

EFFECTO DEL PLASMA SEMINAL EN LA CONSERVACIÓN DE SEMEN EN ESPECIES DE USO ZOOTÉCNICO

Effect of seminal plasma in the conservation of semen in zootechnical species

María I. Carretero^{1,3}, Fernanda G. Fumuso^{1,3}, María S. Giuliano²

Universidad de Buenos Aires,
Facultad de Ciencias
Veterinarias, Instituto de
Investigación y Tecnología en
Reproducción Animal,

1 Cátedra de Teriogenología

2 Cátedra de Física
Biológica.

3 Consejo Nacional de
Investigaciones Científicas y
Técnicas (CONICET).

E-mail:

ignaciacarretero@fvvet.uba.ar

RESUMEN

El plasma seminal (PS) actúa como un medio de transporte para los espermatozoides a través del tracto reproductivo de la hembra y del macho, regula la osmolaridad del eyaculado a través de los componentes inorgánicos, es fuente de energía para los espermatozoides, brinda protección buffer contra los cambios de pH, protege a los espermatozoides de los efectos deletéreos de las especies reactivas del oxígeno a través de sus enzimas antioxidantes y regula la respuesta inmune del tracto reproductivo de la hembra. Las proteínas del PS han sido asociadas a eventos relacionados con la fertilización como la maduración espermática, la capacitación espermática, la interacción con el oviducto e incluso están implicadas en la interacción con el ovocito. En muchas especies, el PS es rutinariamente diluido o removido durante el proceso de criopreservación de semen; esto puede tener efectos positivos y/o negativos sobre la función espermática y la fertilidad. También el PS ha sido agregado luego del proceso de criopreservación. Los efectos que el PS tiene sobre el espermatozoide criopreservado varían entre especies, entre individuos de una misma especie y entre eyaculados de un mismo individuo. A pesar de un notable avance en el conocimiento de las funciones del PS, todavía existen controversias acerca del preciso rol del PS en la función espermática, en la fertilidad del macho y en el efecto que ejerce éste sobre los espermatozoides criopreservados.

Palabras clave: plasma seminal, espermatozoide, fertilidad, macho

ABSTRACT

Seminal plasma (PS) acts as a transport medium for sperm through the reproductive tract of the female and male, regulates the osmolarity of the ejaculate through the inorganic components, is a source of energy for sperm, provides buffer protection against pH changes, protects sperm from the deleterious effects of reactive oxygen species through their antioxidant enzymes and regulates the female reproductive tract's immune response. PS proteins have been associated with fertilization events such as sperm maturation, sperm capacitation, interaction with the oviduct and are even involved in the interaction with the oocyte. In many species, PS is routinely diluted or removed during the semen cryopreservation process; this can have positive and/or negative effects on sperm function and fertility. The PS has also been added after the cryopreservation process. The effects that PS has on cryopreserved spermatozoa vary between species, between individuals of the same species and between ejaculates of the same individual. Despite a notable advance in the knowledge of the functions of PS, there is still controversy about the precise role of SP in sperm function, male fertility and its effect on cryopreserved spermatozoa.

Keywords: seminal plasma, spermatozoa, fertility, male

INTRODUCTION

El semen puede ser dividido en dos partes, un componente celular, los espermatozoides y una parte fluida, el plasma seminal. Maxwell *et al.* (2007) definió al PS como una secreción compleja compuesta por iones inorgánicos, azúcares, sales orgánicas, lípidos, enzimas, prostaglandinas, proteínas y varios factores producidos por los testículos, epidídimos y glándulas accesorias del macho. De estos componentes, las proteínas han sido muy estudiadas (de Graff *et al.*, 2014) y se han dividido en tres familias: las adhesinas espermáticas (spermadhesins), las proteínas con fibronectina dominios tipos-2 (BSPs: Binder of Sperm Proteins, inicialmente denominadas Bull Seminal Plasma Proteins) y las proteínas secretorias ricas en cisteína (CRISPs: Cysteine Rich Secretory Proteins).

