

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

UNIDAD LAGUNA



DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Técnicas de preservación de semen canino

P O R

LYDIA DEL CARMEN COVARRUBIAS RANGEL

MONOGRAFÍA

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL

TÍTULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO.

JUNIO DEL 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

UNIDAD LAGUNA



DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Técnicas de preservación de semen canino

MONOGRAFÍA

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P O R

LYDIA DEL CARMEN COVARRUBIAS RANGEL

ASESOR:

MVZ. CARLOS RAÚL RASCÓN DIAZ

COLABORADOR

MC. JOSÉ LUIS COVARRUBIAS CASTRO

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO.

JUNIO DEL 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA



DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Técnicas de preservación de semen canino

MONOGRAFÍA

APROBADO POR EL COMITÉ DE MONOGRAFÍA

PRESIDENTE DEL JURADO

MVZ. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

MVZ. RODRIGO ISIDRO SIMÓN ALONSO



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA



DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Técnicas de preservación de semen canino

MVZ. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ
PRESIDENTE

MC. JOSÉ LUIS COVARRUBIAS CASTRO
VOCAL

MVZ. SILVESTRE MORENO ÁVALOS
VOCAL

MC. JORGE ITURBIDE RAMÍREZ
VOCAL SUPLENTE

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser mi guía fundamental para la realización y culminación de este trabajo.

A mi Esposo Jorge, a mi hija Ana Sofía, a mis padres y hermanos, por su gran amor, apoyo y comprensión.

DEDICATORIA

A DIOS

Por haberme dado la oportunidad de elegir esta hermosa carrera y por tener tantas bendiciones en el transcurso de ella.

A MI “ALMA MATER”

Por abrirme las puertas y brindarme las facilidades de alcanzar una meta realizada en la vida.

A MI FAMILIA

Por el amor, respeto y apoyo que siempre me han dado incondicionalmente.

A MI ASESOR

Al MVZ. Carlos Raúl Rascón Díaz. Gracias por su orientación, asesoría y revisión de la misma. Por todo su gran apoyo y amistad.

Al MC. José Luis Covarrubias Castro, por su valioso esfuerzo, entusiasmo y su gran ayuda en la realización de dicho trabajo.

Al MVZ. Silvestre Moreno Ávalos y Al MC. Jorge Iturbide Ramírez por el apoyo en la realización de este trabajo.

ÍNDICE

Contenido	Página
AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA.....	I
I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- ANTECEDENTES	3
ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL PERRO.....	11
3.1. Órganos genitales del macho.	11
3.1.1. Escroto.	11
3.1.2. Testículos.....	11
3.1.2 Epidídimo.	11
3.1.3 Conductos deferentes.	12
3.1.4 Cordón espermático (funículos spermaticus).	12
3.1.5 Canal inguinal.	12
3.2. Glándulas genitales accesorias.	13
3.2.1. Glándulas vesiculares.	13
3.2.2. Próstata.....	13
3.2.3. Glándulas bulbouretrales.	13
3.3. Genitales externos.....	13
3.3.1. Pene.....	13
3.3.2. Prepucio.....	14
3.3.3. Uretra masculina.	14
IV.- ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN.	15
4.1. Hormonas Hipotalámicas.....	15
4.1.1. Hormona liberadora de Gonadotropina (GnRH).....	15
4.2. Hormonas Hipofisiarias.....	15
4.2.1. Hormona Folículo Estimulante (FSH).....	15
4.2.2. Hormona Luteinizante (LH).	16
4.2.3. Prolactina.	17
4.3. Hormonas foliculares.	17
4.3.1. Estrógenos.....	17
4.3.2. Progesterona.....	17
4.3.3. Prostaglandinas.....	18
4.3.4. Andrógenos.....	18

4.3.5. Inhibina.....	19
V. FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN.....	19
5.1. Fisiología de la Reproducción del Macho.....	19
5.1.1. Espermatogénesis.....	19
5.1.2. Control de la temperatura.....	21
5.1.3. Transporte del semen.....	21
5.1.4. Erección.....	22
5.1.5. Eyaculación.....	23
VI. PRINCIPIOS GENERALES DE LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN.....	24
6.1 Impacto de la refrigeración y la congelación en la estructura y función espermáticas.....	28
6.1.1. Susceptibilidad al Choque Térmico.....	29
6.1.2. Alteraciones morfofuncionales derivadas de la refrigeración y la congelación.....	32
6.1.2.1 Refrigeración.....	32
6.1.2.2 Congelación.....	34
6.1.2.3. Consecuencias de la congelación.....	39
6.1.2.4. Implicaciones en la funcionalidad espermática.....	40
6.2. Protocolos de refrigeración y congelación.....	40
6.2.1. Dilución y empleo de crioprotectores.....	40
6.2.1.2. Situación actual de los procesos de refrigeración y congelación para el semen canino.....	42
6.2.1.3 Papel de los crioprotectores.....	44
6.2.1.3.1 Yema de huevo.....	45
6.2.1.4. Glicerol.....	46
6.2.1.5. Dimetilsulfoxido.....	52
6.2.1.6. Etilenglicol.....	52
6.2.1.6. Adición de azúcares.....	54
6.2.1.7. Adición de Equex®.....	54
6.2.1.8. Otros compuestos.....	64
6.3. Periodos de refrigeración y de equilibrio.....	65
6.4. Ritmos de congelación y descongelación.....	67
VII. Evaluación de la calidad espermática.....	70
7.1. Principios generales.....	70
7.1.1 Atributos del espermatozoide fértil.....	71

7.1.2. Semen fresco.....	72
7.2 Semen refrigerado y congelado.....	74
7.3 Pruebas clásicas de evaluación seminal.....	75
7.3.1. Motilidad espermática.	76
7.3.2. Estimación subjetiva.....	76
7.3.3. Análisis computarizado (CASA).	77
7.4. Prueba de termo resistencia.....	85
7.4.1. Concentración.	86
7.4.2. Morfología.	87
7.4.3. Integridad del acrosoma.....	90
7.4.4. Integridad de la membrana plasmática.	94
7.4.5. Test de endósmosis.	95
7.5. Pruebas complementarias de evaluación seminal.....	96
7.5.1. Utilización de marcadores fluorescentes: microscopía de fluorescencia y citometría de flujo.	96
7.5.2. Evaluación de la viabilidad.	98
7.5.3. Evaluación de la integridad acrosomal.....	99
7.5.4. Evaluación simultánea de la viabilidad e integridad del acrosoma.....	102
7.5.5. Evaluación de la actividad mitocondrial.....	103
7.6. Valoración de la capacitación mediante la prueba de tinción con clortetraciclina.....	107
7.6.1. Actividad enzimática del acrosoma.	108
7.6.2. Ensayos de unión y penetración a zona pelúcida.	109
7.6.3. Pruebas de inducción de la reacción acrosómica.	110
VIII. Conclusión.	111
LITERATURA CITADA.....	112

I.- INTRODUCCIÓN

El aumento del valor y las posibilidades de comercialización de los cachorros de pura raza así como el aumento de la importancia de la cría canina tanto desde el punto de vista económico, recreativo o para la obtención de perros de trabajo ha impulsado el desarrollo e implementación de las biotecnologías reproductivas en esta especie. La Inseminación Artificial (IA) ha beneficiado el mejoramiento genético en los perros de raza pura. El desarrollo de IA (la primera generación de biotecnologías reproductivas), junto con la criopreservación de semen ha hecho posible la distribución por el mundo de material genético a un bajo costo. Diversas metodologías de criopreservación de semen, se están aplicando cada vez con más frecuencia con el fin de establecer bancos de reserva genética para conservar las diferentes especies en el futuro (1). Las especies en vías de extinción son los principales impulsores y receptores de esta corriente (2). La primera comunicación de IA en caninos fue realizada en 1887 por Lazzaro Spallanzani quien utilizó semen fresco (3, 4, 5). Sin embargo fue muchos años más tarde cuando este tópico se convirtió en foco de interés para la investigación. En 1956, Harrop (6) comunica que una de seis perras inseminadas con semen refrigerado después de seis días de almacenamiento resultó preñada. En 1954, Rowson (7) notifica la primera congelación de semen exitosa en caninos y más tarde en 1969, Seager (8) obtiene la primera preñez con semen congelado en perros. Desde la ocurrencia de estos eventos, el interés de los criadores caninos en la IA y la criopreservación de semen han aumentado en forma creciente. Es así que en el mundo, por aproximadamente 5 décadas, muchas camadas han nacido a partir de IA con semen fresco, refrigerado y congelado. Sin embargo las tasas de preñez obtenidas a partir de IA usando semen congelado son aún poco satisfactorias y esto ocurre en particular con las obtenidas bajo condiciones clínicas. En la clínica reproductiva diaria las variables asociadas al manejo del semen en la descongelación, a la técnica de IA implementada y a la detección del momento de mayor fertilidad están fuertemente influenciadas por el entrenamiento del operador actuante, a la infraestructura de la clínica en la que se realiza el procedimiento y al estado de salud y nutrición de los reproductores utilizados (9,

10, 11, 12, 13). Estos hechos se relacionan tanto con las particularidades de la fisiología reproductiva de la hembra como con la especial sensibilidad del semen canino a los procesos de criopreservación y la falta de desarrollo en esta área. (12, 14). Es así que son necesarias investigaciones dirigidas a mejorar la habilidad para mantener la capacidad fecundante del semen congelado en caninos y obtener así tasas de preñez y tamaños de camada satisfactorios. Para que sea posible la interacción óvuloespermatozoide y el comienzo de una nueva vida, un número suficiente de espermatozoides fértiles debe arribar a la ampolla para encontrarse con los oocitos y que ocurra así la secuencia de eventos necesarios para la fertilización (15, 16). Evaluación de la calidad seminal y predicción de la capacidad fecundante Existen una gran variedad de pruebas de laboratorio que han sido desarrolladas para evaluar la calidad del semen (integridad espermática y capacidad fecundante) usado para IA, y predecir así la capacidad fecundante del mismo. El uso de estas pruebas en forma combinada puede aumentar la exactitud en la estimación de la función espermática. Sin embargo, es imposible reemplazar las pruebas de campo, pues las pruebas in vitro nunca podrán predecir exactamente que ocurrirá cuando se encuentren óvulo y espermatozoide in vivo (15, 17). Los métodos más precisos para evaluar la capacidad de fecundante del semen luego de ocurrido un proceso de criopreservación son las pruebas de campo, es decir la inseminación de un gran número de hembras (18). Este hecho fue posible en los animales de granja (19, 20, 21). Sin embargo, en pequeños animales las pruebas de fertilidad a campo son difíciles de implementar ya que usualmente solo un pequeño número de hembras está disponible para el estudio, razón por la cual poseen baja sensibilidad.

