

DETERMINACIÓN DE LA CONGELABILIDAD DE CARNEROS DE PELO (PELIBUEY-BLACKBELLY) DE ACUERDO CON LA VIABILIDAD Y CINÉTICA ESPERMÁTICA

Determination of the freezing of hair rams (Pelibuey-Blackbelly) according to sperm viability and kinetics

Julio Cesar Gómez Vargas¹ , Rosendo Cuicas Huerta¹ , Isidro Jáuregui Plata¹ , Isidro Gutiérrez Segura¹ ,
Raúl Ulloa Arvizu² , David Urban Duarte³ , Efrén Estrada Paqui^{*1} 

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Guerrero, Guerrero, México.

² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

³ Centro Nacional de Recursos Genéticos, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Jalisco, México.

* Corresponding author:
Carretera Altamirano – Iguala km. 3, Col. Querenditas, Ciudad Altamirano, Guerrero, CP. 40610, Mexico.

Efrén Estrada Paqui
e-mail: eeestrada@uagro.mx

Recibido: 26/06/2020

Aceptado: 20/07/2020

Publicado: 21/08/2020

ABSTRACT

The objective of this study was to categorize the freezing of sperm of 11 rams (Pelibuey-Blackbelly) aged 18 to 24 months based on total motility and sperm viability at thawing. The semen was diluted to 37 °C with Triladyt® and egg yolk, packed in 0.5 mL straws at a sperm concentration of 200x10⁶. After 15 minutes after defrosting at 37 °C, sperm motility and kinetics were evaluated by means of the CASA system, and fluorescence viability with kit FluoVit® (Microptic, S.L., Barcelona, Spain). The freezing categorization of ram ejaculates was 27.2% and 72.7% for rams with high freezing (CAC) (n= 3) and rams with low freezing (CBC) (n= 8) respectively. Ejaculates from CAC showed significant differences (p<0.05) in kinetic speed parameters (VCL, VSL and VAP), which suggests that these ejaculates are more suitable for cryopreservation and would have a greater chance of fertilizing due to their faster and more progressive movements.

Keywords: Ram, sperm cryopreservation, sperm.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue categorizar la congelabilidad de espermatozoides de 11 carneros (Pelibuey-Blackbelly) de 18 a 24 meses de edad en base a motilidad total y viabilidad espermática a la descongelación. El semen fue diluido a 37 °C con Triladyt® y yema de huevo, envasado en pajillas de 0.5 mL a una concentración espermática de 200x10⁶. A los 15 minutos luego de la descongelación a 37 °C, se evaluó la motilidad y cinética espermática por medio del sistema CASA, y la viabilidad por fluorescencia con kit FluoVit® (Microptic, S.L., Barcelona España). La categorización de la congelabilidad de los eyaculados de carnero fue de 27.2 y 72.7% para los carneros con alta congelabilidad (CAC) (n= 3) y carneros con baja congelabilidad (CBC) (n= 8) respectivamente. Los eyaculados provenientes de CAC mostraron diferencias significativas (p<0.05) en los parámetros cinéticos de velocidad (VCL, VSL y VAP), lo que sugiere que estos eyaculados son más aptos para la criopreservación y tendrían mayor posibilidad de fecundar por sus movimientos más rápidos y progresivos.

Palabras clave: Ovino, criopreservación espermática, espermatozoide.

INTRODUCCION

La criopreservación del semen es una biotecnología esencial para la reproducción asistida, permite la conservación del material genético por un período indefinido de tiempo (Essawe et al., 2018). Se han desarrollado y perfeccionado numerosas técnicas con el objetivo de lograr nacimientos mediante la aplicación de dosis seminales crioconservadas (Watson, 1979), obteniendo grandes avances en la congelación del semen de toro, mientras que otras especies, como el carnero, los resultados de fertilidad han sido inconsistentes (O'Meara et al., 2005; Barbas y Mascarenhas, 2009). Estas variaciones en los resultados pueden deberse a varios factores. Uno de ellos es el daño que sufren los espermatozoides debido al proceso de congelación-descongelación (Watson, 1995). Esta respuesta del espermatozoide del carnero al proceso de congelación-descongelación puede variar entre individuos dentro de la misma especie (Holt et al., 2005; Casas et al., 2009) e incluso entre fracciones procedentes del mismo eyaculado (Sieme et al., 2004).