La mayor parte de las proteínas del PS son derivadas de las glándulas sexuales accesorias (de Graff *et al.*, 2014) y su concentración varía entre las especies e incluso entre individuos de una misma especie. Por ejemplo, el carnero presenta altas concentraciones de BSP y adhesinas (de Graff *et al.*, 2014). La llama, alpaca y camello presentan altas concentraciones de un factor inductor de la ovulación (FIO) identificado como un factor de crecimiento nervioso beta (Adams *et al.*, 2005; de Graff *et al.*, 2014). Además, pequeñas cantidades de este factor han sido identificadas en el toro, carnero y el padrillo equino (de Graff *et al.*, 2014). Queda por determinar si esta proteína tiene efectos similares en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal en las especies ovuladoras inducidas y las ovuladoras espontáneas. Otro ejemplo es la proteína mucina 5b, muy abundante en el PS de la alpaca y vinculada a la alta viscosidad y filancia del semen de esta especie (Kershaw-Young y Maxwell 2012).

El PS actúa como un medio de transporte para los espermatozoides a través del tracto reproductivo de la hembra y del macho, regula la osmolaridad del eyaculado a través de los componentes inorgánicos, es fuente de energía por los azúcares que contiene, brinda protección buffer contra los cambios de pH, protege a los espermatozoides de los efectos deletéreos de las especies reactivas del oxígeno a través de las enzimas antioxidantes, regula la respuesta inmune del tracto reproductivo de la hembra (de Graff *et al.*, 2014; Troedsson *et al.*, 2005). Las proteínas del PS han sido asociadas a eventos relacionados con la fertilización, como la maduración espermática (Dacheux y Paquignon 1980; Dacheux *et al.*, 1998), la capacitación espermática (Chang, 1957; Triphan *et al.*, 2007), la interacción con el oviducto mediante la formación de reservorios espermáticos (Gwathmey *et al.*, 2006; Apichela *et al.*, 2014) e incluso están implicadas en la interacción con el ovocito (Töpfer-Petersen *et al.*, 1998). Sin embargo, a pesar de este notable avance en el conocimiento de las funciones del PS, todavía existen controversias acerca del preciso rol del PS en la función espermática y en la fertilidad del macho e incluso los reportes son contradictorios y pueden variar entre especies, estación de colecta del eyaculado y el individuo (Leahy y de Graaf, 2012).

Actualmente, muchos de los trabajos realizados en biotecnologías reproductivas de los machos están enfocados al efecto del PS en los protocolos de refrigeración y congelamiento profundo. Sin embargo, todavía existen muchos interrogantes y es posible que lo que funciona correctamente en una especie o en un individuo no funcione en otra/o. En un protocolo de criopreservación los espermatozoides y el PS se exponen a un diluyente con el objetivo de minimizar los daños que sufren las células cuando

son expuestas a bajas temperaturas. Sin embargo, al diluir el eyaculado se diluye el efecto del PS y se desconoce si esa dilución afecta la funcionalidad del mismo. Por otra parte, los espermatozoides permanecen un periodo relativamente corto con el PS y el interrogante, cuando se congelan muestras de semen, es si hay que dejar o no el PS; si hay que congelarlo con un cierto porcentaje de PS o si hay que agregarlo luego de descongelar las muestras. Por otra parte, la composición del PS varía entre individuos de una misma especie y esta diferente composición podría generar que un individuo congele o refrigere semen mejor que otro.

Este manuscrito presenta algunos de los estudios que evalúan el efecto del PS sobre espermatozoides criopreservados en especies de interés zootécnico.

