



UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN RECURSOS CINEGÉTICOS

Mejora del protocolo de criopreservación espermática en ciervo Ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*): Efectos del tiempo de equilibración y del método de refrigeración y de congelación sobre la calidad espermática a la descongelación.

Silvia Villaverde Morcillo

Directoras:

Dra. Ana Josefa Soler Valls

Dra. María Rocío Fernández Santos

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN INVESTIGACIÓN BÁSICA Y APLICADA EN
RECURSOS CINEGÉTICOS**

Línea de Investigación: Banco de Recursos Genéticos

Albacete, 3 de diciembre del 2012



**Instituto de Investigación
en Recursos Cinegéticos**

CSIC - UCLM - JCCM

IREC



Contenido

Resumen.....	3
1. Introducción.....	5
2. Material y métodos.....	6
2.1. Origen y preparación de las muestras.....	6
2.2. Recogida espermática y evaluación inicial de las muestras.....	6
2.3. Congelación espermática.....	7
2.4. Evaluación espermática.....	7
2.4.1. Motilidad espermática subjetiva.....	7
2.4.2. Parámetros de velocidad espermática.....	7
2.4.3. Evaluación estado del acrosoma.....	8
2.4.4. Evaluación mediante citometría de flujo.....	8
2.5. Diseño experimental.....	9
2.5.1. Experimento 1.- Efectos de refrigerar el material espermático en tubo (15mL) o en pajuela sobre la calidad seminal a la descongelación de espermatozoides de ciervo Ibérico.....	10
2.5.2. Experimento 2.- Efecto del tiempo de equilibración sobre la calidad seminal a la descongelación de espermatozoides epididmarios de ciervo Ibérico.....	10
2.5.3. Experimento 3.- Efecto del método de congelación sobre la calidad seminal a la descongelación en espermatozoides epididmarios de ciervo Ibérico.....	10
2.6. Análisis estadístico.....	12
3. Resultados.....	12
3.1. Experimento 1.- Efectos de refrigerar el material espermático en tubo (15mL) o en pajuela sobre la calidad seminal a la descongelación de espermatozoides de ciervo Ibérico.....	12
3.2. Experimento 2.- Evaluación tiempos de equilibración.....	13
3.3. Experimento 3.- Comparativa de tres métodos ambulantes de congelación.....	15
4. Discusion.....	17
5. Conclusiones.....	20
6. Bibliografía.....	21



Resumen

El objetivo del trabajo que a continuación se expone fue estudiar los efectos de modificar diferentes aspectos del protocolo de congelación, sobre la calidad de espermatozoides de ciervo Ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*) descongelados, con el fin de adaptar dicho protocolo a las condiciones habituales de trabajo en el campo.

El material espermático procedió de machos adultos de ciervo Ibérico abatidos durante la época de montería (octubre-diciembre) y fue recogido *postmortem* de la cola del epidídimo. Tras la recogida los espermatozoides fueron congelados. El diluyente de congelación utilizado fue un TRIS-citrato-fructosa adicionado en 2 fracciones. La fracción A se formuló con un 20% de yema de huevo y la fracción B fue realizada igual que la fracción A más un 6% de glicerol.

Estas muestras fueron utilizadas para realizar varios experimentos. En primer lugar se compararon dos técnicas de refrigeración, a) de temperatura ambiente (~ 15°C) a 5°C, con las muestras en un tubo de 15mL y b) con las muestras espermáticas directamente empajueladas. El segundo experimento, consistió en exponer las muestras a diferentes periodos de equilibración (0, 30, 60 y 120 minutos) y en el tercer experimento se compararon cuatro métodos de congelación diferentes (congelación en vapores de nitrógeno líquido en tanque (control), congelación en vapores de nitrógeno líquido en caja de poliestireno, congelación sobre hielo seco y congelación sobre placa metálica).

La calidad seminal fue estudiada tras la descongelación valorándose los siguientes parámetros: motilidad individual, calidad de movimiento y porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto (NAR) mediante microscopía de contraste de fases, parámetros descriptores del movimiento evaluados mediante sistemas de imágenes computerizados (CASA), y viabilidad, potencial de la membrana mitocondrial e integridad del ADN mediante citometría de flujo.

En el experimento 1, observamos que la refrigeración en pajuela incrementó ($p < 0,05$) a la descongelación el número de espermatozoides vivos y con la mitocondria activa y disminuyó el porcentaje de espermatozoides apoptóticos con respecto a la refrigeración en tubo. Con respecto al experimento 2, observamos que cuando no se llevó a cabo periodo de equilibración, la calidad seminal a la descongelación fue inferior al resto de los tiempos de equilibración. Así, el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos como la VSL y VAP fueron menores para las muestras no refrigeradas en relación al resto. En el tercer experimento, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la calidad seminal a la descongelación entre congelar las muestras en tanque o en caja de poliestireno. Sin embargo, se observó una disminución ($p < 0,05$) de la motilidad y de NAR para las muestras congeladas con hielo seco y en placa metálica en relación al resto de los métodos de congelación. Además, para las muestras espermáticas que fueron congeladas en placa metálica también fueron menores los valores de VCL, VSL, VAP y ALH y todos los parámetros evaluados mediante citometría de flujo en relación al método control.



En conclusión, diversas modificaciones en el protocolo de congelación estándar de espermatozoides epididimarios de ciervo Ibérico pueden ser llevadas a cabo sin afectar a la calidad espermática tras la descongelación. Esto permitirá simplificar el protocolo de congelación facilitando el trabajo realizado en condiciones de campo

Palabras clave: congelación, espermatozoides epididimarios, refrigeración, equilibración, congelación.



1. Introducción.

Las técnicas de reproducción asistida junto con los métodos de criopreservación de germoplasma han sido significativamente implementadas en las últimas décadas tanto en la medicina humana como en la medicina veterinaria. En el ámbito de la veterinaria de fauna silvestre ha cobrado gran importancia el desarrollo de las técnicas de obtención y congelación de espermatozoides y ovocitos, que pueden ser obtenidos incluso de animales hallados muertos (Holt, 1984, Pukazhenthí et al., 2007) ya que se considera una herramienta importante para la conservación de la biodiversidad.