II.- ANTECEDENTES

El semen puede ser conservado mediante refrigeración o congelación. La refrigeración disminuye la tasa metabólica y prolonga la sobrevivencia espermática. Los diluyentes de semen utilizados para refrigeración protegen las membranas espermáticas de los daños causados por los cambios de temperatura, proveen energía, estabilizan el pH y la presión osmótica (26). La yema de huevo es un componente habitual de los diluyentes para semen debido a que sus fosfolípidos y proteínas de baja densidad protegen al espermatozoide del shock de frío (42, 43).

En 1956, Harrop (6) comunica la primera preñez en caninos con semen refrigerado a 4° C durante 4 días usando un diluyente a base de leche. Desde entonces varios diluyentes han sido probados para su uso con semen canino (44, 45, 46). Uno de los diluyentes más comúnmente usados es el Tris-citrato conteniendo 20% de yema de huevo (TYH) (45, 78), el cual permite el uso de semen refrigerado con buena capacidad fecundante durante 24-48 horas post-refrigeración, obteniéndose porcentajes de preñez aceptables (62,5%; Fosberg 91, 46). Este diluyente se ha comparado in vitro con diluyentes preparados en base a leche y yema de huevo; y crema de leche y yema de huevo, observándose resultados similares en cuanto a la conservación de motilidad espermática e integridad de membrana (46). El MRA® (glucosa, EDTA, citrato de sodio, acetato de potasio, aminoglucósidos, excipiente tampón), es un diluyente que posibilita buena conservación del semen porcino tanto en relación a la viabilidad espermática como a la preservación de la capacidad fecundante (27, 48). Este diluyente con el agregado de 20% de yema de huevo permitió obtener en caninos, parámetros seminales (porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto) significativamente mayores que el TYH cuando el semen fue refrigerado durante 24, 48 o 72 hs tanto a 4° C como 15° C (78). Se ha observado que la longevidad del semen canino es significativamente mayor a 4° C que a 22° C (47). Sin embargo no se observaron diferencias significativas cuando se conservó a 4° C o 15° C (78). Tanto el tipo de diluyente usado como la

temperatura de almacenado son factores que poseen gran influencia sobre la capacidad fecundante del semen luego de la refrigeración (50). El semen refrigerado, no requiere el uso de equipos sofisticados para su preparación y puede utilizarse mediante la aplicación de IA vaginal (2, 12). Para la refrigeración se colecta la fracción espermática del semen canino y se la mezcla con el diluyente elegido, el cual debe encontrarse a la temperatura del semen en el momento de la dilución. Entre semen y diluyente debe respetarse una relación 1:3 o 1:4. El semen así preparado puede refrigerarse a 4 °C o 15°C y utilizarse para IA lográndose tasas de preñez aceptables durante las primeras 24-48 h. Previo a la IA el semen refrigerado debe alcanzar lentamente la temperatura ambiente (12). La utilización de semen refrigerado con diluyentes protectores como el tris-buffer con el agregado de 20 % de yema de huevo permite conservar espermatozoides con buena capacidad fecundante por un período de tiempo suficiente para trasladar el semen e inseminar animales ubicados en localizaciones geográficas distantes. Esto hace posible la IA de una hembra con el semen de un macho que se encuentre en otra provincia u otro país limítrofe o cercano con mínimo gasto y baja complejidad de manejo. De esta manera se amplían las posibilidades de uso de un reproductor, permitiendo la comercialización de semen y facilitando el intercambio genético entre diferentes establecimientos (40). Hasta hace poco tiempo, se practicaba IA exclusivamente con semen fresco, posteriormente comenzó a utilizarse semen refrigerado. En muchos países de Europa así como en Estados Unidos la IA con semen refrigerado es una práctica rutinaria, sin embargo no ocurre lo mismo en Sudamérica. Este método de criopreservación de semen puede ser implementado con bajo costo, fácil manejo y moderada infraestructura, factores que pueden determinar, en el futuro, su uso rutinario en Sudamérica, mejorando así las posibilidades del uso del semen de reproductores valiosos. Los procesos de congelación-descongelación resultan en reducción de la fertilidad del semen criopreservado si lo comparamos con el semen fresco. Este hecho es el resultado tanto de la pérdida de viabilidad espermática (población de espermatozoides muertos) como de las alteraciones funcionales instauradas en la población sobreviviente (28). Los espermatozoides criopreservados exhiben

modificaciones de membrana similares a las ocurridas en espermatozoides capacitados, dichos eventos reducen la longevidad espermática (51). Estos cambios similares a la capacitación espermática están relacionados con eventos que desestabilizan las membranas. Un aumento de la tasa de concepción puede lograrse mejorando los métodos de criopreservación tratando de prevenir o minimizar la ocurrencia de los eventos que desestabilizan las membranas y aumentando así la cantidad de espermatozoides con capacidad fecundantes en la población de espermatozoides sobrevivientes luego del proceso de criopreservación (27, 28). Existen variados tipos de daños asociados tanto al enfriamiento propiamente dicho como a los componentes de un diluyente. Estos daños están relacionados con los cambios de temperatura (shock de frío), la toxicidad de los crioprotectores y la formación y disolución de hielo en el medio ambiente extracelular (26,52, 53, 54, 55). Cada paso del protocolo de criopreservación podría afectar la estructura de la membrana así como el metabolismo y la función celular. Sin embargo los pasos están interrelacionados entre sí y un cambio en uno de ellos puede modificar el efecto de otras variables (56). Las primeras preñeces obtenidas en caninos a partir de IA con semen congelado fueron logradas utilizando lactosa y un diluyente con base Tris (8, 57,). Desde entonces, variados diluyentes han sido evaluados para su uso en caninos, sin embargo los diluyentes en Tris Base son aún los usados más frecuentemente (3, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64,). En la actualidad, el glicerol es el crioprotector usado con más frecuencia en la preparación de diluyentes de semen, habiendo sido utilizado también el dimetilsulfoxido (DMSO) (61, 65). Existen otros compuestos como el duodecil sulfato de sodio (SDS), glicina betaina, prolina y metilxantinas que han sido incluidos en los diluyentes utilizados para congelación de semen canino (64,66, 67, 68,). La yema de huevo es el componente más efectivo para proteger al espermatozoide del shock de frío y es generalmente incluido en los diluyentes utilizados para criopreservación. Este componente previene la aparición de colas dobladas y protege la motilidad (69, 70). El compuesto activo en la yema de huevo es la fracción de lipoproteína de baja densidad, una molécula de alto peso molecular que solo puede actuar en la

superficie celular (54). Se ha comprobado que la acción de ciertos detergentes sobre las lipoproteínas de la yema de huevo mejora el efecto crioprotector de los diluyentes de semen en algunas especies (68, 71, 72, 73). Compuestos detergentes que contienen dodecil sulfato de sodio (SDS) solos o como un componente del Equex STM® paste (detergente comercial) han sido incluidos en diluyentes de semen usados para la congelación de semen canino (12, 43, 74, 75). Se observó que la adición de Equex STM paste a un diluyente con base Tris mejora la supervivencia espermática al descongelado (64, 68, 40) así como la capacidad espermática para unirse a la zona pelúcida de ovocitos homólogos (76, 77, 78). Peña (68), observó un efecto benéfico en todos los indicadores de viabilidad espermática al utilizar dos pasos de dilución en el protocolo de congelación cuando incorpora Equex STM paste al diluyente. Sin embargo no se ha evaluado el efecto de diferentes concentraciones de Equex STM paste sobre la viabilidad espermática al descongelado. Notlhing (79) obtuvo altos porcentajes de preñez mediante IA intravaginal con semen criopreservado utilizando un diluyente con el agregado de Equex STM paste. Así mismo Rota (80) obtuvo buenos resultados utilizando inseminación artificial intravaginal e intrauterina con semen congelado utilizando Equex STM paste. Sin embargo no existen estudios de fertilidad en relación con las concentraciones de Equex STM paste utilizadas en la formulación de los diluyentes. Diferentes tipos de azúcares han sido incluidos en los diluyentes usados para congelación de semen canino (81, 82). Los azúcares utilizados poseen variadas funciones tales como proveer un sustrato energético para las células espermáticas durante la incubación, mantener la presión osmótica del diluyente y actuar como crioprotectores (83). Se ha estudiado la influencia de los azúcares (monosacáridos, disacáridos, trisacáridos), sobre la motilidad, viabilidad y porcentaje de acrosomas intactos durante la dilución, equilibración y congelación de espermatozoides caninos (83). La suplementación del diluyente con azúcares influencia la calidad espermática pos-equilibración y pos-descongelación. El tipo y localización del impacto protector del azúcar sobre la célula espermática varía de acuerdo al tipo de azúcar utilizado (83, 84, 85, 86, 87). La trealosa es usada como una molécula protectora en la estabilización celular