REVISIÓN DEL TEMA

En el padrillo equino se observó que la incubación de las muestras a 22 °C con PS en diferentes porcentajes (0, 5, 10, 20, 40 y 80%) durante 15 minutos previo al congelamiento no afectó la movilidad ni viabilidad espermáticas (Moore *et al.*, 2005). Sin embargo, cuando incubaron las muestras a 5 y 20 °C durante mayor tiempo (2 a 6 horas) previo al congelamiento, las muestras con 5% de PS presentaron mayores porcentajes de movilidad progresiva y total al descongelamiento que las muestras con 20% de PS (Moore *et al.*, 2005). Aurich *et al.* (1996) observaron que el agregado de PS de un padrillo de alta movilidad a uno de baja movilidad previo al congelamiento de las muestras mejoraba la movilidad y viabilidad post-descongelado de los espermatozoides del padrillo con baja movilidad. Mientras que el procedimiento inverso empeoraba la calidad de la muestra del padrillo de alta movilidad al descongelado. Estos resultados indican que la composición individual del PS modifica la crío - supervivencia del semen equino (Aurich *et al.*, 1996). Respecto a la refrigeración de semen equino, la adición de 50% de PS a espermatozoides seleccionados por Androcoll ETM previo a la conservación mostró un efecto negativo sobre la movilidad que se exacerbó con la refrigeración, mientras que la adición de menores porcentajes de PS (1,5; 2,5 y 5%) previo a la conservación de espermatozoides seleccionados no afectó la movilidad ni la viabilidad (Morrel *et al.*, 2010). Además, estos autores compararon centrifugar (eliminación del PS) y no centrifugar las muestras previo a la refrigeración y observaron mayor viabilidad en las muestras no centrifugadas (refrigeradas en presencia de PS).

Estos resultados indican que si no se dispone de un método de selección de espermatozoides para mejorar las muestras previo a la refrigeración de semen equino, sería conveniente no centrifugar los eyaculados debido a que la viabilidad es mayor cuando no se elimina el PS. En otro trabajo, Brinsko *et al.* (2000) compararon dos grupos de padrillos, los que "refrigeran bien" (descenso de la movilidad \leq 30% luego de 24 h de refrigeración) y los que "refrigeran mal" (descenso de la movilidad \geq 40% luego de 24 h de refrigeración). Conjuntamente compararon dos metodologías de refrigeración: sin centrifugar las muestras (presencia de PS) y centrifugando las muestras y removiendo parcialmente el PS (10-12% de PS). En el grupo de padrillos que refrigeran mal se observó que cuando se centrifuga y remueve parcialmente el PS, la movilidad total es mayor que si no se centrifuga. Mientras que, en los buenos refrigeradores los mayores porcentajes de movilidad se observaron en las muestras no centrifugadas (presencia de PS). Estos resultados podrían sugerir que el PS podría tener un efecto diferente de acuerdo

al padrillo y en los padrillos que refrigeran mal ese efecto sería negativo. Esta respuesta variable entre individuos también la observaron Morrell *et al.* (2014) en espermatozoides refrigerados de padrillos con el agregado de 5% de PS (homólogo o heterólogo) previo a la conservación sobre la movilidad e integridad del ADN. En conclusión, en el equino, sería conveniente centrifugar las muestras y remover la mayor parte del PS o dejar un bajo porcentaje del mismo (5%) en un protocolo de congelamiento profundo. Con respecto a la refrigeración, en el protocolo habitual las muestras se diluyen sin remover el PS, sin embargo debería considerarse la remoción del PS de las muestras de los padrillos que refrigeran mal.

En rumiantes, se evaluó el efecto del PS sobre espermatozoides de eyaculado y de epidídimo comparando muestras control (criopreservadas en presencia de PS) y muestras lavadas (remoción del PS) a las que posteriormente se las resuspendió en PS o TALP previo a la conservación. Con respecto a las muestras provenientes de eyaculados, en el ovino el semen control (presencia de PS) presentó mayor movilidad tanto luego de la refrigeración como luego del congelamiento con respecto a las muestras lavadas. Además, en las muestras lavadas con adición de PS la movilidad fue mayor respecto a las muestras lavadas y resuspendidas en TALP. En el bovino, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de movilidad de las diferentes muestras. Con respecto a las muestras de epidídimo, en el ovino los espermatozoides de epidídimo congelados en presencia de PS tuvieron mayor movilidad que los espermatozoides de eyaculado y los de epidídimo congelados con TALP, presentando éstos últimos muy baja movilidad. En el bovino, los espermatozoides epididimarios congelados con PS presentaron mayor movilidad que los espermatozoides de eyaculado, sin embargo el TALP no tuvo un efecto negativo sobre los espermatozoides de epidídimo como se observó en el carnero (Graham, 1994). Este estudio muestra que la centrifugación de las muestras previo a la criopreservación de eyaculados de carnero no es recomendable debido a que la movilidad fue menor cuando se lavaron las muestras y se eliminó el PS. Sin embargo, la centrifugación no fue detrimental para los eyaculados de bovino.