El sistema CASA ofrece automatización, velocidad, objetividad y repetibilidad en las evaluaciones, lo que permite detallar mejor la calidad del semen analizado y, por lo tanto, proporciona información adicional sobre las características cinéticas de los espermatozoides, que se limitan a la observación convencional. Por lo tanto, Moses et al., (1995) informaron que estos parámetros proporcionan detalles que permitirían una mejor evaluación de la calidad del semen, mientras que Amann y Katz (2004), informan que se puede predecir el potencial de fertilidad del macho o seleccionar el mejor procedimiento de manejo del semen.

El objetivo del presente estudio fue categorizar la congelabilidad del semen de carneros de pelo (Pelibuey-Blackbelly) en función de la evaluación de la viabilidad y la cinética espermática posdescongelación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en la unidad de producción ovina y el laboratorio de reproducción animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 1 de la Universidad Autónoma de Guerrero, Guerrero, México. Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo de conformidad con las leyes mexicanas para el bienestar y la experimentación de los animales (Ley 491 de Bienestar Animal del Estado de Guerrero, México).

Colección y evaluación de semen. Se utilizaron 11 carneros de pelo (Pelibuey-Blackbelly) de entre 18 y 24 meses de edad, los cuales fueron alojados en corrales individuales de 12 m², alimentados con una dieta de sorgo, soya y pastoreo con forraje nativo. Los carneros fueron entrenados previamente para la colección seminal con la ayuda de un maniquí (Buitrago y Pérez, 2008). Se realizaron colecciones cada cuatro días hasta obtener 3 eyaculados por carnero utilizando vagina artificial a 42 °C (Palomo et al., 2017). Los parámetros seminales evaluados antes del proceso de crioconservación fueron volumen, motilidad total (MT), concentración y viabilidad espermática (VE). El volumen fue medido directamente en tubo graduado después de la colección seminal. La MT se evaluó bajo observación microscópica, con un microscopio óptico (Labomed® Lx 500) (40X) atemperado a 37 °C. La concentración espermática se calculó mediante

recuento en cámara de Neubaur (Marienfeld®) previa dilución del semen 1:400 en solución de formaldehído al 2.9%. La VE se estimó mediante tinción con eosina-nigrosina, contando 200 espermatozoides y el resultado fue expresado en porcentaje. Los eyaculados (tres por carnero) incluidos en el trabajo fueron los más altos, según los reportados para la especie (Aké et al., 2017). Los valores promedio \pm EE antes de la congelación de los eyaculados de los carneros para estas variables fueron: volumen: 1.03 ± 0.1 mL; motilidad total: $85 \pm 0.9\%$; concentración: $3,854 \pm 239.1 \times 10^6$ /ml; viabilidad espermática: $84 \pm 0.6\%$.

Criopreservación y descongelación. El semen fue diluido previamente 1:1 (v/v) en medio comercial (Trilady®) a 37 °C. Posteriormente se ajustó la concentración espermática a 200×10^6 espermatozoides, inmediatamente se envasó en pajuelas de 0.5 mL y selladas con alcohol polivinílico. Después se refrigeraron durante 120 minutos hasta alcanzar 5 °C, luego se expusieron a vapores de nitrógeno líquido (-196 °C) durante 10 min a 5 cm de altura y se almacenaron en termo criogénico. Después se descongelaron dos pajuelas de cada carnero en baño maría a 37 °C durante 30 segundos con base en el procedimiento descrito por Cebrián et al., (2010).

Evaluación de la cinética a la descongelación. Después de 15 min posdescongelación de las pajuelas se colocaron 10 μ L de semen en cámara Makler (Sefi-Medical Instruments Ltd., Biosigma Srl, Italia) atemperada a 37 °C donde se evaluó la MT (%), velocidad curvilínea (VCL, μ m/s), velocidad rectilínea (VSL, μ m/s), velocidad lineal (VAP, μ m/s), índice de linealidad (LIN, VSL/VCL \times 100, %), índice de rectitud (STR, VSL/VAP \times 100, %), amplitud media de desplazamiento lateral (ALH, μ m) y la frecuencia de batido de la cabeza (BCF, Hz) mediante software CASA (Sperm Class Analyzer - SCA 5 2010), provisto de un microscopio de contraste de fases (Nikon, Eclipse E200MV R) atemperando las muestras a 37 °C. Los ajustes del sistema fueron los siguientes: número de imágenes (25/s), óptica (Ph-), escala (Nikon 10X), área de partículas (>15 a 70 μ m²) espermatozoide lento (10-45 μ m/s), espermatozoide promedio (45-75 μ m/s), espermatozoide rápido (>75 μ m/s), progresivo (80%, STR) (Berlinguer et al., 2009; Tabarez et al., 2017).

