

Germán Darío Saavedra Correa

Conservación seminal en toros
Cebú. Efecto de la retirada del
plasma seminal y su posterior
incorporación sobre la calidad
espermática en los protocolos de
criopreservación

Departamento
Patología Animal

Director/es
Gonzalez Orti, Noelia
Gil Huerta, Lydia

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**CONSERVACIÓN SEMINAL EN
TOROS CEBÚ. EFECTO DE LA
RETIRADA DEL PLASMA SEMINAL Y
SU POSTERIOR INCORPORACIÓN
SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA**

Autor

Germán Darío Saavedra Correa

Director/es

Gonzalez Orti, Noelia
Gil Huerta, Lydia

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Patología Animal

2018



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza

*“Conservación seminal en toros Cebú”
Efecto de la retirada del plasma seminal y su posterior
incorporación sobre la calidad espermática en los
protocolos de criopreservación*



GERMÁN DARÍO SAAVEDRA CORREA

Zaragoza, 2017



Departamento de
Patología Animal
Universidad Zaragoza

Dra. Lydia Gil Huerta, Profesora Titular del Departamento de Patología Animal, y Dra. Noelia González Ortí, Profesora Contratada Doctor del Departamento de Patología Animal **informan que:**

Don Germán Dario Saavedra Correa, ha trabajado bajo nuestra dirección en la presentación y puesta a punto de su Tesis Doctoral, la cual coincide con el proyecto original "***Conservación seminal en toros Cebú: Efecto de la retirada del plasma seminal y su posterior incorporación sobre la calidad espermática en los protocolos de criopreservación***"

Así mismo, certificamos que el material bibliográfico, experiencias y casuística presentados han sido seleccionados, y que tanto su elaboración como resultados y conclusiones hacen estimar a los que suscriben, como directores de la Tesis Doctoral, que cumple los requisitos para su defensa, pudiendo ser sometida al tribunal que se ha nombrado por la Comisión Académica del Doctorado.

Para que conste a los efectos oportunos, emitimos este informe en Zaragoza a 17 de Octubre de 2017.

Fdo: Lydia Gil Huerta

Fdo: Noelia González Ortí

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Lydia Gil Huerta, por su apoyo y dedicación

A la doctora Noelia González Ortí, por su empeño en este trabajo

Al doctor José Ignacio de Blas por su apoyo con las herramientas estadísticas

Al doctor Ricardo Cepero por sus consejos

A mis compañeros Dany y Rafa

A Jaime Cardozo, por su apoyo en los laboratorios de Proteómica

A Natalia Restrepo por su colaboración en los laboratorios

A mi madre QEPD

A mi padre a pesar de su enfermedad, se entera de todo

A Mónica, por su gran apoyo y paciencia

A mis hijos Juan Camilo y Santiago

A mis hermanas

A mis amigos y compañeros

A mis verdaderos colegas de trabajo

ABREVIATURAS

ADNmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
AE	Adhesinas Espermáticas
AFPs	Proteínas anticongelantes del plasma seminal
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
An	Acrosomas normales
aSFP	Proteína de fluido ácido seminal
BHT	Butirihidroxitolueno
BSP	Plasma seminal bovino
CE	Circunferencia Escrotal
Ce	Concentración espermática
CGP	Células germinales primordiales
Cn	Células normales
CPN	Complejo de poro nuclear
DHL-X	Deshidrogenasa de lactato
En	Envoltura nuclear
EN	Eosina Nigrosina
FAEO	Factor activador esperma – ovocito
GNPDA	Isomerasa glucosalina deaminasa
GNPI	Isomerasa glucosalina 6 fosfato
GPx	Glutathione reductasa
GSH	Glutathion tripéptido (presente en la mayoría de las células)
HOS (+)	Test de resistencia osmótica positiva
HSP	Heparina del plasma seminal bovino
HV	Hartón del Valle
IA	Inseminación Artificial

kDa	Kilo Dalton
MA	Membrana acrosomal
MAE	Membrana nuclear externa
MAI	Membrana nuclear interna
MAS	Selección asistida por marcadores
MDA	Malonaldialdehydo
ME	Membrana espermática
Mip	Motilidad individual progresiva
Mm	Motilidad masal
MP	Membrana plasmática
MW	Peso molecular
OPN	Osteopontina
ORT	Test de resistencia osmótica
P25b	Proteína de superficie del esperma en el toro
PDGS	Prostaglandina D-Sintasa tipo Lipocalina
PHGPx	Fosfolípido hidrogenasa glutathion peroxidasa
pI	Punto isoelectrico
PKC	Protein Kinsasa C
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PMSF	Fosfometilsulfonilfluoruro
PS	Plasma Seminal
QTL	Loci de características cuantitativas
ROS	Especies reactivas de oxigeno
SD	Dismutasa superoxidasa
SDS-PAGE	Electroforesis Desnaturalizante en Geles de Poliacrilamida
SPMI	Inhibidores de la motilidad espermática
Spz	Espermatozoides

TP	Teca perinuclear
V	Volumen del eyaculado
VPA	Vaina pos acrosómica
V y M	Vivos y Muertos
ZP	Zona pelúcida

TABLAS DE CONTENIDOS

	Página
ABREVIATURAS	5
INDICE DE FIGURAS	11
INDICE DE TABLAS	12
INTRODUCCIÓN	14
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Caracterización de las Razas Bovinas	17
2.1.1 Características de la raza Criolla Hartón del Valle.....	17
2.1.2 Características de la raza Cebú Gyr.....	18
2.2 Componentes del Eyaculado	18
2.2.1 La célula espermática.....	19
2.2.1.1 Estructura y función del espermatozoide del mamífero.....	19
2.2.1.2 Cabeza del espermatozoide.....	20
2.2.1.3 Flagelo del espermatozoide.....	22
2.2.1.4 Pieza intermedia.....	23
2.2.2 Plasma seminal (PS).....	23
2.2.2.1 Componentes epididimarios.....	24
2.2.2.2 Componentes de las glándulas sexuales accesorias.....	25
2.3 Calidad Seminal	25
2.3.1. Estudio del volumen y concentración espermática.....	26
2.3.2 Estudio de la motilidad y calidad de movimiento.....	26
2.3.3 Estudio de la morfología espermática.....	28
2.3.4 Estudio del acrosoma.....	28
2.3.5 Estudio de la membrana espermática.....	29

2.3.6 Composición química de la célula espermática.....	30
2.3.7 Componentes inorgánicos de los espermatozoides.....	30
2.3.8 Componentes bioquímicos de los espermatozoides.....	30
2.4 Crioconservación Espermática.....	31
2.4.1 Antecedentes históricos.....	32
2.4.2 Estrés oxidativo.....	33
2.4.3 Protección antioxidante.....	33
2.5 Proteómica del Plasma Seminal.....	34
2.5.1 Proteína ácida del líquido seminal (aSFP).....	35
2.5.2 Proteínas BSP A1 / A2.....	35
2.5.3 Proteínas P25b (Proteínas de superficie).....	36
2.5.4 Proteínas AFP y AFGP.....	37
2.5.6 Espermadhesinas.....	37
2.5.7 Fosfolipasa A2 (PLA2).....	38
2.5.8 Proteínas del choque térmico (Hsp).....	39
2.5.9 Osteopontina (OPN).....	40
2.5.10 Clusterina.....	41
2.5.11 Proteína prostaglandina D-Sintasa.....	41
2.5.12 Caltrina (inhibidor del transporte de Ca).....	42
3. JUSTIFICACIÓN y OBJETIVOS.....	43
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
4.1. Material	45
4.1.1. Material fungible	45
4.1.2. Material e inventariable	45
4.1.3. Material biológico.....	47
4.2 Metodología.....	48
4.2.1. Colecta de semen.....	48

4.2.2 Obtención del PS.....	48
4.2.3 Cuantificación de las proteínas.....	50
4.2.4. Separación de las proteínas mediante electroforesis	51
4.2.5 Captura y análisis de las imágenes de los geles.....	52
4.2.6 Evaluación de los parámetros espermáticos.....	53
4.2.7 Congelación de las muestras.....	55
4.2.8 Evaluación de las muestras postcongelación.....	56
4.2.9 Análisis Estadístico.....	56
5. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	57
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
6.1 Perfiles electroforéticos unidimensionales de proteínas de plasma seminal.....	59
6.1.1. Evaluación espermática en de las razas cebú y criollas.....	59
6.1.2. Determinación de los mapas electroforéticos 1D.....	61
6.1.3. Correlaciones entre bandas de proteínas de PS y las variables de calidad seminal de las razas Gyr y HV.....	67
6.2. Influencia del plasma seminal sobre los parámetros seminales.....	71
6.2.1 Selección de toros Criollos HV.....	71
6.2.2. Evaluación de toros Cebús Raza Gyr.....	76
6.2.3 Adición del plasma seminal.....	77
7. RECOMENDACIONES.....	83
8. CONCLUSIONES	84
9. RESUMEN.....	85
10. SUMMARY.....	88
11. BIBLIOGRAFÍA	91

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del espermatozoide de los mamíferos.....21

Figura 2. Raza criolla Hartón del Valle y Raza Cebuína Gyr.....46

Figura 3. Obtención del plasma seminal.....49

Figura 4. Precision Plus Protein™ Dual Color Standards 1610374(Bio Rad).....51

Figura 5. Procedimiento de la electroforesis 1D.....52

Figura 6. Cuantificación de las bandas de proteínas digitalizadas.....52

Figura 7. Diseño experimental primer objetivo.....57

Figura 8. Diseño experimental segundo objetivo.....58

Figura 9. Mapa electroforético 1D bandas de proteínas PS Gyr (Toros 1 a 3).....62

Figura 10. Mapa electroforético 1D bandas de proteínas PS Gyr (Toros 4 y 5).....62

Figura 11. Mapa electroforético 1D bandas de proteínas PS HV (Toros 6 y 7).....63

Figura 12. Mapa electroforético 1D bandas de proteínas PS HV (Toros 8 y 9).....64

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales y equipos inventariables.....44

Tabla 2. Material fungible.....47

Tabla 3. Descripción de los tratamientos.....49

Tabla 4. Valores promedio y desviación estándar de los parámetros de calidad seminal de los toros de la raza cebú Gyr y criollo Hartón del Valle.....59

Tabla 5. Prueba del rango múltiple de Duncan para concentración espermática para el efecto TORO (Gyr y Hartón del Valle).....60

Tabla 6. Valores de concentración relativa y significancia de bandas de proteínas del PS de los toros de las razas cebú Gyr y criollo Hartón del Valle.....65

Tabla 7. Relación entre bandas de proteínas del PS y su frecuencia de presentación en los toros de las razas cebú Gyr y criollo HV66

Tabla 8. Correlación entre bandas de proteínas del PS y variables espermáticas entre toros de la raza Gyr y HV.....68

Tabla 9. Correlación entre bandas de proteínas (38 y 25 MW (kDa)) del PS de los toros de la raza Gyr y HV.....68

Tabla 10. Correlación entre las distintas bandas de proteínas del PS presentes en las razas Gyr y HV69

Tabla 11.- Volumen seminal.....71

Tabla 12: Concentración Espermática.....71

Tabla 13. Calidad seminal toros Criollos HV.....72

Tabla 14. Comparación calidad seminal (Motilidad progresiva y Vitalidad) en los distintos tiempos (Fresco, 1h, 24h y descongelación) de toros Criollos Hv.....73

Tabla 15. Comparación calidad seminal (f. Normales, Acrosomas y Endosmosis) en los distintos tiempos (Fresco, 1h, 24h y descongelación) de toros Criollos HV.....74

Tabla 16. Calidad seminal Toros Criollos HV seleccionados (V, Ce, M.Masal, M.Individual).....75

Tabla 17. Calidad seminal Toros Criollos HV seleccionados (V y M, F. Normales, Acrosomas y Endosmosis).....75

Tabla 18: Calidad seminal de los toros Gyr76

Tabla 19: Comparación de los valores de calidad seminal de raza Gyr y HV77

Tabla 20. Comparación de la calidad seminal manteniendo el plasma seminal en raza Gyr (Mot. Progresiva, Vitalidad) en los distintos tiempos.....	78
Tabla 21. Comparación de la calidad seminal manteniendo el plasma seminal en raza Gyr (F. Anormales, Acrosomas y Endosmosis) en los distintos tiempos.....	78
Tabla 22. Comparación de la calidad seminal adicionando (25% y 50%) de plasma seminal en raza Gyr (Mot. Progresiva, Vitalidad) en refrigeración.....	79
Tabla 23. Comparación de la calidad seminal adicionando (25% y 50%) de plasma seminal en raza Gyr (Formas Anormales, Acrosomas y Endosmosis) en refrigeración.....	79
Tabla 24. Evaluación del efecto de la retirada de plasma seminal Gyr y/o adición de plasma seminal de raza Criolla sobre la congelación.....	80
Tabla 25. Evaluación del efecto de la retirada de plasma seminal Gyr y/o adición de plasma seminal de raza Criolla sobre la congelación.....	80

1.-INTRODUCCIÓN

La conservación del semen en sí misma es una técnica de gran relevancia dentro de las biotecnologías de la reproducción, puesto que permite la conservación de material genético de numerosas especies. Por otro lado, contribuye y ayuda a la utilización de otras técnicas reproductivas, tales como la inseminación artificial (IA) o la fertilización in vitro (FIV). La inseminación artificial permite la utilización del potencial genético de reproductores de alto valor de los cuales se ha preservado genética, permitiendo así el cruzamiento y selección de individuos. De esta manera y utilizando la combinación de ambas técnicas, se contribuye a incrementar la producción de las especies doméstica.

En eyaculados ovinos se encontraron proteínas del PS que se adhieren al espermatozoide en el momento de la eyaculación, las cuales confieren una protección y reparación de la membrana frente a los efectos del choque térmico (Cardozo et al., 2006). Las proteínas mencionadas se conocen como RSVP14 y RSVP20, son producidas en las vesículas seminales y se caracterizan por tener un efecto protector frente a los procesos de congelación y descongelación (Fernández y Gallego, 2006). Estas investigaciones demuestran que los eyaculados de ovinos contienen proteínas que ayudan a mantener la viabilidad de la membrana espermática que asegura el poder fecundante de los espermatozoides bajo condiciones ambientales adversas (Rueda, 2011).

En diversas especies entre las cuales se pueden citar los bovinos, el escaso poder fecundante del semen descongelado puede estar motivado por cambios estructurales, bioquímicos y funcionales, así como en la composición lipídica de la membrana que sufren la mayoría de las células espermáticas durante el proceso de preservación. Posiblemente sean cambios generados por el estrés térmico, mecánico, químico u osmótico que los protocolos implican, teniendo como consecuencia una baja motilidad y una pérdida de la capacidad fertilizante de estos espermatozoides en el interior del tracto reproductivo de la hembra (Cardozo, 2006). Durante los protocolos de preservación la integridad de la membrana espermática se ve alterada, y viendo que la fertilidad se ve reducida tras la descongelación, queda demostrado que su integridad es crucial para que los espermatozoides conserven su funcionalidad natural después de la descongelación. Además, hay que valorar que la capacitación y reacción acrosómica precoz que conllevan las técnicas de preservación puedan ser una de las causas de la pérdida del poder fecundante de los espermatozoides (Martínez, 2005).

La congelación y descongelación del semen provocan cambios bruscos a la membrana de los espermatozoides de los mamíferos, posiblemente atribuidos al estrés por temperatura, mecánica, química y osmótica, entre los cuales se pueden mencionar cambios estructurales y composición lipídica de la membrana teniendo como consecuencia la pérdida del poder fecundante (Cardozo, 2006).

De hecho, los bajos porcentajes de viabilidad y motilidad de los espermatozoides no serían los responsables directos de su bajo poder fecundante, si no que algunos autores lo atribuyen a la pérdida de proteínas de membrana. La principal función de la membrana espermática es formar una barrera de protección y comunicación con el medio extracelular, además transmite señales bioquímicas entre ligando y receptor del medio externo al interno de la célula espermática (Cardozo, et al., 2006). Todo esto hace que el espermatozoide dependa de su membrana para tener un poder fecundante exitoso.

Varias investigaciones han dirigido sus pasos a encontrar la manera de proteger a los espermatozoides frente a estos daños generados por la criopreservación, entre ellas encontramos la inclusión de plasma seminal (PS), o proteínas del mismo en medios de dilución del semen, con el fin de revertir los daños causados a la membrana del espermatozoide y confiriéndole la capacidad de contrarrestar los cambios ocasionados por estrés térmico (Barrios et al., 2000).

Investigaciones anteriores adelantadas en la Corporación Colombiana de Investigación CORPOICA, evidenciaron que los espermatozoides de toros criollos Sanmartinero, penetraban en mayor cantidad de ovocitos que los espermatozoides de toros Cebú. Así mismo, se estableció que los toros Sanmartinero presentaban niveles superiores de ciertos compuestos como ácido cítrico o ácido pirúvico, lo cual dio pie a plantear las primeras hipótesis en busca de establecer los motivos de su superior comportamiento (Rueda, 2008). Sin embargo, no se han realizado estudios que permitan establecer posibles relaciones entre las concentraciones de proteínas del plasma seminal y las variables de calidad seminal, estas últimas consideradas como señales del funcionamiento del espermatozoide.

Con base en lo anteriormente expuesto, en la primera parte de este estudio se evaluaron los perfiles electroforéticos de las proteínas del PS de toros Criollos y Cebú, mediante el uso de la electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida SDS-PAGE 1D, para de esta manera poder establecer las correlaciones existentes con las variables de calidad seminal.

Para seguir valorando estos resultados y confirmar el efecto beneficioso, en una segunda experiencia se retiraron distintos niveles de PS (25 y 50 %) en eyaculados de toros Gyr para sustituirlos por la misma proporción de PS de toros Criollos y ver el efecto de las proteínas de dicho plasma sobre la calidad seminal tanto en el proceso de refrigeración como en el de congelación y ver de qué manera influye sobre ella.

2.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En esta investigación se ha trabajado con la raza criolla Hartón del Valle, descendiente del cruce de razas traídas al país desde Europa y la raza cebú Gyr lechero originario de la India, pero mejorado en Brasil y de gran importancia económica en Colombia por su gran capacidad de adaptación y sus buenos índices en producción de leche.

2.1 Caracterización de las Razas Bovinas

En regiones tropicales las razas autóctonas y las cebuínas se utilizan para generar razas sintéticas con buenos índices de producción, tolerancia al calor y los parásitos. Por medio de programas de mejoramiento genético para fijar características de importancia económica como la producción de leche en el trópico bajo, basados en reproductores genéticamente superiores de los diferentes hatos.

La biología molecular es una herramienta imprescindible en el logro de este fin, por medio de los QTL (*loci de características cuantitativas*) y genes candidatos, es encontrar genes y marcadores que puedan ser implementados en programas de mejoramiento genético por medio de la selección asistida por marcadores (*MAS*).

En el caso del ganado cebuino una de las primeras aplicaciones de la genética molecular es la identificación de animales resistentes a garrapata, estrés calórico, parásitos, mamitis y demás propias del trópico bajo; a partir de los QTL significativos y genes candidatos identificados en las razas cebuínas lecheras, se podrán utilizar en el programa de Prueba de Progenie de la raza por medio de toros jóvenes con alto potencial genético y descartando los de bajo potencial, evitando sobrecostos por el mantenimiento de los animales en el tiempo por varios años. Utilizando los QTL significativos en embriones producidos *in vitro* o por transferencia de embriones se puede disminuir el intervalo generacional y hacer selección incluso en el estado embrionario (Ardila, 2010).

2.1.1 Características de la raza Criolla Hartón del Valle

Los bovinos criollos colombianos Hartón del Valle, considerados criollos caucanos se han caracterizado por ser animales de alta fertilidad con intervalos entre partos de 365-390 días y una tasa de natalidad superior al 90%. Igualmente se destacan por una gran precocidad alcanzando su pubertad a los 12 meses, la edad al primer servicio a los 22 meses y la edad al primer parto a los 32 meses. La precocidad del Hartón del Valle se ha visto

reflejada también en pesos de destete de 180-200 kg a los 8 meses de edad. Si se les continúa con un sistema de manejo y alimentación adecuada alcanzan desarrollos y pesos significativos de 280 kilos en las hembras y 300 kilos en los machos a los 18 meses de edad, todo depende de las condiciones de manejo que aplique el productor para lograr alcanzar las metas satisfactorias. (Casas y Valderrama, 1998).

2.1.2 Características de la raza Cebú Gyr

Teniendo en cuenta el mejoramiento genético de las razas cebuínas, el país que más se ha destacado es Brasil, líder en programas de mejoramiento en el trópico. Este país ha obtenido importantes avances en progreso genético en su rebaño de leche por medio del mejoramiento clásico y de técnicas reproductivas tales como la inseminación artificial, la transferencia de embriones o la fecundación *in vitro*, principalmente para características de fácil medida y alta heredabilidad.

Datos de la Asociación Brasileña de Criadores de Cebú (ABCZ), sobre el desempeño productivo y reproductivo de la raza Gyr, reportando datos como edad al primer parto (EPP) de 44,7 meses y un intervalo entre partos (IPP) de 16,1 meses; una producción de leche por lactancia (305 días) de 3000 kg con un porcentaje de grasa de 4,5 en hembras longevas y con vacas jóvenes de 5000 kg en intensivo con suplementos concentrados; en Colombia muchas vacas superan los 4000 kg de leche por lactancia bajo condiciones de pastoreo y suplementación durante el ordeño con piensos comerciales.

Estos logros se han obtenido gracias a programas de transferencia de embriones producidos *in vitro*, partiendo de ovocitos obtenidos mediante aspiración folicular trasvaginal de vacas de alta genética y toros de elite. Además de todo esto según la ABCZ encontraron una ganancia de peso diario de 1,214 kg que son superiores a las ganancias obtenidas en otras pruebas similares con otras razas cebú de carne. (Ardila, 2010).

2.2 Componentes del Eyaculado

El eyaculado cuenta con dos componentes principales, las células germinales o espermatozoides y el plasma seminal, que es el medio en el cual los espermatozoides se encuentran resuspendidos (Mann y Lutwak, 1981).

2.2.1 La célula espermática

Los espermatozoides son células alargadas consistentes con cabeza aplanada portadora de núcleo y una cola o flagelo que es el aparato necesario para la motilidad celular. Están cubiertos en su totalidad por la membrana plasmática. El extremo anterior del núcleo espermático está cubierto por el acrosoma, un delgado saco membranoso de doble capa estrechamente adherido al núcleo durante las últimas etapas de la formación del espermatozoide en el testículo. Esta estructura en forma de casquete, contiene varias enzimas hidrolíticas incluyendo proacrosina, hialuronidasa, esterases y ácidohidrolasa, que participan en el proceso de fecundación. Un cuello une la cabeza del espermatozoide con el flagelo, que a su vez se subdivide en los segmentos medio, principal y caudal (Hafez, 2002) (Figura 1).

El conducto deferente contiene el 2% de los espermatozoides, en la cola del epidídimo que es el sitio principal de almacenamiento el 70% y en los demás conductos del sistema canicular se encuentran los restantes. La mayor parte de los espermatozoides almacenados y no eyaculados son eliminados gradualmente mediante la orina y aquellos que no sufren un envejecimiento gradual hasta que degeneran y mueren (Hafez, 2002).

2.2.1.1 Estructura y función del espermatozoide del mamífero

Para apreciar plenamente el mecanismo de la biogénesis de los espermatozoides (espermatogénesis y espermiogénesis), es importante revisar brevemente la estructura subcelular y la función del espermatozoide de mamíferos. El espermatozoide (Figura 1) se compone de cabeza, pieza intermedia y la cola o flagelo. Tanto la cabeza como la cola de los espermatozoides están cubiertas por la membrana plasmática o plasmalema (Bloom y Fawcett, 1995).

La cabeza del espermatozoide en roedores tiene forma de gancho (falciforme), mientras que los ungulados, carnívoros y primates, están en forma de espátula. Una distinción importante entre espermatozoide de ungulados y roedores es la ausencia total de un centrosoma y centriolos en los roedores, en contraposición a una forma reducida de centrosoma con un solo centriolo proximal en los ungulados. Como se describe a continuación, todos los euterios mamíferos comparten las otras características generales de la cabeza y la cola de los espermatozoides.

