capacidad de experimentar reacción acrosómica mediante incubación con calcio ionóforo A23187 y lectinas fluorescentes. Los resultados obtenidos para cada variable se correlacionaron entre sí en cada experimento. Para ejecutar estos experimentos, se utilizaron pools de semen obtenidos a partir de la fracción espermática de distintos eyaculados provenientes de 19 perros entre los 2 y 7 años de edad, de distintas razas y con fertilidad anterior probada. La selección de los eyaculados se realizó teniendo en cuenta una motilidad total superior al 80%, motilidad progresiva superior al 70% y el porcentaje de anomalías morfológicas inferior al 20%.

En el experimento 1 se valoró la incorporación de aminoácidos al diluyente de refrigeración Tris-fructosa-ácido cítrico y 20% de yema (medio control) y se propuso la reducción de la concentración de yema. Los resultados sugieren que la suplementación con taurina a 30 y 50mM proporciona solo ligeras mejoras de la motilidad espermática y que la adición de 30mM de taurina ha permitido rebajar al 5% el porcentaje de yema, sin diferencias con el medio control hasta el día 7. Solamente se han observado diferencias entre los diluyentes que contienen un 20 y un 10% de yema, para la motilidad total estimada visualmente en los días 2 y 3 ( $p < 0,001$ ). Se han obtenido altas y significativas correlaciones entre los resultados de motilidad estimada visualmente y mediante análisis informático, al igual que con el test de hipo-ósmosis ( $r$  entre 0,703 y 0,976,  $p < 0,01$ ). El marcaje con CTC permitió establecer diferencias significativas para el patrón AR de espermatozoides refrigerados en diluyentes con 20% de yema y 0, 30 y 50mM de taurina, siendo el diluyente con 30mM de taurina el que induce mayor porcentaje en menor tiempo (14,67%, en el día 3,  $p = 0,007$ ).

El segundo experimento se realizó para valorar la capacidad del etilenglicol como crioprotector en el diluyente de congelación del espermatozoide canino, alternativamente o asociado al glicerol o la Pasta Equex<sup>®</sup>. La utilización de etilenglicol al 4% presenta resultados

similares de motilidad a los obtenidos con 8% de glicerol; sin embargo, resulta perjudicial cuando se emplea al 8% ( $p < 0,05$ ). La adición de Equex STM Paste<sup>®</sup> a un diluyente con 5% de etilenglicol mejora los resultados frente al 4% de etilenglicol o el 8% de glicerol ( $p < 0,05$ ). El uso de 5% de etilenglicol y 0,5% de Equex-STM Paste no obtuvo mejores resultados que el diluyente Uppsala-Equex (con 5% de Glicerol y 0,5% de Equex-STM Paste), que permite mayor supervivencia celular post-descongelación.

En el tercer experimento se compararon los resultados de evaluación de la actividad mitocondrial espermática, realizada mediante citometría de flujo tras tinción con *R123* asociada a *PI*, con los de valoración de la vitalidad por tinción con eosina-nigrosina y de la motilidad estimada subjetivamente; pudiéndose establecer altas correlaciones entre ellos ( $r$  de 0,992 a 0,999,  $p < 0,01$ ).

En el cuarto experimento se estudió el impacto de la suplementación del diluyente de congelación Uppsala-Equex con los aminoácidos taurina o hipotaurina a 0, 25, 50 y 75mM en distintos aspectos de las funciones espermáticas. No se obtuvo influencia significativa en la motilidad espermática; sin embargo, la adición de 25mM de hipotaurina presentó un valor significativamente menor del factor ALH tras 2h en incubación a 38°C ( $p = 0,021$ ), mientras que la adición de 50mM de hipotaurina dio lugar a un mayor % de células espontáneamente reaccionadas (PI-PSA+) inmediatamente a la descongelación y tras 1h:30' en incubación a 38°C ( $p < 0,001$ ). También se ha valorado la capacidad del semen congelado con cada diluyente para presentar capacitación y reacción acrosómica *in vitro*, tras la incubación con CCM y con calcio ionóforo a distintas concentraciones: 0, 2,5 y 10 $\mu$ M. La adición de 2,5 y 10 $\mu$ M de calcio ionóforo al semen canino descongelado e incubado durante 20min en CCM a 38°C permitió inducir un incremento de la reacción acrosómica verdadera (PI-PNA+) tras 5, 15 y 30 minutos mas en incubación, frente a 0 $\mu$ M ( $p < 0,001$ ). Fue posible observar diferencias ( $p = 0,05$ ) en el porcentaje de reacciones acrosómicas a los 15min de incubación con 2,5 $\mu$ M de ionóforo; alcanzando el diluyente con 50mM-Taurina mayor porcentaje, frente a los diluyentes con 75mM-Taurina, 25 y 50mM-Hipotaurina y sin diferencias frente al diluyente control. Sin embargo, estos diluyentes presentaban una reducción del 19 al 21% en la reacción acrosómica con relación al diluyente control; además para el diluyente UE 75T pasados 30 minutos, esta reducción alcanzaba el 22%.

## **8. SUMMARY**



## SUMMARY

The aim of this work was to study the effects of different cryoprotectants used to refrigerate and freeze dog spermatozoa on motility, integrity of the plasmatic and acrosomal membranes, on the acrosome reaction and the capacitation process, as well as on the mitochondrial activity.

Four experiments were carried out with this purpose, in which chilled (at 4°C) and frozen-thawed spermatozoa were analysed for functionality by conventional methods and -depending on the experiment- complementary methods, namely: -motility assessed by computerized-assisted system analysis SCA<sup>®</sup>2002; -integrity of the plasmatic membrane determined by the endosmosis test, by the fluorochrome probe *propidium* iodide (PI) and by eosin-nigrosin staining; -integrity of the acrosome membrane by the specific staining Spermac<sup>®</sup> or fluorescent lectins of *Pisum sativum* (PSA) and of *Arachis hypogea* (PNA); -capacitation status with chlortetracycline staining (CTC); -mitochondrial activity with the mitochondrial probe rhodamine123 (R123) as well as -capacity to undergo acrosome reaction by incubation with calcium ionophore A23187 and fluorescent lectins. The results obtained with different variable were correlated, for each experiment. To carry out these experiments, pools of the sperm-rich fraction of different ejaculates from 19 dogs aged between 2 and 7 years of age, of different breeds and with proven previous fertility, were used. The ejaculates utilized in the experiments were selected based on the following minimum requirements: total motility higher than 80%, progressive motility above 70% and less than 20% abnormal sperm forms.

In the first experiment the incorporation of amino acids to the tris-fructose-citric acid extender-20% egg yolk (control extender) was evaluated and a reduction of the egg-yolk used in the extender, was tested. The results show that incorporation of taurine at 30 and 50 mM presented discrete beneficial effects on sperm motility and that the addition of taurine at 30mM allows for a decrease of the concentration of egg yolk to 5% without detrimental effect on motility, during 7 days. The only differences between extenders containing 20% egg yolk and the equivalent extender with 10% were on the visual motility in day 2 and 3 ( $p < 0,001$ ). There were high, significant correlations between the results obtained by visual and computerized evaluation of the motility, as well as with the endosmosis test ( $r = 0,703$  to  $0,976$ ,  $p < 0,01$ ). Staining with chlortetracycline probe evidenced significant differences in AR pattern in spermatozoa refrigerated in the extender with 20% yolk and 0, 30, and 50mM taurine; the extender with 30mM of taurine was the one that induced higher percentages of AR, in a shorter period of time (14,67% in day 3,  $p = 0,007$ ).

The second experiment was carried out with the aim of evaluating the viability of using ethylene glycol as a cryoprotectant in the freezing extender of canine semen, alternatively or associated with glycerol and the Equex<sup>®</sup> Paste. The use of 4% ethylene glycol had similar results to those generated with 8% glycerol; however, the use of ethylene glycol at 8% was harmful

( $p < 0,05$ ). The addition of Equex STM Paste to the extender with 5% ethylene glycol improved the results in relation to 4% ethylene glycol or 8% glycerol ( $p < 0,05$ ). The use of 5% ethylene glycol and 0,5% of Equex-STM Paste was not better than the results obtained with Uppsala-Equex extender (with 5% glycerol and 0,5% Equex-STM Paste), that allowed a longer post-thaw longevity.

In the third experiment the results of the evaluation of the sperm mitochondrial activity by means of flow cytometry after R123-PI staining, were compared with those obtained with the evaluation of vitality with eosin-nigrosin staining and visual assessment of motility. High correlations between them were found ( $r = 0,992$  to  $0,999$ ,  $p < 0,01$ ).

In the fourth experiment, the impact on sperm function of supplementing the freezing extender Uppsala-Equex with the amino acids taurine and hypotaurine at 25, 50 and 75 mM concentrations was studied. The addition of taurine or hypotaurine to the Uppsala-Equex extender did not influenced sperm motility; however, the addition of 25mM of hypotaurine resulted in a lower value of ALH after 2h thawing in incubation at 38°C ( $p = 0,021$ ), while the addition of 50mM of hypotaurine originated a higher percentage of spontaneously reacted cells (PI-PSA+) immediately after thawing and after 1h:30min of incubation at 38°C ( $p < 0,001$ ). We also studied the capacity of spermatozoa frozen with each extender, to present *in vitro* capacitation and acrosome reaction after incubation with CCM and with calcium ionophore in concentrations of 0, 2,5 and 10µM. The addition of 2,5 and 10µM of calcium ionophore to the post-thaw canine sperm after 20min of incubation with CCM at 38°C increased the induction of true acrosome reaction (PI-PNA+) compared to 0µM ( $p < 0,001$ ). For the 2,5µM ionophore concentration, differences of RA ( $p = 0,05$ ) were only apparent at 15min of incubation, for extender 50mM-*taurine* extender, resulting in the highest RA percentages, *versus* the 75mM-*taurine*, 25- and 50mM-*hypotaurine* extenders; however, RA percentages were not different from the one obtained with semen frozen with the control extender. Those extenders presented a reduction of 19 to 21% in the AR percentage in relation to the control extender. In the UE75T extender this reduction reached 22% at 30min of incubation.

## **9. RESUMO**



## RESUMO

O objectivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da incorporação de vários crioprotectores nos diluentes de refrigeração e congelação de sémen canino a nível da motilidade, integridade da membrana plasmática e do acrossoma, estado de capacitação, reacção acrossómica e actividade mitocondrial.

Para tal realizaram-se 4 ensaios, nos quais os espermatozóides preservados por refrigeração e congelação foram analisados mediante métodos convencionais e, dependendo do ensaio, por provas complementares de avaliação da funcionalidade, tais como: -motilidade determinada pelo sistema informático SCA<sup>®</sup>2002, -integridade da membrana plasmática avaliada pelo teste de endosmose ou por coloração com o marcador fluorescente iodeto de *propidium* (PI) ou por coloração com eosina, -integridade do acrosoma avaliada através da coloração específica Spermac<sup>®</sup> ou com as lectinas fluorescentes de *Pisum sativum* (PSA) e de *Arachis hypogea* (PNA), -estado de capacitação com clortetraciclina (CTC), -actividade mitocondrial por marcação com Rodamina123 (R123) e -capacidade de apresentar reacção acrossómica mediante incubação com cálcio ionóforo A23187 e lectinas fluorescentes. Os resultados obtidos para cada variável foram correlacionados entre si em cada estudo. Para executar estes trabalhos, utilizaram-se pools de sémen obtidos a partir das fracções espermáticas de distintos ejaculados provenientes de 19 cães de 2 a 7 anos, de distintas raças e com fertilidade anterior comprovada. A selecção dos ejaculados efectuou-se tendo em conta uma motilidade total superior a 80%, motilidade progressiva superior a 70% e uma percentagem de anomalias morfológicas inferior a 20%.