durante la congelación. Durante la congelación ocurren fenómenos de deshidratación celular. Este azúcar es acumulado en altas concentraciones (superiores al 20%) en muchos organismos capaces de sobrevivir a la deshidratación completa. Por ejemplo las levaduras utilizadas en panadería, las cuales han sido estudiadas exhaustivamente, no sobreviven a la desecación durante la fase de crecimiento logarítmico (en la cual no poseen cantidades significativas de trealosa), pero durante la fase estacionaria ellas acumulan este azúcar y pueden desecarse satisfactoriamente (88, 89). Se ha comunicado el efecto benéfico en la viabilidad espermática al descongelado en espermatozoides de carnero y equino cuando el diluyente es suplementado con trealosa (90, 91, 92). Este disacárido posee un efecto protector relacionado con el efecto osmótico que produce y su interacción específica con los fosfolípidos de membrana (85, 86). Por debajo de aproximadamente -5°C , las células y el medio que las rodea permanece no congelado gracias al superenfriamiento y al descenso del punto de congelación producido por los solutos protectores presentes frecuentemente en el medio externo. Es así que el contenido de la célula permanece no congelado y superenfriado, presumiblemente pues la membrana plasmática bloquea el desarrollo de cristales de hielo dentro del citoplasma. El agua superenfriada de la célula, tiene por definición un potencial químico mayor que el agua parcialmente congelada existente en el exterior de la célula. El medio externo de la célula como consecuencia de la congelación parcial y de la formación de cristales de hielo, posee una concentración de solutos mayor en la fracción líquida externa que antes de la formación de los cristales de hielo (87). Esto determina que el medio externo que rodea a la célula posea una mayor presión osmótica que el medio celular interno. En respuesta a los fenómenos ocurridos y a las diferencias fisicoquímicas entre el medio interno y externo el agua sale de la célula y se congela externamente. Si el enfriamiento es suficientemente lento, la célula es capaz de perder agua y concentrar suficientemente los solutos para eliminar el superenfriado y mantener el potencial químico del agua intracelular en equilibrio con el agua extracelular. El resultado es que la célula se deshidrata y no se congela en su interior (93). Los azúcares no

permeables (trealosa, lactosa, sacarosa, rafinosa) brindan un medio hipertónico causando deshidratación celular antes de la congelación (85, 88, 94). Este efecto osmótico disminuye el agua intracelular congelable y en relación a esto la cuantía de daño celular por la cristalización del hielo (91, 95). El mayor grado de estrés sufrido por los fosfolípidos de la bicapa lipídica de la membrana resulta en una transición de fase termotrópica, fusión y aumento de la permeabilidad de membrana. Debido a que el agua, ligada al hidrógeno de los grupos polares de las cabezas, es removida por la deshidratación aumenta la temperatura de transición (T_m) de gel a líquido cristalino. Sin embargo la solubilidad fosfolipídica de la fase gel está siempre disminuida relativamente en comparación con lo que se observa en la fase líquida cristalina y podrían existir diferencias de sensibilidad en la T_m en el estado de hidratación lo cual puede resultar en separación fosfolipídica (85). La trealosa posee una acción protectora relacionada con su interacción específica con los fosfolípidos de membrana (84, 85, 88, 96) y puede ser capaz de prevenir la separación de fase y la fusión entre las bicapas durante la congelación (14). Este azúcar muestra una interacción directa con los fosfolípidos de las cabezas de los grupos polares durante la desecación y congelación, reduciendo las fuerzas de Van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas que se relacionaría con la disminución de T_m (84, 96). El agregado de trealosa al diluyente utilizado para la congelación de semen canino podría mejorar la viabilidad espermática al descongelado (97). El espermatozoide es una célula altamente especializada con una membrana plasmática que no solo ayuda a mantener la integridad celular sino también participa en los eventos de fusión de membrana asociados con la fertilización (98). La membrana plasmática es considerada como el sitio donde se inicia la injuria inducida por la congelación (99). En humanos, la integridad de la membrana plasmática y acrosómica fue estudiada mediante microscopio electrónico de transmisión (MET) y se observó una correlación positiva entre los daños observados y la fertilidad (100). En caninos se han estudiado los cambios ultraestructurales presentes en las cabezas espermáticas usando MET (40). Cuando se compararon los dos métodos de congelación (Congelación en termo de nitrógeno vs congelación sobre vapores de nitrógeno líquido) utilizados para

criopreservar semen en caninos (44,80) no se observaron diferencias entre los métodos, y ningún método provocó daño más extenso que el otro, ni mejoró significativamente la calidad espermática al descongelado. Sin embargo en ambos métodos se observaron importantes cambios a nivel de las cabezas en el semen congelado, lo cual puede causar reducida longevidad espermática y explicar las bajas tasas de concepción obtenidas con IA intavaginal en comparación con IA intrauterina cuando se usa semen congelado (40, 101). Estudios dirigidos a caracterizar el tipo y extensión de los cambios ultraestructurales presentes en espermatozoides caninos congelados con diferentes diluyentes podrían ayudar a desarrollar nuevos diluyentes prediciendo en forma más segura la fertilidad de ese semen. El semen congelado puede ser almacenado por largo tiempo en bancos de semen y preservar así material genético, es así que un reproductor puede ser usado mucho tiempo después de su muerte. Inseminación artificial con semen congelado Tres puntos conforman las llaves del éxito para obtener buenos resultados con la implementación de IA en caninos: 1) Determinación del momento óptimo para la IA, 2) Uso de semen de buena calidad, 3) Uso de una adecuada técnica de IA (12). El semen congelado luego de la descongelación posee una vida mucho más corta que el semen fresco, debido a que los protocolos de criopreservación producen un número potencial de factores de estrés que pueden producir variados cambios en el espermatozoide (102, 103). Es así que en caninos, si se usa semen congelado, la IA debe realizarse entre el día 4 y 7 del estro, ya que este es el período óptimo para la concepción. En este momento, el espermatozoide posee altas probabilidades de interactuar con ovocitos fértiles en relación al tiempo de vida de los mismos (10). La IA debe ser realizada con un número de espermatozoides vivos y competentes al descongelado suficientes para obtener una alta probabilidad de fertilización. Es por esto que debe ISSN 0365-5148 Semen canino criopreservado *Analecta Veterinaria* 2006; 25 (2): 29-38 35 considerarse un protocolo de criopreservación que no solo logre una gran población de sobrevivientes sino también la integridad de las células que la conforman (102). En el perro se estima que entre 150 y 200 X 106 espermatozoides viables al descongelado son necesarios para obtener tasas

aceptables de preñez (34). Debido a la corta sobrevivencia de los espermatozoides congelados en comparación con el semen fresco, el uso de IA intrauterina aumenta las posibilidades de preñez. La inseminación artificial intrauterina puede realizarse depositando el semen en el útero, a través de la cateterización de cervix o inoculándolo directamente en el cuerpo o cuernos uterinos en forma quirúrgica. Si bien la IA con semen fresco es una práctica usada rutinariamente en la reproducción de pequeños animales, no ocurre lo mismo con la IA con semen criopreservado (refrigerado o congelado). Sin embargo, el continuo estudio de los factores que posibilitan una mejor criopreservación de semen relacionados con los procesos de refrigerado, congelado y descongelado, posibilitarán en el futuro aplicación frecuente de esa biotecnología.

ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL PERRO.

3.1. Órganos genitales del macho.

3.1.1. Escroto.

Es un saco membranoso dividido por un séptum medio en dos cavidades, ocupadas cada una por los testículos, epidídimo y parte distal del cordón espermático. Está situado entre la región inguinal y el ano (Sisson *et al.*, 1993).

Un músculo especial en la piel del escroto, el dartos, regula la proximidad de los testículos a la pared abdominal influyendo así sobre su temperatura (Allen, 1992). La red compleja de suministro de sangre también contribuye a mantener la temperatura de los testículos por debajo de la temperatura normal del cuerpo. Ésto facilita el desarrollo óptimo de los espermatozoides (Cunningham, 1999; Davol, 2000).

3.1.2. Testículos.

Los testículos del macho canino son relativamente pequeños, tienen forma oval o redondeada, su eje mayor es oblicuo y esta dirigido dorsal y caudalmente (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993). Atraviesan el canal inguinal entre los 4 y 5 días de edad (Cunningham, 1999), y alcanzan su ubicación en el escroto en 35 días (Allen, 1992).

3.1.2 Epidídimo.

El epidídimo es largo, extremadamente enrollado sobre sí mismo e íntimamente unido a lo largo de la parte dorsal de la superficie lateral del testículo (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993). Es una estructura formada por cabeza, cuerpo y cola. Los espermatozoides maduran en su paso a través de él, y en el perro, este recorrido se efectúa en 14 días (Allen, 1992).

3.1.3 Conductos deferentes.

Los conductos deferentes, son la continuación de la cola del epidídimo, con una ampolla estrecha en el perro y entran a la superficie craneodorsal de la próstata (Cunningham, 1999; Davol, 2001; Sisson *et al.*, 1993). Este conducto transporta los espermatozoides desde el epidídimo hasta la uretra, y tiene un diámetro de 1 mm aproximadamente (Allen, 1992).

3.1.4 Cordón espermático (funículos spermaticus).

El cordón espermático comienza en el anillo inguinal profundo, donde sus partes constituyentes se juntan, se extiende oblicua y centralmente a través del canal inguinal y pasa junto al pene para terminar en el borde de inserción del testículo.

Está formado por las siguientes estructuras:

1. Arteria testicular.
2. Venas testiculares.
3. Linfáticos que acompañan a las venas.
4. Plexo testicular de nervios autónomos.
5. Conductos deferentes, arteria y vena.
6. Haces de tejido muscular liso alrededor de los vasos.
7. Capa visceral de la túnica vaginal.

El cordón espermático y la túnica vaginal son largos y cruzan al lado del pene muy oblicuamente. El extremo más superior de la túnica está algunas veces cerrado, de modo que no existe anillo vaginal (Sisson *et al.*, 1993).

3.1.5 Canal inguinal.

Los vasos espermáticos y el conducto deferente penetran en el abdomen a través de un espacio estrecho en los músculos de la pared abdominal, que se conoce como el canal inguinal (Allen, 1992)..

3.2. Glándulas genitales accesorias.

3.2.1. Glándulas vesiculares.

Las glándulas vesiculares no están presentes en el perro (Cunningham, 1999; Sisson *et al.*, 1993).

3.2.2. Próstata.

Allen (1992), considera a la próstata como la única glándula accesoria en el perro. La próstata es relativamente grande y a menudo está alargada, especialmente en los animales viejos (Cunningham, 1999; Sisson *et al.*, 1993). Es de color amarillento y con una estructura densa. Se localiza a la altura del borde craneal del pubis o cerca de él, rodeando el cuello de la vejiga y la uretra (Sisson *et al.*, 1993). Es una estructura bilobulada en la entrada de la pelvis. La uretra atraviesa la glándula antes de llegar a la base del pene. La próstata aumenta normalmente de tamaño según avanza la edad. Esta glándula produce una secreción transparente que es expulsada al interior de la uretra; ésta secreción es conocida como fluido prostático, y constituye la primera y tercera fracción del eyaculado; tiene poder bactericida (Allen, 1992).