En el ovino, se han realizado varios estudios que evalúan el efecto del PS colectado en diferentes estaciones sobre el congelamiento profundo, con la hipótesis de que la composición del PS crudo o de las proteínas del mismo varían según el momento del año en que se colecta la muestra por tratarse de una especie fotoperiódica negativa. Leahy *et al.* (2010) no observaron un efecto de la estación de colecta del PS ni de las proteínas sobre la movilidad total cuando la adición se realizó previo al congelamiento de las muestras. Sin embargo, observaron mayor viabilidad cuando se utilizó PS o proteínas del PS colectados de enero a septiembre. Además, cuando las muestras se diluyeron en presencia de proteínas del PS colectadas de enero a junio se observó un mayor porcentaje de espermatozoides vivos que cuando se utilizó PS crudo colectado en los mismos meses. En el mismo trabajo, compararon la adición de proteínas del PS directamente al espermatozoide o el agregado de las mismas al diluyente previo a la conservación. Ambos métodos de suplementación de las proteínas del PS mejoraron el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosomas intactos y el porcentaje de movilidad progresiva respecto al control, pero la suplementación directa de las proteínas a los espermatozoides previo al congelamiento fue más efectiva (Leahy *et al.*, 2010). Estos resultados indican que la suplementación de los espermatozoides de carnero con proteínas del PS antes del congelamiento mejora la

viabilidad al post descongelado, observando un mayor efecto protector cuando el PS es colectado en la estación reproductiva y cuando la suplementación de las proteínas es directa al espermatozoide. La menor protección observada cuando se agregan las proteínas al criodiluyente podría deberse a la unión de las mismas a la yema de huevo disminuyendo su disponibilidad para unirse a las membranas espermáticas (Leahy *et al.*, 2010). En otro trabajo se adicionó PS colectado en diferentes estaciones (otoño – invierno, primavera y verano) a muestras congeladas/descongeladas, es decir, la adición del mismo fue luego de descongelar las muestras (Domínguez *et al.*, 2008). Estos autores observaron que el PS de otoño e invierno mejoraron la movilidad de los espermatozoides de carnero criopreservados. Esto podría deberse a la mayor cantidad de proteínas y diferente composición del PS colectado en otoño (Domínguez *et al.*, 2008), reforzando la idea de que el PS es diferente de acuerdo a la estación del año.

También, en los ovinos, se han aislado las vesículas del PS que se obtienen por ultracentrifugación y se les atribuye un rol en la movilidad y capacitación espermáticas. Para evaluar el efecto de las mismas El-Hajj Ghaoui *et al.* (2007) incubaron semen congelado/descongelado de carnero con PS completo, con vesículas del PS y también utilizaron la fracción libre de vesículas. Estos autores observaron que la incubación de semen congelado/descongelado de carnero en PS autólogo completo o en la fracción libre de vesículas mejoró la movilidad e integridad de las membranas. Sin embargo, a pesar de que el PS mejoró las características seminales *in vitro*, esta mejora no se evidenció en las tasas de preñez. Contrariamente, Maxwell *et al.* (1999) reportaron que la adición de PS a espermatozoides descongelados de carneros mejoraba los porcentajes de preñez por inseminación artificial (IA) vía cervical, obteniendo resultados similares a la inseminación vía laparoscópica (66,7% para IA en útero vía laparoscopia; 60,0% para IA en cérvix con PS; 24,3% para IA en cérvix sin PS).