Viabilidad espermática. Se analizó utilizando un kit FluoVit® (Microptic, S.L., Barcelona España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se mezclaron 10 μ L de semen con 1 μ L de trihidrocloruro de trihidrato de Hoechst atemperado a 37 °C. Cinco minutos más tarde, se añadió 1 μ L de yoduro de propidio túbio (37 °C) y la mezcla se incubó durante cinco minutos más. Después se colocaron 10 μ L de la muestra en cámara de Makler (Sefi-Medical Instruments Ltd., Biosigma Srl, Italia) atemperada a 37 °C y se visualizó a través de la unidad de emisión fluorescente (Nikon, Eclipse E200MV R) conectada al sistema CASA (Sperm Class Analyzer - SCA 5 2010) donde se clasificaron dos poblaciones de espermatozoides: vivos con membrana plasmática intacta (trihidrocloruro de trihidrato +/IP-) que se tiñeron de azul y espermatozoides muertos con membrana plasmática dañada (trihidrocloruro trihidrato -/IP+) que se tiñen de rojo. Se contaron 200 espermatozoides y el resultado se expresó como porcentaje de acuerdo con el procedimiento descrito por Abdel-Aziz et al., (2019).

Análisis estadístico. Después de la descongelación, se clasificó la congelabilidad seminal de acuerdo con el procedimiento descrito por Casas et al., (2009) realizando un análisis de agrupamiento jerárquico, que incluye un algoritmo de agrupamiento de enlace completo (vecino más alejado), el cual consiste en calcular las frecuencias de Chi-cuadrado a partir de la motilidad progresiva y la viabilidad espermática, formando dos grupos: carneros con alta congelabilidad (CAC) y carneros de mala congelabilidad (CBC) y como resultado se elaboró un dendrograma de disimilitud. Se realizó un análisis de varianza multivariado para los promedios de las variables (MT y VE) entre CAC y CBC. Los patrones cinéticos de motilidad espermática entre CAC y CBC fueron analizados con un modelo lineal generalizado (GLM), se utilizó SPSS ver. 19.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.) El nivel de significancia se estableció en $P < 0.05$.

RESULTADOS

Se determinaron dos grupos de congelabilidad de acuerdo con los resultados de MT y VE de los eyaculados, como se observa en la figura 1 (dendrograma de disimilitud) obteniendo 27.2 y 72.7% de carneros de alta congelabilidad y carneros de baja congelabilidad respectivamente. Los carneros de alta congelabilidad presentaron valores superiores al 55% de MT y 50% de VE, en tanto que el resto de los carneros mostraron valores inferiores al 46.8 y 46.0% respectivamente (figura 2). Al considerar los promedios de MT y VE por categoría de congelabilidad se observó que los CAC presentaron valores superiores ($p < 0.05$) a los CBC (Tabla 1).

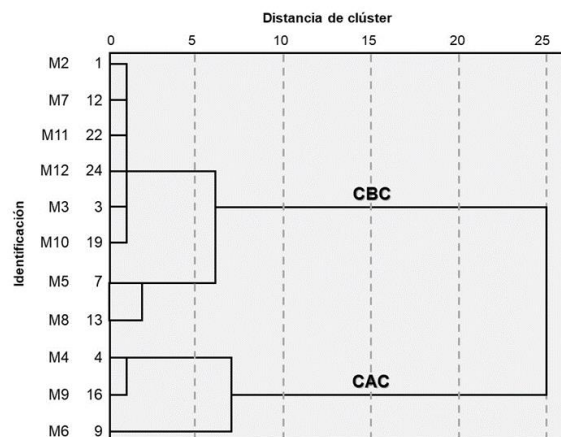


Figura 1. Dendrograma de congelabilidad de eyaculados de carneros Pelibuey-Blackbelly. Carneros con alta congelabilidad (CAC) y carneros de mala congelabilidad (CBC)