La recogida de material espermático *postmortem* es interesante ya que nos permite obtener germoplasma tanto de especies cinegéticas (Soler et al., 2008), como en ejemplares de especies en peligro de extinción hallados muertos (Gañán et al., 2009). La creación de bancos de material genético para este tipo de especies mejora notablemente el manejo de las poblaciones preservando la variabilidad genética (Soler et al., 2008).

El proceso de congelación celular produce daños, por eso se utilizan diluyentes de congelación con crioprotectores (Fernandez-Santos et al., 2005, Fernandez-Santos et al., 2006a, Fernandez-Santos et al., 2006b, Soler et al., 2003b). La criopreservación de los espermatozoides tiene efectos sobre sus características físicas. Se han descrito daños en su membrana plasmática y acrosómica (Watson, 1995, Peña et al., 2003), en la mitocondria (Peña et al., 2003, Meyers, 2005) y en la capacidad de fertilización (Watson, 2000, Gillan and Maxwell, 1999). Las lesiones por congelación que se han observado en los espermatozoides son debidas, principalmente, al conocido como choque por frío, que se produce cuando hay un disminución brusca de la temperatura de 25 °C a 5 °C (Holt, 2000).

Para minimizar los efectos dañinos durante la criopreservación es necesario llevar a cabo un protocolo de congelación óptimo. Así, para el protocolo estándar utilizado en espermatozoides epididimarios de ciervo Ibérico, las muestras son refrigeradas en un tubo disminuyendo la temperatura de temperatura ambiente a 5 °C de forma rápida (10 min), tras lo cual son refrigeradas a 5 °C durante 120 minutos (periodo de equilibración) y congeladas en vapores de nitrógeno líquido en un tanque (Garde et al., 2006).

El periodo de equilibración es necesario puesto que favorece la estabilización de las membranas a 5°C, principalmente la de la membrana acrosómica, minimizando así los daños causados por la congelación (Watson and Martin, 1976). Los lípidos de la membrana plasmática requieren de un periodo de tiempo para estabilizarse con el crioprotector y que éste pueda ejercer su función (Hammerstedt et al., 1990). En bovino se ha demostrado que los periodos de equilibración largos reportan mejores resultados que los procedimientos con periodos de equilibración cortos o ausentes (Guimarães et al.).

Los efectos de las variaciones en los métodos de refrigeración y congelación, así como en el sistema de almacenamiento del semen eyaculado durante la refrigeración, han sido estudiados en diferentes especies salvajes, oryx (Roth et al., 1999) y ocelote (Stoops et al., 2007) y domésticas, toro (Guimarães et al., 2010) y caprino (Memon et al., 2012) con gran variedad de resultados.

Hasta el momento no existe ningún trabajo en el que se hayan estudiado los efectos de las modificaciones en el protocolo de congelación en espermatozoides de ciervo Ibérico. Además, en este trabajo, hemos empleado espermatozoides



epididimarios que presentan unas características diferentes a los espermatozoides procedentes de eyaculado ya que no han estado expuestos a las secreciones de las glándulas sexuales accesorias que alteran las propiedades de la membrana y, por lo tanto, la sensibilidad y resistencia al proceso de criopreservación (Fernandez-Santos et al., 2006a).

Por todo ello el objetivo general de este trabajo es evaluar diferentes modificaciones del protocolo de congelación para simplificarlo en condiciones de campo. Este hecho es especialmente relevante en el caso del ciervo Ibérico puesto que los lugares donde son recogidas las muestras suelen estar alejadas del laboratorio con lo que la posibilidad de llevar a cabo el proceso de congelación en el campo simplificaría y acortaría los tiempos desde la recogida de los testículos hasta la llegada al laboratorio. Se plantean como objetivos específicos:

- 1.- Evaluar el efecto de refrigerar el semen en tubo o en pajuela sobre la calidad seminal a la descongelación de espermatozoides epididimarios de ciervo Ibérico.
- 2.- Evaluar el efecto sobre la calidad seminal a la descongelación de muestras espermáticas epididimarias de ciervo Ibérico tras ser expuestas a diferentes tiempos de equilibración (0, 30, 60 y 120 minutos).
- 3.- Estudiar el efecto sobre la calidad seminal a la descongelación de diferentes métodos de congelación (vapores en tanque, vapores en caja de poliestireno, hielo seco y placa metálica) en muestras espermáticas epididimarias de ciervo Ibérico.

2. Material y métodos

2.1. Origen y preparación de las muestras.

Los diferentes procedimientos se realizaron empleando el material espermático obtenido de ejemplares adultos de ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*) abatidos en zonas de caza controlada durante la estación reproductiva (octubre-diciembre), dentro del territorio de la Comunidad de Castilla la Mancha, conforme a la Ley de caza de Castilla la Mancha 2/93. Los testículos fueron recogidos junto al escroto antes de las 6 horas *postmortem*, y se trasladaron a temperatura ambiente hasta el laboratorio donde se procesaron. En los experimentos 1 y 2 se emplearon muestras de 25 ejemplares, mientras que en el experimentos 3 se emplearon muestras procedentes de 6 machos..

2.2. Recogida espermática y evaluación inicial de las muestras.

Los espermatozoides fueron extraídos manualmente de la cola del epidídimo mediante el método descrito por Soler et al. (Soler et al., 2003a). Los espermatozoides se recogieron de la cola del epidídimo y fueron depositados en una placa de petri con 0,5ml del diluyente de congelación TRIS-citrato-fructosa con un 20% de yema de huevo clarificada (Fracción A). Posteriormente se añadió la cantidad suficiente de Fracción A para obtener una fracción final de 400×10^6 spz/mL. Una vez diluido se evaluó la motilidad (como se describe en el apartado 2.3.1.) y solamente se congelaron aquellas muestras con valores superiores a un 60%.