2.2.1.2 Cabeza del espermatozoide

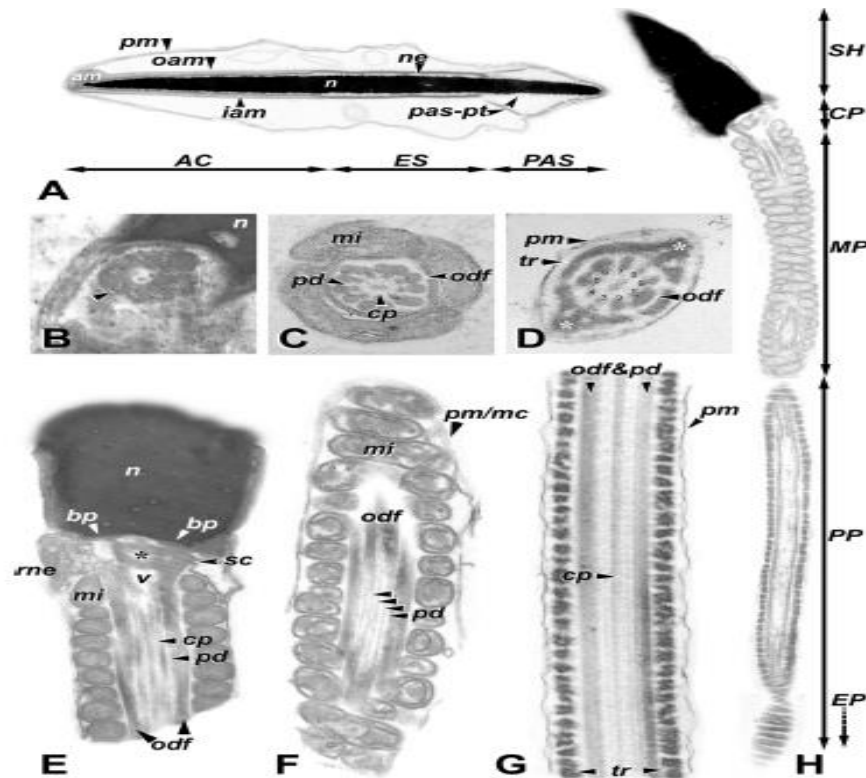
Progresando desde adentro hacia fuera, la cabeza del espermatozoide se compone de un núcleo, en el cual el ácido desoxirribonucleico (ADN) de núcleo de condensación y enlazador histonas, han sido parcialmente reemplazado durante la espermiogénesis por protaminas con carga positiva de ADN, proteínas que transportan la hipercondensación del núcleo del espermatozoide en forma compacta, forma hidrodinámica que le permitirá adquirir motilidad y tener capacidad para penetrar la zona pelúcida del ovocito. (Brewer y Corzett, 2002; Dadoune et al., 2004).

El núcleo está cubierto por una envoltura nuclear reducida (En), de la que los complejos de poro nuclear (CPN) se han eliminado durante la espermiogénesis, a excepción de algunos elementos de red redundantes con CPN, que se encuentra en algunas especies en la base del núcleo del espermatozoide. (Ho & Suarez, 2003). La protección del núcleo de espermatozoide se realiza por la teca perinuclear (TP), a veces se denominada "matriz perinuclear", la cual forma una coraza rígida compuesta de proteínas estructurales de disulfuro amalgamado, estabilizado con varias moléculas de proteína (Oko, 1995), algunos de estos funcionan como receptores celulares una vez notan la presencia de adenosín trifosfato (ATP) disuelto en el citoplasma de los ovocitos al momento de la fecundación (Sutovsky et al., 2003).

La TP se divide en tres segmentos que reflejan los principales fragmentos de la cabeza del espermatozoide y cumplen funciones únicas durante fertilización:

El primero es una capa subacrosómica que subyace en el segmento acrosomal de la cabeza del espermatozoide cuya función es anclar el acrosoma, una vesícula derivada del aparato de Golgi que forma una tapa en el hemisferio proximal de la cabeza del espermatozoide que alberga proteasas y los receptores necesarios para la interacción espermatozoide con la zona pelúcida del ovocito. Las membranas acrosomal interior y exterior (MAI y MAE, respectivamente), otros componentes reconocidos, sostienen el interior de una matriz acrosomal densa que contiene las proteasas necesarias para la penetración de la ZP en la fertilización (Gerton, 2002; Yoshinaga y Toshimori, 2003). El segmento subacrosómico se fusiona con la MAI y probablemente estabiliza las moléculas receptoras presentes en ella que son necesarios para la unión secundaria de la cabeza del espermatozoide a la zona pelúcida del ovocito después de la excitosis acrosomal.

Figura 1. Estructura del espermatozoide de los mamíferos



Fuente: (Sutovsky, et al., 2003).

Estructura del espermatozoide bajo microscopía electrónica de transmisión. (A) membrana espermática; (ES) segmento ecuatorial; (AC) acrosoma; (PAS) posacrosoma; (pm) membrana plasmática; (am) matriz acrosomal; (pas-pt) vaina posterior acrosómica; (n) núcleo del espermatozoide; (B, E) pieza intermedia; (C, F) pieza principal; (D, G) pieza de conexión; (E) centríolo proximal; (v) bóveda vacía; (sc) columnas estriadas; (odf) fibras densas externas; (pd) microtúbulos periféricos; (cp) microtúbulos centrales; (tr) nervios transversales; (pb) placa basal; (SH) cabeza del espermatozoide; (CP) pieza de conexión; (MP) pieza intermedia; (PP) pieza principal; (EP) pieza final.

En la fecundación, la MAI sigue estando presente mientras que el MAE se pierde durante la exocitosis acrosomal, vesiculación inducida por la unión del plasmalema espermatozoides/complejo MAE a la proteína ZP3, el receptor de espermatozoides en zona pelúcida del ovocito (Figura 1).

El segundo segmento es el ecuatorial, y es un complejo plegado de PT, MAE y MAI, que lleva moléculas de receptores que participan en la unión inicial de la cabeza del

espermatozoide al huevo membrana plasmática (oolemma) del ovocito, una vez que las penetra el espermatozoide a través de la ZP y alcanza el espacio perivitelino, receptor putativo de moléculas que participan en el esperma-oolemma vinculantes, como equatorin/MN9 que están presentes en esta región (Toshimori et al., 1992).

El tercer segmento, se crea una vaina posacrosómica (VPA) de la PT del espermatozoide para albergar un complejo de las proteínas de señalización que se refiere colectivamente como (FAEO), o el factor de activación esperma-ovocito (Sutovsky et al., 2003). Después de la fusión de la cabeza del espermatozoide con el oolemma, algunas de las moléculas se dispersan a través del FAEO ooplasma, para activar la vía de señalización que conduce a la activación de ovocitos e inicio del desarrollo del cigoto, mientras que otras moléculas liberadas de la VPA pueden permanecer asociadas con el núcleo de esperma, ya que se transforma en un pronúcleo masculino.

2.2.1.3 Flagelo del espermatozoide

La cola de los espermatozoides o flagelo, le proporciona la capacidad de movimiento gracias a la disposición de los microtúbulos del axonema flagelar denominada "9 + 2". La disposición 9 + 2 del axonema se refiere a nueve microtúbulos periféricos, dispuestas simétricamente en conexiones dobles por una dineína a un par central de microtúbulos en la vaina radial. Las conexiones dobles exteriores, están en paralelo con nueve fibras densas externas que proporcionan flexibilidad, pero firme apoyo durante el movimiento flagelar. Topológicamente la cola de los espermatozoides se puede dividir en cuatro segmentos principales que comparten una estructura común más interna de microtúbulos basados en un axonema paralelo a nueve fibras densas externas, pero difieren en su subestructura externa. Progresando desde la porción proximal hasta el extremo distal, estos segmentos incluyen una pieza de conexión, una intermedia, una principal y una pieza terminal.

La pieza de conexión se compone de nueve columnas estriadas o segmentadas que son una continuación directa de las fibras densas exteriores en los otros segmentos flagelares; enjaulado dentro de estas nueve columnas es la masa densa de cabeza compacta, que, en la mayoría de los mamíferos, excepto los roedores, contiene el centriolo del espermatozoide (proximal), un remanente del centrosoma bicentriolar encontrado en un principio en células espermatogénicas haploides. La degradación completa de ambos centriolos durante espermiogénesis distingue roedores de ungulados, carnívoros y primates.

La placa basal proporciona la conexión entre el extremo proximal de la pieza de conexión y la fosa de la implantación de la cabeza del espermatozoide (Saacke, 2008).

2.2.1.4 Pieza intermedia

La pieza intermedia está cubierta por la vaina mitocondrial en forma de una hélice de aproximadamente 75 a 100 mitocondrias espermáticas, que generan la energía para la motilidad flagelar del espermatozoide. Cada mitocondria lleva varias copias del genoma mitocondrial paterno; el estrés oxidativo por la maduración y fecundación del espermatozoide tal vez está relacionados con eventos mutagénicos, estas mitocondrias paternas con el ADN mitocondrial (ADNmt) paterno parecen ser eliminadas por proteólisis específica en el interior del óvulo fecundado (Sutovsky et al., 2004).

La pieza principal se separa de la pieza intermedia por el anillo de Jensen, el anillo de desplazamiento de material denso se encuentra en la porción distal de la vaina mitocondrial. Esta pieza está protegida por la fibrosa, compuesta por dos columnas longitudinales que corren paralelamente a las fibras densas exteriores tres y ocho (Figura 1 D), conectado a ambos lados por una serie de nervios transversales. La vaina fibrosa proporciona soporte al axonema del espermatozoide, las proteínas al interior de la vaina fibrosa captan la proteína quinasa necesaria para el proceso de capacitación espermática y la hiperactivación antes de la fertilización (Eddy et al., 2003). La pieza terminal contiene doble axonema y en los extremos fibras densas al exterior de la vaina fibrosa.

2.2.2 Plasma seminal (PS)

El plasma seminal no es necesario para que los espermatozoides tengan capacidad fecundante, pero es importante para la monta natural puesto que los espermatozoides necesitan un vehículo para que una vez depositados en el tracto genital de la hembra puedan llegar hasta el lugar de la fecundación (Senger, 2003).

Actualmente está fuera de toda duda el valor del plasma seminal como regulador en todos los procesos que ocurren tanto a nivel espermático, como a nivel del tracto genital de la hembra. Estas funciones se refieren principalmente a la nutrición, protección, regulación de la motilidad y capacitación de los espermatozoides, reconocimiento y unión entre gametos y acción sobre el tracto genital de la hembra, en donde produce un

incremento de las contracciones uterinas, una modulación de la respuesta inmune y una relajación del istmo oviductal (Caballero, 2007).

La centrifugación y retirada de todo el plasma seminal de un eyaculado que va a ser refrigerado utilizando diluyentes estándar resulta en una reducción significativa en la motilidad de los espermatozoides del mismo. Sin embargo, la centrifugación y retirada parcial del plasma seminal previo a dicho almacenamiento a 5°C resulta en una mejoría en las características de motilidad. Esto sugiere que es esencial una baja concentración de plasma seminal, o el uso de un sustituto de éste adicionado a los diluyentes, para mantener las características de motilidad espermática. No se describen diferencias en motilidad total ni integridad de membrana espermática al separar el plasma seminal de las distintas fracciones que componen el eyaculado, por lo que podemos suponer que el PS de todas las fracciones tiene un efecto similar sobre los espermatozoides tras almacenarlos 24 horas a 5°C (Diaz, 2014).

En las últimas dos décadas se ha encontrado que el PS bovino contiene una proteínas de la familia de BSP (proteínas del plasma seminal bovino) sintetizadas en las glándulas vesiculares, aunque se encuentran en el PS de todos los mamíferos, su concentración varía entre especies, siendo del 65% para el toro, mientras que para el gorañón solo representa el 1,1% (Bergeron y Manjunath, 2006).

Los azúcares, el inositol, o los ácidos cítrico y ascórbico proporcionan energía para el metabolismo de la célula. También los aminoácidos (carnitina, taurina, hipotaurina) proporcionan energía y protegen contra sustancias oxígeno reactivas y enzimas (proteasas, acrosina, nucleasas, fosfatasa ácida y alcalina y superóxido dismutasa) que intervendrán en la licuefacción seminal, penetración del ovocito por parte del espermatozoide, y digestión de espermatozoides muertos y dañados (Sandoval, 2005).

2.2.2.1 Componentes epididimarios

El paquete espermático se une con las distintas sustancias que componen el plasma seminal de forma secuencial. Se estima que aproximadamente el tiempo de migración epididimaria es de 10, 11, 14 y 15 días respectivamente en el conejo, toro, cerdo y caprino respectivamente. En este segmento, los espermatozoides sufren cierto grado de maduración y pueden permanecer viables durante periodos prolongados de tiempo debido a que su motilidad y metabolismo son muy bajos. En el macho bovino, el epidídimo tiene una

amplia capacidad de almacenaje de espermatozoides que oscila entre 20.000 y 80.000 millones lo que está en relación con la edad y el desarrollo testicular (Saacke, 2008).

2.2.2.2 Componentes de las glándulas sexuales accesorias

Las glándulas sexuales accesorias constituyen un pool de secreciones exocrinas que suministran la mayor parte del plasma seminal rico en carbohidratos, sales de ácido cítrico, proteínas, aminoácidos, enzimas, vitaminas hidrosolubles y sustancias minerales con un poder tampón relativamente elevado. De aquí que el plasma seminal constituye un medio líquido especialmente apto para el desarrollo de las funciones vitales de los espermatozoides. Las glándulas anexas del aparato genital entran en actividad tras la aparición de la pubertad, tienen un desarrollo variable de acuerdo con la especie, son palpables en parte por vía rectal en animales mayores y en los machos castrados son rudimentarias (Pérez, 2009).

Durante la eyaculación, los espermatozoides procedentes del epidídimo entran en contacto con las distintas secreciones provenientes de las glándulas vesicales, la próstata y las glándulas bulbouretrales. El conjunto de sustancias producidas por estas glándulas es especie-específico y altamente variable entre individuos de la misma especie, así como entre eyaculados de un mismo individuo, que además puede variar a consecuencia de diferentes procesos patológicos, estación del año o estado fisiológico del animal (Pérez, 2009). Las variaciones en la composición del plasma seminal en los machos están relacionadas con diferentes índices de fertilidad (Moura et al., 2010).

En especies como equinos, rumiantes y cerdos, donde el cérvix se encuentra abierto, la mayor parte del eyaculado se deposita en el útero lo que unido a las contracciones del miométrio producto de la descarga de oxitocina facilita el transporte de los espermatozoides (Pérez, 2009).

2.3 Calidad Seminal

Se están llevando a cabo investigaciones para identificar qué características del semen que influyen sobre las tasas de fertilidad de los toros. Estas características incluyen la capacidad del espermatozoide para unirse, penetrar y fertilizar un ovocito. También se están realizando investigaciones para desarrollar análisis que determinen de manera más precisa la fertilidad de toros individuales. Algún día será posible predecir la fertilidad de toros

individuales ya sea por muestras de semen o por muestras de ADN (Perry y Patterson, 2010).

Una evaluación adecuada de semen para la reproducción siempre ha sido de gran importancia. El análisis de semen es una valiosa herramienta de diagnóstico para evaluar el estado de fertilidad del macho. Sin embargo, la predicción del potencial de fertilidad de un toro sobre la base de un único ensayo no es fiable. Parámetros convencionales utilizados para la evaluación de semen tienen una aplicación limitada, ya que sólo ayudan a evaluar la integridad estructural de la célula (Neild et al., 1999) sin embargo cada espermatozoide consiste en múltiples compartimentos subcelulares con diferentes funciones, todo lo cual debe estar intacto para una fertilización exitosa (Amann y Graham, 1993).

2.3.1. Estudio del volumen y concentración espermática

Basado en experiencias en las que se han realizado extracciones con vagina artificial se ha podido valorar que el eyaculado de un toro joven tiene un volumen aproximado de 2 ml *versus* a los 4 ml que produce un toro adulto. Pruebas con electroeyaculador muestran valores normales entre 5 y 15 ml. Con un segundo eyaculado, proporcionando 15 – 20 minutos de periodo refractario, el volumen puede incrementarse, pero esta diferencia podría no existir en el caso de una muy buena excitación en la primera colecta.

En general los bovinos de razas lecheras dan un mayor volumen de eyaculado que aquellos de razas para carne (Almela, 2014).

En cuanto a la concentración espermática, varía en función de la especie, edad, raza, estado fisiológico, método y frecuencia de recolección. También influyen el estado nutricional, la excitación sexual, época del año y peso vivo del animal. Los datos medios de un eyaculado bovino oscilan entre 200×10^6 espermatozoides/ml en toros jóvenes y $1,8 \times 10^6$ espermatozoides/ml en toros adultos (Hafez, 2002).

2.3.2 Estudio de la motilidad y calidad de movimiento

La motilidad espermática se valora de forma subjetiva observando una gota de semen diluido con un microscopio óptico, y determinando el porcentaje de células móviles y calidad de movimiento. La utilización de métodos computarizados como el sistema CASA (Computer- Assisted- Sperm- Analysis), permite una valoración totalmente objetiva, cuantificando parámetros de velocidad y cinética de movimiento (Castillo, 2012).

La velocidad y tipo de movimiento de los espermatozoides, puede variar de un seminal a otro dependiendo de factores ambientales, método de colecta, manejo del semen, intervalo colecta valoración, etc. Además, hay que tener otros factores a la hora de valorar la motilidad, como son las aglutinaciones: los espermatozoides tienen cargas eléctricas negativas, razón por la cual se repelen entre sí; al perder la carga negativa tienden a agruparse (aglutinación), debido al aumento de la acidez en el medio (Castillo, 2012).

Los espermatozoides en la luz del túbulo seminífero carecen de movimiento, además conforme se alejan de las células de Sertoli todavía conservan una porción de citoplasma, lo que recibe el nombre de "gota citoplasmática" (Chenoweth, 1997, citado por Barrios, 2002). La motilidad la adquieren durante su paso por la cabeza y el cuerpo del epidídimo, donde sufren además importantes modificaciones bioquímicas y morfológicas. Este tiempo requerido para la movilización de los espermatozoides por la cabeza y el cuerpo del epidídimo no se ve afectado por eyaculaciones más frecuentes, es decir que toros que eyaculan diariamente o tres veces a la semana mantienen un tiempo promedio de trayecto que dura aproximadamente 2.5 días en el toro adulto en ambos casos (Amann y Schanbacher, 1983, citado por Barrios, 2002).

La motilidad espermática depende de factores endógenos y exógenos. La aparición de la movilidad está asociada al aumento intracelular de AMP cíclico y de proteínas-quinasas dependientes de AMP cíclico y a la disminución de Ca^{++} y de calmodulina. La movilidad progresiva está asociada al aumento de la carnitina intracelular en los espermatozoides. No se conocen exactamente los factores que disparan la movilidad, pero se sabe que son de origen epididimario y que podrían hacer intervenir fosforilaciones de proteínas dependientes de AMP cíclico, por tanto, del sistema adenilatociclasa. La movilidad espermática es un factor considerado actualmente de gran importancia en la biología de la reproducción y la calidad del mismo ha sido relacionada a la fertilidad en humanos y en otras especies animales (Suarez et al., 1984, citados por Vera, 2002).

La motilidad espermática ha sido el parámetro más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis seminal, al ser esta una de las más importantes expresiones de la función espermática, que según algunos autores, puede ser uno de los factores que mejor se correlaciona con la fertilidad (Muiño et al., 2005).

2.3.3 Estudio de la morfología espermática

Los resultados durante la evaluación de la morfología pueden ser variables, puesto que sobre ellos influyen varios factores, desde el tipo de tinción, la forma de hacer la extensión misma de la muestra, hasta la zona de lectura de la extensión en el microscopio. Desde que se publicó un manual basado en el sistema de calificación de (MacLeod 1970) se intenta estandarizar e interpretar la morfología de las células espermáticas (Castillo, 2012).

El espermatozoide es una célula alargada que en el bovino mide aproximadamente 75 μm de largo y tiene una carga haploide de cromosomas (1n cromosoma). Está formada por tres componentes principales: cabeza, cuello y cola. La cabeza del espermatozoide contiene el material genético y mide 8-10 μm de largo, 4-5 μm de ancho y 0.5 μm de grosor (Mc. Donald, 1991, citado por Barrios, 2002).

Cada una de las partes del espermatozoide se ha diseñado para desempeñar con éxito las funciones que tiene encomendadas para ser fértil. Cualquier anomalía en alguna de estas partes por tanto puede tener repercusión sobre el éxito de tales funciones.

En la morfología espermática pueden darse anomalías, que según su origen se clasifican en primarias (si se producen en el testículo durante la espermatogénesis) o bien secundarias (si se originan en el epidídimo, durante el transporte). La designación de anormalidades primarias y secundarias se refiere al origen del defecto y no a la severidad del mismo. En consecuencia, ambos tipos de anormalidades son igualmente importantes cuando se evalúa la calidad seminal.

Los espermatozoides con anormalidades primarias como defectos de cabeza y cola, al igual que con anormalidades secundarias, la gota citoplasmática posiblemente la más común, bajaron los porcentajes de fertilidad en hembras debido a que llegan o no llegan al ámpula por la dificultad de pasar el cuello uterino, el oviducto e imposibilidad de romper la zona pelúcida del ovocito (Saacke, 2008).

2.3.4 Estudio del acrosoma

La relación del estado del acrosoma con la fertilidad es poco importante para algunos autores (Pursel et al., 1984), sin embargo, otros sí encuentran correlaciones positivas entre el número de acrosomas normales y la fertilidad, como (Galli y Bosisio 1988), o también una relación negativa entre el porcentaje de acrosomas alterados y el índice de

fertilidad en un ensayo heterospérmico, como (Berger y Parker en 1989, citados por Almela, 2014).

El acrosoma contiene varias enzimas hidrolíticas (acrosina, hialuronidasa, esterases e hidrolasas ácidas) que participan activamente en el proceso de la fecundación (Chenoweth, 1997). Valorar la membrana acrosomal nos va a permitir valorar su estado, para ello se utilizan distintos protocolos que se reflejan en el siguiente apartado: estudio de la membrana espermática.

2.3.5 Estudio de la membrana espermática

La membrana espermática (ME) es una estructura heterogénea y dinámica que presenta 5 dominios diferentes: acrosoma, segmento ecuatorial, región posacrosomal, pieza intermedia y cola, además; participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, con funciones específicas que permiten que el espermatozoide adapte su metabolismo al medio circundante, proporcionándole un sistema molecular para el reconocimiento del ovocito (Hammerstedt et al., 1990, citados por Rubio et al., 2009).

De aquí deriva que, la evaluación morfológica o estructural del espermatozoide haga énfasis en la valoración de la integridad de su membrana plasmática (MP) y acrosomal (MA), pudiendo en algunos casos evaluarlas juntas o por separado realizando tinciones sencillas y observando con un microscopio óptico, observando mediante el uso de óptica de contraste diferencial de interferencia o Nomarski, o utilizando microscopía electrónica de transmisión o de barrido. Sin embargo, aun cuando algunas técnicas morfológicas proveen información veraz sobre los daños ocurridos a la MP y MA, no siempre se asocia a la fertilidad del toro (*Bos taurus - indicus*), a menos que el daño ocasionado en los espermatozoides de una muestra seminal sea muy notable. La integridad de la ME es fundamental para el metabolismo espermático e imprescindible en varios eventos involucrados en la fecundación, como lo son la capacitación, la reacción acrosómica y la fusión con el ovocito, (Madrid, 2004; Rota, et al., 2000; Watson, 2000, citados por Rubio, et al., 2009) lo cual, garantiza la fertilidad del macho reproductor.

La integridad de la membrana plasmática y acrosomal reflejan la viabilidad espermática, y el proceso de criopreservación podría afectar estas membranas ocasionando daños como hinchamiento y disrupción de las mismas, cambios en la fluidez, alteración del flujo de calcio y cambios en la actividad enzimática que pueden inducir una capacitación

espermática anticipada, viéndose afectada la fertilidad (Tartaglione y Ritta, 2004, citados por Cabrera y Pantoja, 2012).

La prueba de resistencia osmótica (HOST⁺), que evalúa la integridad de la membrana espermática y la prueba de integridad acrosomal, a través de tinción Azul de Tripán/ Giemsa, permiten predecir con bastante confiabilidad la capacidad fértil de un toro, toda vez que se ha encontrado correlaciones altas y positivas con la tasa de fertilidad in vivo (Aisen y otros, 2002, citados por Cabrera y Pantoja, 2012).

2.3.6 Composición química de la célula espermática

Los principales componentes químicos de las células espermáticas son ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Cerca de un tercio del peso seco de una célula espermática corresponde al núcleo. La cromatina nuclear está constituida por proporciones aproximadamente iguales de ADN y proteína. El casquete acrosómico contiene una variedad de enzimas. En la cola hay muchas proteínas estructurales, enzimas, así como lípidos (Hafez, 2002).

2.3.7 Componentes inorgánicos de los espermatozoides

Los espermatozoides son ricos en fósforo, nitrógeno y azufre. La mayor parte del fósforo está asociada al ADN, mientras que el azufre se deriva de proteínas nucleares básicas, y de los componentes de la cola (Hafez, 2002).

2.3.8 Componentes bioquímicos de los espermatozoides

El núcleo de los espermatozoides está compuesto por cromatina condensada en la que el ADN es estabilizado por protaminas. Los núcleos de los espermatozoides de la mayor parte de las especies contienen solo protaminas, mientras que en otras especies contiene cantidades variables de histona más grandes, ricas en arginina. Estas proteínas nucleares básicas, importantes para la condensación y estabilización del ADN, son mantenidas juntas por enlaces sulfhidrilo. Dicha variante de enlace aumenta cuando los espermatozoides pasan al epidídimo.

Durante la fecundación los espermatozoides experimentan una reacción acrosomal en la cual la mayor parte del contenido acrosómico se libera o expone a través de aberturas

creadas por fusión del plasma y membrana acrosómica externa. La hialuronidasa liberada dispersa las células monticulares que rodean al ovocito recién ovulado.