No primeiro ensaio avaliou-se a incorporação de aminoácidos no diluente de refrigeração Tris-fructose-ácido cítrico e 20% de gema de ovo (diluente controlo) e propôs-se a redução da concentração de gema. Os resultados sugerem que a incorporação de taurina a 30 e 50mM proporciona ligeiras acréscimos na motilidade e que a adição de 30mM de taurina permitiu diminuir a 5% a percentagem de gema, sem diferenças com o diluente controlo até ao dia 7. Observaram-se diferenças apenas entre os diluentes que contêm 20 e 10% de gema, para a motilidade total estimada visualmente nos dias 2 e 3 ( $p < 0,001$ ). Obtiveram-se elevadas e significativas correlações entre os resultados de motilidade estimada visualmente e mediante análise informática, assim como com o teste de endosmose ( $r$  entre 0,703 e 0,976,  $p < 0,01$ ). A coloração com CTC permitiu estabelecer diferenças significativas para o padrão AR dos espermatozóides refrigerados em 20% de gema e 0, 30 e 50mM de taurina, sendo o diluente com 30mM de taurina o que induz maior percentagem em menor tempo (14,67%, no dia 3,  $p = 0,007$ ).

O segundo ensaio realizou-se com o objectivo de avaliar a capacidade do etileno glicol como crioprotector no diluente de congelação do espermatozóide canino, alternativamente o associado ao glicerol ou à Pasta Equex<sup>®</sup>. A utilização de etileno glicol a 4% apresenta resultados de motilidade similares aos obtidos com 8% de glicerol; todavia, resulta prejudicial quando se utiliza a 8% ( $p < 0,05$ ). A adição de Equex STM Paste<sup>®</sup> ao diluente com 5% de etileno glicol melhora os resultados em relação a 4% de etileno glicol o a 8% de glicerol ( $p < 0,05$ ). O uso de 5%

de etileno glicol com 0,5% de Equex-STM Paste não proporcionou melhores resultados que o diluente Uppsala-Equex (5% de Glicerol com 0,5% de Equex-STM Paste), que permitiu uma maior sobrevivência celular pós-descongelação.

No terceiro ensaio compararam-se os resultados da avaliação da actividade mitocondrial espermática, realizada com citometria de fluxo após coloração com *R123* associada ao *PI*, com os de avaliação da vitalidade por coloração com eosina-nigrosina e da motilidade estimada subjectivamente; podendo estabelecer-se elevadas correlações entre si ( $r$  de 0,992 a 0,999,  $p < 0,01$ ).

No quarto ensaio estudou-se o impacto da suplementação do diluente de congelação Uppsala-Equex com os aminoácidos taurina ou hipotaurina a 0, 25, 50 e 75mM em distintos aspectos das funções espermáticas. Não se obteve influência significativa na motilidade espermática; no entanto, a adição de 25mM de hipotaurina apresentou um valor significativamente inferior do factor ALH após 2h em incubação a 38°C ( $p=0,021$ ), enquanto que a adição de 50mM de hipotaurina deu lugar a uma maior % de células com reacção acrossómica espontânea (PI-PSA+) imediatamente após a descongelação e após 1h:30' em incubação a 38°C ( $p < 0,001$ ). Também se avaliou a capacidade do sémen congelado em cada diluente para apresentar capacitação e reacção acrossómica *in vitro*, após a incubação com CCM e ionóforo de cálcio em distintas concentrações: 0, 2,5 e 10 $\mu$ M. A adição de 2,5 e 10 $\mu$ M de ionóforo de cálcio ao sémen canino descongelado e incubado durante 20min em CCM a 38°C permitiu induzir um incremento da reacção acrossómica verdadeira (PI-PNA+) após 5, 15 e 30 minutos em incubação, comparativamente a 0 $\mu$ M ( $p < 0,001$ ). Foi possível observar diferenças ( $p=0,05$ ) na percentagem de reacções acrossómicas aos 15min de incubação com 2,5 $\mu$ M de ionóforo; alcançando o diluente com 50mM-Taurina a maior percentagem, em relação aos diluentes com 75mM-Taurina, 25 e 50mM-Hipotaurina e sem diferenças em relação ao diluente controlo. No entanto, estes diluentes apresentaram uma redução de 19 a 21% na reacção acrossómica em relação ao diluente controlo; em concreto, no diluente UE 75T, após 30 minutos, esta redução alcançava 22%.

## **10. BIBLIOGRAFÍA**



**Referencias Bibliográficas**

- AALSETH, E.P.; SAACKE, R.G. (1985) - Morfological change of the acrosome on motile bovine spermatozoa due to storage at 4°C. *J Reprod Fert* **74**: 473-478.
- AALSETH, E.P.; SAACKE, R.G. (1986) - Vital staining and acrosomal evaluation of bovine sperm. *Gamete Research* **15**: 73-81.
- ABDELHAKEM, A.A.; GRAHAM, E.F.; VAZQUEZ, I.A.; CHALONER, K.M. (1991) - Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen. *Cryobiology* **28**: 43-49.
- ABOAGLA, E.M.E.; TERADA, T. (2003) - Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of Reproduction* **69**: 1245-1250.
- ABOAGLA, E.M.E.; TERADA, T. (2004) - Effects of supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology* **62**: 809-818.
- AGCA, Y.; GILMORE, J.; BYERS, M.; WOODS, E.J.; LIU, J.; CRITSER, J.K. (2002) - Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars. *Biol Reprod* **67**: 1493-1501.
- AHMAD, K.; FOOTE, R.H. (1986) - Postthaw survival and fertility of frozen bull spermatozoa treated with antibiotics and detergent. *J Dairy Sci* **69**: 535-541.
- ALM, H.; TORNER, H.; BLOTTNER, S.; NÜRNBERG, G.; KANITZ, W. (2001) - Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on in vitro fertilization of horse oocytes. *Therio* **56**: 817-829.
- ALMLID, T. & JOHNSON, L.A. (1988) - Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J Anim Sci* **66**: 2899-2905.
- ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MOREIRA, R.M.; CESARINO, M.M. (2000) - Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Vet J* **32**: 541-545.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. (1983) - Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol Reprod* **29**: 548-555.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. (1992) - Evidence for increased lipid peroxidation damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* **13**: 232-241.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. (1993) - Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. *J Androl* **14**: 199-209.
- ALVAREZ-SANTOS, C. (2001) - Curso del SPSSWIN, versión 10.0, Alvarez-Santos (Ed.), Servicio Informático de Somosaguas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- AMANN, R.P. (1989) - Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J Androl* **10**: 89-98.
- AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. (1980) - Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biol Reprod* **23**: 647-656.
- AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. (1993) - *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl* **14**: 397-406.

- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. (1987) - Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* **7**: 145-176.
- ANCHORDOGUY, T.J.; RUDOLPH, A.S.; CARPENTER, J.F.; CROWE, J.H. (1987) - Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* **24**: 324-331.
- ANDERSEN, K. (1972) - Fertility of frozen dog semen. *Acta Vet Scand* **13**: 128-130.
- ANDERSEN, K. (1975) - Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchthygiene* **10**: 1-4.
- ANDERSEN, K. (1980)- Artificial insemination and storage of canine semen. In: Morrow, D.A. (Ed). Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in animals. WB Saunders, Philadelphia. pp 661-665.
- ANZAR, M.; HASSAN, M.M.; GRAHAM, E.F.; DEYO, R.C.M.; SINGH, G. (1991) - Efficacy of the Hamilton Thorn motility analyzer (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen. *Therio* **36**: 307-317.
- ARRIOLA, J.; FOOTE, R.H. (1987) - Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *J Dairy Sci* **70**: 1664-1670.
- ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.; HOEY, B.M.; BUTLER, J. (1988) - The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J* **256**: 251-255.
- AUGER, J.; LEONCE, S.; JOUANNET, P.; RNOT, X. (1993) - Flow cytometric sorting of living, highly motile human spermatozoa based on evaluation of their mitochondrial activity. *J Histo Cyto* **41**: 1247-1251.
- AUGER, J.; RNOT, X.; DADOUNE, J.P. (1989)- Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. *J Androl* **10**: 439-448.
- AXNÉR, E.; HERMANSSON, U.; LINDE-FORSBERG, C. (2004) - The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **84** : 179-191.
- BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. (2000) - Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* **21**: 1-7.
- BAILEY, J.L. ; ROBERTSON, L.; BUHR, M.M. (1994) - Relationships among in vivo fertility, computer-analysed motility and in vitro  $Ca^{2+}$  flux in bovine spermatozoa. *Can J Anim Sci* **74**: 53-58.
- BALL, B.A.; VO, A. (2001) - Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *J Androl* **22**: 1061-1069.
- BARNA, J.; ASHIZAWA, K.; BOLDIZSÁR, H.; INOUE, M. (1998) - Effects of taurine on the motility and intracellular free  $Ca^{2+}$  concentration of fowl spermatozoa in vitro. *J Reprod Fertil* **114**: 225-229.
- BARTLETT, D.J. (1962) - Studies on dog semen I. Morphological characteristics. *J Reprod Fertil* **3**: 173-189.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C.G. (2000) - The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial potential, and membrane lipid peroxidation. *J Androl* **21**: 895-902.
- BEDFORD, J.M. (1970) - Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol Reprod Supplement* **2**: 128-158.