2.3. Congelación espermática.

Una vez que las muestras fueron diluidas con la FA, se añadió el mismo volumen (concentración final 200×10^6 spz/mL) de la FB, con igual composición que la FA pero con un 6% de glicerol. Tras ello, las muestras fueron refrigeradas de temperatura ambiente a 5 °C en un tubo de 15ml de forma rápida en 10 minutos y equilibradas a la temperatura de 5 °C durante 120 minutos. Posteriormente, las muestras fueron envasadas en pajuelas y congeladas en vapores de nitrógeno líquido. Para ello, las pajuelas se depositaron en un rack con una altura de 4,5cm por encima del nivel del nitrógeno líquido y fueron congeladas en vapores en un tanque, tras lo cual se almacenaron en nitrógeno líquido como mínimo durante 1 mes. Modificaciones de este tipo de congelación estándar fueron estudiadas y son descritas en el diseño experimental.

2.4 Evaluación espermática.

Las muestras espermáticas fueron descongeladas a 37 °C durante 20 segundos tras lo cual se llevó a cabo la siguiente evaluación seminal.

2.4.1. Motilidad espermática subjetiva

La valoración de la motilidad espermática subjetiva se realizó mediante la observación a 100x aumentos de una muestra espermática. Para ello, 5 µl de muestra espermática diluida con el diluyente de congelación fueron depositados en una cámara de Makler previamente atemperada a 37 °C con platina calefactable (Nikon Eclipse 80i;Tokyo;Japón). Se valoraron dos parámetros:

1. *Porcentaje de espermatozoides móviles*, se evaluó la media de espermatozoides móviles en diferentes campos de la muestra expresándose en porcentaje.
2. *Calidad del movimiento (CM)* de los espermatozoides, se determinó en función del tipo de movimiento generalizado de los espermatozoides siendo:
0=inmóviles
1=espermatozoides que giran sobre sí mismos
2=espermatozoides con movimientos circulares
3=movimientos rectilíneos lentos.
4=movimientos rectilíneos rápidos y
5=movimientos rectilíneos muy rápidos

2.4.2. Parámetros de velocidad espermática.

Para el análisis de los parámetros de velocidad de los espermatozoides se empleó un sistema de análisis espermático computerizado (Sperm-Class Analyzer®; Microptic; Barcelona, España) que lleva a cabo una evaluación de los mismos a partir de una grabación de la muestra a través de un microscopio óptico (Nikon Eclipse 80i;Tokyo;Japón) y una cámara digital (A302fs DC; Basler Vision Technologies;Ahrensburg, Germany).

Para la evaluación se depositaron 5 µl de muestra espermática en una cámara de Makler atemperada a 37 °C y se observaron con un microscopio de contraste de fases de



100x. Se evaluaron para cada espermatozoide los siguientes parámetros (Mortimer and Mortimer, 1988):

1. Velocidad curvilínea (VCL; $\mu\text{m}/\text{seg}$)
2. Velocidad rectilínea (VSL; $\mu\text{m}/\text{seg}$)
3. Velocidad para la trayectoria corregida (VAP; $\mu\text{m}/\text{seg}$)
4. Linealidad (LIN;%)
5. Desplazamiento lateral de la cabeza (ALH; μm)

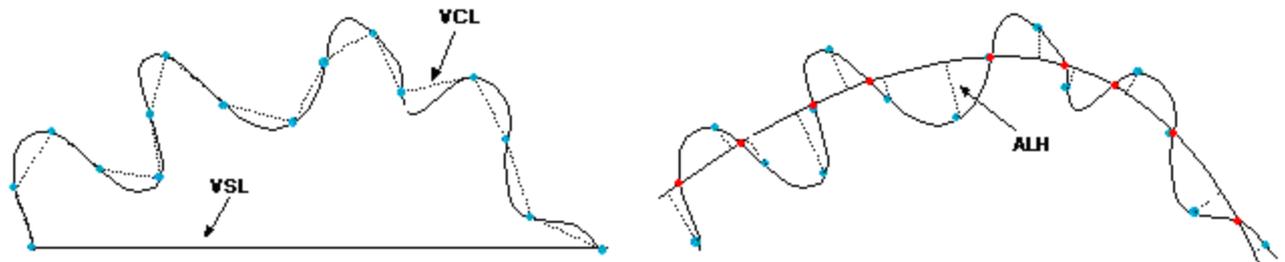


Figura.1.- Esquema de los parámetros espermáticos de velocidad.

2.4.3. Evaluación del estado del acrosoma.

Para evaluar la integridad acrosómica de los espermatozoides se empleó microscopía óptica (Nikon Eclipse 80i;Tokyo;Japón), de contraste de fases a 400x. Para ello se utilizaron 5 μl del semen que se depositaron en solución fijadora de glutaraldehído al 2% tamponada en cacodilato de sodio/HCL 0,165 M (pH=7,3). Aquellos espermatozoides con el borde apical íntegro se consideraron como células con el acrosoma intacto (NAR).

2.4.4. Evaluación mediante citometría de flujo.

Algunas de las características fisiológicas de los espermatozoides fueron evaluadas mediante citometría de flujo. El procedimiento se realizó de acuerdo a trabajos anteriores de otros autores (Domínguez-Rebolledo *et al.*, 2009; Martínez-Pastor *et al.*, 2009; Domínguez-Rebolledo *et al.*, 2010). Las muestras espermáticas fueron diluidas hasta los 10^6 espermatozoides/ml en medio BGM-3 y teñido con tres combinaciones diferentes de fluoróforos.

Las evaluaciones se realizaron mediante un citómetro de flujo *Cytomics FC 500* (Becton Dickinson, San José, California) equipado con un láser de argón de 488-nm (YO-PRO-1, PI, CM-H₂DCFDA y SCSA) y otro de helio de 633-nm (para el Mitotracker Deep Red). La fluorescencia del YO-PRO-1 y SCSA fue leída usando un filtro 525/25BP. Mientras, en el caso del PI y el Mitotracker Deep Red se emplearon filtros 615DSP y 675/40BP respectivamente. Para cada muestra, fueron grabadas aproximadamente unas 10.000 células. El análisis de los datos de citometría fue llevado a cabo usando el software *WEASEL v.2.6* (WEHI; Melbourne, Victoria, Australia).