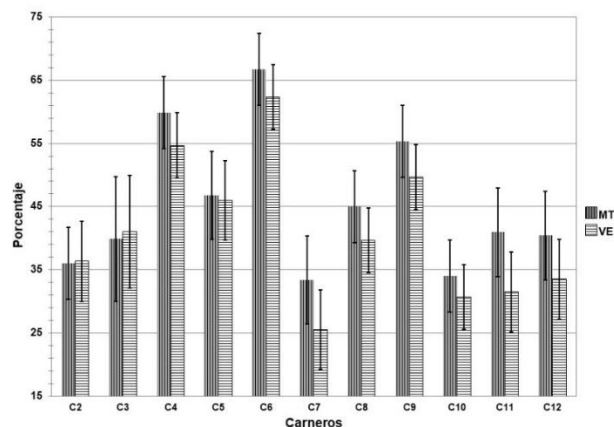


Figura 2. Variación porcentual de los valores de motilidad total (MT) y viabilidad espermática (VE) posdescongelación de carneros (Media \pm EE, $n=11$).

Tabla 1. Motilidad total y viabilidad espermática posdescongelación de acuerdo con la categoría de congelabilidad del semen de carnero.

Variable seminal	Categoría	Media (%)	EE	Intervalo de confianza (%)		P
				Inferior	Superior	
Motilidad total	CAC (n=3)	60.6 ^a	2.8	54.3	67.0	0.0001
	CBC (n=8)	39.9 ^b	1.7	36.0	43.8	
Viabilidad espermática	CAC (n=3)	53.3 ^a	3.1	46.3	60.3	0.0010
	CBC (n=8)	35.7 ^b	1.9	31.5	40.0	

CAC: carneros de alta congelabilidad; CBC: carneros de baja congelabilidad.

Los estimadores cinéticos de velocidad (VCL, VSL y VAP) de acuerdo con las categorías de congelabilidad presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre CAC y CBC (Tabla 2). Sin embargo, los parámetros cinéticos de angularidad y oscilación (LIN, STR, ALH y BCF) no mostraron diferencias significativas entre categorías ($P > 0.05$).

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio permitieron separar carneros en dos categorías: de alta y baja congelabilidad, según su evaluación seminal posdescongelamiento, determinándose un 27.2% de CAC y un 72.7% de CBC.

Tabla 2. Valores cinéticos de espermatozoides de carnero Pelibuey-Blacbelly descongelados según la categoría de congelabilidad.

Variable cinética	CAC (n=3,580)	CBC (n=4,813)
VCL ($\mu\text{m/s}$)	66.3 \pm 8.6 ^a	41.9 \pm 5.2 ^b
VSL ($\mu\text{m/s}$)	27.6 \pm 5.3 ^a	14.1 \pm 3.3 ^b
VAP ($\mu\text{m/s}$)	38.1 \pm 6.0 ^a	21.4 \pm 3.7 ^b
LIN (%)	40.0 \pm 6.8 ^a	31.3 \pm 4.1 ^a
STR (%)	70.2 \pm 8.0 ^a	61.1 \pm 4.9 ^a
WOB (%)	56.7 \pm 5.3 ^a	49.0 \pm 3.3 ^a
ALH (μm)	3.2 \pm 5 ^a	2.4 \pm 0.3 ^a
BCF (Hz)	19.6 \pm 1.7 ^a	18.1 \pm 1.3 ^a

Letras diferentes (superíndice) en filas indica diferencia estadísticamente ($P < 0.05$). CAC: carneros de alta congelabilidad; CBC: carneros de baja congelabilidad; VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad lineal; VAP: velocidad media; LIN: índice de linealidad; STR: índice de rectitud; WOB: índice de oscilación; ALH: amplitud media del desplazamiento lateral; BCF: frecuencia de batido de la cabeza.

Los CAC presentaron valores de MT y VE superiores al 55 y 45% respectivamente. En este sentido García (2014), encontró porcentajes de MT de 40.8 y 47.4% y VE de 28.9 y 40.5% en carneros de 1 y 2 años respectivamente. Así mismo Brito et al., (2004) observaron MT de 40.2 y 45.8% de VE en espermatozoides de carneros de pelo.