La proacrosina es el precursor de una enzima proteolítica, la acrosina que se piensa que ayuda a los espermatozoides que están penetrando, a digerir un camino a través de la zona pelúcida. El segmento ecuatorial difiere del casquete acrosómico en que su contenido no se libera durante la reacción acrosómica inicial, sino que es expuesta cuando el espermatozoide penetra en la zona pelúcida. Sin embargo, los espermatozoides, pueden ser capaces de penetrar mecánicamente en la zona pelúcida por medio de su propia motilidad.

La vaina mitocondrial de los gametos masculinos, rica en fosfolípidos, varía mucho entre especies respecto al número de mitocondrias y composición bioquímica. Dichos gametos contienen enzimas del sistema respiratorio citocromooxidasa de citocromo y la vía glucolítica. Están presentes asimismo otras enzimas metabólicas, incluyendo la deshidrogenasa de lactato específica de los espermatozoides, conocida como LDH-X.

Los nucleótidos adenina y guanina, ricos en energía son componentes importantes de la energética espermática, como lo son también las proteínas del axonema, tubilína y dineína. Se ha demostrado que la dineína espermática, que es la principal proteína en los brazos de los microtúbulos axonémicos, es una ATP asa activada por cationes divalentes (Hafez, 2002).

2.4 Crioconservación Espermática

La reducción de la temperatura por debajo de los 37°C y, principalmente de 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 N₂ líquido, sino mantener la integridad en un rango de temperatura, entre -15°C y -60°C, en el que se producen los mayores daños, y que las células experimentan en dos ocasiones, es decir, durante la congelación y durante la descongelación. A -196°C no se producen reacciones térmicas, puesto que por debajo de -130°C no existe agua en estado líquido (Mazur, 1984, citado por Almela, 2014).

En el toro, la dilución y refrigeración a 5°C provocan edema del acrosoma en el 50% de los espermatozoides (Andrade, 2005). La actividad respiratoria del espermatozoide disminuye, así como la glucolisis, lo que provoca una reducción en los niveles de ATP y, por tanto, la pérdida de la motilidad. En síntesis, podemos mencionar que los daños provocados por el proceso de congelación y descongelación son los siguientes:

- Deshidratación celular, que provoca un aumento de la permeabilidad no selectiva de las membranas celulares a consecuencia de cambios en la distribución de sus componentes, especialmente los lípidos, y la formación de “pliegues” en la membrana, debido a los cambios de volumen, que pueden llegar a producir el contacto y la eventual fusión entre membranas contiguas.
- Aumento de la concentración de solutos intra y extracelulares, que pueden resultar tóxicos para la célula.
- Estrechez de los canales de líquido extracelular no congelado, lo que impide la acomodación celular en los mismos, provocando deformación y posibles lesiones celulares (Holt, 2000, citado por Almela, 2014).

2.4.1 Antecedentes históricos

Tenemos que remontarnos a 1677 para encontrar los primeros estudios sobre el espermatozoide, cuando la Real Sociedad de Londres anuncia su hallazgo de haber encontrado células móviles en el semen humano. 100 años más tarde, el cura italiano Abbe Lázaro Spallanzani observó que el semen de humanos, potros y ranas podían conservarse durante 30 minutos en la nieve y tras ser calentados nuevamente recuperaban su motilidad. Mantegazza en 1866 también confirmó que el semen podía ser conservado a bajas temperaturas.

En las distintas especies animales los protocolos de congelación del semen se han ido desarrollando de manera paralela a la inseminación artificial, a partir de los resultados obtenidos en la especie humana; así Chang y Walton en 1940, sugieren bajar la temperatura al semen para bajar el metabolismo celular. Los componentes de los diluyentes seminales también han ido evolucionando, en el año 1939 Phillis introduce la yema de huevo para evitar daños en el proceso de congelación. En aquellos tiempos se daba poca importancia a los agentes crioprotectores, y se intentó preservar el semen con técnicas como la vitrificación, que es un proceso de congelación tan rápida que no da opción a la formación de cristales, sin embargo no fue hasta que se descubrió el uso del glicerol por (Polge, 1952) cuando comenzaron a obtenerse resultados esperanzadores tras la congelación, puesto que el glicerol proporcionaba al espermatozoide las condiciones adecuadas para que resistiera temperaturas bajo cero. Esto permitió hacer diversos experimentos para diseñar nuevos protocolos de congelación y que la técnica despegase definitivamente. De hecho, el semen de varias especies se congela y utiliza con éxito en la

IA. Sin embargo, y con excepción de los bóvidos, la utilización generalizada de semen congelado no se ha extendido a otras especies domésticas (Holt, 2000).

2.4.2 Estrés oxidativo

Con la criopreservación se busca conservar las células espermáticas, sin embargo, se presentan algunos inconvenientes, tales como el estrés oxidativo al que se ven sometidos los espermatozoides.

Se le llama oxidación a todo proceso en el que existe una pérdida de electrones y existe captación de hidrógeno, a la vez se llama una reducción a la captación electrones y pérdida de oxígeno. Toda oxidación se acompaña de una reducción, que se denominan reacciones redox; siendo de gran importancia debido a que los seres vivos aprovechan la energía libre a partir de ellas (Villalba, 2014), pero hay que valorar que no sean excesivas.

Se define estrés oxidativo un proceso en el cual hay un aumento en la velocidad de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) junto con una disminución del sistema de defensa, dando como resultado una alta concentración en estado estacionario de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Villalba, 2014).

Los espermatozoides espontáneamente producen diversas ROS, las especies oxidantes tienen un papel importante en los procesos de fosforilación de la tirosina asociadas con la capacitación espermática, pero cuando estos exceden las defensas antioxidantes de las células, ponen en alerta su capacidad fecundante (Bilaspuri et al., 2011, citados por Tabarez, 2014).

2.4.3 Protección antioxidante

Diferentes compuestos son los responsables de la protección antioxidante en la célula: glutathione reductasa (GSH), glutathione peroxidasa (GPx), la catalasa (CAT) y el superóxido dismutasa (SOD), malonaldehído (MDA), tal y como describen (Marti et al. en 2003, citados por Asadpour et al., 2012).

Por otro lado, la cisteamína induce a las células a consumir la cisteína permitiendo así la síntesis GSH, a consecuencia de esto el ciclo de la cisteamína cumple con el papel de mecanismo de defensa contra la formación de las ROS (Merto, et al. 2013, citados por Güngör et al., 2016).

También el Butirihidroxitulueno (BHT) hace parte de un sistema antioxidante natural que contribuye con el mecanismo de peroxidación lipídica en el semen (Shoae y Zamiri, 2008, citados por Asadpour et al., 2012).

En un estudio reportado por Bucak et al., en 2009 durante el desarrollo del embrión del bovino, ovino, porcino, hámster y búfalos, se señala que las cisteamínas disminuyen niveles de peróxidos de hidrógeno, igualmente observaron que la cisteamína elevaba los porcentajes de motilidad espermática en los espermatozoides ovinos tras la descongelación (Güngör et al., 2016).

Olfati et al. en 2014 evaluaron los parámetros espermáticos tras la congelación con el uso de diferentes niveles de MDA, SOD y GPx en toros Holstein y Simmental, observando que los medios ricos en GSH y SOD mejoraron la motilidad progresiva para la raza Holstein ($p < 0,05$), mientras que para la raza Simmental mejoraron la motilidad progresiva y el test de resistencia osmótica HOST ($p < 0,001$), comparados con el grupo control. En el semen de los toros Holstein hubo menor efecto del MDA y mayor para la actividad del GPx, comparado con el grupo control ($p < 0,05$). Para el semen de los toros Simmental se observó mayor actividad del SOD comparadas con el grupo control ($p < 0,001$). Se concluyó que la mejor combinación (GSH \times SOD) mejora el porcentaje de los parámetros espermáticos poscongelación, reflejado en una escasa reacción de peroxidación lipídica y un aumento de las enzimas antioxidantes.

2.5 Proteómica del Plasma Seminal

La proteómica del plasma seminal puede predecir la fertilidad del macho, puesto que aporta información sobre el contenido o ausencia de proteínas de membrana específicas que intervienen en la fecundación. Para que esta tenga lugar, varios fenómenos deben ser tenidos en cuenta: la motilidad de la célula espermática, la capacitación y reacción acrosómica y la interacción con la zona pelúcida del ovocito. Todos ellos conllevan la fusión de los gametos y la formación del cigoto (Restrepo et al., 2013).

El plasma seminal (PS), una secreción fisiológica de múltiples glándulas del tracto reproductivo masculino, es un fluido muy complejo y es el medio natural para la maduración final de los espermatozoides mediante la presencia de hormonas enzimáticas y la sucesión de eventos modificadores de la superficie (Mann y Lutwak, 1981). El enfoque proteómico del plasma seminal es una herramienta valiosa para identificar las proteínas que juegan un papel clave en la maduración de los espermatozoides, su viabilidad y el proceso de

fertilización. Aunque la identificación de proteínas del PS (Moura, et al., 2010), proporciona muchas ideas acerca de su relación con los fenómenos biológicos, la mayor parte de sus funciones exactas aún no se conocen. Proteínas asociadas a la fertilidad se describen en el PS, así como glicoproteínas que participan en el reconocimiento del ovocito por parte del espermatozoide y la modulación tanto de la capacitación como de reacción acrosómica espermáticas.

2.5.1 Proteína ácida del líquido seminal (aSFP)

La contribución de las proteínas del aSFP en la respuesta a la congelación es también una cuestión de estudio en varias especies, incluyendo el toro, macho cabrío (Rebolledo et al., 2007), el búfalo (Harshan et al., 2006) o el jabalí (Casas et al., 2009). Comparando el perfil de proteínas aSFP de toros con alta y baja congelabilidad seminal, Jobim et al. en 2004 sugirieron dicha proteína como marcador de buena congelabilidad del semen. La aSFP es una proteína no ácido glicosilada con un peso molecular de 12,9 kDa, sintetizada principalmente por la ampolla y el epitelio de la vesícula seminal de toro en altas concentraciones (2-7 mg / ml en PS). Moura y colaboradores en 2010, describieron también su presencia en el líquido del epidídimo.

Esta proteína no se ha detectado en otros tejidos bovinos ni en otras especies de mamíferos, tales como la cabra, oveja, cerdo, rata, perro, incluso la especie humana, (Einspanier et al., 1993). Presenta aproximadamente un 50% de aminoácidos con una secuencia similar a las de los polipéptidos de la familia Spermadhesin (Einspanier, et al., 1994), pero con diferentes características biológicas, aSFP se une sólo débilmente a la tapa acrosomal de espermatozoides eyaculados bovinos y se libera cuantitativamente durante la capacitación in vitro (Dostàlovà et al., 1994, citados por Barajas, 2013). Además, aSFP no posee ni hidratos de carbono ni capacidades de unión a la zona pelúcida del ovocito, lo que refuerza el planteamiento de que la aSFP no está implicada en la interacción entre gametos, (Ekhlasi et al., 2008).

2.5.2 Proteínas BSP A1 / A2

Basado en el peso molecular (PM), y punto isoelectrico (pI), la banda de proteína de peso molecular del 15 al 17 kDa y pI entre 4,5 a 5,5 se podría pensar que corresponden las cuales mostraron la mejor densidad óptica pueden corresponder a proteínas BSP A1 / A2,

que desarrollan un papel muy importante en el proceso de congelación del semen bovino. (Jobim et al., 2004).

Las proteínas BSP A1 / A2 tienen una significativa afinidad con la heparina del plasma seminal bovino (*HSP*), por unirse específicamente con los fosfolípidos y la colina en el momento de la eyaculación, lo que le confiere la capacidad para mediar en el flujo de colesterol y fosfolípidos (Thérien et al., 1998).

Tras la criopreservación seminal se observa una disminución significativa (70- 80%) de la concentración de proteínas BSP, lo que indica que acontecen cambios en la membrana de los espermatozoides durante la congelación, lo que puede alterar las propiedades de la membrana, dando lugar a la capacitación prematura de los espermatozoides después de la descongelación (Nauc y Manjunath, 2000, citados por Mascarenhas, et al., 2009b). Por lo tanto, se puede suponer que una mayor cantidad de esta proteína en el PS, podría dar una mayor estabilidad de la membrana de los espermatozoides durante el proceso de congelación del semen.

El mecanismo de acción de las BSP en la criopreservación de semen consiste en que, durante la eyaculación, las proteínas BSP secretadas por las vesículas seminales se unen a la membrana de los espermatozoides e inducen el eflujo de colesterol y fosfolípidos de la membrana. Si el semen no se diluye, está expuesto continuamente a altas concentraciones de proteínas BSP en consecuencia la eliminación de los lípidos es continua, resultando en una disminución de la capacidad de resistencia de la célula espermática al choque térmico y la congelación (Manjunath et al., 2007, citados por Mascarenhas et al., 2009b).

2.5.3 Proteínas **P25b** (Proteínas de superficie)

La P25b es una proteína de superficie de los espermatozoides adquirida durante su tránsito por el epidídimo (Sullivan y Robitaille, 1989). Esta proteína se comporta como una mediadora entre la interacción de gametos, actuando como una molécula de unión de la zona pelúcida (Bérubé y Sullivan, 1994; Boué y otros, 1994, citados por Mascarenhas et al., 2009b). La P25b fue considerada como un marcador de la fertilidad bovina (Parent et al., 1999); y la infertilidad en el bovino está asociada a bajos niveles de esta proteína. Por lo tanto, la pérdida de proteína que se produce en el proceso de congelación puede ser suficiente para reducir la fertilidad de semen de bovino congelado (Lessard et al., 2000).

2.5.4 Proteínas **AFP** y **AFGP**

Otras proteínas han surgido como quizás la perspectiva para la adición al semen congelado, a fin de minimizar las lesiones de la criopreservación. Se descubrió un pez en la Antártida que podía soportar la congelación, hecho que se atribuye a la presencia de proteínas específicas, las que más tarde se denominaron proteínas anticongelantes, (De Vries y Wohlschlag, 1969). Las proteínas anticongelantes (AFP) y glicoproteínas de congelación (AFGPs) protegen las células frente a la crioconservación mediante la modificación de la forma de los cristales de hielo (Ishiguro y Rubinsky, 1994; Chapsky y Rubinsky, 1997, citados por Mascarenhas et al., 2009b). Se conocen cuatro AFP diferentes: LPFH, AFPII, AFPIII, AFPIV y también se ha identificado AFGPs, pero sólo tres formas de estas proteínas están disponibles comercialmente: LPFH, AFP III y AFGP (Mascarenhas et al., 2009b).

Sendos estudios han demostrado el efecto positivo de la adición de AFP en la congelación de semen en chimpancé (Younis et al., 1998) y ovejas (Payne et al., 1994), puesto que proporcionaron un aumento en el porcentaje de espermatozoides móviles después de la descongelación. Sin embargo, en los espermatozoides de ratón, se observó una relación inversa entre las concentraciones de AFP y el porcentaje de espermatozoides vivos después de la descongelación (Koshimoto y Mazur, 2002, citados por Mascarenhas, et al., 2009b).

El grupo de Prathalingam en 2006 valoró el efecto de añadir el LPFH y AFGP AFPIII a cuatro concentraciones (0,1; 1,0; 10,0 y 100,0 µg/ml) en el diluyente para la congelación de semen bovino. LPFH, AFPIII y AFGP no afectaron la proporción de células viables ni a la integridad del acrosoma postdescongelación. Sin embargo, se observó un aumento de la resistencia osmótica cuando el semen se trató con LPFH de 0,1; 1,0 y 10,0 µg/ml.

2.5.6 Espermadhesinas

Las espermadhesinas pertenecen a la familia de glicoproteínas de bajo peso molecular (12-16 kDa), y que tienen diferentes funciones, (Romero et al., 1997). Estas proteínas se unen a la superficie del espermatozoide durante la eyaculación (Sanz et al., 1992; Topfer-Petersen et al., 1998).

Hasta la fecha, las espermadhesinas han sido identificadas en el plasma seminal porcino: AWN, AQN-1, AQN-3 (Calvete et al., 1996), PSPI / PSP-II (Varela et al., 1997); en el plasma seminal bovino: ASFP (Wempe et al., 1992); Z13 (Tedeschi et al., 2000); en el

plasma seminal equino: HSP-7 (Reinert et al., 1996) y en el plasma seminal ovino: Espermadhesina 15,5 kDa (Bergeron et al., 2005 citados por Mascarenhas et al., 2009a).

La espermadhesina Z13 es una proteína que tiene una relación inversa con la fertilidad, encontrándose en mayor cantidad en el fluido de las glándulas accesorias bajando la fertilidad reproductiva del toro (Moura et al., 2006). Killian y colaboradores en 1993 mediante el uso de la misma técnica en toros Holstein, encontraron un péptido más abundante de bajo peso molecular en el plasma seminal en un grupo de toros infértiles, por lo que fue llamado factor antifertilidad y más tarde fue identificado como la espermadhesina Z13 (Moura et al., 2006).

La espermadhesina Z13 tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en un 50% a la proteína ácida a partir de fluido seminal bovina (aSFP) y un 43% de homología con los inhibidores de la motilidad de espermatozoides (SPMI) que se encuentran en el plasma seminal de los seres humanos, (Tedeschi, et al., 2000; Robert y Gagnon, 1996), así como en la especie porcina (Iwamoto, et al., 1995, citados por Mascarenhas, et al., 2009a).

También se ha comprobado que las espermadhesinas y sus agregados presentan afinidad por la manosa, pudiendo ser las responsables de la formación del reservorio oviductal en la zona de la unión útero-tubárica, ya que se ha demostrado que esta afinidad esta correlacionada positivamente con la habilidad para interactuar con el epitelio oviductal, (Jelínková et al., 2004; Liberda et al., 2006). Por último, las espermadhesinas AQN-1, AQN-3, AWN y sus agregados presentan afinidad por las cadenas de carbohidratos de la zona pelúcida, lo que sugiere que podrían estar involucradas en el reconocimiento entre gametos, (Jonáková et al., 2000, citados por Mercado, 2011).

2.5.7 Fosfolipasa A₂ (**PLA₂**)

Esta proteína del PS bovino tiene un PM de 60 kDa y pI de 5,6 Soubeyrand, et al., (1997), mientras que el análisis de componentes de proteínas de membrana de los espermatozoides PLA₂ detecta una isoforma 16 kDa. (Rönkkö et al., 1991, citados por Moura et al., 2006).

La expresión de isoformas de la PLA₂ en el fluido de las glándulas accesorias de novillos Holstein también es frecuente en los toros de alta fertilidad, y parece que la contribución de la fertilidad de la PLA₂ "in vivo" es significativa (Moura et al., 2006).

La PLA₂ asociada a la membrana de los espermatozoides participa en la síntesis de ácido araquidónico cuando es activado por la progesterona, Ca⁺⁺ y la proteína quinasa C. El ácido araquidónico se convierte entonces en la prostaglandina E₂ ciclooxigenasa, que induce el flujo de Ca⁺⁺ a través de la membrana de los espermatozoides que resulta en la fusión de la membrana y la reacción del acrosoma. La prostaglandina E₂ activa la fosfolipasa A₂ causando posteriormente un aumento en el calcio. PLA₂ también participa en la interacción espermatozoide con el ovocito se activa por la interacción con la zona pelúcida y mecanismos intracelulares de segundos mensajeros (Yuan et al., 2003).

La PLA₂ se presenta como una enzima multifuncional y sus interacciones con la fertilidad pueden ser resultado de varios factores (Moura et al., 2006).

2.5.8 Proteínas del choque térmico (Hsp)

Las proteínas de choque térmico (Hsp) son moléculas con propiedades altamente conservadoras, que se expresan bajo situaciones de estrés celular en todos los organismos vivos, desde las células procariontas hasta las células eucariotas (Lindquist, 1966; James et al., 1997). La primera descripción de la respuesta celular al choque térmico data de hace más de tres décadas en las glándulas salivales de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), las cuales mostraron signos de inflamación tras la exposición al calor (Ritossa, 1962). La identificación del gen responsable de esta inflamación se realizó posteriormente y con ello surgió el término "proteínas de choque térmico" (Tissiere, et al., 1974, citados por Sandoval, 2013).

Las Hsp se clasifican dentro de cuatro diferentes familias de acuerdo a su peso molecular medido en kilo Dalton (kDa), más que por sus funciones: Hsp27, Hsp60, Hsp70, y Hsp90 kDa, (Haas et al., 1991). Recientemente, se han identificado otras de mayor peso molecular a nivel embrionario (Hatayama et al., 1997). Las Hsp que ejercen funciones más importantes sobre la fisiología reproductiva son la Hsp 60 y 70. Las familias de las Hsp 60 se expresan de manera constitutiva o inducida por estrés celular moderado. El sitio de expresión de las Hsp60 es la mitocondria (Jindal y otros, 1989), aunque también se expresa en otros sitios, incluyendo la superficie celular, (Soltys y Gupta, 1996, citados por Bañuelos, et al., 2001).

Existen cuatro fases durante el proceso de espermatogénesis, que involucran situaciones complicadas de actividad y diferenciación celular como la proliferación amitótica de la espermatogonia, el desarrollo meiótico de los espermatozoides, el desarrollo post-

meiótico de las espermátidas y la maduración de los espermatozoos. Al tratarse de un fenómeno tan complejo, no es sorprendente que este proceso se vea acompañado de la expresión de diferentes tipos de Hsp (Meinhardt et al., 1999, citados por Bañuelos, et al., 2001).

2.5.9 Osteopontina (OPN)

La osteopontina es una glicoproteína ácida originalmente identificada y aislada a partir de la matriz ósea bovina (Franzen y Heinegard, 1985). Se identificó en las células de Sertoli, y en el epitelio seminífero en la cola de los espermatozoides de rata (Siiteri et al., 1995). El antisuero contra osteopontina humana y antisuero preparado contra la osteopontina purificado de plasma seminal bovino reaccionó con la proteína en el plasma seminal y las vesículas y ampollas de fluidos seminales, lo que lleva a la conclusión de que las principales fuentes de Osteopontina son las vesículas y ampolla seminal en el caso del bovino (Cancelar et al., 1999 citados por Mascarenhas et al., 2009b).

Varios estudios en bovinos, con el uso de anticuerpos específicos han demostrado que la OPN es una de las proteínas del plasma seminal asociadas con la fertilidad. Además, Henault y colaboradores en 1995 encontraron que la exposición a los fluidos de las glándulas sexuales accesorias de toros de alta fertilidad mejoró la capacidad fecundante del esperma de los toros de baja fertilidad. Curiosamente, el grupo de Moura en 2006 encontraron que los toros de alta fertilidad Holstein tienen mayores concentraciones de OPN en los fluids accesorios de las glándulas sexuales que los toros de baja fertilidad, citados por (Boccia et al., 2013).

Muchos mecanismos han sido asignados a la relación de las OPN con la Fertilidad: Cancelar y su grupo en 1999 mencionaron que la relación puede ser indirecta, mediante la protección de la superficie epitelial de las glándulas accesorias contra infecciones bacterianas conferida por esta proteína (Brown et al., 1992) mencionan que se une a los receptores de la integrina situados en la superficie del epitelio celular, y que tienen un papel protector en infecciones bacterianas. La OPN parece estar involucrada en la adhesión celular a través de la familia de las integrinas de los receptores (Craig et al., 1989) y los receptores para integrina parecen tener un papel fundamental en la unión de espermatozoide ovocito, la preimplantación y la implantación (Vinatier, 1995). Esto podría explicar la relación de esta proteína con la fertilidad.

2.5.10 Clusterina

La Clusterina es otra proteína que ha mostrado una relación inversa con la fertilidad. En el ganado vacuno, las tasas positivas de inmunodetección de Clusterina en espermatozoides se correlacionaron inversamente con la tasa de fecundidad (Ibrahim et al., 2000). La Clusterina es el nombre de una glicoproteína que tiene puntos de unión a la heparina (Pankhurst et al., 1998) y puede regular el transporte y la redistribución de los lípidos en suero sanguíneo humano (Jenne et al., 1991). Es abundante en el hígado, cerebro y testículos del bovino (Palmer y Christie, 1992), y en otras especies en el epidídimo (Fouchécourt et al., 2000), también se encuentra en el plasma seminal, así como en la superficie de la membrana de las células espermáticas del bovino y el hombre (Howes et al., 1998). La Clusterina está involucrada en muchos procesos fisiológicos, incluyendo la adhesión celular y la agregación (Blaschuk et al., 1983) y la maduración del espermatozoide (Sylvester et al., 1991 citados por Mascarenhas et al., 2009b).

2.5.11 Proteína prostaglandina D-Sintasa

La prostaglandina D, una proteína de 26 kDa, pI 6,2, se forma activamente en diversas células y tejidos, incluyendo los órganos genitales de machos y hembras, (Ujihara et al., 1988; Blodorn et al., 1996 y Gerena et al., 1998). Es la principal proteína secretada por las células epiteliales del epidídimo en muchas especies, como la ovina y equina (Fouchécourt et al., 1999) o el ganado bovino (Gerena et al., 1998), así como en el hombre (Tokugawa et al., 1998). En el ganado vacuno, la PGDS también se localizó en la región apical del acrosoma (Gerena et al., 2000, citados por Mascarenhas et al., 2009b).