Se evaluaron los siguientes parámetros espermáticos:

- La *viabilidad* espermática (estado del plasmalema) fue evaluada con YOPRO-1 (0,1 μM) y yoduro de propidio (PI) (10 μM). El YO-PRO-1 permite discriminar aquellos espermatozoides con un aumento en la permeabilidad de la membrana y el PI marca aquellas células espermáticas con la membrana dañada. Los espermatozoides fueron incubados en oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se identificaron



tres subpoblaciones diferentes: espermatozoides viables (YO-PRO-1-/PI-), espermatozoides apoptóticos (YOPRO-1+/PI-) y espermatozoides muertos (YO-PRO-1+/PI +); dos de las cuales fueron tenidas en cuenta en este trabajo: espermatozoides viables (YO-PRO-1-/PI-) y espermatozoides apoptóticos (YO-PRO-1+/PI-).

- La actividad *mitochondrial* fue evaluada con una combinación de YO-PRO-1 (0,1 μ M) y Mitotracker Deep Red (0,1 μ M). En este caso mediante el uso del Mitotracker se identificaron las mitocondrias activas, mientras que con el YOPRO-1 se discriminó los espermatozoides con la membrana íntegra de los que presentaron un aumento de la permeabilidad (Martínez Pastor *et al.* 2010). Al igual que en el caso anterior, los espermatozoides fueron incubados en presencia de los fluorocromos en oscuridad durante 20 minutos. Los espermatozoides YO-PRO-1-/MT+ fueron considerados como viables con mitocondria activa.

- El estado del ADN se evaluó mediante el *Sperm Chromatin Stability Assessment* (SCSA[®]). Para ello, se utilizó el colorante metacromático naranja de acridina, que se intercala con las hebras de la cromatina, dando fluorescencia verde en las zonas con ADN intacto y rojo en las zonas con ADN dañado como describió Evenson *et al.* (2002). Las muestras (5 μ l) fueron diluidas en medio TNE (500 μ l), congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80° C hasta su evaluación. En el momento de la evaluación las muestras fueron descongeladas a 37 °C en un baño María. Posteriormente se añadieron 400 μ l de solución detergente y treinta segundos después se incorporó el colorante naranja de acridina (1,2 ml) (Evenson *et al.*, 2002). La lectura se realizó a los dos minutos y medio. El parámetro utilizado en este trabajo, fue el índice de fragmentación del ADN (% DFI_{total}). Este índice de fragmentación informa sobre la cantidad de emisión roja que produce una muestra del total de fluorescencia emitida.

Los análisis mediante citometría de flujo se realizaron con un citómetro de flujo modelo Becton Dickinson LSR-1 (BD Bioscience, San José, CA, USA) equipado con un láser de Arg-ión de 488nm, para la detección de YO-PRO-1, PI, SCSA y un láser de Helio de 633nm para la detección del Mitotracker Deep Red, empleado con filtros.



2.5. Diseño experimental.

Experimento 1.- Evaluación de la calidad seminal a la descongelación en muestras epididimarias de ciervo Ibérico refrigeradas en tubo de 15 ml o en pajuelas de 0,25 ml.

Tras la dilución de las muestras espermáticas con la FA y la FB, las muestras fueron divididas en 2 alícuotas. Una de las alícuotas se depositó en un tubo de vidrio de 15 mL el cual fue depositado en un contenedor de agua a 5 °C situado en una cámara a esa misma temperatura. Esta metodología es la habitual por lo que las muestras procesadas así se denominaron muestras control.

El material espermático de la segunda alícuota fue envasado en pajuelas de polipropileno de 0,25 ml. Las pajuelas se introdujeron en un tubo de 15 ml lleno de agua a la misma temperatura que el material espermático envasado y este, a su vez, en un contenedor con agua a 5 °C dentro de una cámara a la misma temperatura, de la misma forma que para la primera alícuota. El tiempo requerido para disminuir la temperatura, desde la temperatura ambiente (TA) a 5 °C, fue en ambos casos aproximadamente 10 minutos. Tras ello, se continuó con el protocolo de congelación estándar descrito en el apartado 2.3.

Experimento 2.- Efecto del tiempo de equilibración sobre la calidad seminal a la descongelación de espermatozoides epididimarios de ciervo Ibérico.

Tras la dilución de las muestras espermáticas con la FA y la FB, las muestras fueron refrigeradas mediante el protocolo habitual descrito en el apartado 2.3. Tras ello, el material espermático diluido fue dividido en cuatro alícuotas, cada una de las cuáles fue equilibrada a 5 °C durante diferentes tiempos. Una de las alícuotas no tuvo ningún tiempo de equilibración (0), de modo que tras alcanzar la temperatura de 5 °C las muestras fueron congeladas directamente siguiendo el protocolo estándar. Las otras alícuotas fueron equilibradas durante periodos de 30, 60 y 120 minutos a 5 °C respectivamente, tras lo cual se congelaron de la misma manera que las muestras sin equilibración siguiendo el protocolo estándar descrito en el apartado 2.3.

Experimento 3.- Efecto del método de congelación sobre la calidad seminal a la descongelación en espermatozoides epididimarios de ciervo Ibérico.

Tras la dilución de las muestras espermáticas con la FA y la FB, las muestras fueron refrigeradas y equilibradas de forma estándar (refrigeración en tubo y 120 minutos de equilibración). Posteriormente a la equilibración el material espermático fue envasado en pajuelas de 0,25 ml, las cuáles fueron destinadas a diferentes tratamientos de congelación. En el primer tratamiento, las pajuelas fueron congeladas según el procedimiento estándar en el tanque de vapores de nitrógeno líquido. En el segundo tratamiento las pajuelas fueron congeladas sobre un rack a 4,5 cm sobre el nivel de nitrógeno líquido situado dentro de una caja de poliestireno. En el tercer tratamiento las pajuelas fueron depositadas sobre hielo seco y en el cuarto tratamiento las pajuelas fueron depositadas sobre una placa metálica la cual, se encontraba flotando sobre el nitrógeno líquido.