3.2.3. Glándulas bulbouretrales.

Las glándulas bulbouretrales no están presentes en el perro (Cunningham, 1999).

3.3. Genitales externos.

3.3.1. Pene.

El pene está compuesto de raíz, cuerpo y glande. En su parte caudal existen dos cuerpos cavernosos visibles, separados por un tabique medio. En su parte craneal hay un hueso, el *os penis*, que es un hueso rodeado por el glande (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993). En los perros grandes alcanza una

longitud de 10 cm. o más. Está considerado como una parte del cuerpo cavernoso que se ha osificado (Sisson *et al.*, 1993).

El glande es muy grande y se extiende sobre toda la longitud del pene; su parte craneal, llamada *pars longa glandis*, es cilíndrica, con un extremo libre puntiagudo, constituye las tres cuartas partes distales del glande y termina en la abertura de la uretra; caudalmente existe un alargamiento redondeado, llamado bulbo del glande, que sin erección es difícil de apreciar, pero que cuando el pene se encuentra en erección consiste en un abultamiento más o menos esférico responsable de la fijación del pene en la vagina de la perra durante el apareamiento (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993).

3.3.2. Prepucio.

El prepucio forma una vaina completa alrededor de la parte craneal del pene (Sisson *et al.*, 1993). Cubre completamente el pene no erecto (Allen, 1992). La capa más externa es ordinariamente integumento. Las capas internas son delgadas, de color rojizo y aglandulares. Presenta una mucosa que se continúa con la mucosa del pene en el glande peniano. En estas capas hay muchos nódulos linfáticos, que son especialmente grandes y a menudo prominentes en el fondo de la cavidad prepucial (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993).

3.3.3. Uretra masculina.

Este conducto tiene la misión de transportar tanto la orina como el semen al extremo del pene (Allen, 1992). La parte pelviana de la uretra es relativamente grande. Su primera porción se extiende desde la vejiga y está cubierta por la próstata (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993).

IV.- ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN.

4.1. Hormonas Hipotalámicas.

4.1.1. Hormona liberadora de Gonadotropina (GnRH).

Es producida en el hipotálamo (en la base del encéfalo) y transportada hasta la glándula pituitaria anterior (adenohipófisis) mediante un sistema especializado de vasos sanguíneos. Esta hormona determina de forma selectiva la liberación de la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y de la Hormona Luteinizante (LH) (Allen, 1992; Ruckebusch *et al.*, 1991), éstas dos hormonas (FSH y LH) participan en el control de la reproducción en mamíferos machos y hembras (Ruckebusch *et al.*, 1991).

La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), se libera en pulsaciones casi cada dos horas. Su liberación se aumenta por la noradrenalina y el estradiol. También influyen en la liberación de GnRH las feromonas que estimulan el bulbo olfatorio y señales luminosas que actúan en la retina. La dopamina, opiodes y endorfinas inhiben la descarga de GnRH. También el tratamiento prolongado con corticosteroides y el estrés tienen una retroalimentación negativa en la producción de GnRH por el hipotálamo. Cuando los niveles de estradiol son altos, el GnRH favorece la producción de la Hormona Luteinizante (LH) en lugar de Hormona Folículo Estimulante (FSH). En contraste, altas concentraciones de progesterona y bajas de estrógenos apoyan una producción hipotalámica de GnRH, dando así prioridad a producir FSH (Ruckebusch *et al.*, 1991).

4.2. Hormonas Hipofisiarias.

4.2.1. Hormona Folículo Estimulante (FSH).

Es sintetizada y liberada en la adenohipófisis por estimulación de la hormona liberadora de gonadotropinas hipotalámicas (GnRH) (Ruckebusch *et al.*, 1991). En la hembra es la responsable de estimular el desarrollo de los folículos en los ovarios (Allen, 1992; Ruckebusch *et al.*, 1991). No han sido bien

determinadas las concentraciones circulantes en la perra (Allen, 1992). La síntesis y liberación de Hormona Folículo Estimulante (FSH), está bajo la influencia de altas concentraciones sostenidas de estradiol. Por el contrario una elevación de progesterona aumenta la producción de GnRH, estimula la producción de FSH (Ruckebusch *et al.*, 1991). En el macho es responsable de la estimulación de algunos de los procesos en la espermatogénesis (Allen, 1992; Ruckebusch *et al.*, 1991).

4.2.2. Hormona Luteinizante (LH).

Es producida en la adenohipófisis por estimulación de la hormona liberadora de gonadotropinas hipotalámicas (GnRH) (Ruckebusch *et al.*, 1991). En la hembra es liberada en forma de pulsaciones cortas y la frecuencia de éstas pulsaciones aumenta 1 ó 2 semanas antes de comenzar el proestro. Las concentraciones circulantes aumentan hasta alcanzar un máximo 48 horas antes de que ocurra la ovulación, por eso se le conoce como hormona ovulatoria (Allen, 1992; Ruckebusch *et al.*, 1991). Su función es estimular la maduración, luteinización y ovulación de los folículos ováricos (Allen, 1992), y mantiene la luteinización folicular en la hembra que ovula (Ruckebusch *et al.*, 1991), por lo cual se considera luteotrófica (mantiene el funcionamiento de los cuerpos luteos) (Allen, 1992).

En el macho es la responsable de la estimulación de las células intersticiales (células de Leydig) en el testículo para producir testosterona y dihidrotestosterona, y por lo tanto se le conoce como hormona estimulante de las células intersticiales (ICSH) (Allen, 1992; Ruckebusch *et al.*, 1991).

Al inicio de la pubertad, los niveles altos de Hormona Luteinizante inducen a los testículos para producir testosterona, que llevará a la maduración de los espermatozoides (Davol, 2001).

4.2.3. Prolactina.

Producida y liberada por la adenohipófisis. Actúa sobre la glándula mamaria para estimular la producción de leche. Sus concentraciones en sangre suelen aumentar de acuerdo a la disminución de las concentraciones de progesterona, aunque en algunos casos la progesterona puede estimular la liberación de prolactina. La prolactina también es considerada luteotrófica (mantiene el funcionamiento del cuerpo lúteo) (Allen, 1992).

4.3. Hormonas foliculares.

4.3.1. Estrógenos.

Hormonas esteroideas producidas en la perra por folículos en crecimiento. Los principales son 17α -estradiol, 17β -estradiol y estrona, algunos de los cuales pueden ser conjugados. Las concentraciones circulantes aumentan poco días antes del inicio del proestro, posteriormente se produce un aumento brusco de sus concentraciones en sangre, alcanzando su máximo 48 horas antes de la oleada de LH (Allen, 1992).

Los estrógenos determinan cambios que tienen lugar en el proestro, como pueden ser: (Allen, 1992)

- a) Flujo vaginal
- b) Engrosamiento de la mucosa vaginal
- c) Cambio en la consistencia de la mucosidad cervical
- d) Tumefacción de la vulva
- e) Producción de feromonas

4.3.2. Progesterona.

Es una hormona esteroide producida por folículos maduros y por el cuerpo lúteo. Las concentraciones circulares aumentan cuando los estrógenos alcanzan su máximo, al final del proestro. La hormona es producida por las células de la granulosa en vías de luteinización en los folículos intactos (Allen, 1992).

Los valores en el plasma aumentan de forma constante a un promedio de 2 a 3 ng./ml. y se incrementan en el momento de la ovulación a más de 5 ng./ml. (5 a 8 ng./ml.), las concentraciones máximas se alcanzan unos 20 días después de finalizado el estro, se encuentre la perra en gestación o no. Posteriormente se produce un descenso gradual hasta sus valores mínimos, que son alcanzados 60 a 70 días después de la ovulación (Allen, 1992 Davol, 2000 Hutchison, 2001).

4.3.3. Prostaglandinas.

En la perra la producción espontánea de prostaglandina por el útero no es responsable de la lisis de los cuerpos lúteos, tal como sucede en otras especies. Los cuerpos lúteos en la perra dejan de ser funcionales de forma gradual debido a la ausencia de un apoyo trófico (LH y/o prolactina) o porque tienen un ciclo vital limitado (Allen, 1992), de 63 días en las hembras preñadas y de 100 días en las hembras no gestantes (Esquivel, 2002)

4.3.4. Andrógenos.

Son producidos por células en los testículos que forman pequeños islotes entre los túbulos seminíferos; estas son las células intersticiales o células de Leydig (Allen, 1992).

La conversión de testosterona a dihidrotestosterona inducirá el desarrollo de la glándula próstata, la uretra masculina, el pene, y el escroto (Allen, 1992; Davol, 2001). Después, los testículos descienden al escroto y completan el desarrollo del sistema reproductor masculino (Davol, 2001). Los efectos adicionales de la testosterona incluirán la inducción de otras características físicas del género así como los rasgos de conducta, incluyendo la conducta de apareamiento y marcando de territorio con orina (Allen, 1992; Davol, 2001). En los perros adultos las concentraciones de testosterona en plasma varían entre 0,5 y 5,0 ng./ml. En perros castrados, los valores son inferiores a 200 pg./ml. (Allen, 1992).

Se desconocen las funciones de éstas hormonas en la perra, pero se sabe que sus concentraciones circulantes alcanzan un máximo al mismo tiempo que la oleada de LH (Allen, 1992).

4.3.5. Inhibina.

Esta es una hormona producida en los testículos por las células de Sertoli que inhibe la liberación de FSH (Allen, 1992; Davol, 2000; Ruckebusch *et al.*, 1991). No se ha demostrado su existencia en el perro (Allen, 1992)

V. FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN.

5.1. Fisiología de la Reproducción del Macho.

El testículo es el órgano de apoyo para el sistema reproductor masculino; sin embargo hay que recordar que todas las funciones testiculares se encuentran influenciadas por el sistema neuroendocrino (Cunningham, 1999).