A través de inmunocitoquímica, se observó la ubicación específica de la prostaglandina en el tejido intersticial del testículo, las células de Sertoli y las células principales de la cola del epidídimo de los ratones. Esta localización sugiere que esta proteína tiene un papel importante en el proceso de desarrollo y maduración de la célula espermática (Gerena, et al., 2000). Sin embargo, el papel exacto que tiene sobre los espermatozoides todavía no es muy claro (Moura et al., 2006).

El papel de la PDGS sobre la fertilidad es contradictorio; por un lado, una mayor expresión de las PGDS en el PS se asocia con toros Holstein adultos de alta fertilidad evaluados "in vivo". Por otra parte, tres isoformas del fluido epididimario PGDS mostraron mayor expresión en los toros Holstein de baja fertilidad, (Killian et al., 1993; Gerena et al., 1998, citados por Moura et al., 2006).

Estas observaciones están de acuerdo con Fouchécourt, et al., en 2002, quienes encontraron bajas concentraciones de PGDS en el semen de carneros y toros de alta fertilidad. Una vez conocido que grandes cantidades de esta proteína, en el tracto genital pueden afectar la función reproductiva, puede asumirse que dicha función se desarrolla mejor cuando la concentración de proteína es baja.

2.5.12 Caltrina (inhibidor del transporte de Ca)

Se ha postulado que los niveles de Ca^{++} libre en el citoplasma se acumulan en bajas concentraciones en espermatozoides de eyaculados frescos por la sensibilidad de la calmodulina ATPasa dependiente de Ca^{++} que inhibe la capacitación. La inhibición de calmodulina o calmodulina sensible a las ATPasas Ca^{++} produce un incremento en la concentración intracelular de Ca^{++} , que se refleja en una mayor proporción de espermatozoides capacitados (Fraser, et al., 1995). Esto sugiere que la constante circulación de Ca^{++} citoplasmático por ATPasas- Ca^{++} juega un papel importante en la prevención de la capacitación prematura de los espermatozoides, sin embargo, la inhibición de los intercambiadores de Na^{+}/Ca^{++} por un péptido de plasma seminal de 10 kDa (Caltrina) previene los aumentos de Ca^{++} por los espermatozoides de bovino en eyaculados frescos, (Rufo, et al., 1984). La proteína kinasa C (PKC) y el voltaje dependiente de los canales de Ca^{++} parecen estar involucrados en los incrementos de Ca^{++} (Córdoba et al., 1997), a este respecto la despolarización del potencial de la membrana plasmática es un prerrequisito para que la zona pelúcida desencadene la reacción acrosomal (Zeng et al., 1995; Arnoult et al., 1996, citados por Avalos, 2004).

3.-JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los bovinos Criollos en América Latina se encuentran distribuidos en diversas regiones y países, en sistemas de producción de leche y carne. Algunas de las razas bovinas Criollas que se pueden mencionar en Colombia son: Romosinuano, Blanco Orejinegro (*BON*), Hartón del Valle (*HV*), Sanmartinero (*SM*), Costeño Con Cuernos (*CCC*), entre otras.

Investigaciones realizadas en la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica Tibaitatá y Corpoica La libertad) desde el año 2008, han demostrado que toros reproductores de las razas criollas como Sanmartinero, Romosinuano, Costeño Con Cuernos y Blanco Orejinegro, presentan altos índices de penetración de ovocitos *in vitro* comparados con toros de razas foráneas e introducidas como Cebú y Holstein. Aunque se sabe del buen comportamiento reproductivo de los machos bovinos criollos, aun no se conoce con exactitud las razones de su fertilidad superior (Rueda, 2011), sin embargo las razas cebuínas como el Gyr lechero a pesar de tener buenos índices de producción en zonas de trópico bajo, también presentan deficiencias en los eyaculados de los machos, reflejados en la disminución de los valores de algunos parámetros espermáticos, tales como la integridad de los acrosomas, o procesos como la capacitación espermática y la misma reacción acrosómica. Probablemente esto sea atribuible a la interacción de las proteínas del plasma seminal sobre la membrana de los espermatozoides

Debido a que las células espermáticas no poseen capacidad fecundante en el eyaculado, sí se adquiere al momento de interactuar con el tracto reproductivo de la hembra (Swamy, 2004); algunas proteínas del PS se unen a estas células gracias a la afinidad por los lípidos de membrana, lo que ocasiona una reconfiguración en su estructura (capacitación espermática), lo cual sucede al momento de la eyaculación cuando las proteínas llamadas BSP (Bovine Seminal Plasma), se unen a la membrana provocando este fenómeno. Dichas proteínas son sintetizadas por las glándulas vesiculares, se conocen como BSP A1, A2 y A3, con pesos moleculares de 15 a 15,5 kDa, (Manjunath, 1993), de igual manera incrementan la motilidad del espermatozoide cuando se unen a su parte media (Sánchez, 2004, citados por Rueda F. , 2011).

En los últimos años se han identificado, aislado y caracterizado varias proteínas del PS, en diversas especies como el porcino, el equino, el ovino, el bovino y el humano entre otras. Los resultados de estos estudios sugieren que la composición proteica del plasma seminal es diferente entre especies y que algunas de ellas están asociadas a la fertilidad de

las mismas. Sin embargo, las correlaciones entre las proteínas del plasma y las variables de calidad seminal han sido poco estudiadas.

Basados en esas investigaciones en las que se demuestra la importancia del PS en el comportamiento de las células espermáticas en el proceso de conservación en refrigeración o congelación, se plantea entonces replicar esos estudios con la raza criolla Hartón del Valle comparando con el cebú Gyr, determinando los perfiles electroforéticos 1D SDS-PAGE.

Teniendo en cuenta este antecedente y conociendo la proteómica del PS de los toros criollos colombianos y su influencia sobre la fisiología normal de las células espermáticas en los procesos reproductivos como la resistencia al choque frío, reconocimiento de la ZP del ovocito, capacitación y reacción acrosómica, estaríamos en condiciones de valorar la influencia del plasma seminal de toros criollos Hartón del Valle sobre los eyaculados de los toros Cebú Gyr.

Por todo ello los objetivos que se plantean en el trabajo son:

1. Determinar los perfiles electroforéticos unidimensionales de proteínas de plasma seminal (*PS*) de toros criollos HV y cebú Gyr, para establecer su posible relación con los parámetros de calidad seminal.
2. Valorar el efecto del reemplazo de dos niveles de PS del eyaculado de toros cebú Gyr por los mismos niveles de PS de toros criollos HV sobre dichos parámetros en los protocolos de preservación seminal, bien en refrigeración o en congelación

4.-MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Material Biológico

Para el primer objetivo se empleó semen de cuatro toros criollos de la raza criolla Hartón del Valle propiedad de la Hacienda Zanjón Hondo en el municipio de Tuluá, departamento del Valle y cinco de la raza cebú Gyr propiedad de la Ganadería LOS PAISAS en la ciudad de Pereira departamento de Risaralda estando ambos departamentos situados en Colombia (Figura2). Las edades de los toros comprendían entre los 3 y los 5 años. Se realizaron tres extracciones a cada toro de cada raza a un ritmo de una recogida semanal.

En el caso del segundo objetivo, se trabajó con el grupo de toros criollos en la hacienda "Zanjón Hondo", del municipio de Tuluá en el departamento del Valle - Colombia, allí se contó con un núcleo puro de ésta raza; se utilizaron cuatro animales que cumplían los requisitos de reproductores aptos para la investigación. Por el lado del grupo de animales cebú Gyr, éstos procedían de la Ganadería "Los Paisas" área rural del municipio de Pereira - Risaralda - Colombia, también contaba con toros puros de la raza y máximos exponentes en ferias ganaderas en todo el país. Ambas ganaderías tenían las mismas características climatológicas y sistemas de manejo de los animales. Los toros criollos HV y cebú Gyr permanecían en diferentes sitios geográficos, pero con condiciones ambientales y de manejo muy similares; los sistemas de alimentación a base de pastoreo con pasto estrella (*Cynodon dactylon*), sal y agua. Durante la fase de experimentación los animales no tuvieron contacto con las hembras.

Los cuatro toros criollos fueron colectados una vez por semana durante tres semanas, cada animal se colectó dos veces el mismo día teniendo en cuenta el periodo refractario para garantizar un buen volumen de eyaculado para extraer evaluar y congelar su PS. Los cinco toros cebú se colectaron igualmente una vez por semana durante tres semanas y dos eyaculados.

Las colectas se realizaron por el método de electroeyaculación (Electrojac 5) utilizando una intensidad promedio de 17 milivoltios. Los eyaculados recogidos se mantenían en el baño María a 37°C hasta tener todas las muestras. Antes de proceder a la separación del PS, se hicieron los respectivos análisis espermáticos a tener en cuenta para el desarrollo del siguiente capítulo de esta investigación.

Figura 2. Raza criolla Hartón del Valle y Raza Cebuina Gyr



Fuente: El autor, (Revista EL CEBÚ N° 382, 2011)

4.1.2 Material Inventariable

En la Tabla 1 se describen los materiales y equipos inventariables utilizados durante el trabajo de investigación.

Tabla 1. Materiales y equipos inventariables

EQUIPO	CASA COMERCIAL
Baño termostático	Minitube
Centrífuga refrigerada	Minitube
Cuantificador de proteínas	Bio-Rad
Documentador de imágenes ChemiDoc™ MP System	Bio-Rad
Electroeyaculador (electrojac 5)	Minitube
Equipo de electroforesis	Bio-Rad
Espectrofotómetro	NANODROP (ND 1000®)
Fotómetro Spermacue	Minitube
Incubadora térmica, 4 – 60°C	Minitube
Microscopio con contraste de fases	Olympus
Termo N ₂ líquido	MVE
Vórtex	Bio-Rad

4.1.3 Material Fungible

En la Tabla 2 se detallan en orden alfabético todos los insumos utilizados en el desarrollo de la investigación.

Tabla 2. Material fungible

INSUMO	CASA COMERCIAL
Aceite mineral	Sigma
Ácido acético	Merck
Acrilamida	Serva.
Amfolitos (pH: 3-10)	Sigma
APS	Sigma
Bisacrilamida	Bio-Rad.
Bromo fenol	Sigma
BSA	Sigma
CHAPS	Sigma
Colorante Comassie Blue G-250	Merck
Diluyente comercial Andromed®	Minitube
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Dodecyl sulfato sódico (SDS)	Sigma
EDTA	Sigma
Enzima N-Glycosidasa F	Roche
Etanol	Merck
Fosfometilsulfonilfluoruro PMFS	Sigma
Glicerol	Sigma
Glicina	Merck
Inmobilón P	Millipore
Iodoacetamida	Sigma
Marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad
Membranas Sequi-Blot de PVDF	Bio-Rad.
Metanol	Merck
Sulfobetaina (SB 3-10)	Sigma
Temed	Sigma
Thiourea	Sigma
Tiras de poliacrilamida pH (3 a 10) inmovilizado (IPGs) en aceite mineral	Bio-Rad
Tributilfosfina (TBP)	Sigma
TRIS	Serva
Urea	Sigma

4.2 Metodología

Para llevar a cabo el primer objetivo de este trabajo, se contó con la colaboración de los laboratorios de Microbiología Molecular del Centro de Biotecnología y Bioindustria de CORPOICA, sede Tibaitatá en Cundinamarca, a donde fueron llevadas las muestras del PS extraído previamente de los eyaculados de los toros a evaluar.

4.2.1 Colecta de semen

Antes de la utilización del electroeyaculador (Electrojac 5), utilizando una intensidad promedio de 17 milivoltios, se procedió a la preparación del animal, lo cual incluía: recortar los pelos del orificio prepucial y limpiar suciedades, en caso de ser necesario lavar y secar cuidadosamente el área. Un ayudante procedía a limpiar el recto y a estimular mediante masaje transrectal las glándulas accesorias y, posteriormente, se introducía el electrodo adecuado.

Se recogió la fracción espermática rica en espermatozoides, y se colectó utilizando un mango adaptado a un embudo de látex conectado a su vez a un tubo graduado. Una vez obtenida la muestra se trasladó al baño termostático a 37 °C para proceder a su valoración en fresco, y posteriormente tras la centrifugación, necesaria para iniciar el proceso de refrigeración.

4.2.2 Obtención del PS

La separación del PS se realizó mediante centrífuga refrigerada a 4°C con una intensidad de 2500 rpm durante 7 minutos. El sobrenadante se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y el nuevo sobrenadante obtenido se filtró mediante una membrana *Millipore 6V de 0,22 μm*. Al filtrado se le adicionó un inhibidor de proteasas PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride, 2 μl por 1 ml de PS) para impedir que las enzimas proteasas fragmenten las proteínas del plasma seminal. Posteriormente la muestra se guardó a -20°C hasta su uso (Figura 3).

En el caso del segundo objetivo, el plasma no fue adicionado con ningún inhibidor de proteasas. El PS heterospérmico se almacenó congelado heteroplásmico de los cuatro toros, hasta el momento de realizar los reemplazos a 25 y 50%, previa remoción en las mismas cantidades en los eyaculados de los toros cebuínos, como se describe en los tratamientos siguientes.

En la tabla 3, se muestran los tratamientos que se hicieron con retirada del 25 y 50% del PS en los eyaculados de los toros cebú Gyr y se reemplazaron en los mismos niveles por el de los toros criollos HV almacenados para tal fin. Se hicieron las evaluaciones de los parámetros seminales en refrigeración a 0, 1 y 24 horas, igualmente después de la congelación de la siguiente manera:

Tabla 3. Descripción de los tratamientos

Tratamiento	Descripción tratamientos aplicados
T 0	Eyaculado Gyr + diluyente comercial (Andromed®)
T1	Eyaculado Gyr – 25% PS + diluyente comercial
T2	Eyaculado Gyr – 25% PS + 25% PS criollo + diluyente comercial
T3	Eyaculado Gyr – 50% PS + diluyente comercial
T4	Eyaculado Gyr – 50% PS + 50% PS criollo + diluyente comercial

Figura 3. Obtención del plasma seminal



4.2.3. Cuantificación de las proteínas

Se cuantificaron 8 bandas de proteínas con pesos moleculares MW de 13, 15, 25, 38, 63, 68, 72 y 174 kDa para la raza Gyr, mientras que en el caso de la raza Hartón del Valle fueron 9 bandas de proteínas con MW 13, 15, 25, 38, 68, 72, 83, 121 y 174 kDa. Para ello se utilizó el protocolo diseñado por Bradford en 1976. Se utilizó como reactivo el colorante Comassie Blue G-250, sensibilidad (1-100 µg), la reacción finaliza a los 5 minutos y la muestra es estable para su lectura durante 1 hora. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro que mide la cantidad de luz absorbida por la muestra, en un rango de longitud de onda de 280 nanómetros. Se realizó una curva estándar, para ello se utilizó BSA 0,5 mg/ml junto con el reactivo e incubándose durante 5 minutos. Con la curva establecida pudimos obtener el dato de las proteínas totales presentes en el plasma seminal.

Una vez obtenidos los eyaculados y evaluados, como los datos se salían de la curva, fue necesario realizar una dilución 1:50. Sin embargo, en el caso de los toros HV la absorbancia continuaba siendo demasiado elevada (413-8) y se consideró adecuado llevar su dilución a 1:100.

Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 280 nanómetros, los datos se interpolaron en la ecuación de la recta $y = mx + b$, donde:

$$y = \text{Abs. 280}$$

$$m = \text{pendiente}$$

$$x = \text{la concentración de proteínas}$$

$$b = \text{ordenada al origen}$$

El manejo de los datos arrojados por el lector se organizó para valores de absorbancia a 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800; que interpolados a la ecuación de la recta quedó así:

$$y = 0,0002x + 0,1674$$

Para este caso el (R^2 es de $0,9982$), el R^2 debe ser 1,0 o mínimo 0,98. En el *cuadro1*. aparecen los datos de cuantificación de las proteínas del PS.

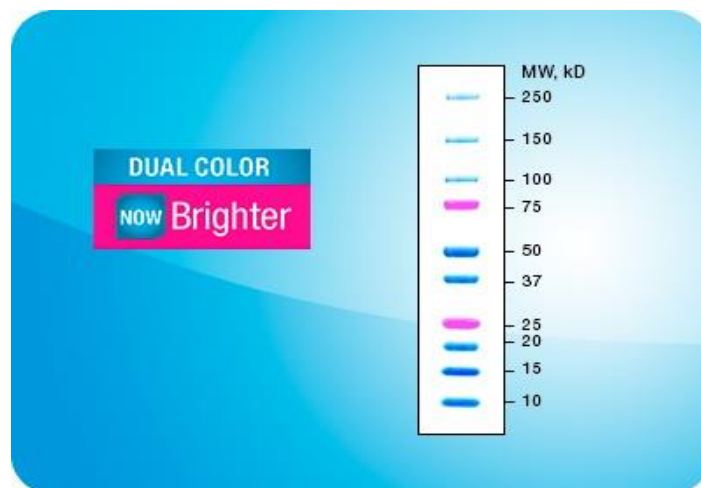
4.2.4. Separación de las proteínas mediante electroforesis

Las proteínas se separaron por el procedimiento de electroforesis en una dimensión (1D) SDS-PAGE según el protocolo de Laemmli (1990).

Para efectuar el procedimiento, se realizaron geles de 7 x 8 cm, y de 1,0 mm de grosor. Cada gel se realizó en gradiente de concentración lineal de poliacrilamida (10% - 20%) *Figura 5A*. Las soluciones de poliacrilamida se prepararon a partir de una solución stock al 30%, en un tampón con Tris-Base 1,38 M, EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 0.5M y SDS (Dodecyl sulfate de sodium) 10% en agua a pH 7.0; la polimerización se realizó con 0.8µl/ml de TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine) y 17 µl /ml de APS (Persulfato de amonio) al 10% *Figura 5B*. Para determinar el peso molecular de las bandas de proteína, se utilizó el marcador de peso molecular Precision plus protein Estándar (Bio-Rad ®), cuyo rango de peso es de 10 a 250 *kDa*. (Figura 4)

La electroforesis se realizó a 180 voltios durante 65 minutos (*Figura 5C*). Se usó una solución amortiguadora (solución tampón) de corrida compuesto por Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS al 0,1% (pH 8,3) (*Figura 5C*). La tinción del gel se efectuó con azul brillante de Comassie (1%), diluido en metanol: ácido acético: agua en relación 4,5: 1: 4,5 (Flesch y Gadella, 2000). Los geles permanecieron en solución de tinción durante 1 hora, posteriormente se retiró la solución de tinción, y el gel se cubrió con una solución decolorante a base de metanol-ácido acético hasta la visualización de las bandas de proteína. (Figura 5).

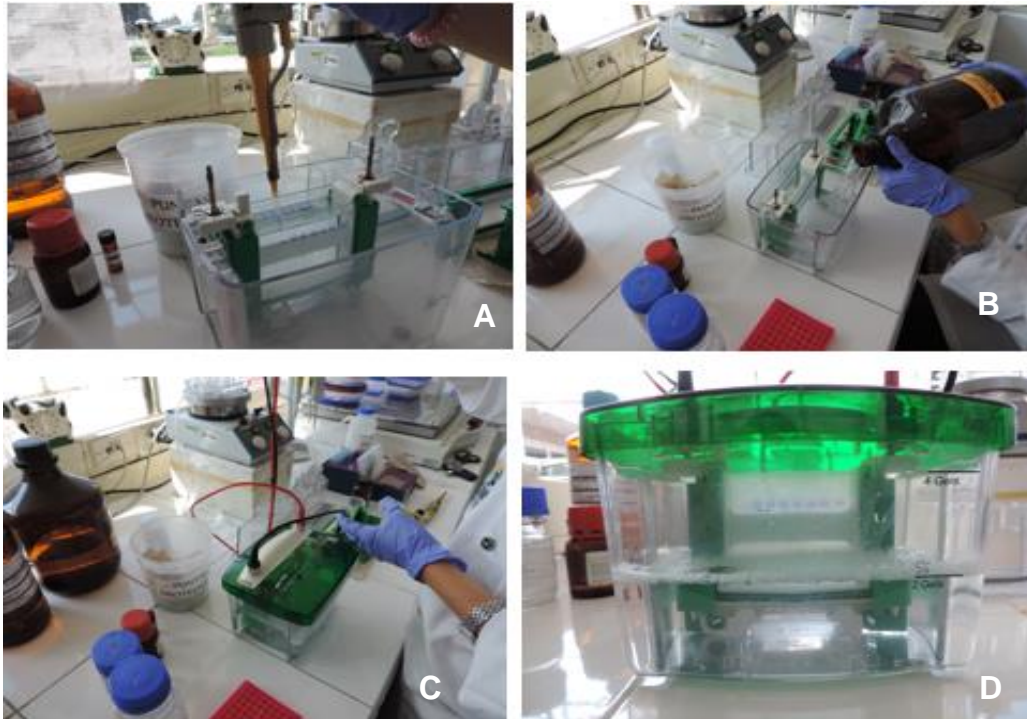
Figura 4. Precision Plus Protein™ Dual Color Standards #1610374(Bio Rad)



4.2.5 Captura y análisis de las imágenes de los geles

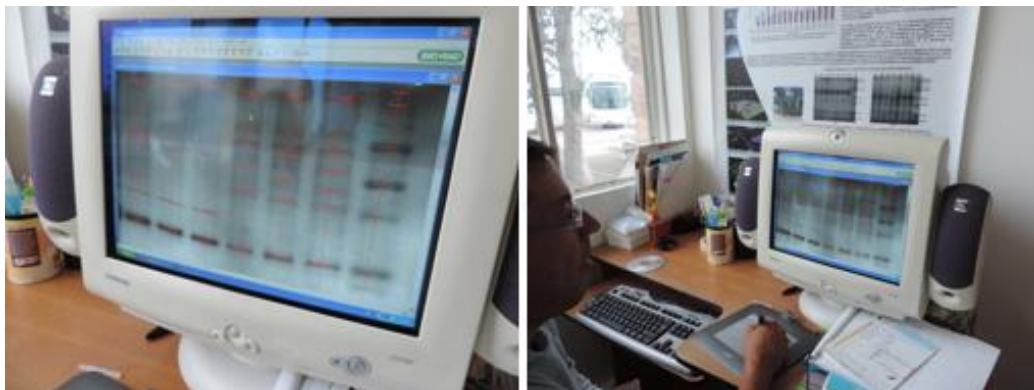
Una vez visualizadas las bandas, se procedió a la digitalización de los geles introduciéndolos en el documentador de imágenes (Molecular Imagen Gel Doc, Bio-Rad ®). Las imágenes obtenidas se analizaron con el Software Quantity One ®, en el cual se determina el peso molecular cada banda y mide las densidades ópticas de sus proteínas; teniendo en cuenta esa medición, se estima una cantidad relativa de proteína para cada una de ellas (Figura 6).

Figura 5. Procedimiento de la electroforesis 1D



A. Llenado de pocillos; B. Polimerización; C. Electroforesis a 180V; D. Solución amortiguadora.

Figura 6. Cuantificación de las bandas de proteínas digitalizadas



4.2.6 Evaluación de los parámetros espermáticos

Una vez extraído el semen de cada uno de los toros se realizó la evaluación de la calidad seminal tanto macroscópica como microscópicamente (volumen, color y densidad, pH, concentración, motilidad masal, motilidad individual progresiva, vitalidad, morfoanomalías, integridad del acrosoma y resistencia al test osmótico).

Volumen (V)

Primero se determinó el volumen contenido en el tubo graduado de recolección, luego con el uso de una pipeta graduada se aspiró toda la muestra registrando su volumen expresado en mililitros.

Color y densidad

El color se determinó por su aspecto, el cual estuvo asociado a su calidad (entre blanco cremoso a blanco lechoso). La densidad se determinó por el grado de opacidad, variando de denso cremoso a denso acuoso; algunos toros presentaron y semen en tono amarillo con olor normal que se consideraron normales y asociados a la presencia de riboflavina.

pH

Se estableció en cada eyaculado utilizando papel indicador (PANPEHA ®, Sigma Aldrich).

Concentración espermática (C_e)

Se determinó la cantidad de espermatozoides para cada eyaculado mediante la utilización de un fotómetro Spermacue (Minitube Iberica) calibrado para bovinos, colocando una gota de semen puro sobre la cubeta, que se rellenaba por capilaridad y se insertaba posteriormente para su lectura. La concentración se expresó en Spz x 10^6 /ml. Los valores fueron considerados normales para cada raza y estuvieron acordes con el color y densidad.

Motilidad masal (*Mm*)

Se colocó una gota de semen puro (20 µl) sobre un portaobjetos en el microscopio óptico con objetivo de 10x y con platina atemperada a 37 °C. Se estimó mediante una valoración subjetiva del movimiento masivo de los espermatozoides, según Evans et al. (1990), con un rango de 0 a 5.

Motilidad individual progresiva (*Mip*)

Para ello, se colocó una gota de semen puro (20 µl) sobre un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos atemperado. Se valoró con el objetivo de 40x. Se observó un campo y se valoró subjetivamente. Los espermatozoides que se movían en forma rectilínea progresiva, siendo éstos los que atraviesan el campo de observación, se consideraron como motiles progresivos. Los espermatozoides que giraban en círculo o en forma oscilatoria, se consideraron con movimientos anormales. El porcentaje que se indica es el de los espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo del total de espermatozoides.