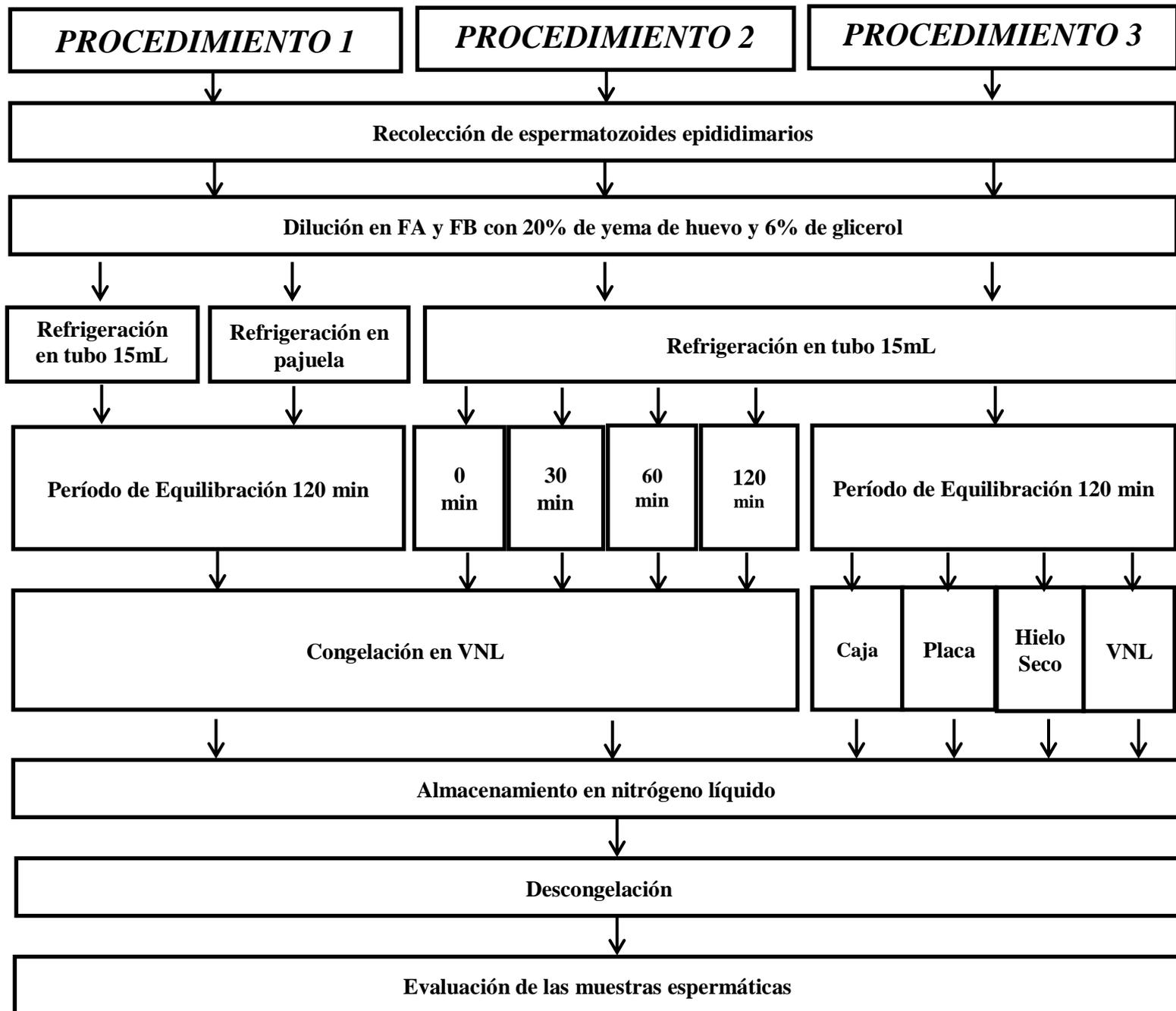


Figura 2.- Esquema del diseño experimental.

FA, fracción A; FB, fracción B; VNL, vapor de nitrógeno líquido.



2.5. Análisis estadístico.

El análisis estadístico fue realizado con el paquete de software SPSS 15.0 para Windows (SYSTAT Software Inc., Evanston, IL, USA).

Se realizó un análisis GLM-Anova para evaluar el efecto de los diferentes tiempos de equilibración, método de refrigeración y congelación sobre la calidad seminal a la descongelación, estos factores se consideraron como factores fijos mientras que los parámetros de calidad seminal fueron considerados como parámetros independientes. Se realizó un test de Bonferroni para determinar las diferencias entre los grupos. Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

3. Resultados.

3.1. Experimento 1.- Evaluación de la calidad seminal a la descongelación en muestras espermáticas epididimarias de ciervo Ibérico refrigeradas en tubo de 15 ml o en pajuelas de 0,25 ml.

Como se observa en las Tablas 1 y 2, no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) para los parámetros de motilidad subjetivos ni para los parámetros de velocidad cuando las muestras fueron refrigeradas en pajuelas en lugar de en un tubo de 15ml. Sin embargo, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los porcentajes de espermatozoides vivos y con la mitocondria activa, obteniendo resultados más altos para estos parámetros cuando las muestras fueron refrigeradas en pajuela.

Tabla 1. Efecto de la refrigeración del material espermático en tubo (15 ml) y en pajuela sobre la motilidad espermática subjetiva e integridad del acrosoma en espermatozoides epididimarios de ciervo Ibérico.

REFRIGERACIÓN	Motilidad (%)	CM (0-5)	NAR (%)
Tubo	69,17±11,58 ^a	2,25±0,41 ^a	64,83±6,61 ^a
Pajuela	74,17±8,61 ^a	2,33±0,25 ^a	68,67±9,58 ^a

Diferentes superíndices^(a,b), dentro de columna indica la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$)

Datos representados mediante las medias y desviación estándar.

CM: calidad del movimiento; NAR: integridad del acrosoma.



Tabla 2. Efecto de la refrigeración del material espermático en tubo (15 ml) y en pajuela sobre los parámetros de velocidad en espermatozoides epididimarios de ciervo Ibérico.