En conclusión, la especie bovina no presenta mayores inconvenientes con el semen congelado/descongelado alcanzando porcentajes de preñez muy aceptables. En el ovino, la IA con semen congelado/descongelado presenta sus inconvenientes cuando se utiliza la vía cervical. Por este motivo se han realizado varios estudios que evalúan el efecto del PS en la criopreservación. En esta especie no se recomienda la centrifugación previa al congelamiento de las muestras. Por otra parte, se observa un efecto positivo de la adición del PS (antes o después de la conservación) sobre las diferentes características seminales, sin embargo los resultados sobre las tasas de preñez son controversiales.

El PS de los camélidos sudamericanos (CSA) tiene características particulares que se tendrían que tener en cuenta para poder contar con protocolos de criopreservación de semen que permitan obtener tasas aceptables de preñez mediante IA (Giuliano *et al.*, 2010; Apichela *et al.*, 2014; Kershaw-Young *et al.*, 2013). Dos de las más importantes características que presenta el PS, son su capacidad de formar hilo cuando se lo pipetea y de presentar viscosidad estructural alta (Casaretto *et al.*, 2012). Con respecto al manejo del semen, estas características reológicas dificultan la separación de los espermatozoides del plasma, la dilución del eyaculado, la homogeneidad de las muestras, la separación en alícuotas y el envasado en pajuelas (Giuliano *et al.*, 2010). Diferentes enzimas (tripsina, colagenasa, fibrinolisisina, hialuronidasa, papaína) se han utilizado para disminuir la viscosidad del plasma seminal en CSA con resultados variables (Bravo *et al.*, 1999; 2000; Giuliano *et*

al., 2010; Kershaw-Young *et al.*, 2013). La incubación del semen de CSA con una solución de colagenasa en HEPES-TALP demostró ser la más eficaz para eliminar la filancia de las muestras, separar los espermatozoides del plasma seminal e inducir movilidad espermática progresiva y así conseguir la primera preñez a nivel mundial a partir de embriones obtenidos mediante fertilización in vitro (Trasorras *et al.*, 2014).

Kershaw-Young *et al.* (2013) determinaron que la incubación con papaína podría ser utilizada antes del proceso de criopreservación para facilitar el manejo del semen. Además, como se mencionó previamente, el PS de llama y alpaca contiene un factor inductor de la ovulación (FIO) que cuando se administra a hembras de forma IM logra una alta respuesta ovulatoria (Ratto *et al.*, 2005). Actualmente, se han realizado varios estudios en los CSA que evalúan el efecto del PS sobre espermatozoides de semen fresco o de epidídimo, sin embargo, hay pocos trabajos que evalúen el efecto del PS sobre la criopreservación de semen. Un trabajo realizado en alpacas reporta que una concentración final de 10% de PS conserva la movilidad espermática, la integridad acrosómica y la viabilidad de espermatozoides de epidídimo y de eyaculado de semen fresco de alpaca (Kershaw-Young y Maxwell, 2011). En nuestro laboratorio, muestras de semen fresco de llama fueron incubadas con colagenasa (con el objetivo de disminuir la filancia y remover el PS). Posteriormente a una alícuota se le adicionó HEPES-TALP (HT), a otra alícuota se le agregó PS y ambas se incubaron a 37 °C durante 3 horas. En todas las muestras incubadas con colagenasa observamos movilidad progresiva (MP). Esta movilidad desapareció inmediatamente luego de la adición de PS, mostrando solo movimientos oscilatorios. Por el contrario, las muestras incubadas en HT mantuvieron la MP e incluso presentaron mayor vigor. A las 3 horas de incubación las muestras incubadas con PS presentaron un descenso significativo de la movilidad total (MT), este descenso no se observó en las muestras incubadas con HT. Estos resultados nos indican que el PS tiene un efecto sobre el patrón de movilidad de los espermatozoides de semen fresco (Carretero *et al.*, 2015).