Vivos y muertos (*V y M*)

Se estimó la vitalidad espermática mediante la tinción de eosina-nigrosina descrita por Eliasson y Treichl (1971). Una muestra de semen y un volumen igual de una solución de eosina-nigrosina (5 % *p/v* de eosina amarilla, 10 % *p/v* de nigrosina en una solución salina) se depositó sobre un portaobjetos, se homogenizó la mezcla y se hicieron extensiones en capa fina. Tras el secado al aire de la extensión, se observaron bajo microscopía de campo claro a 40X al menos 200 células, diferenciando aquellas que estuvieron parcial o totalmente teñidas de las que no permitieron el paso del colorante. El resultado se expresó como el porcentaje de espermatozoides no teñidos.

Células normales (*Cn*)

Las morfoanomalías de las células espermáticas se realizaron con la misma placa de tinción para *VyM*, en un microscopio de contraste de fases a 100X con objetivo de inmersión, evaluando la morfología de al menos 200 células espermáticas. Los resultados se expresaron en un porcentaje total que incluyó los grupos de anomalías. Las morfoanomalías se clasificarán de acuerdo con Howard y Pace (1988) en presencia de gota

citoplásmica proximal, colas en látigo, colas en ovillo, otras (alteraciones de la cabeza, colas y cabezas sueltas, colas dobles, etc.).

Acrosomas normales (*An*)

Para determinar el estado de los acrosomas, se utilizaron 90 μ l de glutaraldehído atemperado a 37°C, preparado para ésta prueba, a la que se le adicionaron 10 μ l de semen diluido a igual temperatura para fijar la muestra. Se observaron al menos 200 espermatozoides, clasificando como acrosomas normales aquellos que presenten espermatozoides con bordes apicales bien definidos y nítidos en forma de semiluna oscura (Pursel y Johnson, 1974). Los resultados se expresaron como porcentaje de acrosomas normales.

Endosmosis (*End*)

Esta prueba se realizó tomando 90 μ l de solución hipoosmótica (100 mOsm/l) atemperada, a la que se le adicionaron 10 μ l de semen diluido a la misma temperatura. La mezcla se incubó al baño maría a 37°C durante 15 minutos; seguidamente se le agregaron 100 μ l de glutaraldehído igualmente atemperado, para fijar la muestra. Una gota de la muestra procesada y fijada se depositó en un portaobjetos y se cubrió. Las muestras se valoraron con el objetivo 40X, contando 200 células y determinando porcentaje de espermatozoides con reacción de membrana (cola enrollada).

4.2.7 Congelación de las muestras

Una vez diluida la muestra según el tratamiento, se realizó el descenso térmico para pasar de 37°C a 5°C en un lapso de 2 horas, seguidamente se hizo un periodo de equilibrado de otras 2 horas. En este periodo se espera que el crioprotector empiece a ejercer su acción sobre las células espermáticas para protegerlas del choque frío.

A continuación, se procedió al llenado de pajuelas de 0,5 ml (20 por cada tratamiento) previa dilución con el diluyente comercial Andromed® garantizando una concentración de 30×10^6 espermatozoides con motilidad progresiva morfológicamente normales (Spz MPMN).

La congelación se hizo colocando las pajuelas en las rejillas de congelación sobre vapores a una distancia de 7 cm del nivel de nitrógeno líquido durante 10 minutos, para

pasar luego a sumergirlas totalmente en el nitrógeno para ser almacenadas en canastillas dentro del termo de congelación.

4.2.8 Evaluación de las muestras postcongelación

Se escogieron muestras al azar por tratamiento después de una semana de congelación, se les aplicó el mismo protocolo de evaluación seminal que el descrito en el caso del semen fresco y refrigerado para así determinar el efecto de la remoción y adición de PS heterospérmico de toros criollos sobre los toros cebú tras la congelación.

4.2.9 Análisis Estadístico

Para el análisis de los datos resultantes de los perfiles electroforéticos unidimensionales de proteínas de plasma seminal (*PS*) de toros criollos HV y cebú Gyr, se utilizó el paquete estadístico de SAS[®] (versión 9.2). Los datos obtenidos se sometieron a una prueba de t, que permitió establecer las diferencias estadísticas de las variables entre razas y entre toros. De otro lado, los datos se sometieron al procedimiento de correlación de Pearson, para determinar la correlación entre las variables de calidad seminal y los valores de concentración de las proteínas, así como también la correlación entre las proteínas.

En el caso de los datos relacionados con los parámetros seminales tras los diferentes tratamientos de adición de plasma seminal, se utilizó el paquete estadístico SPSS19. Para la evaluación de la calidad seminal de los toros del estudio en los distintos momentos de preservación se aplicó un Modelo Lineal Generalizado (GLM). En aquellos casos en los que se observaron diferencias significativas entre las medias, se realizó además una prueba de rango post hoc para clasificar los toros en función de los valores medios obtenidos. Se aplicó una T Student para muestras pareadas que comparaban diferentes variables en ambas razas, y una prueba de Levene para determinar las diferencias estadísticas ($p < 0,05$).

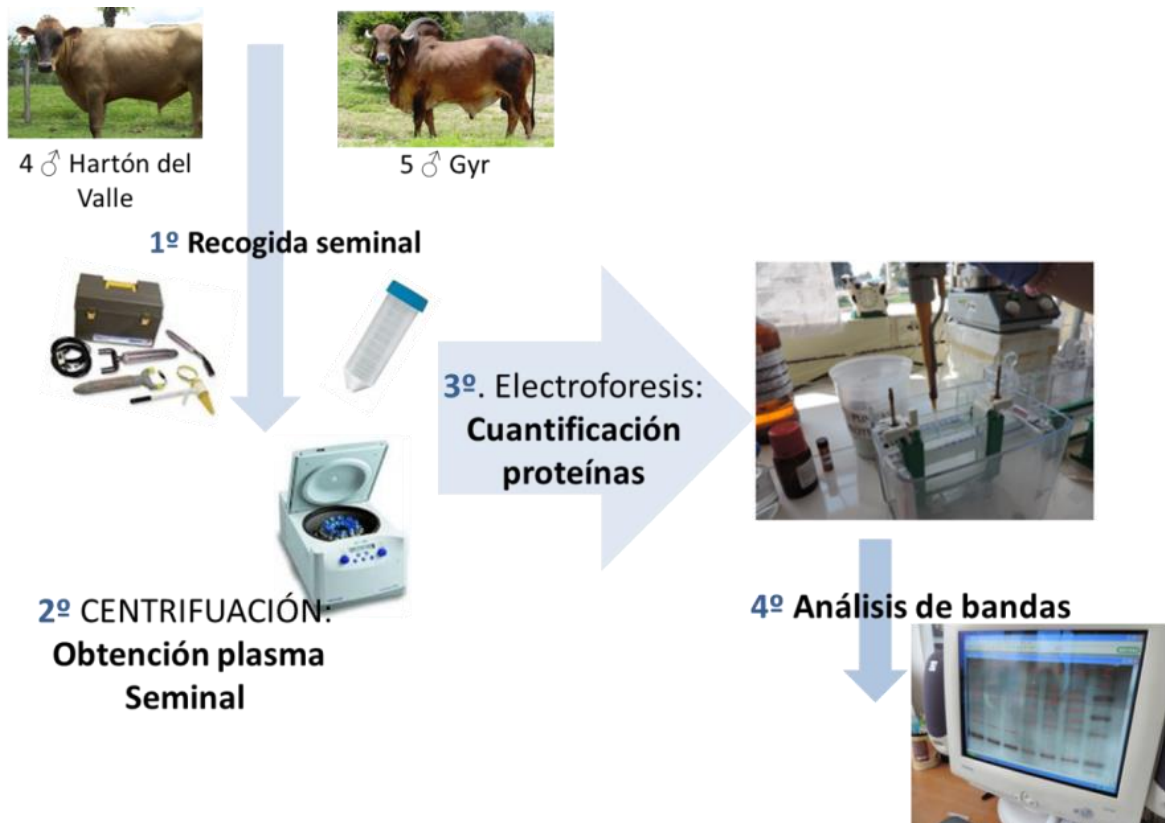
Para analizar el efecto de la adición de plasma seminal se aplicó una T Student de muestras pareadas, comparando tiempos de conservación y protocolo de adición de plasma seminal.

5.-Diseño Experimental

5.1 Perfiles electroforéticos unidimensionales de proteínas de plasma seminal

En la siguiente figura queda descrito el diseño experimental que se planteó para alcanzar el primer objetivo.

Figura 7. Diseño experimental primer objetivo



5.2 Influencia del plasma seminal sobre los parámetros seminales

Al igual que el en caso del primer objetivo, en el segundo se ha seguido un diseño experimental similar, que queda recogido en la figura 8.

Figura 8. Diseño experimental segundo objetivo



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Perfiles electroforéticos unidimensionales de proteínas de plasma seminal

Para esta primera fase se tuvieron en cuenta las variables de los parámetros espermáticos en ambas razas y en segundo lugar la cuantificación de las proteínas por el método Bradford de todos los toros, los mapas electroforéticos 1D de proteínas del PS, al igual, que la correlación de las cuantificaciones de las proteínas que presenta éste entre toros criollos con toros cebú.

6.1.1. Evaluación espermática en de las razas cebú y criollas

Se valoraron los datos de las variables espermáticas: volumen, concentración, motilidad masal e individual y vitalidad para cada grupo racial. Los resultados de las variables sin hacer referencia al grupo racial teniendo en cuenta el promedio y la desviación estándar fueron $9,74 \pm 2,99$ (ml) para volumen, $502,89 \pm 241,51$ (Spz x 10^6 / ml) para concentración, $85,00 \pm 4,61$ (%) para motilidad masal, $85,00 \pm 6,65$ (%) para motilidad individual progresiva y $75,11 \pm 4,18$ (%) para vivos y muertos.

Los anteriores resultados para cada variable están dentro de los valores promedio de las razas cebuínas pero con diferencias entre las razas criollas evaluadas en trabajos realizados en Corpoica por (Rueda, 2008).

También se evaluaron los parámetros de calidad espermática dentro de cada grupo racial con la prueba estadística *t de Student*, la tabla 4 muestra que el semen de los toros criollos Hartón del Valle presentan valores superiores a los toros cebú Gyr para la variable concentración espermática ($P < 0,001$).

Tabla 4. Valores promedio y desviación estándar de los parámetros de calidad seminal de los toros de la raza cebú Gyr y criollo Hartón del Valle ($P < 0,001^*$)

	V	Ce	MM	MIP	VyM
RAZA	<i>Media±D.Est.</i>	<i>Media± D.Est.</i>	<i>Media±D.Est.</i>	<i>Media±D.Est.</i>	<i>Media±vD.Est.</i>
Gyr	8.47 ± 3.18	357.60± 203.4	82.33± 2.58	80.00± 3.27	73.73± 3.19
HV	11.33± 1.83	684.50±142.95*	88.33± 4.44	91.25± 3.77	76.83± 4.75

La concentración espermática superior que presentaron los toros criollos HV sobre los cebú Gyr ($P < 0,0001$), evidencia la posibilidad que estos poseen una mejor capacidad de fecundar un mayor número de ovocitos, lo que también se refleja en mayores porcentajes de fertilidad de las razas bovinas criollas. Esto se corrobora con estudios hechos por Sánchez en 2009, en los que encuentra mayores valores de la concentración espermática en toros criollos colombianos Sanmartinero que en los cebú, atribuyéndolo a la circunferencia escrotal (35,5 cm vs. 36,5 cm) y la correlación entre el número de espermatozoides producidos por cm^2 de tejido testicular.

En la prueba de rango múltiple de Duncan para la variable concentración espermática, la tabla 5, agrupa las medias, las repeticiones y el toro. Los toros cebú se enumeraron de 1 a 5 y los toros criollos siguen la secuencia de 6 a 9. Dicha tabla detalla en orden secuencial el potencial de los toros, siendo más relevantes las razas criollas sobre las razas cebú.

Tabla 5. Prueba del rango múltiple de Duncan para concentración espermática para el efecto TORO (Gyr y Hartón del Valle).

Duncan Agrupamiento	Media	N	Toro
A	727.0*	3	8*
AB	707.0	3	7
AB	696.3	3	9
ABCD	607.7	3	6
ABCD	450.0	3	4
ABCD	399.7	3	2
BCD	327.7	3	5
CD	314.3	3	1
D	296.3	3	3

Según la prueba de Duncan, el toro 8 corresponde al grupo de los toros criollos y fue el mejor de los reproductores para la variable concentración espermática (A), sin embargo el toro 3 de la raza cebú reflejó el valor más bajo de todos los animales evaluados (D).

Con esta prueba se debe tener en cuenta que las medias con la misma letra no son significativamente diferentes. Para las demás variables no hubo diferencias estadísticas diferentes. Para las demás variables no se encontraron diferencias significativas que merezcan incluirse en tablas y figuras.

6.1.2. Determinación de los mapas electroforéticos 1D

Los mapas unidimensionales de las proteínas de PS de los toros cebú Gyr y criollos HV, se obtuvieron mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico o SDS-PAGE, en una dimensión (1D).

En las Figuras 9 y 10, se relacionan los mapas electroforéticos 1D referenciales de las proteínas del PS de los cinco toros Cebú, y en las *figuras 6.3 y 6.4* de los cuatro toros criollos HV. En total se hicieron 27 mapas referenciales (tres por cada toro) para garantizar la repetitividad del ensayo. Al margen derecho de la figura, se encuentra el marcador de peso molecular (*MW*) expresado en kilo Dalton (kDa).

Como se observa en la Figura 9, el análisis de la imagen de los geles unidimensionales del PS de los tres primeros toros Cebú, permitió establecer que el toro 1 presenta 8 bandas y los demás toros cuatro bandas. Se encuentran 4 bandas de proteínas con pesos moleculares (*MW*) de 15, 25, 68 y 174 kDa presentes en los tres toros identificadas con flechas de color rojo y se les asignó como nombre el de su peso molecular aproximado. Igualmente están marcados con flecha de color verde las bandas de proteína con valores de 250, 72, 38 y 13 kDa, por estar presente en todas las muestras del toro 1.

Las bandas de 15 y 25 kDa están presentes en todos los toros (1 a 3) siendo las de mayor porcentaje de concentración en el plasma seminal y están marcadas con símbolo de color amarillo en el mapa referencial. Dichas concentraciones que se mencionan están expresadas en porcentaje, el programa de analizador de geles convierte las unidades de densidad óptica en valores porcentuales.

En la Figura 8, igualmente para los toros 4 y 5 de la raza cebú se pueden observar 7 bandas proteínas con MW de 72, 38 y 13 kDa para el toro 4 marcadas con flecha de color verde, el toro 5 presenta solo 4 bandas de proteínas. Las bandas con MW de 15, 25, 68 y 174 kDa están presentes en ambos toros y están marcadas con flechas de color rojo, siendo las que tienen mayor concentración las bandas de proteína de 15 y 25 kDa marcadas con símbolo amarillo.

Figura 9. Mapa electroforético 1D bandas de proteínas PS Gyr (Toros 1 a 3)

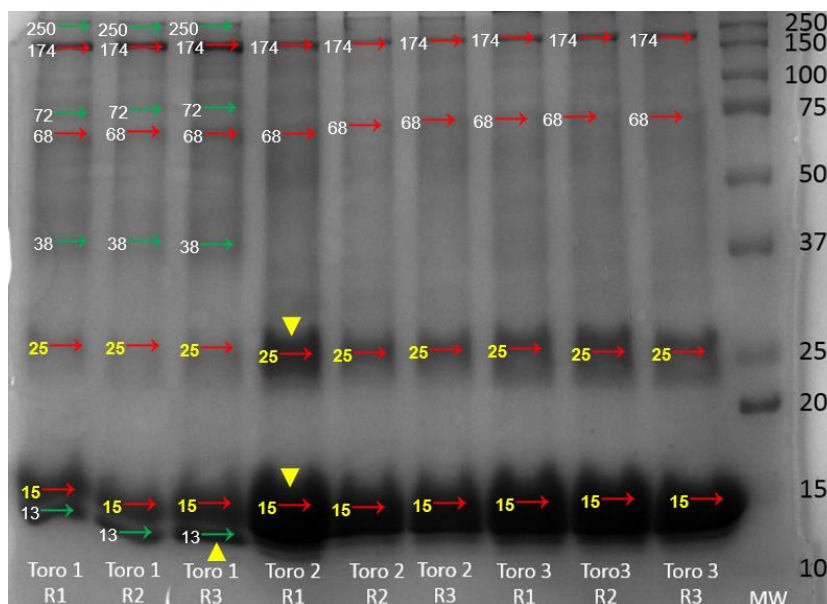
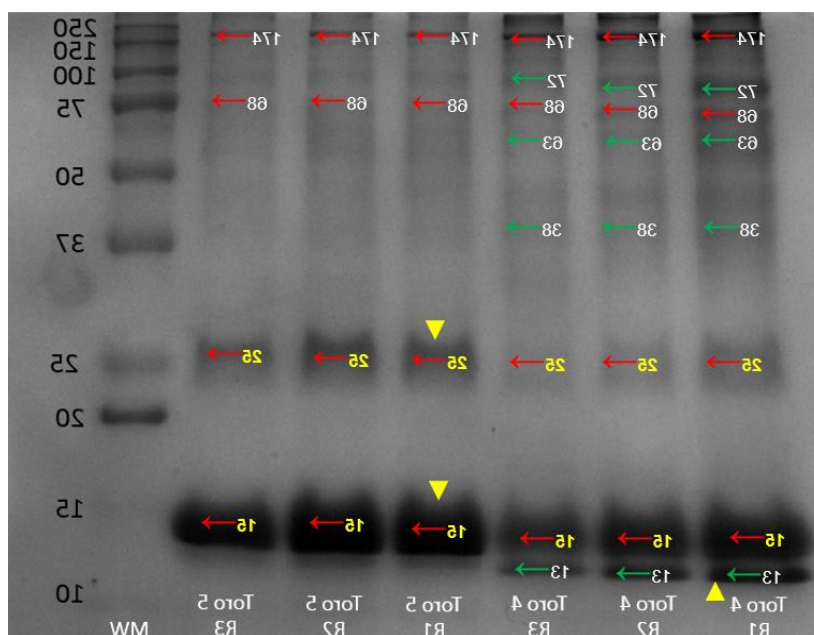


Figura 10. Mapa electroforético 1D bandas de proteínas PS Gyr (Toros 4 y 5)

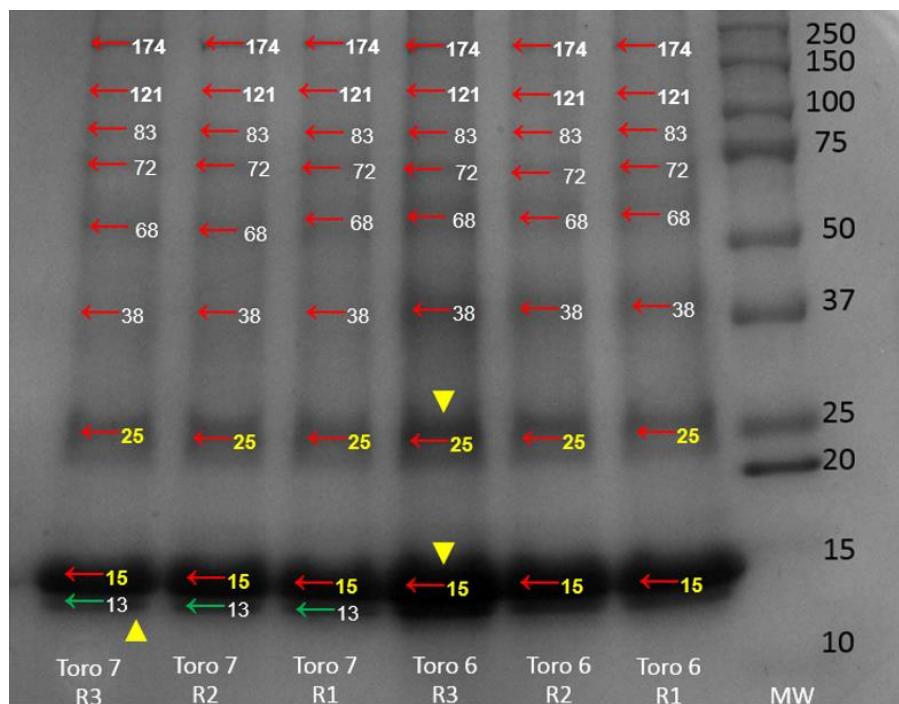


Las bandas con MW de 15, 25, 38, 68, 72, 83, 121 y 174 kDa están presentes en ambos toros y están marcadas con flechas de color rojo. Las bandas de proteína de 15 y 25 kDa marcadas con símbolo amarillo son las que tienen mayor concentración.

En la Figura 11, se muestran los toros criollos 6 y 7 descritos en forma inversa, se puede observar que el toro 6 presenta 8 bandas de proteína, mientras que el toro 7

presenta 9 bandas. Las bandas de proteína con MW de 13 kDa presentes en ese toro se marcan con flecha de color verde.

Figura 11. Mapa electroforético 1D bandas de proteínas PS HV (Toros 6 y 7)

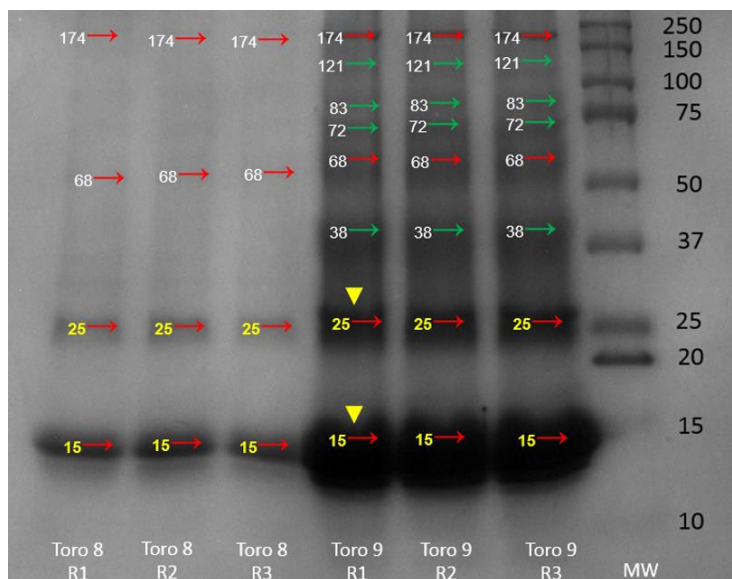


Finalmente, la Figura 12, para los toros criollos 8 y 9 el mapa electroforético referencial de las proteínas del PS, muestra 4 bandas para el toro 8 y 8 bandas para el toro 9. Se encuentran bandas de proteínas con MW de 121, 83, 72 y 38 kDa marcadas con flecha de color verde para el toro 9. Las bandas de proteínas con MW de 174, 68, 25 y 15 kDa marcadas con flecha de color rojo se encuentran en ambos toros, siendo las bandas de 25 y 15 kDa quienes presentan la mayor concentración de proteínas marcadas con símbolo amarillo.

En los mapas electroforéticos referenciales 1D de las proteínas del PS se encontraron 8 bandas de proteínas para los toros cebú y 9 para los toros criollos.

Los toros Gyr presentaron bandas con MW de 250 y 63 kDa que no están presentes en los toros HV, mientras que en el PS de los toros criollos se encuentran proteínas con MW de 121 y 83 kDa que no están presentes en los toros cebú, todos estos valores corresponden a valores de concentración de proteínas marcadas con flecha de color verde en las Figuras 9 a 12.

Figura 12. Mapa electroforético 1D bandas de proteínas PS HV (Toros 8 y 9)



El PS de los toros Gyr presentaron bandas con MW de 250 y 63 kDa que no están presentes en los toros HV, mientras que en el de los toros criollos se encuentran proteínas con MW de 121 y 83 kDa que no están presentes en los toros cebú, todos estos valores corresponden a valores de concentración de proteínas marcadas con flecha verde en las Figuras 7 a 10.

La presencia de bandas de proteínas con MW entre 15 y 25 kDa con mayor cuantificación en el PS para la mayoría de los toros, hace suponer que corresponden a proteínas *BSP* (Bovine Seminal Plasma) teniendo en cuenta trabajos de investigación realizados por Thérien y colaboradores, (1998), hacen referencia a su importancia en el proceso de congelación del semen, por la protección frente choque térmico que confieren. Hay que tener en cuenta que estas proteínas son secretadas por las vesículas seminales y se unen a la membrana espermática permitiendo el flujo continuo de colesterol y fosfolípidos, lo que a su vez después de la congelación permite la capacitación prematura de los espermatozoides. Este hecho hace que nos planteemos que si el semen no se diluye está expuesto a altas concentraciones de proteínas BSP, lo que permitiría la eliminación continua de lípidos y la menor resistencia de la célula espermática al choque frío y la congelación.

Se encontraron 7 bandas de proteínas en PS que están presentes tanto en las razas cebuínas como en las razas criollas, en su orden con un MW de 13, 15, 25, 38, 68, 72 y 174 kDa (Tabla 6).

Solo tres bandas de concentración de proteínas del PS entre razas (MW 38, 68 y 174 kDa) presentaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) (Tabla 6).