- BEDFORD, S.J.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. (1995) - Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. *Therio* **43**: 955-967.
- BELL, M.; WANG, R.; HELLSTROM, W.J.G.; SIKKA, S.C. (1993) - Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human sperm. *J Androl* **14**: 472-478.
- BERGER, T. (1990) - Pisum sativum agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine sperm. *Therio* **33**: 689-695.
- BERNDTSON, W.E.; OLAR, T.T.; PICKETT, B.W. (1981) - Correlation between post-thaw motility and acrosomal integrity of bovine sperm. *J Dairy Sci* **64**: 346-349.
- BIELFELD, P.; JEYENDRAN, R.S.; HOLMGREN, W.J.; ZANEVELD, L.J.D (1990) - Effect of egg yolk medium on the acrosome reaction of human spermatozoa. *J Androl* **11**: 260-269.
- BLACKSHAW, A.W. (1954) - The prevention of temperature shock of bull and ram semen. *Aust Journ of Biol Sci* **7**: 573-582.
- BOATMAN, D.E.; BAVISTER, B.D.; CRUZ, E. (1990) - Addition of hypotaurine can reactivate immotile golden hamster spermatozoa. *J Androl* **11**: 66-72.
- BONGSO, T.A.; NG, S.C.; MOK, H.; LIM, M.N.; TEO, H.L.; WONG, P.C.; RATNAM, S.S. (1989) - Effect of sperm motility on human in vitro fertilization. *Arch Androl* **22**: 185-190.
- BORG, K.; COLEBRANDER, B.; FAZELI A.; PARLEVLIET J.; MALMGREN, L. (1997) - Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology* **48**: 531-536.
- BOUCHARD, G.F.; MORRIS, J.K.; SIKES, J.D.; YONGQUIST, R.S. (1990) - Effects of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. *Theriogenology* **34**: 147-157.
- BREWIS, I.A.; MORTON, I.E.; MOORE, H.D.M.; ENGLAND, G.C.W. (2001) - Solubilized zona pellucida proteins and progesterone induce calcium influx and the acrosome reaction in capacitated dog spermatozoa. *Mol Reprod Dev* **60**: 491-497.
- BRISOLA, L.B.S.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, J.F.C.; MONTAGNER, M.M. (1999) - Integridade das membranas plasmática, nuclear e mitocondrial de espermatozoides ovinos criopreservados com etileno glicol (Integrity of sperm plasma membrane, nucleus and mitochondria after freezing ram semen with ethylene glycol). *Ciência Rural* **29**: 527-531
- BROCHART, M.; COULOMB, J. (1952) - Recherches sur la dilution et la conservation du sperm de chien. *Bull Acad Vet de France* **25** : 59-62.
- BROWN, R.M. (1992) - An update of artificial insemination with fresh, chilled, and frozen semen. *Problems in Vet Med* **4**: 445-452.
- BUDWORTH, P.R.; AMANN, R.P.; CHAPMAN, P.L. (1988) - Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *J Androl* **9**: 41-54.
- BUFF, S.; DONZÉ, A.; GUÉRIN, P.; GUILLAUD, J.; FONTBONNE, A.; MÉNÉZO, J. (2001) - Taurine and hypotaurine in spermatozoa and epididymal fluid in cats. *J Reprod Fertil Suppl* **57**: 93-95.
- CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. (2003) - Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Therio* **59**: 743-751.

CARPENTER, J.F.; CROWE, J.H. (1988) - The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology* **25**: 244-255.

CARRASCOSA, R.E.; MARTINI, A.C.; PONZIO, M.F.; BUSO, J.M.; PONCE, A.A.; LACUARA, J.L. (2001) - Storage of Chinchilla lanigera semen at 4°C for 24 or 72h with two different cryoprotectants. *Cryobiology* **42**: 301-306.

CARVAJAL, G; CUELLO, C.; RUIZ, M.; VÁZQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ E.A.; ROCA J. (2004) - Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *J Androl* **25**: 389-396.

CASSELÉN, B.G. (1987) - Free amino acids in human uterine fluid-possible role of high taurine concentration. *J of Reproductive Medicine* **32**: 181-184.

CAVALCANTI, M.C.O.; MOURA, C.S.; GUERRA, M.M.P.; SILVA, S.V. (2002) - Ação crioprotectora do glicerol e etileno glicol no congelamento do semen de cão. (Cryoprotector action of the glycerol and ethylene glycol in the freezing of the dog semen). *Rev Bras Reprod Anim* **26**: 174-176.

CENTOLA, G.M.; MATTOX, J.H.; BURDE, S.; LEARY, J.F. (1990) - Assessment of the viability and acrosome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single-wavelength fluorescence microscopy. *Mol Reprod Dev* **27**:130-135.

CHEN, Y.; FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C. (1993) - Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology* **30**: 423-431.

CHEN, L.B.; SUMMERHAYES, I.C.; JOHNSON, L.V.; WALSH, M.L.; BERNAL, S.D.; LAMPIDIS, T.J. (1982) - Probing mitochondria in living cells with rhodamine 123. Cold Spring Harbour Symposia on *Quantitative Biology* **46**: 141-155.

CHENG, F.P.; WU, J.T.; CHAN, J.P.W.; WANG, J.S.; FUNG, H.P.; COLENBRADER, B.; TUNG, K.C. (2004) - The effect of different extenders on post-thaw sperm survival, acrosomal integrity in cryopreserved semen of Formosa Sika deer and Formosa Sambar deer. *Theriogenology* **61**: 1605-1616.

CHRISTENSEN, P.; WHITFIELD, C.H.; PARKINSON, T.J. (1996) - In vitro induction of acrosome reactions in stallion spermatozoa by heparin and A23187. *Therio* **45**: 1201-1210.

CHRISTIANSEN (1984) - Reproduction in the dog and cat. Bailliere Tindall, 1984, pp100/115-123.

CHURG, A.; ZANEVELD, L.J.D.; SCHUMACHER, G.F.B. (1974) - Detergent treatment of human and rabbit spermatozoa: ultrastructural changes and release of midpiece enzymes. *Biol Reprod* **10**:429-437.

COETZEE, K.; KRUGER, T.F.; LOMBARD, C.J.; SHAUGHNESSY, D.; OEHNINGER, S.; ÖZGÜR, K.; POMEROY, K.O.; MULLER, C. (1999) - Assessment of interlaboratory sperm morphology readings with the use of a Hamilton Thorne Research integrated visual optical system semen analyzer. *Fertility and Sterility* **71**: 80-84.

CONCANNON, P.W.; BATTISTA, M. (1989) - Canine semen freezing and artificial insemination. In R. W. (Ed). Current Veterinary Therapy. WB Saunders Company, Philadelphia, pp1247-1259.

CÓRDOVA, A.; DUCOLOMB, Y.; JIMÉNEZ, I.; CASAS, E.; BONILLA, E.; BETANCOURT, M. (1997) - In vitro fertilizing capacity of frozen-thawed boar semen. *Therio* **47**: 1309-1317.

CORMIER, N.; SIRARD, M.A.; BAILEY, J.L. (1997) - Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl* **18**: 461-468.

COY, P.; GADEA, J.; ROMAR, R.; MATAS, C.; GARCÍA, E. (2002) - Effect of in vitro fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening and in vitro development in pigs. *Reproduction* **124**: 279:288.

- CROSS, N.L. (1996) - Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor. *Biol Reprod* **54**: 138-145.
- CROSS, N.L.; MEIZEL, S. (1989)- Minireview-methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol Reprod* **41**: 635-641.
- CROSS, N.L.; MORALES, P.; OVERSTREET, J.W.; HANSON, F.W. (1986) - Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Research* **15**: 213-226.
- CUMMINS, J.M.; PEMBER, S.M.; JEQUIER, A.M.; YOVICH, J.L.; HARTMANN, P.E. (1991) - A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge- relationship to fertility and other seminal parameters. *J Androl* **12**: 98-103.
- CURRY, M.R. (2000) - Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction* **5**: 46-52.
- DARIN-BENNETT, A.; POULOS, A.; WHITE, I.G. (1974) - The phospholipids and phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa. *J Reprod Fert* **41**: 471-474.
- DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. (1977) - Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* **14**: 466-470.
- DASGUPTA, S.; MILLS, C.L.; FRASER, L.R. (1993) - Ca<sup>2+</sup>-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J Reprod Fert* **99**: 135-143.
- DAVIS, R.O.; SIEMERS, R.J. (1995) - Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. *Reprod Fertil Dev* **7**: 857-869.
- DE BAULNY, B.O.; LE VERN, Y.; KERBOEUF, D.; MAISSE, G. (1997) - Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Cryobiology* **34**: 141-149.
- DE LAS HERAS, M.A.; VALCARCEL, A.; FURNUS, C.; PÉREZ, L.; MOSES, D.; BALDASSARRE (1996) - Changes in sperm-bound amidase activity suggest subtle damage to ram sperm acrosomes by freezing/thawing, not detected by light microscopy. *Anim Reprod Sci* **45**: 81-89.
- DE LEEUW, F.E.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. (1990) - The role membrane plays in cold shock and freezing injury. *Reprod Dom Anim Suppl* **1**: 95-104.
- DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.; WOELDERS, H. (1991) - The fix vital stain method-simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. *J Androl* **12**: 112-118.
- DEMICK, D.S.; VOSS, J.L.; PICKETT, B.W. (1976) - Effect of cooling, storage, glycerolation and spermatozoal numbers on equine fertility. *J Anim Sci* **43**: 633-637.
- DEMIRCI, B.; LORNAGE, J.; SALLE, B.; POIREL, M.T.; GUERIN, J.F.; FRANCK, M. (2003) - The cryopreservation of ovarian tissue: uses and indications in veterinary medicine. *Therio* **60**: 999-1010.
- DEN DAAS, N. (1992) - Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim Reprod Sci* **28**: 87-94.
- DOBROINSKI, I.; LULAI, C.; BARTH, A.D.; POST, K. (1993) - Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *J Reprod Fert Suppl* **47**: 291-296.
- DOLARA, P.; AGRETI, A.; GIOTTI, A.; PASQUINI, G. (1973a) - Effect of taurine on calcium kinetics of guinea-pig heart. *Eur J Pharm* **24** : 352-358.

DOLARA, P.; MARINO, P.; BUFFONI, F. (1973b) - Effect of 2-aminoethanesulphonic acid (taurine) and 2-hydroxyethane sulphonic acid (isethionic acid) on calcium transport by rat liver mitochondria. *Biochemical Pharmacology* **22**: 2085-2094.

DONNELLY, E.T.; McCLURE, N.; LEWIS, E.M. (2000) - Glutathione and hypotaurine in vitro : effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis* **15**: 61-68.

DOWNING, T.W.; GARNER, D.L.; ERICSSON, S.A.; REDELMAN, D. (1991) - Metabolic toxicity of fluorescent stains on thawed cryopreserved bovine sperm cells. *J Histo Cytochemistry* **39**: 485-489.

DRESSER, D.W.; ATKINS, C.J.; PINDER, A.; MORRELL, J.M. (1993) - Analyses of DNA content of living spermatozoa using flow cytometric techniques. *J Reprod Fertil* **98**: 357-365.

DROBNIS, E.Z.; CROWE, L.M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T.J.; OVERSTREET, J.W.; CROWE, J.H. (1993) - Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *The Journal Exp Zool* **265**: 432-437.

DUMOLIN, J.C.M.; EVERS, J.L.H.; BRAS, M.; PIETERS, M.H.E.C.; GERAEDTS, J.P.M. (1992) - Positive effect of taurine on preimplantation development of mouse embryos *in vitro*. *J Reprod Fertil* **94**: 373-380.

EL-ALAMY, M.A.; FOOTE, R.H. (2001) - Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. *Animal Reproduction Science* **65**:245-254.

ELLINGTON, J.; SCARLETT, J.; MEYERS-WALLEN, V.; MOHAMMED, H.O.; SURMAN, V. (1993) - Computer-assisted sperm analysis of canine spermatozoa motility measurements. *Therio* **40**: 725-733.

ENGLAND, G.C.W (1993) - Cryopreservation of dog semen: a review. *J Reprod Fert Suppl* **47**: 243-255.

ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W.E. (1989) - Seminal characteristics and fertility in dogs. *Veterinary Record* **125**, 399.

ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W.E. (1992) - Factors affecting the viability of canine spermatozoa. I. Potential influences during processing for artificial insemination. *Therio* **37**: 363-371.