5.1.1. Espermatogénesis.

Constituye un proceso complejo mediante el cual se producen los espermatozoides (células germinativas masculinas) en los tubos seminíferos de los testículos (Allen, 1992; Cunningham, 1999; Davol, 2001). Las células llamadas *espermátogonias*, que son las precursoras de los espermatozoides, se dividen de forma normal (mitosis) para dar origen a muchos *espermátocitos*. Los espermátocitos se dividen posteriormente mediante meiosis, por lo que el número normal de cromosomas queda reducido a la mitad (39) en las células resultantes que son llamadas espermátidas y se describen como *haploides* (con la mitad del número normal de cromosomas; las células con 78 cromosomas son llamadas *diploides*; en este número se incluyen los dos cromosomas sexuales). Las espermátidas se transforman en espermatozoides mediante un complejo reagrupamiento de los organelos; básicamente el núcleo pasa a formar la cabeza del espermatozoide, el aparato de Golgi forma el acrosoma, y las mitocondrias y centríolos intervienen en el desarrollo de la cola. La mayor parte del citoplasma

queda en las *células de Sertoli* que aparecen sobre la membrana basal de los tubos seminíferos que regulan la metamorfosis de espermátida a espermatozoide (Allen, 1992; Cunningham, 1999).

La espermatogénesis comienza a los 4 meses de edad aunque los espermatozoides no aparecen en el eyaculado hasta los 10-12 meses (Allen, 1992). En el macho reproductor, la producción de semen es directamente proporcional al tamaño testicular. El semen se guarda en los compartimientos extragonadales del epidídimo y el conducto deferente (Cunningham, 1999; Davol, 2001). La cantidad de semen reservada dependerá de la frecuencia e intervalos entre eyaculaciones. Subsecuentemente la eyaculación frecuente puede causar una reducción en el rendimiento del semen, ya que las reservas de semen se vacían según informes recibidos practicando una eyaculación por día, durante 5 a 7 días. Por consiguiente, una vez que se vacían reservas, el número de espermatozoides total sólo será representado por la producción diaria de semen por los testículos. Por ésta razón la recolección de semen se realiza cada dos días, para permitir que vuelva a tener reservas de espermatozoides (Daval, 2001).

Existen pocas pruebas a favor de que el eyaculado de un perro que realiza cubriciones de forma infrecuente contendrá un número elevado de espermatozoides anormales (Allen, 1992). Por el contrario, los machos con alta demanda pueden experimentar fertilidad menos óptima en ciertos momentos a lo largo de sus años reproductores. La calidad del semen, por consiguiente, es afectada a menudo por factores como la edad, el grado de excitación, frecuencia de eyaculación, técnica de la colección y manejo de la muestra (Daval, 2001).

El ciclo de la espermatogénesis, es decir, desde la división del espermatogonio hasta la aparición del espermatozoide en el eyaculado, tarda 8 semanas; durante 2 de éstas semanas los espermatozoides maduran en el epidídimo (Allen, 1992).

5.1.2. Control de la temperatura.

La espermatogénesis no puede producirse con la temperatura normal del organismo en la mayoría de los mamíferos. Los mecanismos que mantienen los testículos del perro más fríos que el resto del organismo según Allen (1992), Cunningham (1999) y Davol (2001) son:

- ✓ Los testículos se alojan fuera de la cavidad corporal en el saco escrotal.
- ✓ El músculo cremáster puede influir sobre la distancia que media entre el cuerpo y el testículo.
- ✓ El músculo dartos en la pared escrotal puede influir sobre el tamaño del escroto y, en consecuencia, sobre la posición de los testículos.
- ✓ La disposición de los vasos sanguíneos en el cordón espermático permite la refrigeración de la sangre arterial mediante el retomo sanguíneo en el plexo pampiniforme.

5.1.3. Transporte del semen.

Los espermatozoides llegan inmaduros a la cabeza del epidídimo; presentan una gota de citoplasma residual en el cuello. Las células maduran durante su paso a lo largo del epidídimo que se debe posiblemente a la producción constante de más semen en el testículo. Al entrar en el conducto deferente la gota (perla) se mueve hacia el extremo distal de la pieza media o es expulsada del espermatozoide, que ahora se considera maduro (Allen, 1992). Una vez maduros, los espermatozoides emigran de los testículos al epidídimo donde se almacenan. Un extremo del epidídimo se adelgaza en el conducto deferente, el tubo a través del cual el espermatozoide maduro pasa para dejar el escroto (Daval, 2001).

5.1.4. Erección.

La erección es un acontecimiento psicosomático en el que intervienen los sistemas vascular, neurológico y endocrino (Cunningham, 1999). Consiste en la tumescencia del pene como resultado de una acumulación de sangre en sus tejidos provocada por la constricción del retorno venoso (Allen, 1992; Cunningham, 1999). Los factores que estimulan la erección en la mayoría de los animales son el olor de una hembra en celo (estro) y la asociación entre rutina y coito, las vías mediante las que tales estímulos inician la erección son probablemente nerviosos, aunque no se conocen completamente (Allen, 1992).

Lo primero que aparece es un engrosamiento del bulbo del glande. Entonces el collar del glande se engruesa parcialmente. Este engrosamiento se propaga a todos los espacios cavernosos. Cuando el pene está completamente erecto, el epitelio está muy tenso y las venas superficiales son prominentes (Sisson *et al.*, 1993).

En los perros solamente se produce una ligera erección antes del coito; la penetración se ve favorecida por la rigidez del hueso peniano y la erección total se produce una vez que el pene ha sido introducido en la vagina de la perra (Allen, 1992), el bulbo del glande se alarga tanto que no puede ser retirado de la vagina (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993); por tanto, el macho y la hembra quedan enlazados juntos durante 5 ó hasta 60 minutos (Sisson *et al.*, 1993). Sólo después de disminuir la erección puede separarse el macho de la hembra (Allen, 1992). La erección disminuye porque después de la eyaculación se produce un aumento en el tono del músculo liso mediado por el nervio simpático a nivel sacro, aumentando la salida de sangre de los espacios cavernosos, además de producir una contracción del músculo retractor del pene que retira el pene hacia el interior del prepucio (Cunningham, 1999), en el perro la detumescencia del bulbo, ocurre antes que en la corona y en el collar del pene (Sisson *et al.*, 1993).

5.1.5. Eyaculación.

Las contracciones del músculo uretral impulsan los fluidos procedentes de los conductos deferentes y de la próstata hacia la uretra (Allen, 1992), es decir durante la eyaculación, el espermatozoide se arrastrará del epidídimo a través del conducto deferente y se combinará con líquido seminal, secretado por la glándula de la próstata, en la uretra de la próstata antes de expelerse (Davol, 2001).

El perro eyaculará el semen en tres fragmentos (Allen, 1992; Davol, 2001).

- *Primera fracción:*

La primera fracción del eyaculado es la fracción preespermática que es un volumen pequeño de fluido claro (Davol, 2001) que se elimina durante la excitación sexual inicial. Su volumen es variable aunque generalmente es de unos 0,5 ml. Puede ser eyaculada mientras el perro está empujando al intentar introducir su pene en la vagina de la perra, o puede ser expulsada tras la penetración. Procede de la próstata y su función puede ser la de lavar la vagina de restos de orina (Allen, 1992).

- *Segunda fracción*

La segunda fracción es eyaculada generalmente después de la penetración, cuando el macho deja de empujar (Allen, 1992), sin embargo hay quien afirma que durante la eyaculación de este segundo fragmento, el perro empujará vigorosamente (Davol, 2001). Esta porción del eyaculado es rica en espermatozoides y su volumen suele ser de 0,5 a 1 ml. (Allen, 1992; Davol, 2001). Procede de los conductos deferentes y es depositada en la mitad anterior de la vagina al completarse la erección del pene (Allen, 1992). Durante y poco después de la eyaculación de esta fracción, el perro desea instintivamente girar, e incluso intentará caminar encima del brazo de la persona que realiza la recolección si se está realizando la recolección de semen por medio de una vagina artificial (Allen, 1992; Davol, 2001).

- *Tercera fracción:*

La tercera fracción procede de la próstata, suele ser expulsada mientras los perros permanecen en pie, grupa con grupa y unidos (Allen, 1992; Davol, 2001). Su volumen puede ser de 15 a 20 ml. en razas grandes y depende probablemente del tiempo que permanecen unidos. La función de la tercera fracción del eyaculado consiste probablemente en arrastrar a la segunda fracción, rica en espermatozoides, desde la vagina craneal hacia el útero de la perra (Allen, 1992), sin embargo, no siempre es favorable el efecto de la tercera fracción sobre los espermatozoides ya que se trata de fluido prostático (Daval, 2001). Al final de la eyaculación se produce la desinflamación del pene y su retirada de la vagina (Allen, 1992).

VI. 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 ultraestructurales 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 “súperrefrigeran”. 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 compartimento presenta una composición y organización característica, lo que origina propiedades físicas y funciones distintas (Holt, 1984). Así, cada compartimento 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 mitocondrioflagelar (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 (Homfo y Berg, 1989). En consecuencia, la motilidad y la integridad acrosómica disminuyen de modo significativo, tras la congelación y la descongelación.

6.1 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 apenas un 20-30% se mantienen biológicamente íntegros. Esto es indicativo de que la motilidad y la estructura del espermatozoide se afectan en distinto grado, desconociéndose si las alteraciones

se producen simultáneamente o en distintas fases del proceso descongelación y descongelación (Salamon y Maxwell, 1995).

6.1.1. 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 nobicapa 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 reorganización 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).

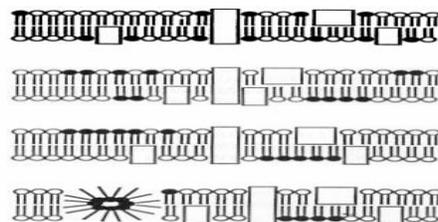


Figura 2.1. Estructura de la membrana celular del espermatozoide y de las alteraciones inducidas por el choque térmico (Tomado de Serres, 2003).

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 Membrana original Refrigerada a 4°C Recalentada a 37°C Membrana alterada a 37°C alteraciones tan marcadas (Quinn y White, 1966). Además en los espermatozoides de toro y cerdo se ha detectado acumulación de 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, 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 inhibitor 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 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.

6.1.2. Alteraciones morfofuncionales derivadas de la refrigeración y la congelación.

6.1.2.1 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 (Jonesy Stewart, 1979). La actividad respiratoria del espermatozoide disminuye, así como laglucolisis, 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 Ca^{2+} , ya aludido (Green y Watson, 2001). Además, el aumento de 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).

6.1.2.2 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).

El espermatozoide de morueco parece presentar más edema que pérdida de material acrosomal, por lo que las lesiones parecen estar restringidas sobre todo 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 descongelación 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-A2 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 antioxidantes 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.