La banda con MW de 174 kDa y 9,13% de concentración de proteínas en PS presentó diferencia altamente significativa ($P < 0,0001$) a favor de la raza Gyr, sin embargo en el caso de la banda de 68 kDa con 3,60% de concentración de proteínas la diferencia altamente significativa ($P < 0,0001$) se encontró a favor de la raza criolla HV. (Tabla 6).

Por último en la Tabla 7 podemos observar que solo dos bandas de proteínas del PS cuyo MW son 83 y 121 kDa, están presentes exclusivamente en todas las muestras de tres de los cuatro toros de la raza criolla Hartón del Valle, lo que hace suponer que no sean moléculas propias del perfil electroforético de la raza, por lo cual se recomienda hacer otras investigaciones con un número superior de animales que permitan saber si son propias de algunos individuos o corregir posibles errores que confirmen la exclusividad en el PS de los toros criollos Hartón del Valle.

Tabla 6. Valores de concentración relativa y significancia de bandas de proteínas del PS de los toros de las razas cebú Gyr y criollo Hartón del Valle ($P < 0,05^*$, $P < 0,001^{**}$)

Banda de Proteína (kDa)	Concentración relativa de proteínas (% mg)		
	Raza Cebú Gyr	Raza Criolla HV	Significancia (P)
250	1,63		
174	9,13	4,46	0,0001**
121		0,56	
83		0,96	
72	1,98	2,10	
68	1,73	3,60	0,0001**
38	3,48	4,62	0,0048*
25	15,35	14,50	
15	62,44	67,14	
13	21,77	16,97	

En la Tabla 6, se puede ver que las proteínas del PS de MW 15, 25, 68 y 174 kDa las comparten todos los toros y todos los muestreos para ambas razas. Mientras que las bandas con MW 13, 38 y 72 kDa están presentes entre toros y entre razas, pero no con la misma frecuencia e intensidad.

Dentro del rango de proteínas del PS con MW entre 15 y 30 kDa según datos de investigaciones internacionales se pueden encontrar la familia de las BSP, monómeros de clusterina, espermadhesina Z13 para las razas cebú y criollo Sanmartinero, mientras que la proteína ácida del plasma seminal aSFP solo se detectaron en el Sanmartinero (Rueda, 2011), lo que puede sugerir que también se encuentre en la raza Hartón del Valle de esta investigación.

Proteínas con MW entre 30 y 60 kDa entre las cuales se pueden encontrar la clusterina y la osteopontina que son relevantes en la calidad espermática y la fertilidad, en este grupo de proteínas se podría ver la banda de proteína 38 kDa encontrada en las razas estudiadas (Gyr y HV) con alta significancia en esta investigación.

La proteína de 68 kDa encontrada para las dos razas con un alto nivel de significancia, está directamente asociada con toros de alta fertilidad y a efectos beneficiosos para la congelación. Podría estar relacionada con la osteopontina (Barajas, 2013).

Todas estas discusiones ponen de manifiesto que hace falta realizar más investigaciones sobre biología molecular del semen bovino con un mayor número de animales y más razas criollas que permitan fijar un estándar sobre las proporciones de intercambio de PS para mejorar los parámetros de fertilidad para semen fresco y descongelado.

Tabla 7. Relación entre bandas de proteínas del PS y su frecuencia de presentación en los toros de las razas cebú Gyr y criollo HV

Banda de Proteína (kDa)	Raza Cebú Gyr		Raza Criolla HV	
	n veces que presentaron la banda	n toros que presentaron la banda	n veces que presentaron la banda	n toros que presentaron la banda
250	3	1		
174	12	4	12	4
121			9	3
83			9	3
72	6	2	9	3
68	12	4	12	4
38	6	2	9	3
25	12	4	12	4
15	12	4	12	4
13	6	2	3	1

6.1.3. Correlaciones entre bandas de proteínas de PS y las variables de calidad seminal de las razas Gyr y HV

Las diferentes variables de calidad espermática están muy relacionadas con el PS, quien interfiere con las propiedades características de la membrana celular entre las cuales se puede mencionar el flujo de colesterol y fosfolípidos, reconocimiento de la zona pelúcida por parte del ovocito ó protección anticongelante, entre otras; de allí la importancia del estudio de sus proteínas mediante la biología molecular. Por ese motivo en esta primera experiencia se tuvo en cuenta por un lado los parámetros espermáticos de los eyaculados, y por otro la parte proteómica del PS.

Se analizaron las variables dependientes de la calidad espermática (volumen, concentración espermática, motilidad masal, motilidad individual progresiva, y vitalidad) al igual que la concentración de las proteínas para las bandas más significativas con MW 38, 68 y 174 kDa (Tabla 8) mediante el paquete estadístico de SAS[®] (versión 9.2), para correlacionar cada variable.

El análisis de la concentración de proteínas del PS en sus bandas con MW 174, 68 y 38 kDa y su relación con las variables de calidad espermática entre los toros de las razas cebú y criollo, se tuvieron en cuenta por su importancia en la fisiología de la célula espermática.

Mediante el método de Coeficientes de correlación Pearson, entre bandas de proteínas del PS y las variables de calidad espermática, se pudo evidenciar que las bandas con MW 174, 68 y 38 kDa, aunque están presentes en los toros de ambas razas no tienen correlación significativa independiente (raza Gyr o raza HV), pero si presentan diferencias significativas entre razas (efecto raza Gyr vs HV). La correlación entre razas no presenta diferencias estadísticas significativas para la banda de proteína con MW 38 kDa (Tabla 8). Lo cual permite suponer la posibilidad del intercambio de PS de la raza criolla HV para mejorar los parámetros espermáticos de la raza cebuina Gyr.

Mediante dicho análisis para ambas razas, se encontró que la banda con MW de 174 kDa tiene una correlación altamente significativa ($P < 0,001$; $r = 0,407$) con la variable volumen y con la variable concentración espermática ($P < 0,001$; $r = 0,576$).

Para la banda de proteína con MW de 68 kDa se estableció que correlaciona significativamente ($P < 0,05$) con la variable viabilidad ($r = 0,315$) y altamente significativa ($P < 0,001$; $r = 0,555$) con las variables motilidad masal y motilidad individual progresiva ($P < 0,001$; $r = 0,719$).

Tabla 8. Correlación entre bandas de proteínas del PS y variables espermáticas entre toros de la raza Gyr y HV ($P < 0,05^*$, $P < 0,001^{**}$)

Correlaciones entre bandas de proteínas y variables espermáticas					
Bandas de proteínas (kDa)	V	Ce	MM	MIP	VyM
174	0,40731**	0,57597**	NS	NS	NS
68	NS	NS	0,55509**	0,71978**	0,31544*
38	NS	NS	NS	NS	NS

Investigaciones realizadas sobre proteómica han permitido establecer que unas proteínas interactúan con otras formando complejos moleculares que regulan la función de otras o de ellas mismas, la extensión y naturaleza de estas interacciones son importantes para entender las vías regulatorias y metabólicas y para la caracterización funcional de muchas otras (Sánchez, 2009). El análisis de los resultados en el presente trabajo permitió detectar diversas interacciones entre bandas de proteínas en el PS de los eyaculados entre las razas cebú Gyr y criollos Hartón del Valle.

Las diversas interacciones entre bandas de proteínas se encontraron mediante Coeficientes de correlación Pearson. Para la raza Gyr solo se encontró correlación altamente significativa entre la banda 25 kDa ($r = -0,98267$) con la banda de proteína de 15 kDa, la correlación negativa hace suponer que existe una acción regulación entre las dos proteínas. (Tabla 9).

Para la raza criolla HV, igualmente solo se encontró correlación significativa entre la banda 38 kDa ($r = 0,80881$) con la banda de proteína de 13 kDa, la correlación positiva hace suponer que dichas proteínas tengan efectos aditivos (Tabla 9).

Tabla 9. Correlación entre bandas de proteínas (38 y 25 MW (kDa)) del PS de los toros de la raza Gyr y HV ($P < 0,05^*$, $P < 0,001^{**}$)

Banda de Proteína MW(kDa)	Correlaciones entre bandas de proteínas		
	Raza Gyr 15	Raza HV 13	Significancia
38	NS	0,80881	0,0083*
25	-0,98267	NS	0,0004**

Haciendo el análisis estadístico con los datos entre toros y entre razas, se pudieron detectar más correlaciones entre las diferentes bandas de proteínas del PS, lo cual podría predecir la factibilidad en beneficio de la conservación de la célula espermática de los toros Gyr cuando se le incluye al eyaculado PS de la raza HV. En concordancia con lo observado por Smith y cols., (1999) y Perez-Pé y cols., (2001), la composición proteica del PS varía entre individuos y especies en relación con la época del año, al menos en especies de reproducción estacional, pero en nuestro caso también podemos observarlo entre razas de la misma especie.

En la Tabla 10, se observan cuatro correlaciones entre bandas de proteínas del PS para ambas razas (cebú Gyr y criollo HV). Existe una correlación negativa de la banda de proteína con MW 174 kDa con otras dos proteínas, las bandas de 38 kDa ($r = -0,66281$) y las bandas de proteínas de 15 kDa ($r = -0,60469$) siendo significativa para la primera y altamente significativa para la segunda. El tipo de correlación indica que existe una acción de regulación entre las proteínas implicadas.

La tercera correlación se establece entre la banda con MW 68 kDa ($r = 0,80881$) y la banda de 121 kDa. Por último podemos observar una cuarta correlación entre la banda con MW 25 kDa ($r = 0,82778$) y la banda de 83 kDa. Ambas son significativamente positivas, lo que igualmente hace suponer la acción aditiva de estas proteínas.

Tabla 10. Correlación entre las distintas bandas de proteínas del PS presentes en las razas Gyr y HV ($P < 0,05^*$, $P < 0,001^{**}$).

Bandas de proteínas (kDa)	Correlaciones entre bandas de proteínas			
	121	83	38	15
174	NS	NS	-0,66281*	-0.60469**
68	0,80881*	NS	NS	NS
25	NS	0,82778*	NS	NS

Se puede afirmar con estos resultados estadísticos, que existe una alta correlación entre las bandas de proteínas 174 kDa con las variables espermáticas volumen y concentración, mientras que estas variables correlacionan negativamente con las bandas 38 y 15 kDa.

Por la otra parte la banda de proteína con MW 68 kDa presenta una alta correlación con las variables espermáticas motilidad masal, motilidad individual progresiva y vivos y muertos, lo que sugiere una correlación positiva con la banda de proteína de 121 kDa y el incremento en su concentración puede ocasionar un efecto benéfico sobre la motilidad y viabilidad de las células espermáticas.

6.2. Influencia del plasma seminal sobre los parámetros seminales

6.2.1 Selección de toros Criollos HV

La obtención de plasma seminal utilizado para adicionar a los eyaculados de los cinco toros cebuinos Gyr antes de ser procesados, se iba a obtener de cuatro toros criollos Hartón del Valle. A cada uno de ellos se les realizó tres extracciones seminales, y se evaluaron las características seminales de cada uno de los eyaculados de forma individual para considerar si podían ser incluidos en la experiencia en función de su calidad.

En cada eyaculado se valoraron tanto parámetros macroscópicos como microscópicos. Dentro de los primeros se tuvo en cuenta el volumen y la concentración. Dentro de los segundos: motilidad masal e individual, vitalidad, formas normales, acrosomas integros y endósmosis (HOS test).

Para determinar posibles diferencias significativas entre los cuatro toros se realizó un test Anova univariante. Se observó que entre los cuatro toros, el volumen presentaba diferencias significativas ($p < 0,05$), aunque no la concentración ($p > 0,05$) (Tablas 11 y 12). Para clasificarlos se aplicó un Post Hoc de subconjuntos homogéneos mediante el test HSD de Tukey, siendo el toro cuatro el que presentaba un volumen mayor.

Tabla 11.- Volumen (*letras diferentes indican diferencias significativas, $p < 0,05$*)

TORO	N	Media ± Desviación típica
1	3	9,67±0,577 ^c
2	3	11,67±0,577 ^b
3	3	10,67±2,309 ^b
4	3	13,33±1,155 ^a
<i>P</i>		<i>0,007</i>

Tabla 12: Concentración Espermática

TORO	N	Media ± Desviación típica
1	3	607,67±198,334
2	3	707,00±67,550
3	3	727,00±118,275
4	3	696,33±204,864
<i>P</i>		<i>0,858</i>

Cada eyaculado se valoró en diferentes momentos: recién obtenido, a la hora, 24h de refrigeración y tras la descongelación. En la Tabla 13 se recogen los datos de las diferentes variables analizadas (motilidad masal e individual, vitalidad, formas normales, acrosomas y endosmosis) en los diferentes momentos. Para reflejar la existencia o no de

diferencias significativas y de esta forma clasificar los toros, se realizó una prueba post hoc de subconjuntos homogéneos, que permitió su clasificación (las diferencias son indicadas con letras minúsculas).

Analizados en conjunto todos los parámetros, el toro 4 era el que peor calidad presentaba a pesar de presentar el mayor volumen, por lo que fue descartado de la prueba.

Tabla 13. Calidad seminal toros Criollos HV (letras diferentes indican diferencias significativas)

		Fresco	Refrigerado 1 h	Refrigerado 24 h	Descongelacion
Contrastacion	Toro	M ± D.	M ± D.	M ± D. Estandar	M ± D.
MPi.	1	91,67±2,887	85,00±5,000	51,67±2,887 ^a	63,00±3,000 ^b
	2	91,67±5,774	81,67±7,638	71,67±2,887 ^c	50,00±,000 ^a
	3	91,67±5,774	81,67±7,638	49,33±1,528 ^a	60,00±8,660 ^b
	4	90,00±,000	83,33±2,887	57,67±3,055 ^a	56,67±2,887 ^a ^b
<i>p</i>		0,951	0,891	0,001	0,051
Vitalidad	1	78,67±1,528 ^{bc}	73,33±2,887	62,67±2,517	68,00±3,000 ^a
	2	72,00±2,000 ^a	67,33±3,055	57,33±2,517	64,33±1,155 ^a
	3	82,33±2,517 ^c	74,67±4,163	56,67±2,517	76,33±2,082 ^b
	4	74,33±4,041 ^{ab}	71,67±2,517	57,00±3,000	66,33±4,163 ^a
<i>p</i>		0,007	0,098	0,071	0,004
F. Normales	1	83,67±3,512 ^b	82,33±3,055 ^b	80,67±2,082 ^c	75,33±4,509 ^b
	2	84,67±1,528 ^b	82,33±2,517 ^b	78,33±3,055 ^{bc}	77,67±3,512 ^b
	3	88,00±2,646 ^b	85,33±2,517 ^b	72,67±4,163 ^a ^b	79,67±3,786 ^b
	4	78,00±2,646 ^a	71,33±2,887 ^a	67,00±3,606 ^a	67,67±4,041 ^a
<i>p</i>		0,011	0,001	0,004	0,027
Acrosomas	1	81,67±3,055 ^a	77,00±6,557 ^b	71,00±2,000 ^b	63,67±5,132
	2	81,67±2,082 ^a	73,00±3,606 ^b	56,67±2,517 ^a	66,67±3,786
	3	87,67±1,528 ^b	79,67±1,528 ^b	66,33±3,055 ^b	69,33±2,887
	4	77,33±2,082 ^a	60,67±2,517 ^a	52,33±3,512 ^a	58,67±4,509
<i>p</i>		0,004	0,002	0,001	0,065
Endosmosis	1	75,33±2,517 ^a	71,67±2,887 ^c	67,33±2,517 ^c	64,33±4,163 ^b
	2	70,00±3,000 ^a	64,67±3,512 ^b	62,33±2,082 ^{bc}	59,67±2,082 ^{ab}
	3	83,33±2,082 ^b	70,33±1,528 ^c	59,67±3,055 ^b	72,33±3,512 ^c
	4	73,67±4,041 ^a	56,67±1,155 ^a	50,67±4,163 ^a	57,00±1,000 ^a
<i>p</i>		0,004	0,001	0,001	0,001

Para completar el estudio, las dosis seminales se valoraron en fresco, refrigerado (1h y 24 h) y a la descongelación. Se realizó una T de Student, comparando la calidad seminal en los distintos tiempos (dos a dos) independientemente de los toros para observar si el tiempo influía sobre los diferentes parámetros (Tabla 14 y 15). En la mayoría de los tiempos comparados se observaron diferencias significativas, siendo la evaluación en fresco y a 1 de refrigeración donde se presentaban los valores más altos. Solamente la vitalidad presentaba diferencias significativas cuando se comparaban las 24 h y la descongelación, en el resto de las variables no se observaron diferencias, lo que indicaría que los toros presentaban la misma capacidad de congelación, manteniendo unos valores altos a la descongelación.

Tabla 14. Comparación calidad seminal (Motilidad progresiva y Vitalidad) en los distintos tiempos (Fresco, 1h, 24h y descongelación) de toros Criollos Hv

	Mot Prog.		Vitalidad	
Tiempos	M±D.Estandar	p	M±D.Estandar	p
F-R1	91,25±3,76	0,001	76,83±4,74	0,001
	82,92±5,41		71,75±3,98	
F- R24	91,25±3,76	0,001	76,83±4,74	0,001
	57,58±9,34		58,42±3,42	
F-D	91,25±3,76	0,001	76,83±4,74	0,001
	57,42±6,50		68,75±5,34	
R1-R24	82,92±5,41	0,001	71,75±3,98	0,001
	57,58±9,34		58,42±3,42	
R24-D	57,58±9,34	0,969	58,42±3,42	0,001
	57,42±6,50		68,75±5,34	

Tabla 15. Comparación calidad seminal (f. Normales, Acrosomas y Endosmosis) en los distintos tiempos (Fresco, 1h, 24h y descongelación) de toros Criollos HV

Tiempos	F. Normales		Acrosomas		Endosmosis	
	M±D.Estandar.	<i>p</i>	M±D.Estandar.	<i>p</i>	M±D.Estandar..	<i>p</i>
F-R1	83,58±4,40	0,001	82,08±4,29	0,001	75,58±5,69	0,001
	80,33±6,05		72,58±8,33		65,83±6,52	
F- R24	83,58±4,40	0,001	82,08±4,29	0,001	75,58±5,69	0,001
	74,67±6,21		61,58±8,12		60,00±6,83	
F-D	83,58±4,40	0,001	82,08±4,29	0,001	75,58±5,69	0,001
	75,08±5,83		64,58±5,45		63,33±6,58	
R1-R24	80,33±6,05	0,003	72,58±8,33	0,001	65,83±6,52	0,001
	74,67±6,21		61,58±8,12		60,00±6,83	
R24-D	74,67±6,21	0,801	61,58±8,12	0,235	60,00±6,83	0,158
	75,08±5,83		64,58±5,45		63,33±6,58	

Una vez que se eligieron los toros criollos, y procesados los eyaculados para obtener el plasma seminal, se repitió el análisis de la calidad seminal de los tres toros seleccionados como control. El análisis de la calidad seminal, puso de manifiesto que entre los tres no existían diferencias significativas ($p > 0,05$) lo que validaba el realizar la mezcla heteroplásmica. Se realizaron cuatro extracciones a cada toro y sus evaluaciones correspondientes. Se hizo un Anova univariante, para conocer si existían diferencias significativas entre ellos. Las tablas 16 y 17 recogen los valores (Media± D. Estandar) y la significación (p), confirmando que los tres toros presentaban similares características seminales

Tabla 16. Calidad seminal Toros Criollos HV seleccionados (V, Ce, M.Masal, M.Individual)

Calidad	Toro	M. \pm D. típica	P
V (ml)	1	12,00 \pm 1,63	0,213
	2	10,00 \pm 1,83	
	3	12,00 \pm 1,63	
Ce (Spz. $\times 10^6$)	1	681,00 \pm 133,6	0,99
	2	693,75 \pm 193,59	
	3	678,75 \pm 139,38	
Mot. Masal	1	4,50 \pm 0,58	0,748
	2	4,25 \pm 0,5	
	3	4,25 \pm 0,5	
Mot. Individual	1	74,19 \pm 17,58	0,849
	2	70,88 \pm 16,2	
	3	71,81 \pm 16,65	

Tabla 17. Calidad seminal Toros Criollos HV seleccionados (V y M, F. Normales, Acrosomas y Endosmosis)

Calidad	Toro	M \pm D. Estandar	P
V y M	1	70,00 \pm 7,35	0,751
	2	67,81 \pm 8,48	
	3	69,00 \pm 8,6	
Formas Normales	1	80,63 \pm 5,83	0,236
	2	77,94 \pm 7,29	
	3	76,69 \pm 6,56	
Acrosomas	1	71,56 \pm 10,46	0,762
	2	70,25 \pm 10,82	
	3	68,81 \pm 10,32	
Endosmosis	1	67,94 \pm 8	0,614
	2	65,25 \pm 9,28	
	3	65,38 \pm 8,59	

6.2.2. Evaluación de toros Cebús Raza Gyr

Para la prueba de adición de plasma seminal obtenido de toros criollos HV, se eligieron cinco toros de raza cebuina Gyr y se realizaron tres extracciones seminales. La calidad seminal media de los cinco toros queda recogida en la tabla 18.

Tabla 18: Calidad seminal de los toros Gyr

Contrastación seminal	N	Media ± D. Estandar
Volumen	15	8,47 ± 3,18
Concentración	15	357,60 ± 203,41
Mot. Masal	15	4,47 ± 0,52
Mot. Progresiva	15	80,00 ± 3,27
Vitalidad	15	73,73 ± 3,20
Formas.Normales	15	81,60 ± 3,14
Acrosomas	15	78,00 ± 3,07
Endosmosis	15	67,00 ± 3,51

Con los valores medios observados, se realizó un ANOVA univariante para determinar diferencias significativas entre toros y repetición. Realizada la prueba inter-sujetos a partir de las medias marginales, solamente se observó que existían diferencias significativas en el parámetro acrosomas normales ($p < 0,012$) siendo el toro 4 quien presentaba un mayor porcentaje de acrosomas normales con respecto a los otros cuatro.

Para determinar la existencia de diferencias entre razas (Gyr y HV), se compararon los valores de calidad seminal entre ambas razas mediante una T Student (Tabla 19). Se observaron diferencias significativas en volumen, concentración, motilidad progresiva, acrosomas y endosmosis, encontrándose siempre valores superiores en los toros de raza criolla HV como se describe en la bibliografía, lo que justificaría el trabajo que se haya realizado con el objetivo de mejorar la calidad de la raza Gyr.

Tabla 19: Comparación de los valores de calidad seminal de raza Gyr y HV

Contrastación seminal	Raza	N	Media ± D. Estandar	<i>p</i>
Volumen	Gyr	15	8,47 ± 3,18	<i>0,007</i>
	HV	12	11,33 ± 1,82	
Concentración	Gyr	15	357,6 ± 203,40	<i>0,001</i>
	HV	12	684,5 ± 142,95	
M Masal	Gyr	15	4,47 ± 0,51	0,502
	HV	12	4,33 ± 0,49	
M.Prog	Gyr	15	80 ± 3,27	<i>0,001</i>
	HV	12	91,25 ± 3,76	
Vitalidad	Gyr	15	73,73 ± 3,19	0,054
	HV	12	76,83 ± 4,74	
F.Normales	Gyr	15	81,6 ± 3,13	0,184
	Hv	12	83,58 ± 4,40	
Acrosomas	Gyr	15	78 ± 3,07	<i>0,008</i>
	HV	12	82,08 ± 4,29	
Endosmosis	Gyr	15	67 ± 3,50	<i>0,001</i>
	HV	12	75,58 ± 5,69	

6.2.3 Adición del plasma seminal

Una vez analizada la calidad seminal de ambas razas, se pasó a la retirada (25 o 50 %) o sustitución del plasma seminal (25 o 50 %) de los eyaculados de raza Gyr por plasma seminal procedente de los toros de raza Criolla HV.

Para el análisis de resultados se compararon mediante una T Student los distintos tiempos de procesado y las concentraciones de plasma. En la Tabla 20 y 21, se recogen los valores medios correspondientes a los valores observados manteniendo el plasma completo de Gyr y no adicionándose plasma de Criollo HV. Se evidencia que el factor tiempos provocaba un descenso en la calidad seminal. Para la motilidad progresiva, se observó que los valores mayores eran en fresco, no observando diferencias entre refrigerado y congelado. La vitalidad presentaba un comportamiento similar al igual que las formas normales. Los acrosomas y la integridad de membrana presentaban, diferencias

significativas en los diferentes momentos de comparación, y quedaba patente que se veían afectados por el propio procesado.