ENGLAND G.C.W.; PLUMMER J.M. (1993) - Hypoosmotic swelling of dog spermatozoa. *J Reprod Fert Suppl* **47**: 261-270.

ENGLAND, G.C.W.; PONZIO, P. (1996) - Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology* **46**: 165-171.

ERICSSON, S.A.; GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; DOWNING, T.W.; MARSHALL, C.E. (1993) - Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Therio* **39**: 1009-1024.

EROKHIN, A.S. (2000) - Activity of antiperoxidative enzymes in fresh and cryopreserved dog semen. In: Farstad, W.; Steel, C. (Ed), *Advances in dog, cat and exotic carnivore reproduction-Book of abstracts*, Oslo, Norway, 29 June-1 July, 2000, p92.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. (1980) - Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* **210**: 1311-1133.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z. ; MELAMED, M.R. (1982) - Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J Histo Cyto* **30**: 279-280.

- EVENSON, D.P.; PARKS, J.E.; KAPROTH, M.T.; JOST, L.K. (1993) - Rapid determination on sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry. *J Dairy Sci* **76**: 86-94.
- FAHY, G.M.; LILLEY, T.H; LINSDELL, H.; JOHN DOUGLAS, M.S.T.; MERYMAN, H.T. (1990) - Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology* **27**: 247-268.
- FARLIN, M.E.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. (1992) - Assessment of *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. *Mol Reprod Dev* **32**: 23-27.
- FARRELL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C.; FOOTE, R.H. (1998) - Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Therio* **49**: 871-879.
- FARSTAD, W. (1984) - Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. *J Small Anim Pract* **25**: 561-565.
- FARSTAD, W. (1996) - Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim Reprod Sci* **42**: 251-260.
- FARSTAD, W. (1998a) - Semen preservation for short- and long term preservation of canine semen. Proceedings of the 1<sup>st</sup> EVSSAR Congress, Barcelona, Spain, 1998. pp.207-212.
- FASTARD W. (1998b) - Mating and artificial insemination in the dog. In G Simpson (Ed), Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology, Cap. 9; pp 102-103, BSAVA, UK.
- FAZELI, A.; HAGE, W.J.; CHENG, F.P.; VOORHOUT, W.F.; MARKS, A.; BEVERS, M.M.; COLENBRANDER, B. (1997) - Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida in vitro. *Biol Reprod* **56**: 430-438.
- FELLMAN, J.H. & ROTH, E.S. (1985) - The biological oxidation of hypotaurine to taurine: hypotaurine as an antioxidant. *Prog Clin Biol Res* **179**: 71-82.
- FERGUSON, J.M.; RENTON, J.P.; FARSTAD, W.; DOUGLAS, T.A.(1989) - Insemination of beagle bitches with frozen semen. *J Reprod Fert Suppl* **39**: 293-298.
- FERRARA, F.; DAVERIO, R.; MAZZINI, G.; BONINI, P.; BANFI, G. (1997) - Automation of human sperm cell analysis by flow cytometry. *Clinical Chemistry* **43**: 801-807.
- FIERRO, R.; FOLIGUET, B.; GRIGNON, G.; DANIEL, M.; BENE, M.C.; FAURE, G.C.; BARBARINO-MONNIER, P. (1996) - Lectin-binding sites on human sperm during acrosome reaction: modifications judged by electron microscopy/flow cytometry. *Archives of Andrology* **36**: 187-196.
- FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W. (1989) - The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* **26**: 64-69.
- FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W.; HANSEN, C.; PANICH, P.L.; SHRESTHA, J.N.B.; UNDERHILL, L. (1993) - The effect of warming velocity on motility and acrosomal integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glycerol level. *Mol Reprod Dev* **34**: 190-195.
- FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W.; PANICH, P.L. (1996) - Glycerol equilibration time revisited. *Reprod Dom Anim* **31**: 141-146.
- FLESCHE, F.M.; VOORHOUT, W.F.; COLENBRANDER, B.; VAN GOLDE, L.M.G.; GADELLA, B.M. (1998) - Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa: a novel technique for monitoring membrane purity and quantity. *Biol Reprod* **59**: 1530-1539.

FONTBONNE, A.; BADINAND, F. (1993) - Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. *J Reprod Fertil Suppl* **47**:531-532.

FOOTE, R.H. (1964) - The effects of electrolytes, sugars, glycerol, and catalase on survival of dog sperm in buffered-yolk mediums. *Am J Vet Res* **25**: 32-36.

FOOTE, R.H.; ARRIOLA, J. (1987) - Motility and fertility of bull sperm frozen-thawed differently in egg yolk and milk extenders containing detergent. *J Dairy Sci* **70**: 2642-2647.

FOOTE, R.H.; LEONARD, E.P. (1964) - The influence of pH, osmotic pressure, glycine, and glycerol on the survival of dog sperm in buffered-yolk extenders. *The Cornell Veterinarian* **54**: 78-89.

FOULKES, J.A. (1977) - The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J Reprod Fert* **49**: 277-284.

FRANKEN, D.R.; KRUGER, T.F.; OEHNINGER, S.; CODDINGTON, C.C.; SMITH, K.; HODGEN, G.D. (1993) - The ability of the hemizona assay to predict human fertilization in different and consecutive IVF cycles. *Human Reprod* **8**: 1240-1244.

FRASER, L.R. (1986) - Both taurine and albumin support mouse sperm motility and fertilizing ability in vitro but there is no obligatory requirement for taurine. *J Reprod Fert* **77**: 271-280.

FRASER, L.R.; LECEWICZ, M.; STRZEZEK, J. (2002) - Fluorometric assessments of viability and mitochondrial status of boar spermatozoa following liquid storage. *Polish J Vet Sci* **5**: 85-92.

FROMAN, D.P.; AMANN, R.P.; RIEK, P.M.; OLAR, T.T. (1984) - Acrosin activity of canine spermatozoa as an index of cellular damage. *J Reprod Fert* **70**:301-308.

GAO, D.Y.; LIU, J.; LIU, C.; MCGANN, L.E.; WATSON, P.F.; KLEINHANS, F.W.; MAZUR, P.; CRITSER, E.S.; CRITSER, J.K. (1995) - Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reprod* **10**: 1109-1122.

GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A. (1995) - Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Biol Reprod* **53**: 276-284.

GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A.; ALLEN, C.H. (1988) - Fluometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa extended in egg yolk and milk. *Therio* **30**: 369-378.

GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A.; YUE, S.T.; ROTH, B.L.; HAUGLAND, R.P. (1994) - Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and Propidium Iodide. *J Androl* **15**: 620-629.

GARNER, D.L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. (1986) - Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol Reprod* **34**: 127-138.

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; GRAVANCE, C.G. (1999) - The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. *Reprod Dom Anim* **34**: 399-404.

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; JOERG, H.W.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. (1997) - Fluometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* **57**: 1401-1406.

GIL, J.; JANUSKAUKAS, A.; HAARD, M. Ch.; HAARD, M.G.M.; JOHANISSON, A.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2000) - Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-plus and Triladyl. *Reprod Dom Anim* **35**: 69-77.

- GILL, H.P.; KAUFMAN, C.F.; FOOTE, R.H.; KIRK, R.W. (1970) - Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid-stored, and frozen-stored semen. *Am J Vet Res* **31**: 1807-1813.
- GÓMEZ-CUÉTARA AGUILAR, C. (2000) - Factores de afectan a la capacidad de congelación del semen equino. Inducción de la reacción acrosómica en semen fresco y descongelado. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España.
- GRAHAM, J.K. (2001) - Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci* **68**: 239-247.
- GRAHAM, E.F.; RAJAMANNAN, A.H.J.; SCHMEHL, M.K.L.; MAKI-LAURILA, M.; BOWER, R.E. (1971a) - Preliminary report on procedure and rationale for freezing boar semen. *AI Digest* **19**: 12-14.
- GRAHAM, E.F.; RAJAMANNAN, A.H.J.; SCHMEHL, M.K.L.; MAKI-LAURILA, M.; BOWER, R.E. (1971b) - Fertility studies with frozen boar spermatozoa. *AI Digest* **19**: 6-7, 16.
- GRAHAM, J.K.; FOOTE, R.H. (1987) - Effects of several lipids, fatty acil chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* **24**: 42-52.
- GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; BAUMBER, J.; BALL, B.A. (2000) - Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Therio* **53**: 1691-1703.
- GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; MILLER, M.G.; BERGER, T. (2001) - Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reprod Toxicology* **15**: 5-10.
- GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. (1990) - Analysis of sperm viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod* **43**: 55-64.
- GREEN, C.E.; WATSON, P.F. (2001) - Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* **122**: 889-898.
- GUÉRIN, P.; FERRER, M.; FONTBONNE, A.; BÉNIGNI, L.; JACQUET, M.; MÉNÉZO, Y. (1999) - In vitro capacitation of dog spermatozoa as assessed by chlortetracycline staining. *Theriogenology* **52**: 617-628.
- GUÉRIN, P.; GUILLAUD, J.; MÉNÉZO, Y. (1995) - Hypotaurine in spermatozoa and genital secretions and its production by oviduct epithelial cells *in vitro*. *Human Reproduction* **10**: 866-872.
- GÜNZEL-APEL, A.R.; GÜNTER, C.; TERHAER, P.; BADER, H. (1993) - Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. *J Reprod Fert Suppl* **47**: 271-278.
- GUTHRIE, H.D.; LIU, J.; CRITSER, J.K. (2002) - Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* **67**: 1811-1816.
- GWATKIN, R.B.L. (1983) - Effect of compounds structurally related to taurine and of taurine uptake inhibitors on the motility of hamster sperm *in vitro*. *Gamete Research* **4**: 347-350.
- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K. (1992) - Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* **29**: 26-38.
- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. (1990) - Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* **11**: 73-88.
- HARKEMA, W.; HARRISON, R.A.P.; MILLER, N.G.A.; TOPPER, E.K.; WOELDERS, H. (1998) - Enhanced binding of zona pellucida proteins to the acrosomal region of intact boar spermatozoa in response to fertilizing conditions: a flow cytometric study. *Biol Reprod* **58**: 421-430.

HARRISON, R.A.P. (1998) - Sperm evaluation: what should be testing? In: K.Oono, D.A.Vaughan, Y.Nagamine, H.Kaneko, J.Noguchi, K.Shirata, S.Miyazaki, K.Kato (Eds), Genetic Diversity and Conservation of Animal Genetic Resources. Proceedings of the 6<sup>th</sup> MAFF International Workshop on Genetic Resources, Nov 4-5, 1998, Tsukuba, Japan, pp135-154.

HARRISON, R.A.P; ASHWORTH, P.J.C.; MILLER, N.G.A. (1996) - Assessment of sperm function under fertilizing conditions. In: Boar Semen Preservation III, Proc 3<sup>rd</sup> Int Conf on Boar Semen Preservation, Mariensee, Germany, Aug 1995, Eds D.Rath, L.A. Johnson & K.F. Weitze. *Reprod Dom Anim* **31**: 25-30.

HARRISON, R.A.P.; DOTT, H.M.; FOSTER, G.C. (1978) - Effect of ionic strength, serum albumin and other macromolecules on the maintenance of motility and the surface of mammalian spermatozoa in a simple medium. *J Reprod Fert* **52**: 65-73.