ENFRIAMIENTO	VCL (µm/seg)	VSL (µm/seg)	VAP (µm/seg)	LIN (%)	ALH (µm)
Tubo	105,70±9,06 ^a	32,52±4,97 ^a	64,12±9,94 ^a	30,49±3,51 ^a	4,28±0,45 ^a
Pajuela	110,63±21,00 ^a	32,63±4,97 ^a	66,97±13,91 ^a	30,04±3,55 ^a	4,49±0,83 ^a

Diferentes superíndices^(a,b), dentro de columna indica la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$)

Datos representados mediante las medias ± error estándar.

VCL (µm/seg): velocidad curvilínea; VSL (µm/seg): velocidad rectilínea; VAP (µm/seg): velocidad para la trayectoria corregida; LI N(%): linealidad; ALH (µm): desplazamiento lateral de la cabeza.

Tabla 3. Efecto de la refrigeración del material espermático en tubo (15 mL) y en pajuela sobre los parámetros espermáticos analizados mediante citometría de flujo en espermatozoides epididimarios de ciervo Ibérico.

REFRIGERACIÓN	VIVOS (%)	APOPTÓTICOS (%)	YO-PRO-1-MT+ (%)	DFI (%)
Tubo	57,38±12,71 ^a	15,34±4,02 ^a	46,69±5,43 ^a	0,31±0,09 ^a
Pajuela	69,64±6,92 ^a	9,17±2,21 ^b	65,03±5,43 ^b	0,34±0,068 ^a

Diferentes superíndices^(a,b,c), dentro de columna indica la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$).

Datos representados mediante las medias ± error estándar.

YO-PRO-1-MT+: espermatozoides con mitocondria activa; DFI: índice de fragmentación del ADN.

3.2. Experimento 2.- Efecto del tiempo de equilibración sobre la calidad seminal a la descongelación de espermatozoides epididimarios de ciervo Ibérico.

Como se observa en la Tabla 4, no existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) para los parámetros de motilidad subjetivos cuando las muestras fueron equilibradas a diferentes tiempos. Sin embargo, cuando las muestras fueron equilibradas durante 120 minutos el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto (NAR) fue más alto en relación a las muestras no equilibradas, no encontrándose diferencias con los periodos de equilibración de 30 y 60 minutos.

En relación a los parámetros de velocidad, las muestras espermáticas que fueron equilibradas durante 120 minutos mostraron valores más altos ($p < 0,05$) para VSL y VAP en relación a los otros tiempos de equilibración (0, 30 y 60 minutos), no existiendo diferencias entre tiempos de equilibración para el resto de parámetros de velocidad espermática (Tabla 5).

Por otra parte, tras el análisis mediante citometría de flujo se observó que no existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) para ningún parámetro de los evaluados entre los diferentes tiempos de equilibración (Tabla 6).



Tabla 4. Efecto del tiempo de equilibración sobre la motilidad espermática subjetiva e integridad del acrosoma en espermatozoides epididimarios descongelados de ciervo Ibérico.

Tiempo equilibración	Motilidad (%)	CM (0-5)	NAR (%)
0 min	52,15±4,82 ^a	1,50±0,083 ^a	34,84±2,64 ^a
30 min	63,02±4,82 ^a	1,60±0,083 ^a	37,56±2,64 ^{a,b}
60 min	64,06±4,91 ^a	1,62±0,083 ^a	42,08±2,70 ^{a,b}
120 min	64,82±4,81 ^a	1,74±0,083 ^a	47,28±2,64 ^b

Diferentes superíndices^(a,b,c), dentro de columna indica la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$)

Datos representados mediante las medias \pm error estándar.

CM: calidad del movimiento; NAR: integridad del acrosoma.

Tabla 5. Efecto del tiempo de equilibración sobre los parámetros de velocidad de espermatozoides epididimarios descongelados de ciervo Ibérico.

Tiempo equilibración	VCL ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	VSL ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	VAP ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	LIN (%)	ALH (μm)
0 min	73,43±4,18 ^a	22,48±1,21 ^a	44,22±2,82 ^a	31,08±1,14 ^a	3,16±0,16 ^a
30 min	82,36±4,18 ^a	25,54±1,21 ^a	51,18±2,82 ^a	30,20±1,14 ^a	3,43±0,16 ^a
60 min	86,39±4,27 ^a	26,91±1,23 ^a	54,71±2,88 ^a	30,49±1,16 ^a	3,54±0,16 ^a
120 min	85,59±4,18 ^a	28,19±1,21 ^b	55,42±2,82 ^b	31,92±1,14 ^a	3,46±0,16 ^a

Diferentes superíndices^(a,b,c), dentro de columna indica la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$)

Datos representados mediante las medias \pm error estándar.

VCL ($\mu\text{m}/\text{seg}$): velocidad curvilínea; VSL ($\mu\text{m}/\text{seg}$): velocidad rectilínea; VAP ($\mu\text{m}/\text{seg}$): velocidad para la trayectoria corregida; LIN (%): linealidad; ALH (μm): desplazamiento lateral de la cabeza.

Tabla 6. Efecto del tiempo de equilibración sobre los parámetros espermáticos analizados mediante citometría de flujo en espermatozoides epididimarios descongelados de ciervo Ibérico.

Tiempo equilibración	Vivos (%)	Apoptóticos (%)	YO-PRO-1-/MT+ (%)	DFI (%)
0 min	32,78±3,37 ^a	16,18±1,41 ^a	25,80±3,74 ^a	0,80±0,09 ^a
30 min	39,92±3,37 ^a	16,33±1,41 ^a	35,44±3,74 ^a	0,90±0,09 ^a
60 min	42,31±3,44 ^a	17,38±1,44 ^a	38,05±3,82 ^a	0,82±0,09 ^a
120 min	39,88±3,37 ^a	19,32±1,41 ^a	38,20±3,74 ^a	0,87±0,09 ^a

Diferentes superíndices^(a,b,c), la presencia de diferentes superíndices dentro de columna indica la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$)

Datos representados mediante las medias \pm error estándar.

YO-PRO-1-/MT+: espermatozoides con mitocondria activa; DFI: índice de fragmentación del ADN.