Tabla 20. Comparación de la calidad seminal manteniendo el plasma seminal en raza Gyr (Mot. Progresiva, Vitalidad) en los distintos tiempos

Procesado	GYR	Mot Progresiva		Vitalidad	
	%	M±D.. Est.	p	M±D.. Est..	p
Fresco/Refrig. 24h	100%	80 ± 3,27	0,001	73,73 ± 3,20	0,001
	100%	61,13 ± 5,95		54,8 ± 5,51	
Fresco/Desc.	100%	80 ± 3,27	0,001	73,73 ± 3,20	0,001
	100%	60,2 ± 8,26		62,73 ± 5,99	
Refrig.24h / Desc.	100%	61,13 ± 5,95	0,767	54,8 ± 5,51	0,001
	100%	60,2 ± 8,26		62,73 ± 5,99	

Tabla 21. Comparación de la calidad seminal manteniendo el plasma seminal en raza Gyr (F. Anormales, Acrosomas y Endosmosis) en los distintos tiempos

Procesado	GYR	Formas normales		Acrosomas		Endosmosis	
	%	M±D. Est.	p	M±D. Est.	p	M±D. Est.	p
Fresco/ Refrig. 24h	100%	81,6 ± 3,14	0,001	78,0 ± 3,07	0,001	67,0 ± 3,51	0,001
	100%	75,67 ± 3,77		64,8 ± 6,84		57,27 ± 5,60	
Fresco/Desc.	100%	81,6 ± 3,14	0,001	78,0 ± 3,07	0,001	67,0 ± 3,51	0,001
	100%	73,53 ± 5,04		55,2 ± 4,59		58,73 ± 4,17	
Refrig.24h / Desc.	100%	75,67 ± 3,77	0,194	64,8 ± 6,84	0,001	57,27 ± 5,60	0,429
	100%	73,53 ± 5,04		55,2 ± 4,59		58,73 ± 4,17	

En la Tabla 21 y 22, se compara los resultados de la refrigeración (24 horas) en función de la cantidad de plasma que se mantiene en el eyaculado y que era reemplazado. No se observaron diferencias significativas en vitalidad en ninguna de las comparaciones; en el resto de las pruebas (motilidad, formas normales, acrosomas y endosmosis) se vio que existían diferencias altamente significativas. Los resultados permitían observar que la retirada de un 25 o 50 % de los eyaculados Gyr y posterior adición de las mismas concentraciones de plasma seminal de toros criollos HV era perjudicial en refrigeración a las

24 h. Solamente las formas normales mejoraban con la adición de plasma de raza criolla en ambas proporciones (25 y 50 %).

Tabla 22. Comparación de la calidad seminal adicionando (25% y 50%) de plasma seminal en raza Gyr (Mot. Progresiva, Vitalidad) en refrigeración.

Procesado	GYR	HV	Mot Progresiva		Vitalidad	
	%	%	M± D. Est	p	M± D. Est	p
Refrig. 24h	100%	0%	61,13 ± 5,95	0,001	54,8 ± 5,51	0,001
	75%	0%	33 ± 2,54		41,47 ± 2,30	
Refrig. 24h	100%	0%	61,13 ± 5,95	0,001	54,8 ± 5,51	0,001
	75%	25%	46 ± 6,33		43,67 ± 2,32	
Refrig. 24h	100%	0%	61,13 ± 5,95	0,001	54,8 ± 5,51	0,001
	50%	0%	29,33 ± 3,72		39 ± 1,93	
Refrig. 24h	100%	0%	61,13 ± 5,95	0,073	54,8 ± 5,51	0,001
	50%	50%	58 ± 4,14		45,4 ± 1,84	

Tabla 23. Comparación de la calidad seminal adicionando (25% y 50%) de plasma seminal en raza Gyr (Formas Anormales, Acrosomas y Endosmosis) en refrigeración.

Procesado	GYR	HV	Formas normales		Acrosomas		Endosmosis	
	%	%	M± D. Est	p	M± D. Est.	p	M± D. Est	p
Refrig. 24h	100%	0%	75,67 ± 3,77	0,112	64,8 ± 6,84	0,001	57,27 ± 5,60	0,001
	75%	0%	77,4 ± 2,87		44,13 ± 4,85		45,8 ± 2,78	
Refrig. 24h	100%	0%	75,67 ± 3,77	0,001	64,8 ± 6,84	0,001	57,27 ± 5,60	0,019
	75%	25%	80,4 ± 2,97		50,13 ± 4,29		52,73 ± 3,41	
Refrig. 24h	100%	0%	75,67 ± 3,77	0,44	64,8 ± 6,84	0,001	57,27 ± 5,60	0,001
	50%	0%	74,93 ± 2,60		40 ± 4,39		41,4 ± 3,14	
Refrig. 24h	100%	0%	75,67 ± 3,77	0,001	64,8 ± 6,84	0,001	57,27 ± 5,60	0,023
	50%	50%	80,6 ± 3,50		48,4 ± 4,53		52,53 ± 4,78	

Finalmente (Tablas 23 y 24), se evaluó el efecto del plasma en el momento de la descongelación, principal motivo de este trabajo (mejorar los resultados de congelación de la raza Gyr). Sólo la integridad de los acrosomas presentaba una mejoría significativa con la

adición tanto del 25 como del 50% de plasma seminal. En el resto de las variables no se observó ninguna mejoría, incluida la endósmosis. No obstante, la mejoría en la integridad de los acrosomas lleva implícita una protección de los mismos, lo cual tendrá reflejo en la fertilidad de las dosis seminales, puesto que el acrosoma es fundamental para que se den con normalidad los procesos de fecundación.

Tabla 24. Evaluación del efecto de la retirada de plasma seminal Gyr y/o adición de plasma seminal de raza Criolla sobre la congelación.

Procesado	GYR	HV	Mot Progresiva		Vitalidad	
	%	%	<i>M± D. Est</i>	<i>p</i>	<i>M± D. Est.</i>	<i>p</i>
Descong.	100%	0%	60,2 ± 8,26	0,001	62,73 ± 5,99	0,001
	75%	0%	40,13 ± 3,89		50,87 ± 2,33	
Descong.	100%	0%	60,2 ± 8,26	0,023	62,73 ± 5,99	0,001
	75%	25%	54,6 ± 3,29		52,67 ± 2,09	
Descong.	100%	0%	60,2 ± 8,26	0,001	62,73 ± 5,99	0,001
	50%	0%	40,73 ± 3,75		49,8 ± 1,21	
Descong.	100%	0%	60,2 ± 8,26	0,012	62,73 ± 5,99	0,001
	50%	50%	56,6 ± 2,03		54,13 ± 2,75	

Tabla 25. Evaluación del efecto de la retirada de plasma seminal Gyr y/o adición de plasma seminal de raza Criolla sobre la congelación.

Procesado	GYR	HV	Formas normales		Acrosomas		Endosmosis	
	%	%	<i>M± D. Est.</i>	<i>p</i>	<i>M± D. Est</i>	<i>p</i>	<i>M± D. Est</i>	<i>p</i>
Descong.	100%	0%	73,5 ± 5,04	0,127	55,2 ± 4,59	0,024	58,73 ± 4,17	0,001
	75%	0%	75,8 ± 2,88		59,13 ± 3,83		49,87 ± 4,05	
Descong.	100%	0%	73,53 ± 5,04	0,003	55,2 ± 4,59	0,001	58,73 ± 4,17	0,257
	75%	25%	78,53 ± 3,04		63,93 ± 4,13		56,93 ± 4,50	
Descong.	100%	0%	73,53 ± 5,04	0,098	55,2 ± 4,59	0,816	58,73 ± 4,17	0,001
	50%	0%	70,73 ± 3,17		54,87 ± 3,25		45,27 ± 4,13	
Descong.	100%	0%	73,53 ± 5,04	0,001	55,2 ± 4,59	0,001	58,73 ± 4,17	0,089
	50%	50%	79,27 ± 2,99		65,33 ± 4,94		55,8 ± 5,09	

De acuerdo a la escasa capacidad biosintética de los espermatozoides, hace que estos necesiten desarrollar ciertos mecanismos precisos para captar del PS los componentes necesarios para desarrollar sus funciones. El PS es el medio natural en el que se conservan los espermatozoides, sus efectos en el mantenimiento de la motilidad y la viabilidad espermática siguen siendo objeto de controversia. Así, por un lado se ha descrito que el PS es importante en la viabilidad espermática en toro (Baa y cols., 1983) y morueco (Asworth y cols., 1994), lo que coincide con nuestros resultados, mientras que otros autores describen efectos negativos de PS sobre la motilidad (De Lamirande y Gagnon, 1984) o la viabilidad espermática (García y Graham, 1987) no observado en este trabajo, donde el mantenimiento del plasma (100%) resulta más beneficioso que su retirada parcial y/o sustitución del plasma seminal. Con respecto a su influencia en la fertilidad, los resultados son igualmente contradictorios. Algunos autores consideran que en algunas especies la fertilidad aumenta tras la adición de componentes del PS (ratón, conejo, rata). En la especie ovina, la adición de PS al diluyente utilizado en la IA parece producir un efecto beneficioso (Maxwell y cols., 1999; Belibasaki y cols., 2000), datos que no se pueden contrastar ya que no se realizaron pruebas de fertilidad *in vivo* en este trabajo.

Los porcentajes de motilidad espermática no fueron más elevados con los distintos tratamientos, lo que no coincidiría con los alcanzados por espermatozoides humanos criopreservados en diluyentes que contenían PS en volúmenes de 50-75%, en comparación con muestras que contenían 0-25% de PS (Ben y cols., 1997). Moore y cols., (2005) observaron que la incubación de espermatozoides equinos con 5% de PS resultó en mayores porcentajes de motilidad espermática después de la criopreservación que cuando fueron incubados con un 20% de PS durante un mínimo de 2 horas antes de la congelación. Esto demuestra que el SP es perjudicial para la criosupervivencia espermática, cuando los espermatozoides son incubados con niveles superiores al 20% de PS durante largo periodos antes de la congelación como sería lo ocurrido en nuestro trabajo, que se mantuvieron en refrigeración 24 horas.

Similarmente, una variabilidad individual en el PS se ha visto que tiene un papel importante en la motilidad de los espermatozoides tras su transporte refrigerado (Brinsko y cols., 2000; Dawson y cols., 2000).

Posiblemente los bajos valores de las variables concuerdan con las afirmaciones de (Holt, 2000) en el proceso de dilución y descenso de la temperatura de 37 a 5°C, las membranas de las células espermáticas sufren edema casi en un 50%, deshidratación celular, cambios en la distribución de los lípidos, fusión con otras células contiguas,

incremento en la concentración de solutos intra y extracelular que pueden resultar tóxicos a las células, entre otras. Es muy común luego de la colecta del semen, enfriarlo desde 37 a 5°C gradualmente en 1,5 a 2 horas y luego hacer un equilibrado durante 3 a 24 horas a 5°, Frijters y colaboradores en 2003 (citados por Almela, 2014) demostraron resultados favorables a favor del porcentaje de acrosomas normales y vitalidad con un equilibrado de 9 y 16 horas respectivamente, en comparación con periodos de equilibrado más cortos, esto podría explicar la alta tasa de degeneración celular durante esta investigación.

Finalmente, cabe mencionar que la pérdida de vitalidad y motilidad espermáticas no indican una total reducción de la fertilidad del semen congelado, pero puede haber una pérdida parcial de proteínas de membrana de las células espermáticas necesarias para la fertilización (Lessard et al., 2000). Además, tal como indican diferentes autores la criopreservación puede causar cambios en el estado de la membrana funcionalmente equivalentes a la capacitación, tanto en espermatozoides de ratón (Fuller y Whittingham 1997), verraco (Maxwell y Johnson 1997) y morueco (Gillan y cols., 1997). Esta prematura capacitación puede deberse a la pérdida de lípidos de la membrana durante la congelación y descongelación (Watson, 1995), así como por la pérdida de factores descapacitantes que son apartados con el PS después de la centrifugación. La separación del PS se ha identificado como inductora de la capacitación en espermatozoides humanos (Gould y cols., 1984; Lambert y cols., 1985) y de ratón (Chang, 1957). También se ha demostrado que el PS limita el desarrollo de la capacitación post-descongelación en los espermatozoides ovinos (Maxwell y cols., 1999). Estos resultados demuestran que los daños funcionales de los espermatozoides durante la criopreservación pueden ser evitados mediante la adición de PS, probablemente a través del efecto de descapacitación combinado con la mejora en el transporte espermático. Los datos obtenidos por El-Hajj Ghaoui y cols. (2006), sugieren que la mayoría de los componentes proteicos del PS ovino se encuentran en la fracción libre de vesículas del PS y que pueden ofrecer los efectos beneficiosos señalados por Maxwell y cols., (1999). En nuestro caso, se ha puesto en evidencia, que la adición de un 25 o 50 % de PS, tras la retirada de la misma cantidad de PS, ofrecía un efecto beneficioso en la integridad acrosomal post descongelación lo que estaría en concordancia con lo observado por estos autores.

7. RECOMENDACIONES

- Vistos los resultados y valorando que algunos partes no mostraron los resultados satisfactorios con las expectativas esperadas, se propone realizar el análisis bidimensional tanto del PS como de la membrana espermática, que permita identificar los puntos de proteína en forma más concisa.
- Se deberían realizar nuevos trabajos de investigación con las mismas razas y un mayor número de animales y muestreos que permitan confirmar la frecuencia de presentación de las bandas de proteína.
- Teniendo en cuenta que en las proteínas encontradas con MW entre 15 y 30 kDa se encuentran las BSP, y que estas tienen que ver con el movimiento de colesterol y fosfolípidos de la célula espermática, se recomienda diluir rápidamente el semen para evitar efectos negativos durante para el proceso de congelación.
- Teniendo en cuenta que la adición de PS del toro criollo no afectó la variable vitalidad, durante la refrigeración a 24 horas, se debería hacerlas a unas dosis menores del 25% y por un tiempo superior a 24 horas, mediante un equilibrado de la temperatura de 16 horas a 5°C (Frijters y otros 2003) antes de la inclusión del PS, con el fin comprobar la conservación del acrosoma de los eyaculados de toros Gyr.
- En vista que a la congelación con niveles de 25 y 50% de plasma seminal de toros criollos sobre los toros Gyr, sería conveniente investigar reemplazando el 100% y con un tiempo de equilibrado del semen como se describió anteriormente, con el fin de mejorar todos los parámetros espermáticos de un semen con capacidad fecundante.
- Tal como se demostró en la primera experiencia, una de las proteínas del PS más abundante es la ABP, la cual está involucrada en el flujo de colesterol y fosfolípidos de membrana (Barbas y Mascarenhas, 2009). El semen debería tener una dilución previa, con el fin de reducir ésta, evitándose el posible debilitamiento de la membrana espermática, que la hace debil al choque térmico afectando negativamente los parámetros espermáticos.

8. CONCLUSIONES

1. La determinación de los perfiles electroforéticos 1D en el PS de los toros cebú Gyr y criollo HV, permitió generar los mapas con bandas de proteínas con su concentración y MW. Los toros Gyr presentaron 8 bandas y los HV 9 bandas.
2. Se encontraron correlaciones positivas significativas entre las bandas de proteínas con MW 174 y 68 kDa y algunos parámetros espermáticos. Los parámetros volumen y concentración espermática se correlacionaron con la primera banda (174 kDa), mientras que la vitalidad y motilidad fueron correlacionadas con la segunda (68 kDa).
3. Las bandas de proteínas encontradas tanto para la raza cebú Gyr como para la raza criolla HV, se correlacionaron de forma independiente, siendo para la raza Gyr la correlación entre la banda 25 con la banda de proteína de 15 kDa y para la raza criolla HV entre la banda 38 con la banda de proteína de 13 kDa.
4. La correlación de las proteínas del PS entre razas arrojó que la banda de 174 kDa tiene una correlación negativa con la banda 15 y con la banda 38 kDa. Se presentó correlación positiva entre la banda 38 con la banda 121 kDa y la banda 25 con la banda de proteína de 83 kDa.
5. La eliminación y restitución de plasma seminal (PS) a los eyaculados de toros de raza Gyr por los toros criollos HV, en 25 y 50%, mostraron un efecto negativo sobre la motilidad, formas normales, acrosomas normales y la endosmosis, durante la refrigeración por 24 horas, que puede atribuirse a un indebido equilibrado de la temperatura.
6. Los eyaculados de los toros Gyr adicionados con PS de los toros criollos a razón de 25 y 50%, presentaron valores aceptables a la descongelación para la variable espermática acrosomas normales, posiblemente atribuible a la presencia de proteínas del PS contenidas en los eyaculados de los toros criollos como factores de protección de membrana al choque térmico.

9. RESUMEN

Los bovinos criollos colombianos Hartón del Valle considerados criollos caucanos se han caracterizado por ser animales de alta fertilidad con intervalos entre partos de 365-390 días y una tasa de natalidad superior al 90%. Igualmente se destacan por una gran precocidad alcanzando su pubertad a los 12 meses, la edad al primer servicio a los 22 meses y la edad al primer parto a los 32 meses. La precocidad del Hartón del Valle se ha visto reflejada también en pesos de destete de 180-200 kg a los 8 meses de edad. Si se les continúa con un sistema de manejo y alimentación adecuada alcanzan desarrollos y pesos significativos de 280 kilos en las hembras y 300 kilos en los machos a los 18 meses de edad, todo depende de las condiciones de manejo que aplique el productor para lograr alcanzar las metas satisfactorias.

Una de las razas cebú más nombradas en Colombia en los últimos años es la Gyr, cuya capacidad de adaptabilidad a climas adversos la convierten en la de mayor potencial para la producción de leche en el trópico bajo del país. En el trópico la raza Gyr es de gran importancia en la industria lechera y es utilizada para generar la raza sintética Gyrolando (5/8 Holstein: 3/8 Gyr) con el propósito de tener animales con alta producción, tolerancia al calor y parásitos, (Ardila, 2010).

Asocebú (Asociación colombiana de criadores de ganado cebú), señala que en el territorio nacional predominan las zonas cálidas y en esa situación no todos los animales soportan forrajes de inferior calidad y las altas temperaturas. Pero la cebuína se adapta a las condiciones climáticas del país en general, y por eso "ha sido seleccionada para mejorar la producción de leche con gran potencial en el trópico bajo".

La raza Gyr puede vivir en zonas altas, pero se ha desplazado a zonas por debajo de los 2.000 metros sobre el nivel del mar donde se ha descubierto que puede producir hasta 20 litros de leche al día con 4.0 % en grasa y 3.5 % en proteína. Con estos sólidos la leche de la Gyr se puede usar para el consumo como un producto fresco o para la fabricación de derivados.

La finalidad del presente trabajo consistió en la determinación de los perfiles electroforéticos 1D SDS-PAGE, de las proteínas del plasma seminal (PS) de toros criollos Hartón del Valle y cebú Gyr, para establecer las correlaciones con las variables de calidad seminal para de ésta manera corroborar la existencia de algunas proteínas del PS presentes en la raza criolla y no en la raza Gyr, que son indispensables para la membrana espermática frente al choque frío.

Se trabajó con 9 toros (4 toros criollos y 5 toros Gyr), a los cuales se les colectó el semen mediante electroeyaculación, con una pauta de un día por semana durante tres semanas. A cada uno de ellos se le realizaron tres recogidas. Cada uno de los eyaculados fue contrastado para determinar la calidad seminal, determinando concentración espermática, motilidad, viabilidad, células normales, integridad acrosómica y de membranas. Para la determinación de las proteínas del plasma seminal, éste se obtuvo por centrifugación refrigerada, a continuación, se le adicionó inhibidor de proteasas (PMSF), para finalmente ser congelado a -20°C hasta el momento de su utilización. Las proteínas del plasma se separaron por electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE.

La concentración espermática superior que presentaron los toros criollos HV sobre los cebú Gyr ($P < 0,0001$), evidencia la posibilidad que estos poseen una mayor capacidad para fecundar un mayor número de ovocitos, lo que también se refleja en mayores porcentajes de fertilidad de las razas bovinas criollas. En los mapas electroforéticos referenciales 1D de las proteínas del PS se encontraron 8 bandas de proteínas para los toros cebú y 9 para los toros criollos.

Obtenidas las muestras, pasamos a valorar la incorporación del PS de cuatro toros criollos Hartón del Valle en los eyaculados de cinco toros cebú Gyr lechero, para ello cada eyaculado se fraccionó en 3 alícuotas, sometidas a distintos tratamientos: control con su propio plasma seminal, retirada y adición del 25% y del 50% de PS respectivamente. La calidad seminal del control y de cada uno de los tratamientos fue valorada tanto en refrigeración a 1 y 24 horas, como después de la congelación. Se observó que entre los cuatro toros el volumen presentaba diferencias significativas ($p < 0,05$).

Comparando la calidad seminal en los distintos tiempos se observaron diferencias significativas, siendo la evaluación en fresco y a 1h de refrigeración donde se presentaban los valores más altos. Solamente la vitalidad presentaba diferencias significativas ($p < 0,05$) cuando se comparaban las 24 h y la descongelación, en el resto de las variables no se observaron diferencias, lo que indicaría que los toros presentaban la misma capacidad de congelación, manteniendo unos valores altos a la descongelación.

Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en volumen, concentración, motilidad progresiva, acrosomas y endosmosis, encontrándose siempre valores superiores en los toros de raza criolla como se describe en la bibliografía, lo que justificaría que el trabajo se haya realizado con el objetivo de mejorar la calidad de la raza Gyr.

Se hallaron los valores medios correspondientes a los valores observados manteniendo el plasma completo de Gyr y no adicionándose plasma de criollo. Se evidencia que el factor tiempos provocaba un descenso en la calidad seminal. Para la motilidad progresiva, se observó que los valores mayores eran en fresco, no observando diferencias entre refrigerado y congelado. La vitalidad presentaba un comportamiento similar al igual que las formas normales. Los acrosomas y la integridad de membrana presentaban, diferencias significativas ($p < 0,05$) en los diferentes momentos de comparación, y quedaba patente que se veían afectados por el propio procesado.

Los resultados de la refrigeración (24 horas) para motilidad, formas normales, acrosomas y endosmosis vimos que existían diferencias altamente significativas ($p < 0,001$). Los resultados permiten observar que la retirada de un 25 o 50 % de los eyaculados Gyr y posterior adición de las mismas concentraciones de plasma HV era perjudicial en refrigeración a las 24 h. Solamente las formas normales mejoraban con la adición de PS de raza criolla en ambas proporciones (25 y 50 %).

Finalmente, se evaluó el efecto del plasma en el momento de la descongelación, principal motivo de este trabajo. Sólo la integridad de los acrosomas presentaba una mejoría significativa con la adición tanto del 25 como del 50% de PS. En el resto de las variables no se observó ninguna mejoría, incluida la endósmosis. No obstante, la mejoría en la integridad de los acrosomas lleva implícita una protección de los mismos, lo cual tendrá reflejo en la fertilidad de las dosis seminales, puesto que el acrosoma es fundamental para que se den con normalidad los procesos de fecundación.

10. SUMMARY

The Colombian creole cattle "Hartón del Valle" considered "criollos caucanos", have been characterized as high fertility animals with birth intervals between 365-390 days and a birth rate over 90%. They are also noted for a great precocity, reaching their puberty at 12 months, age at first service at 22 months and age of first birth at 32 months. The precocity of "Hartón del Valle" has also been reflected in weaning weights of 180-200 kg at 8 months of age. If they are continued with a system of management and adequate food could reach significant developments and get weights of 280 kilos in females and 300 kilos in males at 18 months of age, everything depends on the management conditions applied by the producer to achieve satisfactory goals.

One of the most named zebu breeds in Colombia in recent years is the Gyr, whose adaptability to adverse climates makes it the one with the greatest potential for milk production in the low tropics of the country.

Specialized milk production is concentrated in temperate and cold climates, especially in Antioquia and Cundinamarca. However, dual-purpose breeds have played an important role in generating a quality dairy. The Gyr is one of them and has been used by Colombian farmers, who have even crossed with Holstein, which has resulted in Gyrolando, which has increased milk production by milking.

Asocebú (Asociación Colombiana de Criadores de Ganado Cebú: Cebu Cattle Breeders Association), says that in the national territory the warm zones predominate and in that situation not all the animal support inferior quality fodder and the high temperatures. Nevertheless, the cebuína adapts to the country climatic conditions in general, and for that reason "it has been selected to improve the milk production with great potential in the low tropic".

The Gyr breed can live in highlands but has moved to areas below 2,000 meters above sea level where it has been discovered that it can produce up to 20 liters of milk per day with 4.0% fat and 3.5% protein. With these solids, the milk of the Gyr can be used for consumption as a fresh product or for the manufacture of derivatives.

The purpose of the present work was to determine the electrophoretic 1D SDS-PAGE profiles of seminal plasma (SP) proteins from "Hartón del Valle" and Zebu Gyr, to establish correlations with seminal quality variables in order to corroborate the existence of some PS

proteins present in the Creole breed and not in the Gyr breed, which are indispensable for the sperm membrane against cold shock.

It was worked with 9 bulls (4 native bulls and 5 Gyr bulls), to which the semen was collected by electroejaculation, with a pattern of one day per week for three weeks. To each of them three collections were made to him. Each of the ejaculates was tested to determine seminal quality, determining sperm concentration, motility, viability, normal cells, acrosome and membrane integrity. Seminal plasma was obtained by refrigerated centrifugation, then protease inhibitor (PMSF) was added, finally to be frozen at -20°C until the time of its use. Plasma proteins were separated by denaturing electrophoresis SDS-PAGE.

The higher sperm concentration presented by the HV bulls on the Gyr zebu ($P < 0.0001$), evidences the possibility that they have to fertilize the largest number of oocytes, which is also reflected in higher fertility ratios of the creole cattle breeds. In the 1D reference electrophoretic maps of PS proteins, 8 protein bands were found for zebu bulls and 9 for creole bulls.