6.1.2.3. 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

6.1.2.4. Implicaciones en la funcionalidad espermática.

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

6.2. Protocolos de refrigeración y congelación.

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

6.2.1. 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 procesamiento 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 en la morfología y la motilidad de los espermatozoides y éstas, a su vez, influyen en 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 TRISFructosa- 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 mas difícil (Linde-Forsberg, 2002). También es unánimemente reconocido que la utilización de las pajuelas permite un mejor control de la descongelación.

6.2.1.2. Situación actual de los procesos de refrigeración y congelación para el semen canino.

En las distintas especies domesticas, 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 (Dobrinski 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 intrauterina 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 intrauterina 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

denacimientos 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, 2003).

6.2.1.3 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.

6.2.1.3.1 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 Ca^{2+} en el espermatozoide de toro y morueco. Durante el tiempo en que se desarrolló esta 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).

6.2.1.4. 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 nocongelación, 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 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 cómo 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 anisoosmóticas 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 isoosmóticas, 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 hipoosmótico 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 postdescongelaciónes 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).

6.2.1.5. 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.

6.2.1.6. Etilenglicol.

El etilenglicol (EG) es un polialcohol (C₂H₆O₂) 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 postdescongelación (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 domésticas (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).

6.2.1.6. 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 (Anchoroguy 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 intracelular. 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 ejerció 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.

6.2.1.7. Adición de Equex®.

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 (Sánchez-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).

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 postdescongelación (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 Ca²⁺ 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 más 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, sobretodo, 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).

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 (Casalón, 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 (Casalón, 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 (OH^-) (Aruoma y col., 1988; Fellman y Roth, 1985; Pasantes-Morales y Fellman, 1989), y el $ClOH^-$ (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 OH^- 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 antioxidante 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 inmuno-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 cardíaca, 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 intracelular 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 intracelular 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, aparte 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 H₂O₂ 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 Ca²⁺-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 (Rudolph y Crowe, 1985; Anchooguy 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 (Anchooguy y col., 1987).

6.2.1.8. 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, 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.

6.3. 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 precongelaación, en el rango de 0,5 a 75 minutos, no tuvo efecto alguno en la viabilidad postdescongelaación. 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-descongelaación 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 congelaación 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 congelaación y han utilizado valores arbitrarios (England, 1993). La escasa investigación llevada a cabo sobre el periodo de equilibrio en la congelaación 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 precongelaación. Sin embargo, los mejores resultados de motilidad posdescongelaación 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 homologa 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 rápidas 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.

6.4. 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 a 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/1min o 70°C/8sg,

constataron que el porcentaje más 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 mas 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.

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).

VII. Evaluación de la calidad espermática.

7.1. 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.

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).

7.1.1 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.

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 laboratorios, 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 laboratorios 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).

7.1.2. 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 espermiograma 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).

a. Características del eyaculado de perros fértiles*

Parámetro	
Motilidad (%)	89,5±7,6

Volumen (mL)	1,2±0,7
Concentración (×10 ⁶ /mL)	299,6±127,9
Número total de esp. en un eyaculado (×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 posdescongelación, como fue observado por Nöthling y col. (1997), con excepción de la persistencia de las gotas citoplasmáticas, que se correlacionaron negativamente con la motilidad posdescongelación.

7.2 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 de los espermatozoides necesarios 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 hemizona. Es, además, una técnica lenta y muy exigente en recursos y pericia (Harrison, 1998).

7.3 Pruebas clásicas de evaluación seminal.

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

7.3.1. 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).

7.3.2. Estimación subjetiva.

La estimación visual del porcentaje de espermatozoides móviles es el examen laboratorio, 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).

7.3.3. Análisis computarizado (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 computarizados (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 computarizados 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).

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).

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).

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

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

computarizado 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 computarizada de motilidad espermática, que en el semen de toro es de 10-12 millones/mL (Amann, 1989). Para el sistema computarizado 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, evitarla 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 computarizadas 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 computarizada 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+} intracelular 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 sub poblaciones 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 pos 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 swim-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 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 precongelación 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).

7.4. Prueba de termo resistencia

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.

7.4.1. 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.

7.4.2. 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 extragonadales (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 (Kustritz 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 sufre 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).

Clasificación morfológica del espermatozoide canino

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

(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).

7.4.3. 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 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® (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 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 empiece. 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 postmortem.

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

7.4.4. 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® 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).

7.4.5. 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).

7.5. Pruebas complementarias de evaluación seminal.

7.5.1. 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 más 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).

7.5.2. Evaluación de la viabilidad.

Una combinación utilizada para la determinación de la viabilidad celular es el CFDAPI (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).

7.5.3. 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 eficacia 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 espermatozoidezona (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).

7.5.4. 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®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®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).

7.5.5. 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 carboxidimetil- 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'Connel 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.

7.6. 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 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 decapitación del espermatozoide, ya utilizada en otras especies como el cerdo (Wang y col., 1995; Johnson 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).

7.6.1. 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.

7.6.2. 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-Holsty col., 2000; Peña y col., 2004), así como el ensayo de hemizona, 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.

7.6.3. Pruebas de inducción de la reacción acrosómica.

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 dilauroilfosfatidil- 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 CO₂, 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).

VIII. Conclusión.

La utilización de diluyentes que permitan conservar el semen canino refrigerado logrando altos porcentajes de espermatozoides vivos con motilidad progresiva e integridad acrosómica durante 2 a 5 días, hará posible el traslado de semen a diferentes puntos de nuestro país e incluso a países limítrofes o cercanos. Esto evitará el traslado de animales para la realización de servicio natural, disminuyendo los costos y esfuerzo que esto implica. Es importante destacar que el proceso de refrigeración de semen canino es de bajo costo y fácil realización, pudiendo implementarse con mínimo equipamiento y moderado entrenamiento del operador. Por otro lado, el semen refrigerado puede utilizarse realizando IA intravaginal, técnica poco costosa y de baja complejidad. La implementación de técnicas de refrigeración de semen e inseminación artificial con semen refrigerado en nuestro país permitirá a los Médicos Veterinarios de práctica privada brindar un nuevo servicio, aumentar sus ingresos y mejorar su práctica diaria. Procesos adecuados de criopreservación determinarán un porcentaje reducido de células con membrana espermática dañada y una mayor sobrevivencia de los espermatozoides en el tracto genital femenino. La conservación de la integridad estructural y de la fisiología espermática forma parte de los factores que permiten altos porcentajes de preñez y un mayor tamaño de camada. Con el desarrollo de la criopreservación de semen junto con la determinación exacta del momento de mayor fertilidad de la hembra y una adecuada técnica de IA, esta biotecnología brindará grandes posibilidades en el futuro. Por otra parte la congelación de semen canino aplicando metodologías que permitan obtener porcentajes aceptables de espermatozoides viables al descongelado hará posible introducir esta biotecnología en nuestro medio. Si bien el proceso de congelación de semen canino requiere un moderado costo, equipamiento, infraestructura y entrenamiento del operador, su utilización mediante IA puede ser aplicada en la práctica reproductiva diaria.

LITERATURA CITADA

1. 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.
2. AALSETH, E.P.; SAACKE, R.G. (1986) - Vital staining and acrosomal evaluation of bovine sperm. *Gamete Research* 15: 73-81.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. ALVAREZ-SANTOS, C. (2001) - Curso del SPSSWIN, versión 10.0, Alvarez-Santos (Ed.), Servicio Informático de Somosaguas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
 15. AMANN, R.P. (1989) - Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately *J Androl* 10: 89-98.
 16. 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.
 17. AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. (1993) - In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl* 14: 397-406
 18. AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. (1987) - Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7: 145-176.
 19. 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.
 20. ANDERSEN, K. (1972) - Fertility of frozen dog semen. *Acta Vet Scand* 13: 128-130.

21. ANDERSEN, K. (1975) - Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchthygiene* 10: 1-4.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. AUGER, J.; LEONCE, S.; JOUANNET, P.; RONOT, X. (1993) - Flow cytometric sorting of living, highly motile human spermatozoa based on evaluation of their mitochondrial activity. *J Histo Cyto* 41: 1247-1251.
27. AUGER, J.; RONOT, X.; DADOUNE, J.P. (1989)- Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. *J Androl* 10: 439-448.
28. 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.
29. BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. (2000) - Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* 21: 1-7.
30. BAILEY, J.L. ; ROBERTSON, L.; BUHR, M.M. (1994) - Relationships among in vivo fertility, computer-analysed motility and in vitro Ca²⁺ flux in bovine spermatozoa. *Can J Anim Sci* 74: 53-58.

31. 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 potencial. *J Androl* 22: 1061-1069.
32. BARNA, J.; ASHIZAWA, K.; BOLDIZSÁR, H.; INOUE, M. (1998) - Effects of taurine on the motility and intracellular free Ca²⁺ concentration of fowl spermatozoa in vitro. *J Reprod Fertil* 114: 225-229.
33. BARTLETT, D.J. (1962) - Studies on dog semen I. Morphological characteristics. *J Reprod Fertil* 3: 173-189.
34. 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 potencial, and membrane lipid peroxidation. *J Androl* 21: 895-902.
35. BEDFORD, J.M. (1970) - Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol Reprod Supplement* 2: 128-158.
36. 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.
37. 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.
38. BERGER, T. (1990) - Pisum sativum agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine sperm. *Therio* 33: 689-695.
39. 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.
40. BIELFELD, P.; JEYENDRAN, R.S.; HOLMGREN, W.J.; ZANEVELD, L.J.D (1990) - Effect og egg yolk medium on the acrosome reaction of human spermatozoa. *J Androl* 11: 260-269.

41. BLACKSHAW, A.W. (1954) - The prevention of temperature shock of bull and ram semen. *Aust Journ of Biol Sci* 7: 573-582.
42. BOATMAN, D.E ; BAVISTER, B.D.; CRUZ, E. (1990) - Addition of hypotaurine can reactivate immotile golden hamster spermatozoa. *J Androl* 11: 66-72.
43. 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.
44. BORG, K.; COLEBRANDER, B.; FAZELI A.; PARLEVLIE J.; MALMGREN, L. (1997) - Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology* 48: 531-536.
45. 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.
46. 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.
47. 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 plasm membrane, nucleus and mitochondria after freezing ram semen with ethylene glycol). *Ciência Rural* 29: 527-531
48. BROCHART, M.; COULOMB, J. (1952) - Recherches sur la dilution et la conservation du sperm de chien. *Bull Acad Vet de France* 25 : 59-62.
49. BROWN, R.M. (1992) - An update of artificial insemination with fresh, chilled, and frozen semen. *Problems in Vet Med* 4: 445-452.
50. 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.