Con el objetivo de evaluar otras concentraciones de PS, realizamos un estudio similar utilizando las siguientes concentraciones: 0, 10, 50 y 100% de PS en HT (Carretero *et al.*, 2016a). Similar al experimento anterior las muestras con bajos porcentajes de PS (0 y 10%) presentaron mayores porcentajes de MP y mayor vigor. Las muestras incubadas con 100% de PS presentaron sólo MO mientras que las incubadas con 50% MO y MP. La MT de las muestras con 0, 10 y 50% de PS se conservó a lo largo de las 3 horas de incubación mientras que, similar al estudio previo, se observó un descenso significativo de la misma en las muestras con 100% PS. A las 3 h de incubación, las muestras que presentaron el mayor porcentaje de espermatozoides vivos con sus acrosomas intactos fueron las incubadas con 50% PS, aunque esta diferencia no fue significativa ($p > 0,05$); esto podría indicar que una concentración del 50% de PS estaría indicada en un protocolo de criopreservación. Mientras que, el mayor porcentaje de espermatozoides muertos con sus acrosomas intactos fue observado en las muestras con 100% de PS. Esta observación podría indicar que el PS estaría impidiendo o retrasando la reacción acrosomal (RA), sin embargo los espermatozoides no se mantienen viables. En todos los tiempos de incubación, las muestras con bajas concentraciones de PS (0 y 10%) tuvieron un mayor porcentaje de espermatozoides vivos con RA respecto de las muestras con altas concentraciones de PS. Estos resultados indicarían que la ausencia de PS o su presencia en bajo porcentaje en

presencia de HT, sería beneficioso para que los espermatozoides reaccionen, conserven su viabilidad y se puedan utilizar en un protocolo de fertilización in vitro (FIV). La obtención de embriones de llama por FIV, prescindiendo de la utilización de agentes capacitantes y utilizando espermatozoides de semen fresco en ausencia de PS refuerzan esta hipótesis (Conde *et al.*, 2008; Trasorras *et al.*, 2012; 2014).

En otro estudio, evaluamos el efecto del PS sobre espermatozoides de semen fresco diluidos en lactosa- yema de huevo (LY). Esto se realizó con el objetivo de determinar si el efecto del PS en HT era similar al que se observa cuando se diluye en LY. No se observaron diferencias ni en la movilidad ni en el porcentaje de espermatozoides vivos intactos entre las diferentes concentraciones de PS evaluadas (0, 10 y 50%). Estos resultados indicarían que el efecto del PS en LY sobre los espermatozoides de llama y específicamente sobre el acrosoma es diferente al efecto del PS en HT. Esto podría deberse a que la yema de huevo podría unirse a factores capacitantes y entonces impedir la RA que se observa cuando las muestras tienen bajos porcentajes de PS y se diluyen con HT.

Recientemente, evaluamos el efecto del PS y de una solución de colagenasa sobre espermatozoides refrigerados y congelados de llama (Carretero *et al.*, 2016b). Los protocolos de conservación de las muestras fueron en presencia de PS y colagenasa (protocolo A) y en ausencia de PS y colagenasa (protocolo B). Con respecto a la refrigeración, ambos protocolos preservaron la viabilidad y funcionalidad de membranas. El protocolo A (PS+) mostró menor movilidad y el protocolo B (PS-) mayor descondensación de la cromatina. Estos resultados muestran que la refrigeración de semen de llama utilizando el protocolo A resulta ser más sencilla para trabajar a campo, ya que no requiere centrifugar las muestras, sin embargo la evaluación in vivo de estos protocolos de refrigeración estaría indicada. Con respecto al congelamiento profundo, no se observaron diferencias significativas en ninguna de las variables estudiadas (movilidad, viabilidad y estado acrosomal) entre el protocolo A (PS+) y el B (PS-). Zea *et al.* (2015) tampoco observaron diferencias significativas en la movilidad, viabilidad y funcionalidad de membranas en espermatozoides de alpaca obtenidos por desviación de conducto deferente y criopreservados en presencia y ausencia de PS. De forma similar, Jiménez *et al.* (2016) no observaron diferencias significativas en la movilidad, viabilidad y potencial de membrana en espermatozoides de epidídimo de alpaca congelados con diferentes concentraciones de PS (0, 5, 10 y 15%). Aunque no se observó un efecto del PS sobre las características seminales evaluadas in vitro en espermatozoides criopreservados de CSA, deberían realizarse protocolos de IA para evaluar la fertilidad de las diferentes muestras.