Los valores medios de MT y VE a la descongelación de espermatozoides de CAC superaron significativamente los valores medios de los CBC. Si bien existen pocos trabajos que hayan abordado estas diferencias en el potencial de congelabilidad entre carneros (García, 2014; Tabarez et al., 2017; Palomo et al., 2017), se ha reportado que existen variaciones individuales en la congelabilidad del semen, determinándose que las muestras espermáticas de CAC presentan valores superiores de viabilidad, integridad de membrana del acrosoma y parámetros cinéticos (García, 2014). En el mismo contexto Yeste et al., (2015) en equinos observaron diferencias significativas en la permeabilidad de la membrana plasmática, desorden lipídico de membrana y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a favor de los eyaculados de equinos buenos congeladores. También Casas et al., (2009) ha reportado en porcinos el potencial de congelabilidad, categorizando el 55.2 y 44.8% de verracos buenos y malos congeladores respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos por Yeste et al., (2013), quienes reportaron 54.3 y 45.7% eyaculados provenientes de verracos buenos y malos congeladores respectivamente.

Las diferencias individuales en la congelación del semen han sido informadas entre verracos (Holt et al., 2005; Casas et al., 2009; Druart et al., 2009), entre razas (Park y Yi, 2002; Waterhouse et al., 2006), e incluso entre fracciones provenientes del mismo eyaculado en verracos (Peña y Rodríguez, 2006). Así mismo, han sido documentadas estas diferencias en otras especies como el caballo (Amann y Pickett, 1987), el toro (Thomas et al., 1997) y otros animales no domésticos (Curry, 2000).

La explicación fisiológica de estas diferencias en la congelabilidad entre machos está basada principalmente en la

susceptibilidad del espermatozoide a los daños por el proceso de criopreservación entre animales de la misma especie. Esta condición se ha reportado y explicado de la mejor manera durante el proceso de crioconservación del semen de verraco, en donde no todos los eyaculados presentan la misma capacidad para resistir al proceso de congelación-descongelación (Medrano y Holt, 1998; Hernández et al., 2006; Leahy y Gadella, 2011). El fenómeno de diferenciación entre eyaculados buenos y malos congeladores parece iniciar en el momento de la eyaculación, puesto que Rath y Niemann (1997) observaron que las diferencias de congelabilidad entre verracos se da en muestras eyaculadas, pero no cuando los espermatozoides son colectados en la cola del epidídimo.

Las diferencias en la congelabilidad de los eyaculados afectan a su posterior capacidad fecundante, observando que los espermatozoides crioconservados provenientes de eyaculados buenos congeladores tienen una tasa de penetración en el ovocito in vitro superior que los verracos malos congeladores (Gil et al., 2005).

Por lo tanto, las diferencias entre eyaculados malos y buenos congeladores rebasan el ámbito estricto de la capacidad de resistencia a la congelación. De la misma manera se han llevado a cabo estudios con la finalidad de determinar qué factores hacen posible la distinción entre eyaculados buenos y malos congeladores, en este respecto, se ha sugerido que las diferencias pueden deberse a un defecto en la espermatogénesis o fallas en la maduración en el epidídimo, principalmente en verracos malos congeladores (Calvin y Bedford, 1971). Respecto a este último punto, se ha obtenido mejor calidad de semen y fertilidad in vivo al retirar el plasma seminal después de la colección de semen y su posterior agregarlo en un 10% al momento de la descongelación en muestras de malos congeladores (Okazaki et al., 2009). Esto permite postular que las modificaciones en los protocolos de congelación serán más o menos efectivas sobre la congelabilidad de los eyaculados en relación de si estos son buenos o malos congeladores. Sin embargo, en equinos, las diferencias individuales que existen en la habilidad de la resistencia a los protocolos de congelación-descongelación, han sido reportadas principalmente en la integridad de la membrana y MT.

Por otro lado, los estimadores cinéticos de velocidad (VCL, VSL y VAP) de acuerdo con el potencial de congelación, se observaron diferencias significativas entre CAC y CBC; sin embargo, los parámetros cinéticos de angularidad y oscilación (LIN, STR, ALH y BCF) no mostraron diferencias significativas entre categorías. Cabe destacar que la MT observada en el presente trabajo fue superior a la reportada por García (2014) quien obtuvo 48.4 \pm 2.6 y 27.6 \pm 3.0%, contrariamente los patrones de velocidad (VCL, VSL y VAP) fueron inferiores (101.2 \pm 2.0 $\mu\text{m/s}$; 40.3 \pm 3.8 $\mu\text{m/s}$; 59.8 \pm 4.0 $\mu\text{m/s}$) respectivamente. En este sentido existe poca información documentada basada en la congelabilidad de semen de carneros (Luna et al., 2017), mientras que Ledesma et al., (2017) mencionan que el incremento de los parámetros cinéticos de velocidad como VCL, VSL y VAP, indican que los espermatozoides tienen una gran velocidad y mejor oportunidad de fecundar el ovocito. Los valores reportados por Ledesma et al., (2017) en VCL: 124.9 \pm 45.2 $\mu\text{m/s}$; VSL: 100.1 \pm 42.9 $\mu\text{m/s}$; VAP: 110 \pm 41.1 $\mu\text{m/s}$ junto con los de linealidad (LIN) fueron descritos como espermatozoides

rápidos y lineales, estos valores son superiores en comparación con los observados en el presente estudio, sin embargo, fueron analizados a los 60 min a la descongelación y adicionando plasma seminal.