51. 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.
52. 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.
53. CARPENTER, J.F.; CROWE, J.H. (1988) - The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology* 25: 244-255.
54. CARRASCOSA, R.E.; MARTINI, A.C.; PONZIO, M.F.; BUSSO, 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.
55. 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.
56. CASSLÉN, B.G. (1987) - Free amino acids in human uterine fluid-possible role of high taurine concentration. *J of Reproductive Medicine* 32: 181-184.
57. CAVALCANTI, M.C.O.; MOURA, C.S.; GUERRA, M.M.P.; SILVA, S.V. (2002) – Acção 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.
58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. CHRISTIANSEN (1984) - Reproduction in the dog and cat. Bailliere Tindall, 1984, pp100/115-123.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. CORMIER, N.; SIRARD, M.A.; BAILEY, J.L. (1997) - Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl* 18: 461-468.
69. 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.
70. 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.
71. CROSS, N.L.; MEIZEL, S. (1989)- Minireview-methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol Reprod* 41: 635-641.
72. 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.
73. 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.
74. CURRY, M.R. (2000) - Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction* 5: 46-52.
75. DARIN-BENNETT, A.; POULOS, A.; WHITE, I.G. (1974) - The phospholipids and phospholipidbound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa. *J Reprod Fert* 41: 471-474.
76. DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. (1977) - Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 14: 466-470.
77. DASGUPTA, S.; MILLS, C.L.; FRASER, L.R. (1993) - Ca²⁺-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J Reprod Fert* 99: 135-143.
78. DAVIS, R.O.; SIEMERS, R.J. (1995) - Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. *Reprod Fertil Dev* 7: 857-869.
79. 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.

80. 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.
81. 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.
82. DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.; WOELDERS, H. (1991) - The fix vital stain methods simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. *J Androl* 12: 112-118.
83. 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.
84. 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.
85. DEN DAAS, N. (1992) - Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim Reprod Sci* 28: 87- 94.
86. DOBRINSKI, 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.
87. 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.
88. 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.
89. 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

90. 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.
91. 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.
92. 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.
93. 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.
94. 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.
95. 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.
96. ENGLAND, G.C.W (1993) - Cryopreservation of dog semen: a review. *J Reprod Fert Suppl* 47: 243-255.
97. ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W.E. (1989) - Seminal characteristics and fertility in dogs. *Veterinary Record* 125, 399.
98. 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.
99. ENGLAND G.C.W.; PLUMMER J.M. (1993) - Hypoosmotic swelling of dog spermatozoa. *J Reprod Fert Suppl* 47: 261-270.
100. ENGLAND, G.C.W.; PONZIO, P. (1996) - Comparison of the quality of frozen-thawed and cooledrewarmed dog semen. *Theriogenology* 46: 165-171.

101. 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.
102. 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.
103. EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. (1980) - Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210: 1311-1133.
104. 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.
105. 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.
106. 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.
107. 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.
108. 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.
109. FARSTAD, W. (1984) - Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. *J Small Anim Pract* 25: 561-565.

110. FARSTAD, W. (1996) - Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim Reprod Sci* 42: 251-260.
111. FARSTAD, W. (1998a) - Semen preservation for short- and long term preservation of canine semen. Proceedings of the 1st EVSSAR Congress, Barcelona, Spain, 1998. pp.207-212.
112. 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.
113. 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.
114. 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.
115. 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.
116. 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.
117. 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.
118. FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W. (1989) - The effect of glycerol-related osmotic changes on postthaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 26: 64-69.
119. 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.
120. FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W.; PANICH, P.L. (1996) - Glycerol equilibration time revisited. *Reprod Dom Anim* 31: 141-146.
121. 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.
122. FONTBONNE, A.; BADINAND, F. (1993) - Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. *J Reprod Fertil Suppl* 47:531-532.
123. 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.
124. 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.
125. 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.
126. 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.
127. 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.
128. 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.

129. 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.
130. 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.
131. 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.
132. GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A. (1995) - Viability assessment of mammalian sperm using SYBR- 14 and Propidium Iodide. *Biol Reprod* 53: 276-284.
133. 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.
134. 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.
135. 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.
136. 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.
137. GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; JOERG, H.W.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. (1997) - Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 57: 1401-1406.
138. 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.
139. 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.
140. 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.
141. GRAHAM, J.K. (2001) - Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci* 68: 239-247.
142. 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.
143. 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.
144. GRAHAM, J.K.; FOOTE, R.H. (1987) - Effects of several lipids, fatty acid chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* 24: 42-52.
145. 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.
146. 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.
147. 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.

148. GREEN, C.E.; WATSON, P.F. (2001) - Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 122: 889-898.
149. 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.
150. 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.
151. 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.
152. 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.
153. 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.
154. HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K. (1992) - Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 29: 26-38.
155. 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.
156. 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.
157. 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 6th MAFF International Workshop on Genetic Resources, Nov 4-5, 1998, Tsukuba, Japan, pp135-154.
158. 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 3rd 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.
159. 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 of motility and the surface of mammalian spermatozoa in a simple medium. *J Reprod Fert* 52: 65-73.
160. HARRISON, R.A.P; VICKERS, S.E. (1990)- Use of fluorescent probes to assess membranne integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fert* 88: 343-352.
161. HARROP, A.E. (1954) - Artificial insemination of a bitch with preserved semen. *Brit Vet J* 110 : 424-425.
162. 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.
163. 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.
164. HE, L.; BAILEY, J.L.; BUHR, M.M. (2001) Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potencial. *Biol Reprod* 64: 69-79.
165. 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.

166. HEINZ, K.A.; GLOFCHESKI, D.J.; LEPOCK, J.R.; KRUVU, J. (1990) - Mechanism of freeze-thaw damage to liver alcohol dehydrogenase and protection by cryoprotectants and amino acids. *Cryobiology* 27: 521-538.
167. HELENIUS, A.; McCASLIN, D.R.; FRIES, E.; TANFORD, C. (1979) - Properties of detergents. *Methods in Enzymology* 56: 734-749.
168. HELENIUS, A.; SIMONS, K. (1975) - Solubilization of membrane by detergents. *Biochimica et Biophysica Acta* 415: 29-79.
169. 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.
170. 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.
171. 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.
172. 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.
173. 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.
174. 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.
175. 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.

176. HOLT, W.V. (1984) - Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoon. *International Review of Cytology* 87: 159-194.
177. 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 3rd Int Conf on Boar Semen Preservation, Mariensee, Germany, Aug 1995*, *Repro Dom Anim* 31:17-24.
178. 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.
179. HURET, J.L. (1986) - Nuclear chromatin decondensation of human sperm: a review. *Arch Androl* 16: 97-109.
180. HUXTABLE, R.J. (1992) - Physiological actions of taurine. *Physiological Reviews* 72: 101-163.
181. 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.
182. IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.P. (2001b) - Evaluation of the "Hamilton Thorn Computer- Based Automated System" for dog semen analysis. *Therio* 55: 733-749.
183. IJAZ, A.; DUCHARME, A. (1995) - Effects of various extenders and taurine on survival of stallion sperm colled to 5°C. *Theriogenology* 44:1039-1050.
184. IRVINE, D.S. (1995) - Computer assisted semen analysis systems: sperm motility assessment. *Human Reproduction* 10: 53-59.
185. IVANOVA, M.; MOLLOVA, M. (1993) - Zona-penetration in vitro test for evaluating boar sperm fertility. *Therio* 40: 397-410.
186. 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.

187. JACOBSEN, J.G.; SMITH, L.H. (1968) - Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiological Reviews* 48: 424-511.
188. 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.
189. 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.
190. 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.
191. 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.
192. 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.
193. 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.
194. 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.
195. 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.

196. 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.
197. 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.
198. 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 Fertil* 56: 233-238.
199. 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.
200. 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.
201. 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.
202. 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.
203. KAWAKAMI, E.; HORI, T.; TSUTSUI, T. (1998) - Induction of dog sperm capacitation by oviductal fluid. *J Vet Med Sci* 60: 197-202.
204. 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.
205. 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.
206. 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.
207. 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.
208. 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.
209. KOCHAKIAN, C.D. (1975) - Free amino acids of sex organs in the mouse: regulation by androgens. *Am J Physiol* 228: 1231-1235.
210. 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.
211. 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.
212. KRUVV, J.; GLOFCHESKI, D.J. (1990) - Survival of mammalian cells following multiple freezethaw cycles. *Cryo-Letters* 11: 215-226.
213. KRUVV, J.; GLOFCHESKI, D.J. (1992) - Positive effects of amino acids against freeze-thaw damage in mammalian cells. *Cryobiology* 29: 291-295.
214. KRUVV, J.; GLOFCHESKI, D.J.; LEPOCK, J.R. (1988) - Protective effect of L-glutamine against freeze-thaw damage in mammalian cells. *Cryobiology* 25: 121-130.
215. 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.

216. KURIYAMA, K. (1980) - Taurine as a neuromodulator. Federation Proceedings 39: 2680-2684.
217. 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.
218. LALONDE, R.J.; LEPOCK, J.R.; KRUVU, 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.
219. 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.
220. 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.
221. LINDE-FORSBERG, C. (1995) - Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozenthawed semen in the dog. Semin Vet Med Surg (S Anim) 10: 48-58.
222. 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.
223. 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.
224. LINDE-FORSBERG, C.; FORSBERG, M. (1993) - Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. J Reprod Fert Suppl 47: 313-323.
225. 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.

226. 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.
227. 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.
228. 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.
229. 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.
230. MALMGREN, L. (1997) - Assessing the quality of raw semen: a review. *Therio* 48: 523-530.
231. 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.
232. 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.
233. 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.
234. 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.