HARRISON, R.A.P; VICKERS, S.E. (1990)- Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fert* **88**: 343-352.

HARROP, A.E. (1954) - Artificial insemination of a bitch with preserved semen. *Brit Vet J* **110** : 424-425.

HAY, M.A.; KING, W.A.; GARTLEY, C.J.; LEIBO, S.P.; GOODROWE, K.L. (1997a) - Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *J Reprod Fertil Suppl* **51**: 99-108.

HAY, M.A.; KING, W.A.; GARTLEY, C.J.; LEIBO, S.P.; GOODROWE, K.L. (1997b) - Canine spermatozoa-cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Therio* **48**: 1329-1342.

HE, L.; BAILEY, J.L.; BUHR, M.M. (2001) - Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. *Biol Reprod* **64**: 69-79.

HEBER, U.; TYANKOVA, L.; SANTARIUS, K. (1971) - Stabilization and inactivation of biological membranes during freezing in the presence of amino acids. *Biochimica Et Biophysica Acta* **241**: 578-592.

HEINZ, K.A.; GLOFCHESKI, D.J.; LEPOCK, J.R.; KRUV, J. (1990) - Mechanism of freeze-thaw damage to liver alcohol dehydrogenase and protection by cryoprotectants and aminoacids. *Cryobiology* **27**: 521-538.

HELENIUS, A.; McCASLIN, D.R.; FRIES, E.; TANFORD, C. (1979) - Properties of detergents. *Methods in Enzymology* **56**: 734-749.

HELENIUS, A.; SIMONS, K. (1975) - Solubilization of membrane by detergents. *Biochimica et Biophysica Acta* **415**: 29-79.

HENRY, M.A.; NOILES, E.E.; GAO, D.; MAZUR, P.; CRITSER, J.K. (1993) - Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertility and Sterility* **60**: 911-918.

HENRY, M.; SNOECK, P.P.N.; COTTORRELLLO, A.C.P. (2002) - Post-thaw spermatozoa plasma integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. *Therio* **58**: 245-248.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. (1997) - The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. *Anim Reprod Sci* **50**: 123-139.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. (1998) - An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Anim Reprod Sci* **51**: 321-332.

- HIRAI, M.; CERBITO, W.A.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.B.; BRAUN, J.; LEIDL, W.; OHOSAKI, K.; MATSUZAWA, T.; MIYAZAWA, K.; SATO, K. (1997) - The effect of viscosity of semen diluents on motility of bull spermatozoa. *Therio* **47**: 1463-1478.
- HOFMO, P.O.; BERG, K.A. (1989) - Electron microscopical studies of membrane injuries in blue fox spermatozoa subjected to the process of freezing and thawing. *Cryobiology* **26**: 124-131.
- HOLMES, R.P.; GOODMAN, H.O.; SHIHABI, Z.K; JAROW, J.P. (1992) - The taurine and hypotaurine content of human sperm. *J Androl* **13**: 289-292.
- HOLT, W.V. (1984) - Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoon. *International Review of Cytology* **87**: 159-194.
- HOLT, W.V. (1996) - Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. In D.Rath, L.A. Johnson & K.F. Weitze (Ed), Boar Semen Preservation III, Proc 3<sup>rd</sup> Int Conf on Boar Semen Preservation, Mariensee, Germany, Aug 1995, *Repro Dom Anim* **31**:17-24.
- HOLT, W.V. (2000) - Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* **62**: 3-22.
- HUO, L.J.; MA, X.H.; YANG, Z.M. (2002) - Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Therio* **58**: 1349-1360.
- HURET, J.L. (1986) - Nuclear chromatin decondensation of human sperm: a review. *Arch Androl* **16**: 97-109.
- HUXTABLE, R.J. (1992) - Physiological actions of taurine. *Physiological Reviews* **72**: 101-163.
- IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.P. (2001a) - Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* **55**: 671-684.
- IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.P. (2001b) - Evaluation of the "Hamilton Thorn Computer-Based Automated System" for dog semen analysis. *Therio* **55**: 733-749.
- IJAZ, A.; DUCHARME, A. (1995) - Effects of various extenders and taurine on survival of stallion sperm colled to 5°C. *Theriogenology* **44**:1039-1050.
- IRVINE, D.S. (1995) - Computer assisted semen analysis systems: sperm motility assessment. *Human Reproduction* **10**: 53-59.
- IVANOVA, M.; MOLLOVA, M. (1993) - Zona-penetration *in vitro* test for evaluating boar sperm fertility. *Therio* **40**: 397-410.
- IVANOVA, M.; MOLLOVA, M.; IVANOVA-KICHEVA, M.; PETROV, M.; DJARKOVA, TS; SOMLEV, B. (1999) - Effect of cryopreservation on zona-binding capacity of canine spermatozoa in vitro. *Therio* **52**: 163-170.
- JACOBSEN, J.G.; SMITH, L.H. (1968) - Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiological Reviews* **48**: 424-511.
- JAISWAL, B.S.; EISENBACH, M; TUR-KASPA, I.T. (1999) - Detection of partial and complete acrosome reaction in human spermatozoa: which inducers and probes to use? *Mol Hum Reprod* **5**, 214- 219.
- JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; HAARD, M.G.M.; HAARD, M.CH.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (1999) - Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Therio* **52**: 641-658.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2000) - Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in swedish dairy AI bulls. *Therio* **53**: 859-875.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J.D. (1984) - Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationships to other semen characteristics. *J Reprod Fert* **70**: 219-228.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; ZANEVELD, L.J.D. (1985) - Effect of glycerol and cryopreservation on oocyte penetration by human spermatozoa. *Andrologia* **17**: 241-248.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; ZANEVELD, L.J.D. (1992) - The hypoosmotic swelling test: an update. *Archives of Andrology* **29**: 105-116.

JOHNSON, L.A.; MAXWELL, W.M.C.; DOBRINSKY, J.R.; WELCH, G.R. (1996) - Staining sperm for viability assessment. *Reprod Dom Anim* **31**: 37-47.

JOHNSON, L.A.; PURSEL, V.G.; GERRITS, R.J.; THOMAS, C.H. (1972) - Free amino acid composition of porcine seminal, epididymal and seminal vesicle fluids. *J Anim Science* **34**: 430-434.

JOHNSON, L.V.; WALSH, M.L.; BOCKUS, B.J.; CHEN, L.B. (1981) - Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. *J Cell Biol* **88**: 526-535.

JOHNSON, L.V.; WALSH, M.L.; CHEN, L.B. (1980) - Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 990-994.

JONES, R.C.; STEWART, D.L. (1979) - The effects of cooling to 5°C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. *J Reprod Fert* **56**: 233-238.

KAMPSCHMIDT, R.F.; MAYER, D.T.; HERMAN, H.A. (1953) - Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *J Dairy Sci* **36**: 733-742.

KARABINUS, D.S.; EVENSON, D.P.; KAPROTH, M.T. (1991) - Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. *J Dairy Sci* **74**: 3836-3848.

KASAI, T.; OGAWA, K.; MIZUNO, K.; NAGAI, S.; UCHIDA, Y.; OHTA, S.; FUJIE, M.; SUZUKI, K.; HIRATA, S.; HOSHI, K. (2002) - Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian J Androl* **4**: 97-103.

KAVAK, A.; JOHANNISSON, LUNDEHEIM, N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; AIDNIK, M.; EINARSSON, S. (2003) - Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. *Anim Reprod Sci* **76**: 205-216.

KAWAKAMI, E.; HORI, T.; TSUTSUI, T. (1998) - Induction of dog sperm capacitation by oviductal fluid. *J Vet Med Sci* **60**: 197-202.

KAWAKAMI, E.; VANDEVOORT, C.A.; MAHI-BROWN, C.A.; OVERSTREET, J.W. (1993a) - Induction of acrosome reactions of canine sperm by homologous zona pellucida. *Biol Reprod* **48**: 841-845.

KAWAKAMI, E.; VANDEVOORT, C.A.; MAHI-BROWN, C.A.; TOLLNER, T.L.; OVERSTREET, J.W. (1993b) - Comparison of a fluoresceinated lectin stain with a triple staining for evaluating acrosome reactions of dog sperm. *The Journal of Exp Zool* **265**: 599-603.

KEENAN, L.R.J. (1998) .- The infertile male. In G Simpson (Ed), Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology, Cap. 8, pp 88, BSAVA, UK.

- KUMI-DIAKA, J.; BADTRAM, G. (1994) - Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. *Therio* **41**: 1355-1366.
- KJAESTAD, H.; ROPSTAD, E.; BERG, K.A. (1993) - Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Vet Scand* **34**: 299-303.
- KOCHAKIAN, C.D. (1975) - Free amino acids of sex organs in the mouse: regulation by androgens. *Am J Physiol* **228**: 1231-1235.
- KÖNH, F.M.; MACK, S.R.; SCHILL, W.B.; ZANEVELD, L.J.D. (1997) - Detection of human sperm acrosome reaction: comparison between methods using double staining, Pisum sativum agglutinin, concavalin A and transmission electron microscopy. *Hum Reprod* **12**, 714-721.
- KOUTSAROVA, N.; TODOROV, P.; KOUTSAROV, G. (1997) - Effect of pentoxifylline on motility and longevity of fresh and thawed dog spermatozoa. *J Reprod Fert Suppl* **51**: 117-121.
- KRUUV, J.; GLOFCHESKI, D.J. (1990) - Survival of mammalian cells following multiple freeze-thaw cycles. *Cryo-Letters* **11**: 215-226.
- KRUUV, J.; GLOFCHESKI, D.J. (1992) - Positive effects of amino acids against freeze-thaw damage in mammalian cells. *Cryobiology* **29**: 291-295.
- KRUUV, J.; GLOFCHESKI, D.J.; LEPOCK, J.R. (1988) - Protective effect of L-glutamine against freeze-thaw damage in mammalian cells. *Cryobiology* **25**: 121-130.
- KUNDU, C.N.; DAS, K.; MAJUMDER, G.C. (2001) - Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. *Cryobiology* **41**: 21-27.
- KURIYAMA, K. (1980) - Taurine as a neuromodulator. *Federation Proceedings* **39**: 2680-2684.
- KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.; JOHNSTON, S.D.; ROOT, T.K. (1998) - The effects of stains and investigators on assessment of morphology of canine spermatozoa. *J Am Anim Hosp Assoc* **34**: 348-352.
- LALONDE, R.J.; LEPOCK, J.R.; KRUUV, J. (1991) - Site of freeze-thaw damage and cryoprotection by amino acids of the calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta* **1079**: 128-138.
- LE GAL, F.; BARIL, G.; VALLET, J.C.; LEBOEUF, B. (1993) - In vivo and in vitro survival of goat embryos after freezing with ethylene glycol or glycerol. *Therio* **40**: 771-777.
- LEIBFRIED, M.L.; BAVISTER, B.D. (1981) - The effects of taurine and hypotaurine on in vitro fertilization in the golden hamster. *Gamete Research* **4**: 57-63.
- LINDE-FORSBERG, C. (1995) - Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Semin Vet Med Surg (S Anim)* **10**: 48-58.
- LINDE-FORSBERG, C. (2002) - Hints on dog semen freezing, cryoextenders, and frozen semen artificial insemination. Proceedings from the Society for Theriogenology Meeting, Colorado Springs. August 2002, pp 303-320.
- LINDE-FORSBERG, C.; FORSBERG, M. (1989) - Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J Reprod Fert Suppl* **39**: 299-310.
- LINDE-FORSBERG, C.; FORSBERG, M. (1993) - Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. *J Reprod Fert Suppl* **47**: 313-323.