CONCLUSION

Los efectos que el PS tiene sobre los espermatozoides criopreservados varían entre especies, entre individuos de una misma especie y entre eyaculados de un mismo individuo. A pesar de un notable avance en el conocimiento de las funciones del PS, todavía existen controversias acerca del preciso rol del PS en la función espermática, en la fertilidad del macho y en el efecto que ejerce éste sobre los espermatozoides criopreservados.

REFERENCIAS

- Adams GP, Ratto MH, Huanca W, Singh J. Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biology of Reproduction* 2005. 73: 452- 457.
- Apichela SA, Argañaraz ME, Giuliano SM, Zampin R, Carretero MI, Miragaya M, Miceli DC. Llama oviductal reservoirs: involvement of bulbourethral glands. *Andrologia* 2014. 46(3): 290-295.
- Aurich JE, Kühne A, Hoppe H, Aurich C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology* 1996. 46: 791-797.
- Bravo PW, Pacheco C, Quispe G, Vilcapaza L, Ordoñez C. Degelification of alpaca semen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome. *Archives of Andrology* 1999. 43: 239-246.
- Bravo PV, Callo P, Garnica J. The effect of enzymes on semen viscosity in Llamas and Alpacas. *Small Ruminant Research* 2000. 38: 91-95.
- Brinsko SP, Crockett EC, Squires EL. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology* 2000. 54(1): 129-136.
- Chang MC. A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature* 1957.179:258-259.
- Carretero M, Fumuso F, Miragaya M, Herrera C, Giuliano S. Effect of seminal plasma in *Lama glama* sperm. *Reproduction, Fertility and Development* 2015. 27(1): 223.
- Carretero MI, Fumuso F, Miragaya M, Neild D, Cetica P, Giuliano S. Efect of different concentrations of seminal plasma on sperm viability and acrosomal status in llama. 18th International Congress on Animal Reproduction (ICAR). June 26-30th 2016b. Tours, France.
- Carretero MI, Giuliano SM, Arraztoa CC, Santa Cruz RC, Fumuso FG, Neild DM. Comparison of two cooling protocols for llama semen: with and without collagenase and seminal plasma in the medium. *Andrologia*, 2016, doi:10.1111/and.12691.
- Casaretto C, Martínez Sarrasague M, Giuliano S, Rubin de Celis E, Gambarotta M, Carretero MI, Miragaya M. Evaluation of Lama glama semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer. *Andrologia*, 2012, 44: 335-341.
- Conde PA, Herrera C, Trasorras VL, Giuliano SM, Director A, Miragaya MH, Chaves MG, Sarchi MI, Stivale D, Quintans C, Agüero A, Rutter B, Pasqualini S. In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Animal Reproduction Science* 2008. 109(1-4):298-308.
- Dacheux JL, Paquignon M. Relations between the fertilizing ability, motility and maturation process in the boar. *Annals NY Academic Science* 1980. 438: 526-529.
- Dacheux JL, Druart X, Fouchecourt S, Syntin P, Gatti JL, Okamura N, Dacheux F. Role of epididymal secretory proteins in sperm maturation with particular reference to the boar. *Journal Reproduction Fertility* 1998. 53: 99-107.
- de Graaf S, Rickard J, Pini T, Maddison J, Druart X, Leahy T. Emerging Roles of Seminal Plasma in Sperm Function. 9th Biennial Conference of the Association for Applied Animal Andrology, Newcastle: Association for Applied Animal Andrology 2014. 93-101.
- Domínguez MP, Falcinelli A, Hozbor F, Sánchez E, Cesari A, Alberio RH. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology* 2008. 69: 564-573
- El-Hajj Ghaoui R, Thomson PC, Leahy T, Evans G, Maxwell WM. Autologous whole ram seminal plasma and its vesicle-free fraction improve motility characteristics and membrane status but not in vivo fertility of frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals* 2007. 42(5):541- 549.
- Giuliano SM, Carretero MI, Gambarotta MC, Neild DM, Trasorras VL, Pinto M, Miragaya MH. Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Animal Reproduction Science* 2010. 118 (1): 98-102.
- Graham JK. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology* 1994. 41: 1151-1162.
- Gwathmey TM, Ignatz GG, Mueller JL, Manjunath P, Suarez SS. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biology of Reproduction* 2006. 75: 501-507.
- Jiménez J, Román B, Zurita R, Ugarelli A, Santiani A, Evangelista S. The effect of seminal plasma concentrations on the oxidative damage in epididymal thawed alpaca spermatozoa. Preliminary assay. *Spermova* 2016. 6(1): 82.
- Kershaw-Young CM, Maxwell WMC. The effect of seminal plasma on alpaca sperm function. *Theriogenology* 2011. 76: 1197-1206.
- Kershaw-Young CM, Maxwell WMC. Seminal plasma components in Camelids and Comparisons with other species. *Reproduction in Domestic Animal* 2012. 47(4): 369-375.
- Kershaw-Young CM, Stuart C, Evans G, Maxwell, WMC. The effect of glycosaminoglycan enzymes and proteases on the viscosity of alpaca seminal plasma and sperm function. *Animal Reproduction Science* 2013. 138: 261-267.
- Leahy T, Marti JI, Evans G, Maxwell WM. Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen-thawed ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2010. 119: 147-153.
- Leahy T, de Graff SP. Seminal Plasma and its Effect on Ruminant Spermatozoa During Processing. *Reproduction in Domestic Animals* 2012. 47: 207-213.
- Maxwell WM, Evans G, Mortimer ST, Gillan L, Gellatly ES, McPhie CA. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reproduction, Fertility and Development* 1999.11(2): 123-126.
- Maxwell WMC, de Graff SP, El-Hajj Ghaoui R, Evans G. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Society of Reproduction and Fertility supplement* 2007. 64: 13-38.
- Moore AI, Squires EL, Graham JK. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology* 2005. 63: 2372-2381.
- Morrell JM, Rodríguez-Martínez H, Johannisson A. Single layer centrifugation of stallion spermatozoa improves sperm quality compared with sperm washing *Reproductive BioMedicine Online* 2010. 21: 429- 436.
- Morrell JM, Georgakakos A, Lundeheim N, Nash D, Davies Morel MC, Johannisson A. Effect of heterologous and homologous seminal plasma on stallion sperm quality. *Theriogenology* 2014. 82(1):176-183.