After obtaining the samples, we proceeded to evaluate the incorporation of the SP of the four creole bulls "Harton del Valle" in the ejaculates of five bulls Zebu Gyr dairy, for that reason each ejaculate was divided into 3 aliquots, subjected to different treatments: control with its own seminal plasma, withdrawal and addition of 25% and 50% SP respectively. The seminal quality of the control and of each one of the treatments was valued both in refrigeration at 1 and 24 hours, and after freezing.

It was observed that among the four bulls the volume had significant differences ($p < 0.05$). Each ejaculate was evaluated at different times: freshly obtained, after 1 and 24 hours of cooling and after thawing.

In the majority of the times compared, significant differences were observed, being the evaluation in fresh and to 1 of refrigeration where they presented the highest values. Only the vitality presented significant differences ($p < 0.05$) when 24 h and thawing were compared, in the rest of the variables no differences were observed, which would indicate that the bulls presented the same freezing capacity, maintaining high values to thawing.

Significant differences ($p < 0.05$) were observed in volume, concentration, progressive motility, acrosomes and endosmosis, and higher values were found in bulls of the Creole breed as described in the literature, which would justify the work done with the objective of improving the quality of the Gyr breed.

The mean values corresponding to the observed values were found maintaining the complete plasma of Gyr and not adding creole plasma. It is evident that the time factor caused a decrease in seminal quality. For progressive motility, it was observed that the major values were in fresh, not observing differences between refrigerated and frozen. The vitality presented a similar behavior as the normal forms. Acrosomes and membrane integrity had significant differences ($p < 0.05$) in the different moments of comparison, and it was clear that they were affected by the process itself.

The results of refrigeration (24 hours), for motility, normal forms, acrosomes and endosmosis we see that there are highly significant differences ($p < 0.001$). The results show that the withdrawal of 25 or 50% of ejaculates Gyr and subsequent addition of the same concentrations of plasma HV was detrimental in refrigeration at 24 h. Only the normal forms were improved with the addition of SP of both creole races (25 and 50%).

Finally, the effect of plasma at the time of thawing, the main reason for this work, was evaluated. Only the integrity of the acrosomes showed a significant improvement with the addition of both 25 and 50% SP. In the rest of the variables, no improvement was observed, including endosmosis. However, the improvement in the integrity of the acrosomes implies a protection of the same, which will have a reflection on the fertility of the seminal doses, since the acrosome is fundamental for that the processes of fertilization take place normally.

11. BIBLIOGRAFÍA

Almela, L., 2014. *Aportaciones a la Criopreservación de Gametos Masculinos en la Raza Bovina Murciano Levantina*. Murcia: Universidad de Murcia, facultad de veterinaria.

Almela, L., 2014. *Recongelación de Espermátocitos*. Murcia: Universidad de Murcia.

Amann, P. & Graham, K., 1993. Spermatozoal function. In: , Mcinnon, A. O., Voss, J. L. (eds.),. En: *Equine Reproduction*. UK: Lea and Febiger, London, pp. 715-745.

Ardila, A., 2010. Programa de mejoramiento genético para características económicas en las razas cebuinas lecheras. *Revista de Medicina Veterinaria N° 19 / Enero - junio*, pp. 11-20.

Ardila, A., 2010. Programa de mejoramiento genético para características económicas en razas cebuinas lecheras. *Revista de Medicina Veterinaria N° 19 / Enero - junio*, pp. 11-20.

Artur, G., Noakes, D. & Pearson, H., 1991. *Reproducción y Obstetricia en Veterinaria (Teriogenología)*. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana 702 p..

Asadpour, R., Jafari, R. & Tayefi-Nasrabadi, H., 2012. The effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and lipid peroxidation of chilled bull spermatozoa.. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University, Vol. 13, No. 3, Ser. 40, 13(3)*, pp. 246-249.

Ashworth, J. y otros, 1994. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reprod Fertil Dev 6*, pp. 173-180.

Aurich, J., Kühne, A., Hoppe, E. & Aurich, C., 1996. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology* 46, pp. 791-798.

Avalos, A., 2004. *Pérdida de la asimetría fosfolipídica de la membrana plasmática del espermatozoide de conejo durante la capacitación y la reacción acrosomal*. México DF: Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa..

Baarends, M. y otros, 2003. Loss of HR6B ubiquitin-conjugating activity results in damaged synaptonemal complex structure and increased crossing-over frequency during the male meiotic prophase. *Mol Cell Biol*, 23, p. 1151–1162.

Baas, J.W., Molan, P.C., and Salomon, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 1983. 68: 275-280

Bailey, J., Bilodeau, J. & Cormier, N., 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology* 21(1), pp. 1-7.

Bañuelos, R., Meza, C., Silva, J. & Aréchiga, C., 2001. Las proteínas de choque calórico y su función en la reproducción animal. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, pp. 60-67.

Barajas, D., 2013. *Expresión proteómica del Plasma Seminal del Toro Criollo Sanmartinero y su relación con la Fertilidad y Desarrollo Embrionario in Vitro en Condiciones del Tropico Bajo Colombiano*. Murcia: Universidad de Murcia.

Barbas, J. & Mascarenhas, R., 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm. *Cell Tissue*; 231, pp. 259-275.

Barrios, B., 2002. *Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem*. ULA- Trujillo, s.n., p. 14.

- Barrios, B. y otros, 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod* 63, pp. 1531-1537.
- Bedford, M., 1979. *Evolution of the sperm maturation and sperm storage functions of the epididymis*. pp. 7–21. Baltimore(Munich: Urban & Schwarzenberg Inc): DW Fawcett and JM Bedford.
- Belibasaki, S., Amiridis, G.S., Lymberopoulus, A., Varsakeli, S., Kouskoura, T. Ram seminal plasma and fertility: results from an ongoing field study. *Ac Vet Hung*, 2000. 48: 335-341.
- Ben, W.X., Fu, M.T., Mao, L.K., Ming, Z.W., Xiong, W.W. Effects of various concentrations of native seminal plasma in cryoprotectant on viability of human sperm. *Arch Androl*, 1997. 39:211–216.
- Bergeron, A. & Manjunath, P., 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk.. *Mol Reprod Develop* 73 , p. 1338–1344.
- Berger, T., Andereson, D. & Penedo, C., 1996. Porcine sperm fertilizing potential in relationship to sperm functional capacities. *Animal Reproduction Science*. 44, pp. 231-239.
- Blanes, R., Fernández, P., Jiménez, A. & Romeu, A., 2004. La pentoxifilina como agente antioxidante en el proceso de criopreservación espermática. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, Vol. 21.
- Bloom, W. & Fawcett, W., 1995. *Tratado de histología*. s.l.: Mac Graw Hill, 12°ed..
- Boccia, L. y otros, 2013 . Osteopontin improves sperm capacitation and in vitro fertilization efficiency in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, 80, p. 212–217.
- Brewer, L. & Corzett, M. B. R., 2002. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *J Biol Chem* 277, p. 38895–38900.

- Brinsko, S.P. Insemination doses: How low can we go?. *Theriogenology*, 2006. 66:543–550.
- Brooks, D., 1983. Epididymal functions and their hormonal regulation.. *Aust. J. Biol. Sci.*, 36, pp. 205-221.
- Caballero, I., 2007. *Estudio del plasma seminal y la espermadhesina PSP-I/PSP-II sobre la funcionalidad de los espermatozoides de verraco*. Murcia: Universidad de Murcia. España. 19- 52 p.
- Cabrera, P. & Pantoja, C., 2012. Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Rev Inv Vet Perú* 23 (2): , pp. 192-200.
- Cardozo, J., 2006. *Identificación mediante electroforesis bidimensional de proteínas del plasma seminal ovino capaces de proteger de los daños del frío*. Zaragoza(Aragón): Universidad de Zaragoza.
- Cardozo, J. y otros, 2006. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analysed by two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. *Theriogenology*. *In press*.
- Casas, I. y otros, 2009. Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology*, 72, pp. 930-948.
- Casas, I. & Valderrama, M., 1998. *El Bovino Criollo Hartón del Valle*. Palmira(Valle): Universidad Nacional de Colombia.
- Castillo, V., 2012. *Desarrollo de un método de referencia basado en el método isas y análisis de imágenes para la evaluación morfométrica del acrosoma del espermatozoide en la especie ovina*. Zaragoza(Aragón): Universidad de Zaragoza.
- Chang, M.C. A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature*, 1957. 179: 258-259.

- Cooke, J., 1999. Y chromosome and male infertility. *Rev Reprod*, 4, p. 5–10.
- Curtis, K. & Amann, P., 1981. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. *J. Anim. Sci.* 53(6), pp. 1645-1657.
- Cyr, G., 2001. *Cell-cell interactions in the epididymis*, pp. 215–226. Medimond Publishing Co(NJ): B Robaire, H Chemes and CR Morales Englewood.
- Dacheux, .., Castella, S., Gatti, L. & Dacheux, F., 2005. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*. 63, pp. 319-341.
- Dadoune, P., Siffroi, P. & Alfonsi, F., 2004. Transcription in haploid male germ cells. *Int Rev Cytol* 237, p. 1–56.
- Dawson, G.R., Webb, G.W., Pruitt, J.A., Loughlin, T.M., Arns, M.J. Effect of different processing techniques on motility and acrosomal integrity of cold-stored stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci*, 2000. 20:191–194.
- De Lamirande, E., Eiley, D., Gagnon, C. Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids. *Int J Androl*, 1993. 16:258-266.
- De La Vega, A., Wilde, O. & Cruz, L., 1997. Efecto de la pentoxifilina y la cafeína sobre la motilidad de espermatozoides bovinos criopreservados,. *Avances en Ciencias Veterinarias*, vol.12, Nº 2.
- Diaz, H., 2014. *Evaluación de las características bioquímicas del plasma seminal de alpacas, fresco y post descongelamiento*. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

- Don, J. & Stelzer, G., 2002. The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 187, p. 115–124.
- Dostàlovà, Z. y otros, 1994. Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 375, pp. 457-461.
- Eddy, E., 1999. Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod*, 4, p. 23–30.
- Eddy, M., Toshimori, K. & O'Brien, D., 2003. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech*, Issue 61, p. 103–115.
- Ekhiasi, M. y otros, 2008. Point mutations abolishing the mannose-binding capability of boar spermadhesin AQN-1. *Biochim Biophys Acta*, 1784, pp. 856-862.
- El-Hajj Ghaoui, R., Gillian, L., Thomson, P.C., Evans, G., Maxwell, W.M.C. Effect of seminal plasma fractions from entire and vasectomised rams on the motility characteristics, membrane status and in vitro fertility of ram spermatozoa. *J Androl*, 2006 Aug 23.
- Fawcett, D., 1975. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol*, 44, pp. 394-436.
- Fernández, J. & Gallego, M., 2006. Immunohistochemical localization of sperm preserving proteins in the ram reproductive tract." *J Androl In Press. J Androl In Press*.
- Flesch, F. & Gadella, B., 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Bioch Biophys, Acta* 1469, pp. 197-235.
- Flickinger, J., 1985. The effects of vasectomy on the testis. *N Engl J Med*, 313, p. 1283–1285.

Fraser, L., Strzezek, J. & Saiz, F., 2001. Variaciones en el movimiento de los espermatozoides de verraco durante la administración de acetato de ciproterona (ACP).. *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.*, 16(1), pp. 135-142.

Fuller, S.J., Whittingham, D.G. Capacitation-like changes occur in mouse spermatozoa cooled to low temperatures. *Mol Reprod Dev*, 1997. 46: 318-324

García, M.A, and Graham, E.F. Effects of low-molecular-weight fractions (LMWF) from milk, egg yolk, and seminal plasma on freezability of bovine spermatozoa. *Cryobiology*, 1987. 24: 429-436.

Gerton, G., 2002. *Function of the sperm acrosome*. San Diego, D Hardy, p. 265–302.

Gillan, L., Evans, G., Maxwell, W.M. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*, 1997. 9(5):481-487.

Gliki, G. y otros, 2004. Spermatid differentiation requires the assembly of a cell polarity complex downstream of junctional adhesion molecule. *C. Nature*, 431, p. 320–324.

Guillaume, M., Sabido, O. & Durand, P. L. R., 2004. Cryopreservation Induces an Apoptosis-Like Mechanism in Bull Sperm. *Biology of Reproduction* 71(1), pp. 28-37.

Güngör, S. y otros, 2016. Combination of Cysteamine and Lipoic Acid Improves the Post-Thawed Bull Sperm Parameters.. *Kocatepe Vet Journal*, 9(2), pp. 88-96.

Hafez, E., 2002. *Reproducción e Inseminación Artificial*. 7ª ed. México: Mc. Graw-Hill, 519 p.

Hammerstedt, R., Graham, J. & Nolan, J., 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *Journal of Andrology* 11(1), pp. 73-88.

Hansen, G., 2008. *Factores que intervienen en la congelación del semen vacuno*. Palermo, Buenos Aires, s.n.

- Harrison, R., 1975. *Aspects of the enzymology of mammalian spermatozoa*. s.l.:Biol J Linn Soc.
- Harshan, H. y otros, 2006. Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 93, pp. 124-133.
- Harvey, S. Z. Y., Landry, F., Miller, C. & Smith, J., 2001. Insights into a plasma membrane signature. *Physiological Genomics* 5(3), pp. 129-136.
- Hinton, T., Lan, J., Lye, J. & Labus, C., 2000. *Regulation of epididymal control by testicular factors: the lumicrine hypothesis*, pp.163–173. Norwell, MA(Serono Symposia): E Goldberg.
- Ho, C. & Suarez, S., 2003. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol Reprod* 68, p. 1590–1596.
- Holt, W., 2000. Basic aspects of frozen storage of semen.. *Anim Reprod Sci*. 62, pp. 3-22.
- Holt, W., Head, M. & Horth, R., 1992. Freeze-Induced Membrane Damage in Ram Spermatozoa Is Manifested After Thawing - Observations with Experimental Cryomicroscopy. *Biology of Reproduction* 46(6), pp. 1086-1094.
- Ilio, Y. & Hess, A., 1994. Structure and function of the ductuli efferentes: a review. *Microsc Res Tech*, 29, p. 432–467.
- Januskauskas, A. J. A. & Rodríguez, H., 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology* 60(4), pp. 743-758.

- Jobim, M. y otros, 2004. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, 61, pp. 255-266.
- Killian, G., Chapman, D. & Rogowski, L., 1993. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasm. *Biol Reprod*, 49, pp. 1202-1207.
- Killian, J. & Chapman, A. R. A., 1993. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod* 49, pp. 1202-1207.
- Knobil, E. & Neil, J., 2003. *Male Reproductive Sistem, Nonhuman Mammals*. s.l.:M – Pri. San Diego California.
- Lacham-Kaplan, O., 2004. Lacham-Kaplan O (2004) In vivo and in vitro differentiation of male germ cells in the mouse. *Reproduction*, 128, p. 147–152.
- Larson, K., 1986. *Evaluation of boar semen. En: current therapy in Theriogenology*. s.l.:Eds: Morrow. 972-975 p..
- Leahy, T. & De Graaf, S., 2012. Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. *Reprod Domest Anim*. 47, pp. 207-213.
- Leahy, T. & Gadella, B., 2011. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction*, 142, pp. 759-778.
- Lessard, C. y otros, 2000. Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *Journal of Andrology* 21(5), pp. 700-707.
- Lozano, H., 2009. Factores que afectan la calidad seminal en toros. *Med. vet. zoot.* 56, pp. 258-272.
- Mann, T. & Lutwak, C., 1981. *Male Reproductive Function and Semen*. Springer-Verlag(Berlin, 495 pp): s.n.

- Martínez, G., 2005. Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Rev Cubana Farm*; 39, pp. 3-8.
- Mascarenhas, M., Macedo, R. & Costa, R., 2009a. Marcadores protéicos de fertilidade no plasma seminal e na membrana plasmática. *Rev Bras Reprod Anim Supl, Belo Horizonte, n.6*, pp. 11-19.
- Mascarenhas, M., Macedo, R. & Costa, R., 2009b. Proteínas do plasma seminal relacionadas a congelabilidade do sêmen bovino. *Rev Bras Reprod Anim Supl, Belo Horizonte, n.6*, pp. 25-31.
- Maxwell, W.M.C., Johnson, L.A. Clortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol Reprod Dev*, 1997. 46: 408-418.
- Maxwell, M. y otros, 1998. The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertile Dev 10*, pp. 440-444.
- Maxwell, W.M.C., Johnson, L.A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*, 1999. 52: 1353-1362
- Maxwell, W., De Graaf, S., El-Hajj, R. & Evans, G., 2007. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil (Suppl 64)*, pp. 13-38.
- Mc Donald, L., 1991. *Endocrinología veterinaria y reproducción 4a ed.*. México: Interamericana, pp. 294-344..
- McLachlan, R., 2000. The endocrine control of spermatogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 14*, p. 345–362.
- Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A. & Rodríguez, J., 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't better. *Theriogenology*; 57, pp. 327-344.

- Mercado, E., 2011. *Caracterización de la congelabilidad y mejora de los diluyentes de crioconservación espermática en porcino ibérico*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Moore, A.I., Squires, E.L., Graham, J.K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*, 2005. 63: 2372-2381.
- Moura, A., Koc, H., Chapman, D. & Killian, G., 2006. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J Androl.* 27, pp. 201-211.
- Moura, A., Koc, H., Chapman, D. & Killian, G., 2010. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. *J Proteomics*, 73, pp. 2006-2020.
- Muiño, R. y otros, 2005. *Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial*". Zaragoza(Aragón): Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (AIDA).
- Neild, D. y otros, 1999. The hypo-osmotic swelling test in. *Equine spermatozoa. Theriogenology*, 51(4), pp. 721- 727.
- Nelson, L. & Cox, M., 2009. *Lehninger. Principles of Biochemistry*.. Fifth Edition ed. s.l.:W. H. Freeman & Co. New Cork.
- Oko, J., 1995. Developmental expression and possible role of perinuclear theca proteins in mammalian spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 7, p. 777–797.
- Olden, K. y otros, 1985. Function of glycoprotein glycans. *TIBS* 110, pp. 78-82.
- Olfati, K., Daghigh, H. & Ashrafi, I., 2014. Effects of in combination antioxidant supplementation on microscopic and oxidative parameters of freeze-thaw bull sperm.. *Cell Tissue Bank*, 15(3), pp. 461-470.

- Olivares, A., 2012. *Parámetros reproductivos en cerdas inseminadas con semen refrigerado en presencia de plasma seminal homólogo*. Veracruz: Universidad Veracruzana.
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A. & Giraldo, C., 2006. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Col Cienc Pec* 19.
- Pérez, H., 2009. *Morfofisiología del aparato reproductor del macho*. La Habana: Universidad Agraria de la Habana.
- Perez, R., Barrios, B., Muiño, T. & Cebrian, A., 2001. Seasonal differences in ram seasonal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. *J Chromat.* 760, pp. 113-121.
- Perry, G. & Patterson, D., 2010. Determinación de la fertilidad reproductiva de toros padres.. *HEREFORD, BS. AS., 71(638)*. Department of Animal Sciences <http://muextension.missouri.edu>, pp. 52-59.
- Polge, C., 1952. Freezing of spermatozoa. In: *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*. Ed: Ashwood-Smith MS, Ferrant J Pitman, Bath, pp. 45-53.
- Prathalingam, N. y otros, 2006. Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. *Theriogenology*, v.66, pp. 1894-1900.
- Pursel, V., Johnson, L. & Schulman, L., 1973. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J Anim Sci* 37, pp. 528-531.
- Rebolledo, A. y otros, 2007. Fertility in hair sheep inseminated with freeze spermatozoa rediluted with seminal plasma. *Cient Fac Cienc Vet*, 17, pp. 73-76.
- Reijo-Pera, A., 2000. *The DAZ gene family and germ-cell development*, pp. 213–225. MA: Serono Symposia: E Goldberg Norwell.

Restrepo, N. y otros, 2013. Perfil electroforético bidimensional de proteínas de la membrana espermática de toros Sanmartinero.. *AIDA* , XV Jornadas sobre Producción Animal, Tomo I, pp. 422-424.

Revista EL CEBÚ N° 382, 2011. *Razas Cebuínas*, Bogotá: ASOCEBÚ.

Ricker, J. y otros, 2006. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biology Reproduction* 74(2), pp. 359-365.

Rossi, P., Sette, C., Dolci, S. & Geremia, R., 2000. Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. *J Endocrinol Invest*, 23, p. 609–615.

Rubio, J., Quintero, A. & González, D., 2009. Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Rev. Cient. (Maracaibo)* v.19 n.4 Maracaibo, pp. 382 - 389.

Rueda, F., 2008. *Componentes bioquímicos del semen de toros de razas criollas en el trópico Colombiano*. Bogotá D.C: s.n.

Rueda, F., 2011. *Proteínas del plasma seminal de toros sanmartinero y cebú y su relación con la integridad de la membrana del espermatozoide sometido a procesos de criopreservación*. Bogotá, DC: Universidad Nacional de Colombia.

Saacke, R., 2008. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *ELSEVIER*, pp. 473-478.

Salisbury, G., 1978. *Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle*, 2 edn. San Francisco: Editorial Freeman.

Sánchez, N., 2009. *Determinación de perfiles electroforéticos de proteínas del plasma seminal de toros cebú Brahman y Sanmartinero, y su correlación con las variables de calidad seminal*. Bogotá DC(Cundinamarca): Universidad Incca de Colombia, Facultad de Ciencias Biológicas.

Sandoval, A., 2013. *Papel de la aspirina en la potenciación de la activación del factor de transcripción Hsp en células mononucleares de sangre periférica de rata*. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Sandoval, R., 2005. *Criopreservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes*. Lima : Universidad Nacional Mayor de san Marcos. Facultad de medicina veterinaria. .

Senger, P., 2003. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2 edn. Washington: Current Conceptions, 373 p.

Sette, C., Dolci, S., Geremia, R. & Rossi, P., 2000. The role of stem cell factor and of alternative c-kit gene products in the establishment, maintenance and function of germ cells. *Int J Dev Biol*, 44, p. 599–608.

Sinha-Hikim, P. y otros, 2003. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 85, p. 175–182.

Sutovsky, P., Manandhar, G., Wu, A. & Oko, R., 2003. Interactions of the sperm perinuclear theca with the oocyte: implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense and assisted reproduction. *Microsc Res Tech*, 61, p. 362–378.

Sutovsky, P. y otros, 2004. Degradation of the paternal mitochondria after fertilization: implications for heteroplasmy, ART and mtDNA inheritance. *Reprod Biomed Online*, 8, p. 24–33.

Tabarez, A., 2014. *Optimización del protocolo de Crioconservación de semen caprino de la raza Autóctona en peligro de extinción blanca de Rasquera*. Tesis doctoral. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona.

- Thérien, I., Soubeyrand, S. & Manjunath, P., 1998. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod*, v.57, pp. 1080-1088.
- Thomas, C., Garner, D. & Dejarnette, J. M. C., 1998. Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biology of Reproduction* 58(3), pp. 786-793.
- Toshimori, K., Tanii, I., Araki, S. & Oura, C., 1992. Characterization of the antigen recognized by a monoclonal antibody MN9: unique transport pathway to the equatorial segment of sperm head during spermiogenesis. *Cell Tissue Res.* 270, p. 459–468.
- Tradaoli, G. & Noro, T., 2007. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine Sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology*, 67 (7), p. 1249/55.
- Tsai-Morris, H., Sheng, Y., Lei, J. & Dufau, L., 2004. Gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/Ddx25) is essential for spermatid development and completion of spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, p. 6373–6378.
- Vera, O., 2002. *Predicción del potencial fértil del semen bovino mediante pruebas in vitro de la capacidad funcional espermática*. Maracaibo, Venezuela, Astro Data S.A., pp. 497 - 504.
- Vera, O., 2002. *Predicción del potencial fértil del semen bovino mediante pruebas in vitro de la capacidad funcional espermática*. Maracaibo, Venezuela, Astro Data S.A., pp. 497 - 504.
- Vera, O., 2008. Fisiología de los espermatozoides bovinos. En: *Desarrollo Sostenible de Ganadería Doble Propósito*. Maracaibo - Venezuela (Maracaibo): Fundación GIRARZ, pp. 495-504.

- Villalba, C., 2014. *Implicaciones del estrés oxidativo en la infertilidad masculina: Análisis de marcadores bioquímicos en plasma seminal y su asociación con parámetros del seminograma y la capacitación espermática*, Tesis doctoral. Alicante: Universidad de Alicante.
- Voglmayr, J. & Amann, R., 1973. Glucose metabolism and lipid synthesis of caudaepididymal and ejaculated bull spermatozoa in the presence of selected androgens. *Acta Endocrinol. Vol. 73*, pp. 196-208.
- Watson, F., 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development 7(4)*, pp. 871-891.
- Yanagimachi, R., 1994. *The Physiology of Reproduction*. s.l.:Ed. J.D Neills.
- Yeom, I. y otros, 1996. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonic cells. *Development*, 122, p. 881–894.
- Ying, Y. & Zhao, Q., 2001. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol*, 232, p. 484–492.
- Yoshinaga, K. & Toshimori, K., 2003. Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation. *Microsc Res Tech*, 61, p. 39–45.
- Yuan, Y. y otros, 2003. Zona pellucida induces activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa.. *Biol Reprod*, v.68, pp. 904-913.