LINDE-FORSBERG, C.; STRÖM-HOLST, B.; GOVETTE, G. (1999) - Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Therio* **52**: 11-23.

LINFORD, E.; GLOVER, F.A.; BISHOP, C.; STEWART, D.L. (1976) - The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *J Reprod Fert* **47**: 283-291.

LOBO, M.; ALONSO, J.; MARTÍN DEL RÍO, R. (2000) - Immunohistochemical localization of taurine in the male reproductive organs of the rat. *J of Histochemistry & Cytochemistry* **48**: 313-320.

LOVE, C.C.; THOMPSON, J.A.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L.; BLANCHARD, T.L.; LOWRY, V.K.; VARNER, D.D. (2003) - Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Therio* **60**: 1127-1138.

MAHI, C.A.; YANAGIMACHI, R. (1978) - Capacitation, acrosome reaction, and egg penetration by canine spermatozoa in a single defined medium. *Gamete Research* **1**: 101-109.

MALMGREN, L. (1997) - Assessing the quality of raw semen: a review. *Therio* **48**: 523-530.

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

MANTOVANI, R.; ROTA, A.; FALOMO, M.E.; BAILONI, L.; VINCENTI, L. (2002) - Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: sperm quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. *Reprod Nutr Dev* **42**: 217-226.

MARTINEZ-PASTOR, F.; JOHANNISSON, A.; GIL, J.; KAABI, M.; ANEL, L.; PAZ, P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2004) - Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. *Anim Reprod Sci* **84**: 1-2:121-133.

MARTINS, A.C.A.; MALIBRAN-ROSAS, B.; GONZALEZ-ARAGON, E.; MAYENCO-AGUIRRE, A.M. (2002) - Resultados preliminares del efecto de los aminoácidos en la calidad del semen refrigerado de perro. I Congreso Universitario de Ciencias Veterinarias Y Afines, 28-30 Abril 2002. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España.

MASSIP, A. (2001) - Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod Dom Anim* **36**: 49-55

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. (1997) - Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Therio* **48**: 209-219.

MAXWELL, W.M.C.; STOJANOV, T. (1996) - Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod Fertil Dev* **8**: 1013-20.

MAXWELL, W.M.C.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. (1997) - Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* **8**: 1165-1178.

MAYENCO-AGUIRRE, A.M.; GÓMEZ-CUÉTARA, C. (1996) - Viability of canine sperm frozen with two levels of glycerol. 3<sup>rd</sup> International Symposium on Reproduction of Dogs, Cats and Exotic Carnivores. Veldoven. The Netherlands.

MAYENCO-AGUIRRE, A.; PERES-CORTÉS, A.B. (1998) - Preliminary results of hemi-zona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. *Therio* **50**: 195-204.

MAZUR, P. (1970) - Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* **168**: 939-949.

- MAZUR, P. (1984) - Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* **247**: 125-142.
- MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, AT.D.; RODRIGUES, J.L. (2002) - Current status of cryopreservation: why isn't it better? *Therio* **57**: 327-344.
- MEDRANO, A.; HOLT, W.V. (1996) - Protective effects of glycerol during cold shock in boar spermatozoa. A cryomicroscope study using propidium iodide and SYBR-14. In D.Rath, L.A. Johnson & K.F. Weitze (Ed), Boar Semen Preservation III, Proc 3<sup>rd</sup> Int Conf on Boar Semen Preservation, Mariensee, Germany, Aug 1995, *Reprod Dom Anim* **31**: 281-282.
- MEIZEL, S.; LUI, C.W.; WORKING, P.K.; MRSNY, R.J. (1980) - Taurine and hypotaurine: their effects on motility, capacitation and the acrosome reaction of hamster sperm *in vitro* and their presence in sperm and reproductive tract fluids of several mammals. *Develop Growth and Differ* **22**: 483-494.
- MENDOZA, C.; CARRERAS, A.; MOOS, J.; TESARIK, J. (1992) - Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J Reprod Fertil* **95**: 755-763.
- MERKIES, K.; CHENIER, T.; PLANTE, C.; BUHR, M.M. (2000) - Assessment of stallion spermatozoa viability by flow cytometry and light microscope analysis. *Therio* **54**: 1215-1224.
- MILLER, J.G.O.; SCHULTZ, G.A. (1987) - Amino acid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract. *Biol Reprod* **36**: 125-129.
- MIXNER, J.P.; SAROFF, J. (1954) - Interference by glycerol with differential staining of bull spermatozoa. *J Dairy Sci* **37**: 652.
- MOLINIA, F.C.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. (1994) - Incorporating of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Therio* **42**: 849-858.
- MORAES, C.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, J.F.C.; SCHWEITZER, C.M. (1998) - Criopreservação do semen ovino em pellets com etileno glicol (Ethylene glycol for freezing ram semen in pellets). *Ciência Rural* **28**: 287-292.
- MORALES, P.; OVERSTREET, J.W.; KATZ, D.F. (1988) - Changes in human sperm motion during capacitation *in vitro*. *J Reprod Fert* **83**: 119-128.
- MORRELL, J.M. (1991) - Applications of flow cytometry to artificial insemination: a review. *Veterinary Record* **129**: 375-378.
- MORTIMER, D.; CURTIS, E.F.; MILLER, R.G. (1987) - Specific labeling by Peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *J Reprod Fertil* **81**: 127-135.
- MORTON, D.B.; BRUCE, S.G. (1989) - Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J Reprod Fertil Suppl* **39**: 311-316.
- MRSNY, R.J. ; MEIZEL, S. (1985) - Inhibition of hamster sperm Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity by taurine and hypotaurine. *Life Sciences* **36**: 271-275.
- MRSNY, R.J.; WAXMAN, L.; MEIZEL, S. (1979) - Taurine maintains and stimulates motility of hamster sperm during capacitation *in vitro*. *J exp Zool* **210**: 123-128.
- NAGY, S.; JANSEN, J.; TOPPER, E.K.; GADELLA, B.M. (2003) - A triple stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol Reprod* **68**: 1828-1835.

- NAKATSUKASA, E.; INOMATA, T.; IKEDA, T.; SHINO, M.; KASHIWAZAKI, N. (2001) - Generation of live rat offspring by intrauterine insemination with epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. *Reproduction* **122**: 463-467.
- NEWTON, H.; AUBARD, Y.; RUTHERFORD, A.; SHARMA, V.; GOSDEN, R. (1996) - Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod* **11**: 1487-1491.
- NIKOLAEVA, M.A.; GOLUBEVA, E.L.; KULAKOV, V.I.; SUKHIKH, G.T. (1998) - Evaluation of stimulus-induced acrosome reaction by two-colour flow cytometric analysis. *Mol Hum Reprod* **4**: 243-250.
- NOLAN, J.P.; GRAHAM, J.K.; HAMMERSTEDT, R.H. (1992) - Artificial induction of exostosis in bull sperm. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **292**: 311-322.
- NÖTHLING, J.O.; GERSTENBERG, C.; VOLKMANN, D.H. (1993) - Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. *J Reprod Fert Suppl* **51**: 109-116.
- NOWSHARI, M.A.; BREM, G. (2001) - Effect of freezing rate and exposure time to cryoprotectant on the development of mouse pronuclear stage embryos. *Human Reproduction* **16**: 2368-2373.
- O'CONNELL, M.; McCLURE, N.; LEWIS, S.E.M. (2002) - The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod* **17**: 704-709.
- OETTLÉ, E.E. (1986a) - Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Anim Reprod Sci* **12**: 145-150.
- OETTLÉ, E.E. (1986b) - Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology. *Veterinary Medicine* **81**: 263-266.
- OETTLÉ, E.E. (1993) - Sperm morphology and fertility in the dog. *J Reprod Fert Suppl* **47**: 257-260.
- OETTLÉ, E.E.; SOLEY, J.T. (1988) - Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopic study. *Vet Med Rev* **59**: 28-70.
- OLAR, T.T. (1984) - Cryopreservation of dog spermatozoa. Ph Thesis, Colorado State University, Fort Collins, Colorado.
- OLAR, T.T.; BOWEN, R.A.; PICKETT, B.W. (1989) - Influence of extender, cryopreservative and seminal procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Therio* **31**: 451-461.
- OLLERO, M.; BESCÓS, O.; CEBRIAN-PERÉZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. (1998a) - Loss of membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. *Therio* **49**: 547-555.
- OLLERO, M.; MUIÑO-BLANCO, T.; LÓPEZ-PÉREZ, M.J.; CEBRIAN-PERÉZ, J.A. (1996) - Surface changes associated with ram cryopreservation revealed by counter-current distribution in an aqueous two-phase system-effect of different cryoprotectants. *Journal of Chromatography B* **680**: 157-164.
- OLLERO, M.; PEREZ-PE, R.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J.A. (1998b) - Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology* **37**: 1-12.
- OZASA, H.; GOULD, K.G. (1982) - Protective effect of taurine from osmotic stress on chimpanzee spermatozoa. *Archives Andrology* **9**: 121-126.
- PACE, M.M.; GRAHAM, E.F. (1974) - Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci* **39**: 1144-1149.