3.3. Experimento 3.- Efecto del método de congelación sobre la calidad seminal a la descongelación en espermatozoides epididimarios de ciervo Ibérico.

Los efectos de los diferentes métodos de congelación sobre la viabilidad espermática a la descongelación muestran diferentes respuestas en los parámetros analizados en los espermatozoides.

Así, observamos que cuando las muestras fueron congeladas en vapores en tanque (control) o caja los parámetros de motilidad e integridad de acrosoma no fueron diferentes ($p < 0,05$), aunque si se observan diferencias ($p < 0,05$) entre la congelación de espermatozoides con esta métodos y la congelación en hielo seco y placa metálica (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto del método de congelación sobre la motilidad espermática subjetiva e integridad del acrosoma en espermatozoides epididimarios descongelados de ciervo Ibérico.

Método congelación	Motilidad (%)	CM (0-5)	NAR (%)
Control	69,17±11,60 ^a	2,25±0,41 ^a	64,83±6,61 ^{a,b}
Caja poliestireno	74,17±11,14 ^a	2,41±0,20 ^a	66,00±10,83 ^a
Hielo seco	44,17±13,57 ^b	2,00±0,31 ^a	48,67±9,58 ^b
Placa metálica	13,33±11,70 ^c	1,41±0,73 ^b	14,83±11,12 ^c

Diferentes superíndices^(a,b,c), dentro de columna indica la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$)

Datos representados mediante las medias \pm error estándar.

CM: calidad del movimiento; NAR: integridad del acrosoma; Control: congelación en vapores en vapores en tanque.

En relación a los parámetros de velocidad, las muestras espermáticas congeladas sobre placa metálica, mostraron valores más bajos ($p < 0,05$) para VAP, VSL, VCL y ALH respecto a las muestras congeladas con el método control, con la congelación en caja y la congelación en hielo seco. No se observaron diferencias ($p > 0,05$) en dichos parámetros (Tabla 8), ni en los porcentajes de espermatozoides vivos, apoptóticos y en espermatozoides YO-PRO-/MT+ (Tabla 9) entre las muestras congeladas en tanque (control), en caja y en hielo seco.

Finalmente, cuando se llevó a cabo la evaluación mediante citometría de flujo, encontramos valores más altos ($p < 0,05$) de espermatozoides vivos, apoptóticos y con mitocondria activa, para las muestras que fueron congeladas en tanque, caja y hielo seco en relación a las congeladas en placa metálica. Sin embargo no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) para el porcentaje de DFI entre los diferentes métodos de congelación.



Tabla 8. Efecto del método de congelación sobre los parámetros de velocidad de los espermatozoides epididimarios descongelados de ciervo Ibérico.

Método congelación	VCL ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	VSL ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	VAP ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	LIN (%)	ALH (μm)
Control	105,70 \pm 9,06 ^a	32,52 \pm 4,97 ^a	64,12 \pm 9,94 ^a	30,49 \pm 3,51 ^a	4,28 \pm 0,45 ^a
Caja poliestireno	103,15 \pm 17,74 ^a	32,18 \pm 4,71 ^a	64,12 \pm 9,94 ^a	30,93 \pm 2,25 ^a	4,18 \pm 0,79 ^a
Hielo seco	92,60 \pm 15,42 ^a	28,59 \pm 3,82 ^a	59,11 \pm 9,44 ^a	30,42 \pm 2,48 ^a	3,77 \pm 0,60 ^{a,b}
Placa metálica	54,24 \pm 28,46 ^b	15,97 \pm 7,81 ^b	31,12 \pm 16,84 ^b	28,86 \pm 4,47 ^a	2,44 \pm 1,05 ^b

Diferentes superíndices^(a,b), dentro de columna indica la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$)

Datos representados mediante las medias \pm error estándar.

VCL ($\mu\text{m}/\text{seg}$): velocidad curvilínea; VSL ($\mu\text{m}/\text{seg}$): velocidad rectilínea; VAP ($\mu\text{m}/\text{seg}$): velocidad para la trayectoria corregida; LIN (%): linealidad; ALH (μm): desplazamiento lateral de la cabeza; Control: congelación en vapores en tanque.

Tabla 9. Efecto del método de congelación sobre los parámetros espermáticos analizados mediante citometría de flujo en espermatozoides epididimarios descongelados de ciervo Ibérico.

Método congelación	Vivos (%)	Apoptóticos (%)	YO-PRO-1-MT+ (%)	DFI (%)
Control	57,38 \pm 12,71 ^a	15,34 \pm 4,02 ^a	46,69 \pm 54,30 ^{abc}	0,31 \pm 0,09 ^a
Caja poliestireno	58,18 \pm 17,20 ^a	11,19 \pm 3,85 ^{ac}	53,54 \pm 13,05 ^{ab}	0,31 \pm 0,15 ^a
Hielo seco	38,03 \pm 12,51 ^{ab}	17,04 \pm 7,47 ^{ac}	34,82 \pm 9,47 ^{ac}	0,38 \pm 0,14 ^a
Placa metálica	20,76 \pm 14,53 ^b	4,81 \pm 3,22 ^{bc}	9,19 \pm 6,45 ^d	0,29 \pm 0,089 ^a

Diferentes superíndices^(a,b,c) dentro de columna indica la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$)

Datos representados mediante las medias \pm error estándar.

YO-PRO-1-MT+: espermatozoides con mitocondria activa; DFI: índice de fragmentación del ADN; Control: congelación en vapores en tanque.



4. Discusión.

La criopreservación supone un procedimiento que conlleva un gran riesgo de lesión para las células espermáticas (Fernandez-Santos et al., 2006b, Hammerstedt et al., 1990). Se ha demostrado en diversos trabajos que existe una influencia del diluyente de congelación, así como del procedimiento y manejo de las muestras durante la refrigeración y congelación sobre la viabilidad espermática tras la descongelación (Holt, 2000, Holt et al., 2005, Koshimoto and Mazur, 2002) Esto demuestra que todos los aspectos relacionados con el proceso de criopreservación son de vital importancia para conseguir una buena supervivencia espermática post criopreservación. En el caso del ciervo Ibérico, se han realizado muchos trabajos sobre modificaciones del diluyente de congelación para muestras espermáticas epididimarias (Fernandez-Santos et al., 2005, Fernandez-Santos et al., 2006a, Fernandez-Santos et al., 2006c, Soler et al., 2005). Sin embargo, hasta la fecha, no existen trabajos en los que se hayan estudiado modificaciones del protocolo de congelación para esta especie y este tipo de espermatozoides.