Es importante destacar que estos resultados de cinética espermática demuestran que los carneros de alta congelabilidad son más rápidos y progresivos y se sugiere realizar estudios complementarios (in vivo) para comparar la fertilidad mediante la inseminación artificial por laparoscopia.

CONCLUSIÓN

Las variables seminales de motilidad total y viabilidad espermática determinaron dos categorías de congelabilidad de semen en carneros de pelo (CAC y CBC). Los espermatozoides de CAC mostraron patrones superiores de velocidad (VSL, VCL y VAP) a los CBC. Futuros estudios permitirán estudiar la importancia de categorizar la congelabilidad en programas de mejora genética basados en la inseminación artificial en condiciones de trópico.

CONTRIBUCIÓN DE AUTORES

Preparación y ejecución: GVJC, EPE, JPI,
Desarrollo de la metodología: CHR, UDD, GSI
Redactar el artículo y revisión crítica: GVJC, EPE, UAR

CÓDIGO DE ÉTICA

Los autores declaran que el estudio presentado se ha llevado a cabo de acuerdo con el Código de Ética para los experimentos con animales, tal y como se refleja en la normativa:

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores firmantes del presente trabajo declaran no tener ningún conflicto de interés personal o económico con otras personas u organizaciones que puedan influir indebidamente con el presente manuscrito.

REFERENCIAS

- Abdel-Aziz SA, Saadeldin MI, Ba-Awadh H, Al-Mutary MG, Mouden AF, Alowaimer AN, Abdalla H. Efficiency of commercial egg yolk-free and egg yolk-supplemented tris-based extenders for dromedary camel semen cryopreservation. *Animals*. 2019; 9 (11): 1-15.
- Aké López J, Aké Villanueva N, Aké Villanueva J, Segura Correa J. Evaluación reproductiva del macho ovino. 1.ª ed. Editorial Académica Española; 2017: 33pp.
- Amann R, Pickett B. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of equine veterinary science*. 1987; (7):145-173. doi: 10.1016/S0737-0806(87)80025-4
- Amann RP, Katz DF. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*. 2004; 25 (3): 317-325. doi: 10.1002/j.1939-4640.2004.tb02793.x
- Barbas J, Mascarenhas R., Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*. 2009; 10: 49-62. doi: 10.1007/s10561-008-9081-4
- Berlinguer F, Madeddu M, Pasciu V, Succu S, Spezzigu A, Satta V, Naitana S. Semen molecular and cellular features: these parameters can reliably predict subsequent ART outcome in a goat model. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2009; 7: 125. doi: 10.1186/1477-7827-7-125
- Brito FI, Valencia MJ, Balcázar SA, Angulo MR, Mejía VO. Congelación de semen de carnero en pellets con los diluyentes Tris-glucosa-yema de huevo o Lactosa-yema de huevo. *Avances en investigación agropecuaria*. 2004; 8 (2).
- Buitrago JM, Pérez LM. Comparación de dos diluyentes para la criopreservación de semen ovino. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad la Salle, Bogotá. 2008.
- Calvin HI, Bedford JM. Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*. 1971; (13):65-75.
- Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Bonet S. Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Science Direct*. 2009; 72: 930-948. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.07.001
- Cebrían J, Muñio-Blanco T, Pérez-Pé R, Casao A. Manejo y conservación del semen. Manejo reproductivo en ganado ovino. Ed. Servet. Zaragoza, España. 2010; 127-135.
- Curry M. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*. 2000; 5:46-52.
- Druart X, Gatti JL, Huet S, Dacheux JL, Humblot P. Hypotonic resistance of boar spermatozoa: sperm subpopulations and relationship with epididymal maturation and fertility. *Reproduction*. 2009; 137(2):205-213
- Essawe EM, Wallgren M, Wulf M, Aurich C, Macías B, Sjunnesson Y, Morrell J. Seminal plasma influences the fertilizing potential of cryopreserved stallion sperm. *Theriogenology*. 2018; 115:99-107
- García WC. Optimización de los protocolos de críoconservación de semen ovino de las razas autóctonas en peligro de extinción Xisqueta y Aranasa. Doctor of Veterinary, Universidad Autónoma de Barcelona 2014.
- Gil MA, Roca J, Cremades T, Hernández M, Vázquez JM, Rodríguez-Martínez H, Martínez EA. Does multivariate analysis of post-thaw sperm characteristics accurately estimate in vitro fertility of boar individual ejaculates? *Theriogenology*. 2005; 64(2):305-316.
- Hernández M, Roca J, Ballester J, Vázquez JM, Martínez EA, Johannisson A, Rodríguez-Martínez E. Differences in SCSA outcome among boars with different sperm freezability. *International Journal of Andrology*. 2006; 29(6): 583-591
- Holt WV, Medrano A, Thurston LM, Watson PF. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology*. 2005; 63:370-382.