- Ratto MH, Huanca W, Singh J, Adams GP. Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2005. 3: 29-44.
- Tibary A, Vaughan J. Reproductive physiology and infertility in male South American Camelids: A review and clinical observations. *Small Ruminant Research* 2006. (61): 283-298.
- Trasorras V, Giuliano S, Chaves G, Neild D, Agüero A, Carretero M, Pinto M, Baca Castex C, Alonso A, Rodríguez D, Morrell J, Miragaya M. In vitro Embryo Production in Llamas (*Lama glama*) from In vivo Matured Oocytes with Raw Semen Processed with Androcoll-E using Defined Embryo Culture Media. *Reproduction in Domestic Animals* 2012. 47(4):562-567.
- Trasorras VL, Baca Castex C, Alonso A, Giuliano S, Santa Cruz R, Arraztoa C, Chaves G, Rodríguez D, Neild D, Miragaya M First llama (*Lama glama*) pregnancy obtained after in vitro fertilization and in vitro culture of gametes from live animals. *Animal Reproduction Science* 2014. 148(1-2): 83-89.
- Triphan J, Aumüller G, Brandenburger T, Wilhelm B. Localization and regulation of plasma membrane Ca(2+)-ATPase in bovine spermatozoa. *European Journal of Cell Biology* 2007. 86: 265-273.
- Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlesi-Hundrieser M, Dostalova Z, Sanz L, Calvete JJ. Spermadhesins: A new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* 1998. 30:217-224.
- Troedsson MHT, Desvousges A, Alghamdi AS, Dahms B, Dow CA, Hayna J, Valesco R, Collahan PT, Macpherson ML, Pozor M, Buhi WC. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science* 2005. 89: 171–186