- PACE, M.M.; SULLIVAN, J.J.; ELLIOTT, F.I.; GRAHAM, E.F.; COULTER, G.H. (1981) - Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 0,5-ml french straws. *J Anim Sci* **53**: 693-701.
- PAPAIOANNOU, K.Z.; MURPHY, R.P.; MONKS, R.S.; HYNES, N.; RYAN, M.P.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. (1997) - Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry. *Therio* **48**: 299-312.
- PARKS, J.E. & GRAHAM, J.K.(1992) - Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Therio* **38**: 209-222.
- PASANTES-MORALES, H. ; FELLMAN, J.H. (1989) - Taurine and hypotaurine and membrane lipid peroxidation. In CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine. CRC Press, Boca Raton, Florida. J.Miquel, A.T. Quintanilha, Weber, H. (Eds.). Vol II, pp 105-117.
- PATRAT, C.; SERRES, C; JOUANNET, P. (2000) - The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of the cell.* **92**:255-266.
- PEÑA, A.I.; BARRIO, M.; BECERRA, J.J. ; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P. (2004) - Zona pellucida binding ability and responsiveness to ionophore challenge of cryopreserved dog spermatozoa after different periods of capacitation in vitro. *Anim Reprod Science* **84**: 193-210.
- PEÑA, A.I.; BARRIO, F.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. (1998a) - Proline and Glycibetaine in a Diluent for Freezing Canine Spermatozoa. *Reprod Dom Anim* **33**, 5-9.
- PEÑA, A.I.; BARRIO, F.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. (1998b) - Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology* **50**: 163-174.
- PEÑA, A.I.; BARRIO, F.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. (1998c) - Effects of sodium dodecyl sulphate on post-thaw dog semen quality during *in vitro* incubation at 39°C and 22°C. *Reprod Dom Anim* **33**: 393-398.
- PEÑA, A.; JOHANNISSON, A.; LINDE-FORSBERG, C. (1999a) - Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Therio* **52**: 965-980.
- PEÑA, A.; JOHANNISSON, A.; LINDE-FORSBERG, C. (2001) - Validation of flow cytometry for assessment of viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa and for evaluation of different methods of cryopreservation. *J Reprod Fertil Suppl* **57**: 371-376.
- PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C. (2000) - Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* **54**: 859-875.
- PEÑA, A.I.; LOPEZ-LUGILDE, L.; BARRIO, M.; BECERRA, J.J.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P. (2003b) - Studies on the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of frozen-thawed dog spermatozoa: influence of Equex from different sources, two thawing diluents and post-thaw incubation in capacitation conditions. *Reprod Dom Anim* **38**: 27-35.
- PEÑA, A.I.; LUGILDE, LL.; BARRIO, M.; HERRADÓN, P.; QUINTELA, L.A.; (2003a) - Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of dog spermatozoa. *Therio* **59**: 1725-1739.
- PEÑA, A.I.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. (1998d) - Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. *Therio* **50**: 1211-1220.
- PEÑA, A.I.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. (1999b) - Flow cytometric assessment of acrosomal status and viability of dog spermatozoa. *Reprod Dom Anim* **34**: 495-502.
- PENFOLD, L.M.; MOORE, H.D.M. (1993) - A new method for cryopreservation of mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil* **99**: 131-134.

PEREIRA, R.J.T.A.; TULI, R.K.; WALLENHORST, S.; HOLTZ, W. (2000) - The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A23187 on in vitro induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa. *Therio* **54**: 185-192.

PÉREZ, L.J.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; MOSES, D.; BALDASSARRE, H. (1996) - Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Therio* **46**: 131-140.

PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. (2001) - Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Therio* **56**: 425-434.

PHILLIPS, P.H.; LARDY, H.A. (1940) - A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J Dairy Science* **23**: 399-404.

PICKETT, B.W.; KOMARECK, R.J. (1966) - Effect of cold shock and freezing on lost of lipids from spermatozoa. *J. Dairy Sci.* **50**: 753-757.

PINTO, C.R.F.; PACCAMONTI, D.L.; EILTS, B.E. (1999) - Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology* **52**: 609-616.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. (1949) - Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* **164**: 666.

POMMER, A.C.; LINFOR, J.L.; MEYERS, S.A. (2002) - Capacitation and acrosomal exostosis are enhanced by incubation of stallion spermatozoa in a commercial semen extender. *Therio* **57**: 1493-1501.

PONGLOWHAPAN, S. (2003) - Influence of glucose and fructose in the extender on long-term storage of chilled canine semen. Report nº32, International Master of Science Programme, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden.

POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. (1973) - The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comp Biochem Physiol* **46B**: 541-549.

PROVINCE, C.A.; AMANN, R.P.; PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L. (1984) - Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. *Theriogenology* **22**: 409-415.

PURSEL, V.G.; SCHULMAN, L.L.; JOHNSON, L.A. (1978) - Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *J Anim Sci* **47**: 198-202.

QUINN, P.J. (1989) - Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions. *J of Bioenergetics and Biomembranes* **21**: 3-19.

QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.W.; WHITE, I.G. (1980) - Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J Reprod Fertil* **60**: 403-407.

QUINN, P.J.; WHITE, I.G. (1966) - The effect of cold shock and deep-freezing on the concentration of major cations in spermatozoa. *J Reprod Fertil* **12**: 263-270.

QUINN, P.J.; WHITE, I.G.; CLELAND, K.W. (1969) - Chemical and ultrastructural change ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *J Reprod Fertil* **18**: 209-220.

QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; RIGAU, AT.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. (2003) - Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Therio* **59**: 1973-1990.

RENARD, P.; GRIZARD, G.; GRIVEAU, J.F.; SION, B.; BOUCHER, D.; LE LANNOU, D. (1996) - Improvement of motility and fertilization potencial of postthaw human sperm using glutamine. *Cryobiology* **33**: 311-319.

- RIGAU, T.; FARRÉ, M.; BALLESTER, J.; MOGAS, T.; PEÑA, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. (2001) - Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Therio* **56**: 801-815.
- ROBBINS, R.K.; SAACKE, R.G.; CHANDLER, P.T. (1976) - Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in french straws. *J Anim Sci* **42**: 145-155.
- ROBERTSON, L.; WOLF, D.F.; TASH, J.S. (1988) - Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. *Biol Reprod* **39**: 797-805.
- RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; COSTA, S.H.F.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R.R.; LUCCI, C.M.; BÃO, S.N.; OHASHI, O.M.; FIGUEIREDO, J.R. (2004) - Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Therio* **61**: 1009-1024.
- RODRIGUEZ-GIL, J.E.; MONTSERRAT, A.; RIGAU, T. (1994) - Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Therio* **42**: 815-829.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (1998)- Optimization of sperm quality in AI bulls. *Reprod Dom Anim* **33**: 233-237.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; EKWALL, H.; LINDE-FORSBERG, C.(1993) - Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *J Reprod Fert Suppl* **47**: 279-285.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. (1997) - Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reprod Fertil Dev* **9**: 297-308.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; ZHANG, B.R.; SÖDERQUIST, L. (1996) - Assessment of bull sperm fertilizing ability. *Reprod Dom Anim* **31**: 515-517.
- ROTA, A.; FRISHLING, A.; VANNOZZI, I.; CAMILLO, F.; ROMAGNOLI, S. (2001) - Effect of the inclusion of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing. *J Reprod Fert Suppl* **57**: 377-381.
- ROTA, A.; IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.; LINDE-FORSBERG, C. (1999b) - Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STM paste. *Therio* **51**: 1045-1058.
- ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C.; VANNOZZI, J.; ROMAGNOLI, S.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (1998) - Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentration and freezing/thawing rates. *Reprod Dom Anim* **33**: 355-361.
- ROTA, A.; PEÑA, A.I.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (1999a) - In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim Reprod Sci* **57**: 199-215.
- ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C. (1995) - Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Therio* **44**: 885-900.
- ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (1997) - Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology* **47**: 1093-1101.
- RUDOLPH, A.S.; CROWE, J.H. (1985) - Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology* **22**: 367-377.
- SAACKE, R.G. (1983) - Semen quality in relation to semen preservation. *J Dairy Sci* **66**: 2635-2644.

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

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

SÁNCHEZ-PARTIDA, L.G.; MAXWELL, W.M.C.; PALEG, L.G.; SETCHELL, B.P.(1992) - Proline and glycine betaine in cryoprotective diluents for ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* **4**: 113-118.

SÁNCHEZ-PARTIDA, L.G.; SETCHELL, B.P.; MAXWELL, W.M.C (1997) - Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen semen of ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* **9**: 689-696.

SÁNCHEZ-PARTIDA, L.G.; SETCHELL, B.P.; MAXWELL, W.M.C (1998) - Effect of compatible solutes and diluent composition on the post-thaw motility of ram semen. *Reprod Fertil Dev* **10**: 347-357.

SÁNCHEZ-PARTIDA, L.G.; WINDSOR, D.P.; EPPLESTON, J.; SETCHELL, B.P.; MAXWELL, W.M.C. (1999) - Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. *J Androl* **20**: 280-288.

SANTOS, S.E.C.; VANNUCCHI, C.I.; SATZINGER, S.; VISINTIN, J.A. (2001) - Comparação de dois crioprotectores na congelação de semen de cães (Comparasion of two cryoprotectants for freezing dog semen). *Rev Bras Reprod Anim* **25**: 472-473.

SEAGER, S.W.J. (1969) - Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *AI Digest* **17**: 6/16.

SEAGER, S.J.; FLETCHER, W.S. (1972) - Collection, storage, and insemination of canine semen. *Laboratory Animal Science* **22**: 177-182.

SEAGER, S.J.; FLETCHER, W.S. (1973) - Progress on the use of frozen semen in the dog. *Vet Rec* **92**: 6-10.

SEGOVIA, M.; JENKINS, J.A.; PANIAGUA-CHAVEZ, C.; TIERSCH, T.R. (2000) - Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. *Therio* **53**: 1489-1499.

SERRES, C. (2003) - Evaluación y conservación del semen en el asno zamorano-leonés. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España.

SHAFFER, S.; TAKAHASHI, K.; AZUMA, J. (2000) - Role of osmoregulation in the actions of taurine. *Amino Acids* **19**: 527-546.

SHANNON, P; CURSON, B. (1972) - Toxic effect and action of dead sperm on diluted bovine sperm. *J Dairy Science* **55**: 614-620.

SHANNON, P; CURSON, B. (1983a) - Effect of egg yolk levels on the fertility of diluted bovine sperm stored at ambient temperatures. *New Zea J Agr Res* **26**: 187-189.

SHANNON, P; CURSON, B. (1983b) - Effect of egg yolk, amaranth, DNA, and seminal plasma on resistance of washed and unwashed bovine sperm to cold shock. *New Zea J Agr Res* **26**: 455-460.

SHIER, W.T. (1988) - Studies on the mechanisms of mammalian cell killing by a freeze-thaw cycle: conditions that prevent cell killing using nucleated freezing. *Cryobiology* **25**: 110-120.

SHIMAZU, Y.; YAMADA, S.; KAWANO, Y.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M.; MAITO, K.; TOYODA, Y. (1992) - *In vitro* capacitation of canine spermatozoa. *J Reprod Dev* **38**: 67-71.

- SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. (2003) - Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Therio* **59**: 821-829.
- SILVA, L.D.M.; VERSTEGEN, J.P. (1995) - Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Therio* **44**: 571-579.
- SINGH, M.P.; SINHA, A.K.; SINGH, B.K.; PRASAD, R.L. (1996) - Effect of cryoprotectants on release of various enzymes from buck spermatozoa during freezing. *Therio* **45**: 405-416.
- SIRIVAIYAPONG, S.; BEVERS, M.M.; GABELLA, B.M.; COLENBRANDER, B. (2001b) - Induction of the acrosome reaction in dog sperm: the generation of a functional progesterone receptor is involved. *Mol Reprod Dev* **58**: 451-459.
- SIRIVAIYAPONG, S.; CHENG, F.P.; MARKS, A.; VOORHOUT, W.F.; BEVERS, M.M.; COLENBRANDER, B. (2000) - Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. *Therio* **53**: 789-802.
- SIRIVAIYAPONG, S.; URSEN, P.; BEVERS, M.M.; COLENBRANDER, B. (2001a) - Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* **57**: 383-386.
- SLAVÍK, T. (1987) - Effect of glycerol on the penetrating ability of fresh ram spermatozoa with zona-free hamster eggs. *J Reprod Fertil* **79**: 99-103.
- SMITH, F.O. (1986) - Update on freezing canine semen. In Kirk, R. W. (Ed). Current Veterinary Therapy. WB Saunders Company, Philadelphia, pp1243-1248.
- SMITH, J.F.; MURRAY, G.R. (1997) - Evaluation of different staining techniques for determination of membrane status in spermatozoa. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* **57**: 246-250.
- SOARES, M.P.; ROSSI, C.A.R.; MEZZALIRA, A.; CECIM, M. (2002) - Etileno glicol na criopreservação de semen canino (Ethylene glycol on canine semen cryopreservation). *Ciência Rural* **32**: 649-655.
- SONGSASEN, N.; YU, I.; MURTON, S.; PACCAMONTI, D.L.; EILTS, B.E.; GODKE, R.A.; LEIBO, S.P. (2002) - Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. *Cryobiology* **44**: 79-90.
- SRIVASTAVA, S.; DESAI, P.; COUTINHO, E.; GOVIL, G. (2000) - Protective effect of L-arginine against lipid peroxidation in goat epididymal spermatozoa. *Physiol Chem Phys & Med* **32**: 127-135.
- STEWART, G.R.; LEE, J.A. (1974) - The role of proline accumulation in halophytes. *Planta(Berl.)* **120**: 279-289.
- STOREY, B.T.; NOILES, E.E.; THOMPSON, K.A. (1998) - Comparison of glycerol, other polyols, thehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* **37**: 46-58.
- STROM-HOLST, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2000) - Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *J Reprod Fert* **119**: 201-206.
- STROM-HOLST, B.; ROTA, A.; ANDERSEN-BERG, K.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (1998) - Canine sperm head damage after freezing-thawing: ultrastructural evaluation and content of selected elements. *Reprod Dom Anim* **33**: 77-82.
- STRÖM-HOLST, B.; ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C. (1997) - In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Therio* **48**: 247-256.

SUKARDI, S.; CURRY, M.R.; WATSON, P.F. (1997) - Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. *Anim Reprod Sci* **46**: 89-96.

SZÁSZ, F.; CHENG, F.P.; MARKS, A.; COLENDRANDER, B.; SOLTI, L. (1997) - Induction of acrosome reaction in dog sperm by calcium ionophore. *Acta Veterinaria Hungarica* **45**: 177-187.

SZÁSZ, F.; GÁBOR, G.; SOLTI, L. (2000a) - Comparative study of different methods for dog semen cryopreservation and testing under clinical conditions. *Acta Veterinaria Hungarica* **48**: 325-333.

SZÁSZ, F.; SIRIVAIDYAPONG, S.; CHENG, F.P.; VOORHOUT, W.F.; MARKS, A.; COLENDRANDER, B.; SOLTI, L.; GADELLA, B.M. (2000b) - Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog sperm. *Mol Reprod Dev* **55**: 289-298.

SZTEIN, J.M.; NOBLE, K.; FARLEY, J.S.; MOBRAATEN, L.E. (2001) - Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* **41**: 28-39.

TAO, J.; CRITSER, E.S.; CRITSER, J.K. (1993) - Evaluation of mouse sperm acrosomal status and viability by flow cytometry. *Mol Reprod Dev* **36**: 183-194.

TAMULI, M.K.; WATSON, P.F. (1994) - Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-populations. *Anim Reprod Sci* **35**: 247-254.

TARDIF, A.L.; FARRELL, P.B.; TROUERN-TREND, V.; FOOTE, R.H. (1997) - Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. *J Dairy Sci* **80**: 1606-1612.

THOMAS, C.A.; GARNER, D.L.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. (1997) - Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* **56**: 991-998.

THOMAS, C.A.; GARNER, D.L.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. (1998) - Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod* **58**: 786-793.

THOMAS, P.G.A.; LARSEN, R.E.; BURNS, J.M.; HAHN, C.N. (1993) - A comparison of three packing techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen. *Therio* **40**: 1199-1205.

THOMASSEN, R.; FARSTAD, W.; KROGENAES, A.; FOUIGNER, J.A.; ANDERSEN BERG, K. (2001) - Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study. *J Reprod Fertil Suppl* **57**: 341-346.

TRIMECHE, A.; YVON, J.M.; VIDAMENT, M.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. (1999) - Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. *Therio* **52**: 181-191.

TSUTSUI, T.; HASE, M.; HORI, T.; KOMORIYA, K.; SHIMIZU, N.; NAGAKUBO, K.; KAWAKAMI, E. (2000b) - Effect of addition of Orvus ES Paste to frozen canine semen extender on sperm acrosomes. *J Vet Med Sci* **62**: 537-538.

TSUTSUI, T.; HASE, M.; HORI, T.; ITO, T.; KAWAKAMI, E. (2000a) - Effects of Orvus ES Paste on canine spermatozoal longevity after freezing and thawing. *J Vet Med Sci* **62**: 533-535.

TSUTSUI, T.; HASE, M.; TANAKA, A.; FUJIMURA, N.; HORI, T.; KAWAKAMI, E. (2000c) - Intrauterine and intravaginal insemination with frozen canine semen using an extender consisting of Orvus Es Paste –supplemented egg yolk tris-fructose citrate. *J Vet Med Sci* **62**: 603-606.

- TUCKER, M.J.; AHUJA, K.; STEVENS, P.A.; CRAFT, I.L. (1986) - Cryopreservation of human spermatozoa: an assessment of methodology using rhodamine 123. *Arch Androl* **17**: 179-187.
- TULI, R.K.; SCHMIDT-BAULAIN, R.; HOLTZ, W. (1992) - Computer assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen-thawed semen of bull, boar and goat. *Therio* **38**: 487-490.
- UHLER, M.L.; LEUNG, A.; CHAN, S.Y.W. ; SCHMID, I.; WANG, C. (1993) - Assessment of human sperm acrosome reaction by flow cytometry: validation and evaluation of the method by fluorescence-activated cell sorting. *Fertility and Sterility* **60**: 1076-1081.
- VALCÁRCEL, M.A.A.; DE LAS HERAS, L.P.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. (1994) - Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. *Therio* **41**: 483-489.
- VAN DER HORST, C.J.G.; GROOTEN, H.J.G. (1966) - The occurrence of hypotaurine and other sulphur-containing aminoacids in seminal plasma and spermatozoa of boar, bull and dog. *Biochimica Et Biophysica Acta* **117**: 495-497.
- VAN DER VEN, H.H.; JEYENDRAN, R.S.; AL-HASANI, S.; PEREZ-PELAEZ, M.; DIEDRICH, K.; ZANEVELD, L.J.D. (1986) - Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and *in vitro* fertilization. *J Androl* **7**: 190-196.
- VÁZQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.; PASTOR, L.M.; ROCA, J.; MATAS, C.; CALVO, A. (1996) - Lectin histochemistry during *in vitro* capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa: new lectins for evaluating acrosomal status of boar spermatozoa. *Acta histochem* **98**: 93-100.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. (2002) - Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Therio* **57**: 149-179.
- VISHWANATH, R.; SHANNON, P.; CURSON, B. (1992) - Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilisig ability of bull sperm. *Anim Reprod Sci* **29**: 185-194.
- VOSS, J.L.; PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L. (1981) - Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. *JAVMA* **178**: 287-289.
- WANG, W.H.; ABEYDEERA, L.R.; FRASER, L.R.; NIWA, K. (1995) - Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and *in vitro* fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J Reprod Fertil* **104**: 305-313.
- WARD, C.R.; STOREY, B.T. (1984) - Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Devel Biol* **104**: 287-296.
- WATSON, P.F. (1975a) - The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with a fluorescent probe. *J Reprod Fert* **42**: 105-111.
- WATSON, P.F. (1975b) - Use of Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet Rec* **97**: 12-15.
- WATSON, P.F. (1979) - The preservation of semen in mammals. In: Oxford Reviews of Reproductive Biology, Finn, C.A. (ed), Oxford University Press, Oxford, pp 283-350.
- WATSON, P.F. (1981a) - The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Effects of Low Temperatures on Biological Membranes. G.J.Morris & A.Clark, eds. Academic Press, New York, pp189-218.
- WATSON, P.F. (1981b) - The role of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fert* **62**: 483-492.
- WATSON, P.F. (1995) - Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fert Dev* **7**: 871-891.

WATSON, P.F. (1996) - Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod Dom Anim* **31**: 135-140.

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

WATSON, P.F.; CRITSER, J.K.; MAZUR, P. (1992) - Sperm preservation: fundamental cryobiology and practical implications. In: Infertility. A.A. Templeton & J.O. Drife, eds. Springer-Verlag, London, pp.101-114.

WATSON, P.F.; MARTIN, I.C.A. (1975) - Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen spermatozoa. *Aust J Biol Sci* **28**: 153-9.

WAY, A.L.; HENAULT, M.A.; KILLIAN, G.J. (1995) - Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Therio* **43**: 1301-1316.

WESSEL, M.T.; BALL, B.A. (2004) - Step-wise dilution for removal of glycerol from fresh and cryopreserved equine spermatozoa. *Animal Reprod Science* **84**: 147-156.

WHITE, I.G. (1993) - Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev* **5**: 639-658.

WHITFIELD, C.H.; PARKINSON, T.J. (1995) - Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by in vitro induction of acrosome reactions with calcium ionophore (A23187). *Therio* **44**: 413-422.

WILHELM, K.M.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. (1996) - Comparison of the fertility of criopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. *Therio* **46**: 559-578.

WINDSOR, D.P. (1997)- Mitochondrial fuction and ram sperm fertility. *Reprod Fertil Dev* **9**: 279-284.

WINDSOR, D.P.; WHITE, I.G. (1993) - Assessment of ram sperm mitochondrial function by quantitative determination of sperm rhodamine 123 accumulation. *Mol Reprod Dev* **36**: 354-360.

WINDSOR, D.P.; WHITE, I.G. (1995) - Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial insemination or frozen storage. *Anim Reprod Sci* **40**: 43-58.

WOELDERS, H.; MATTHIJS, A.; ENGEL, B. (1997) - 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* **35**: 93-105.

[www.cryocel.com/rsce.htm](http://www.cryocel.com/rsce.htm) (2003) 'normativa de la RSCE para la congelación de semen canino'.

[www.microopticsl.com](http://www.microopticsl.com) 'Manual de Uso del SCA® 2002'. Help On-Line.

[www.wisc.edu/ansci\\_repro](http://www.wisc.edu/ansci_repro). Lectures. Reproductive physiology. Lecture 16. Fertilization: acrosome reaction.

YANAGIMACHI, R. (1975) - Acceleration of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa by detergents and other reagents. *Biol Reprod* **13**: 519-526.

YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. (2000) - Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* **54**: 579-585.

YU, I.; SONGSASEN, N.; GODKE, R.A.; LEIBO, S.P. (2002) - Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology* **44**: 62-78.

YUNES R.; DONCEL G.F.; ACOSTA, A.A. (2003) - Incidence of sperm-tail tyrosine phosphorylation and hyperactivated motility in normospermic and asthenozoospermic human sperm samples. *Biocell*. **27**: 29- 36.

ZHANG, B.R.; BURH, M.; KROETSCH, T.; LEIBO, S.P. (2001) - Glycine betaine improves survival of fresh bovine spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* **13**: 187-192.



Este trabalho foi financiado no âmbito do PRODEP III  
Concurso n.º 2/5.3/PRODEP/2001  
Formação Avançada de Docentes no Ensino Superior  
Formando nº 2