- Leahy T, Gadella BM. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction*. 2011; 142(6): 759-778
- Ledesma A, Zalazar L, Fernández-Alegre E, Hozbor F, Cesari A, Martínez-Pastor F. Seminal plasma proteins modify the distribution of sperm subpopulations in cryopreserved semen of rams with lesser fertility. *Animal Reproduction Science*. 2017; 184:44-50.
- Luna C, Yeste M, Rivera del Alamo M, Domingo J, Casao A, Rodríguez-Gil J, Muñio-Blanco T. Effect of seminal plasma proteins on the motile sperm subpopulations in ram ejaculates. *Reproduction, Fertility and Development*. 2017; 29: 394-405.
- Medrano A, Holt W. Variación individual en la susceptibilidad del semen porcino al congelado-descongelado. *Archivos de Zootecnia*. 1998; 47: 319-327.
- Moses DF, de las Heras MA, Valcárcel A, Pérez L, Baldassarre H. Use of computerized motility analyzer for the evaluation of frozen-thawed ram spermatozoa. *Andrologia*. 1995; 27: 25-29. Doi: 10.1111/j.1439-0272.1995.tb02091.x
- O'Meara, C., Hanrahan, J., Donovan, A., Fair, S., Rizos, D., Wade, M., Boland, M., Evans, A. and Lonergan, P. Relationship between in vitro fertilization of ewe oocytes and the fertility of ewes following cervical artificial insemination with frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*. 2005; 64: 1797-1808. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.04.009
- Okazaki T, Abe S, Yoshida S, Shimada M. Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. *Theriogenology*. 2009; 71: 491-498.
- Palomo MJ, García W, Tabarez A. Effect of seminal plasma and butylated hydroxytoluene (BHT) concentration on ram sperm freezability. *Small Ruminant Research*. 2017; 153: 66-70.
- Park CS, Yi YJ. Comparison of semen characteristics, sperm freezability and testosterone concentration between Duroc and Yorkshire boars during seasons. *Animal Reproduction Science*. 2002; 73:53-61.
- Peña FJ, Rodríguez H. Citometría de flujo: aplicaciones en el estudio del espermatozoide porcino. Gerona, España: Universidad de Gerona y Red temática nacional de reproducción porcina. 2006; 133-143pp.
- Rath D, Niemann H. In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology*. 1997; 47(4): 785-793.
- Sieme H, Katila T, Klug E. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology*. 2004; 61: 769-784.
- Tabarez A, García W, Palomo MJ. Effect of the type of egg yolk, removal of seminal plasma and donor age on buck sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 2017; 149: 91-98.
- Thomas CA, Garner DL, DeJarnette JM, Marshall CE. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biology of reproduction*. 1997; 56(4): 991-998.
- Waterhouse KE, Hofmo, PO, Tverdal A, Miller RR. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction*. 2006; 131:887-894.
- Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing. *Reproduction, Fertility and Development*. 1995; 7: 871-891.
- Watson PF. The preservation of semen in mammals. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, Finn, C.A. (Ed), Oxford University Press, Oxford. (1979) 283-350pp.
- Yeste M, Estrada E, Casas I, Bonet S, Rodríguez-Gil JE. Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. *Theriogenology*. 2013; 79: 929-939.
- Yeste M, Estrada P, Rocha LG, Marín H, Rodríguez-Gil JE, Miró J. Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. *Andrology*. 2015; 3(2): 395-407.