235. MASSIP, A. (2001) - Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod Dom Anim* 36: 49-55
236. MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. (1997) - Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Therio* 48: 209-219.
237. 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.
238. 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.
239. MAYENCO-AGUIRRE, A.M.; GÓMEZ-CUÉTARA, C. (1996) - Viability of canine sperm frozen with two levels of glycerol. 3rd International Symposium on Reproduction of Dogs, Cats and Exotic Carnivores. Veldoven. The Netherlands.
240. 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.
241. MAZUR, P. (1970) - Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* 168: 939-949.
242. MAZUR, P. (1984) - Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247: 125-142.
243. 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.
244. 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 3rd Int Conf on Boar Semen*

- Preservation, Mariensee, Germany, Aug 1995, *Reprod Dom Anim* 31: 281-282.
245. 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.
246. 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.
247. 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.
248. 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.
249. MIXNER, J.P.; SAROFF, J. (1954) - Interference by glycerol with differential staining of bull spermatozoa. *J Dairy Sci* 37: 652.
250. 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.
251. 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.
252. MORALES, P.; OVERSTREET, J.W.; KATZ, D.F. (1988) - Changes in human sperm motion during capacitation in vitro. *J Reprod Fert* 83: 119-128.
253. MORRELL, J.M. (1991) - Applications of flow cytometry to artificial insemination: a review. *Veterinary Record* 129: 375-378.

254. 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.
255. 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.
256. MRSNY, R.J. ; MEIZEL, S. (1985) - Inhibition of hamster sperm Na⁺, K⁺-ATPase activity by taurine and hypotaurine. *Life Sciences* 36: 271-275.
257. 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.
258. 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.
259. 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.
260. 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.
261. 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.
262. 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.
263. NÖTHLING, J.O.; GERSTENBERG, C.; VOLKMANN, D.H. (1993) - Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. *J Reprod Fertil Suppl* 51: 109-116.

264. 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.
265. 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.
266. OETTLÉ, E.E. (1986a) - Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Anim Reprod Sci* 12: 145-150.
267. OETTLÉ, E.E. (1986b) - Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology. *Veterinary Medicine* 81: 263-266.
268. OETTLÉ, E.E. (1993) - Sperm morphology and fertility in the dog. *J Reprod Fert Suppl* 47: 257- 260.
269. OETTLÉ, E.E.; SOLEY, J.T. (1988) - Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopic study. *Vet Med Rev* 59: 28-70.
270. OLAR, T.T. (1984) - Cryopreservation of dog spermatozoa. Ph Thesis, Colorado State University, Fort Collins, Colorado.
271. 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.
272. 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.
273. 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.
274. 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.

275. OZASA, H.; GOULD, K.G. (1982) - Protective effect of taurine from osmotic stress on chimpanzee spermatozoa. *Archives Andrology* 9: 121-126.
276. PACE, M.M.; GRAHAM, E.F. (1974) - Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci* 39: 1144-1149.
277. 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.
278. 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.
279. PARKS, J.E. & GRAHAM, J.K.(1992) - Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Therio* 38: 209-222.
280. 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.
281. PATRAT, C.; SERRES, C; JOUANNET, P. (2000) - The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of the cell*. 92:255-266.
282. 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.
283. PEÑA, A.I.; BARRIO, F.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. (1998a) - Proline and Glycylbetaine in a Diluent for Freezing Canine Spermatozoa. *Reprod Dom Anim* 33, 5-9.
284. 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.

285. 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.
286. 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.
287. 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.
288. 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.
289. PEÑA, A.I.; LOPEZ-LUGILDE, L.; BARRIO, M.; BECERRA, J.J.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P. (2003b) - Studies on the intracellular Ca²⁺ 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.
290. 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 Ca²⁺ concentration of dog spermatozoa. *Therio* 59: 1725-1739.
291. PEÑA, A.I.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. (1998d) - Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. *Therio* 50: 1211-1220.
292. 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.
293. PENFOLD, L.M.; MOORE, H.D.M. (1993) - A new method for cryopreservation of mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil* 99: 131-134.

294. 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 frozenthawed bovine and caprine spermatozoa. *Therio* 54: 185-192.
295. 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.
296. 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.
297. PHILLIPS, P.H.; LARDY, H.A. (1940) - A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J Dairy Science* 23: 399-404.
298. 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.
299. PINTO, C.R.F.; PACCAMONTI, D.L.; EILTS, B.E. (1999) - Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology* 52: 609-616.
300. POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. (1949) - Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666.
301. 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.
302. PONGLOWHAPAN, S. (2003) - Influence of glucose and fructose in the extender on long-term storage of chilled canine semen. Report n°32, International Master of Science Programme, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden.
303. 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.

304. 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.
305. 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.
306. QUINN, P.J. (1989) - Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions. *J of Bioenergetics and Biomembranes* 21: 3-19.
307. 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.
308. 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.
309. 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.
310. 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.
311. 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.
312. 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.
313. 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.
314. 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.
315. RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; COSTA, S.H.F.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R.R.; LUCCI, C.M.; BÁO, S.N.; OHASHI, O.M.; FIGUEIREDO, J.R. (2004) Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Therio* 61: 1009-1024.
316. 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.
317. RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (1998)- Optimization of sperm quality in AI bulls. *Reprod Dom Anim* 33: 233-237.
318. 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.
319. RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. (1997) - Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reprod Fertil Dev* 9: 297-308.
320. RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; ZHANG, B.R.; SÖDERQUIST, L. (1996) Assessment of bull sperm fertilizing ability. *Reprod Dom Anim* 31: 515-517.
321. 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 Fertil Suppl* 57: 377-381.
322. 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.
323. 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.
324. 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.
325. 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.
326. 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.
327. RUDOLPH, A.S.; CROWE, J.H. (1985) - Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology* 22: 367-377.
328. SAACKE, R.G. (1983) - Semen quality in relation to semen preservation. *J Dairy Sci* 66: 2635-2644.
329. SAACKE, R.G.; MARSHALL, C.E. (1968) - Observations on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil* 16: 511-514.
330. 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.
331. 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.

332. 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.
333. 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.
334. SÁNCHEZ-PARTIDA, L.G.; WINDSOR, D.P.; EPPLESTON, J.; SETCHELL, B.P.; MAXWELL,
335. 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.
336. 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 sémen). *Rev Bras Reprod Anim* 25: 472-473.
337. SEAGER, S.W.J. (1969) - Successful pregnancies utilizing frozen dos semen. *AI Digest* 17: 6/16.
338. SEAGER, S.J.; FLETCHER, W.S. (1972) - Collection, storage, and insemination of canine semen. *Laboratory Animal Science* 22: 177-182.
339. SEAGER, S.J.; FLETCHER, W.S. (1973) - Progress on the use of frozen semen in the dog. *Vet Rec* 92: 6-10.
340. 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.
341. SERRES, C. (2003) - Evaluación y conservación del semen en el asno zamorano-leonés. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España.
342. SHAFFER, S.; TAKAHASHI, K.; AZUMA, J. (2000) - Role of osmorregulation in the actions of taurine. *Amino Acids* 19: 527-546.

343. SHANNON, P; CURSON, B. (1972) - Toxic effect and action of dead sperm on diluted bovine sperm. *J Dairy Science* 55: 614-620.
344. 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.
345. 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.
346. 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.
347. 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.
348. 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.
349. 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.
350. 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.
351. 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.
352. 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.

353. SIRIVAIDYAPONG, 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.
354. 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.
355. SMITH, F.O. (1986) - Update on freezing canine semen. In Kirk, R. W. (Ed). *Current Veterinary Therapy*. WB Saunders Company, Philadelphia, pp1243-1248.
356. 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.
357. 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). *Ciencia Rural* 32: 649-655.
358. 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.
359. 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.
360. STEWARD, G.R.; LEE, J.A. (1974) - The role of proline accumulation in halophytes. *Planta(Berl.)* 120: 279-289.
361. 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.
362. 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.
363. STROM-HOLST, B.; ROTA, A.; ANDERSEN-BERG, K.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZMARTINEZ, H. (1998) - Canine sperm head damage after freezin-thawing: ultrastructural evaluation and content of selected elements. *Reprod Dom Anim* 33: 77-82.
364. STRÖM-HOLST, B.; ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C. (1997) - In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to the methods of cryopreservation. *Therio* 48: 247-256
365. 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.
366. 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.
367. 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.
368. SZÁSZ, F.; SIRIVAIYAPONG, 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.
369. SZTEIN, J.M.; NOBLE, K.; FARLEY, J.S.; MOBRAATEN, L.E. (2001) - Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryoprsevation. *Cryobiology* 41: 28-39.
370. 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.

371. 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.
372. 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.
373. 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.
374. 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.
375. 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.
376. 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.
377. 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.
378. 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.
379. 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.
380. 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.
381. 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.
382. 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.
383. 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.
384. 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.
385. VAN DER HORST, C.J.G.; GROOTEN, H.J.G. (1966) - The occurrence of hypotaurine and other sulfur-containing aminoacids in seminal plasma and spermatozoa of boar, bull and dog. *Biochimica Et Biophysica Acta* 117: 495-497.
386. 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.
387. 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.
388. 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 fertilising ability of bull sperm. *Anim Reprod Sci* 29: 185-194.
389. VOSS, J.L.; PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L. (1981) - Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. *JAVMA* 178: 287-289.
390. 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.
391. 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.
392. WATSON, P.F. (1975a) - The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with a fluorescent probe. *J Reprod Fert* 42: 105-111.
393. WATSON, P.F. (1975b) - Use of Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet Rec* 97: 12-15.
394. 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.
395. 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.
396. 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.
397. 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.
398. WATSON, P.F. (1996) - Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod Dom Anim* 31: 135-140.

399. WATSON, P.F. (2000) - The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61: 481-492.
400. 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.
401. 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.
402. 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.
403. 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.
404. 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.
405. 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.
406. 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.
407. WINDSOR, D.P. (1997)- Mitochondrial function and ram sperm fertility. *Reprod Fertil Dev* 9: 279-284.
408. 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.

409. 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.
410. 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 (2003) 'normativa de la RSCE para la congelación de semen canino'. www.microopticsl.com 'Manual de Uso del SCA® 2002'. Help On-Line. www.wisc.edu/ansci_repro. Lectures. Reproductive physiology. Lecture 16. Fertilization: acrosome reaction.
411. YANAGIMACHI, R. (1975) - Acceleration of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa by detergents and other reagents. *Biol Reprod* 13: 519-526.
412. 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.
413. 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.
414. 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.
415. 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.