Teniendo en cuenta el impacto que tienen, la refrigeración y la congelación de los espermatozoides sobre su viabilidad a la descongelación, es importante que todo el proceso esté completamente adaptado, no solo a las características de la especie con la que se trabaja, si no al medio en el que se realiza cada procedimiento. En el caso del ciervo Ibérico, como sucede con otras especies no domésticas, la recolección y procesado de las muestras no siempre puede realizarse en condiciones de laboratorio, sino que es frecuente que se realicen en condiciones de campo. Por ello, es interesante desarrollar métodos alternativos para refrigerar y congelar las muestras espermáticas en condiciones de trabajo difíciles, que no se traduzcan en una pérdida importante de la calidad de las muestras seminales (Roth et al., 1999).

En nuestro trabajo observamos diferencias de calidad seminal entre las muestras refrigeradas en tubo o en pajuela. Así, a la descongelación obtuvimos valores más altos de espermatozoides vivos y apoptóticos para las muestras que fueron refrigeradas directamente en pajuela frente a las muestras refrigeradas en tubo de 15 ml. Este resultado es comparable a los obtenidos por Thomas et al. (1993) en semen de perro, en las que las muestras de semen envasado en sistemas de menor volumen obtuvieron valores más elevados en los parámetros de motilidad. Esto se debe probablemente, a que en los sistemas de envasado con menor volumen, la superficie de contacto con el medio empleado como refrigerante, en este caso el agua, es mayor, y como consecuencia, el semen se refrigera de manera más homogénea y rápida. La correcta refrigeración de las muestras, permite que las células espermáticas se adapten al cambio de temperatura, reduciéndose así las lesiones producidas por el choque por frío. Aunque no se conoce el proceso con exactitud, se cree que con el cambio de temperatura se produce un reajuste de las proteínas y los lípidos de membrana, principalmente en aquellas involucradas en los canales de iones (Watson, 2000), que producen alteraciones importantes en las células espermáticas. Además, existe la posibilidad de que elementos del citoesqueleto se vean dramáticamente afectados por los cambios de temperatura contribuyendo así a la desorganización de la membrana (Watson, 2000). Por ello, durante el proceso de criopreservación es necesario que las muestras sean expuestas a un método óptimo y a una correcta velocidad de refrigeración para minimizar los daños en la célula espermática. La posibilidad de refrigerar las muestras espermáticas directamente en la pajuela facilitaría en gran medida el desarrollo de la congelación de muestras



espermáticas epididimarias de ciervo Ibérico directamente en el campo, donde muchas veces resulta imposible encontrar cámaras a 5 °C lo suficientemente grandes para envasar las pajuelas tras el proceso de refrigeración. De este modo y como se desprende de nuestros resultados, sería posible envasar las pajuelas a temperatura ambiente y llevar a cabo la refrigeración de las muestras espermáticas envasadas en pajuelas sin detrimento de la calidad seminal.

Durante el periodo de equilibración las membranas espermáticas se estabilizan a la temperatura de 5 °C. En la mayoría de las especies se emplean periodos de equilibración comprendidos entre 30 minutos a dos horas, siendo este último el más frecuente. En el estudio que hemos llevado a cabo no se observaron diferencias de calidad seminal entre los diferentes periodos de equilibración para la mayoría de los parámetros analizados aunque sí se observan resultados más elevados para la integridad acrosómica (NAR), la VAP y la VSL para las muestras que fueron refrigeradas 120 minutos en relación a aquellas que no pasaron por un periodo de equilibración. Estos resultados evidencian la importancia de que exista una fase de equilibración para que los espermatozoides se estabilicen con el crioprotector, favoreciendo así su efecto pero, al menos en el caso del ciervo Ibérico, no parece que la duración de dicho periodo tenga un impacto reseñable en la viabilidad del esperma a la descongelación puesto que no existieron diferencias entre equilibrar las muestras 30, 60, o 120 minutos. Resultados similares se han observado en toro (Guimarães et al., 2010). Así, en los estudios realizados en esta raza bovina se obtuvo mejor calidad seminal a la descongelación cuando se llevó a cabo un período de equilibración, independientemente de su duración.

Esta resistencia de los espermatozoides a los efectos del frío y la rapidez con que se estabilizan con el crioprotector puede deberse a que son de origen epididimario, este fenómeno se ha observado también en otras especies como el impala (*Gilmore et al.*), el facocero (*Gilmore et al.*), elefante y león (*Gilmore et al.*), toro y búfalo (*Herold et al.*) (*Gilmore et al.*, 1998, *Muiño et al.*, 2007, *Herold et al.*, 2006). Los espermatozoides procedentes del epidídimo son espermatozoides inmaduros cuyas propiedades morfológicas y biofísicas les confieren una mayor resistencia al estrés por frío (*Comizzoli et al.*, 2000). También se ha establecido una relación entre el tiempo de equilibración y el diluyente, asumiendo que dicho periodo de equilibración favorece, no solo la adaptación de las células espermáticas al cambio de temperatura, sino también la adaptación del propio diluyente confiriéndole una mayor capacidad crioprotectora.

En relación a la congelación de los espermatozoides utilizando diferentes dispositivos, existen diversos estudios realizados en carnero (*Salamon*, 1968) o perro (*M.G. Ivanova-Kicheva*, 1997);(*Alamo et al.*, 2005). Hasta la fecha no existen trabajos que se hayan realizado en cérvidos por lo que en el caso de estas especies los métodos de congelación se han tenido que adaptar de aquellos desarrollados para ovejas y cabras (*Asher et al.*, 2000). En este estudio, se compararon diferentes métodos de congelación (vapores en tanque, vapores en caja de poliestireno, hielo seco y caja metálica). Las muestras que fueron congeladas sobre placa metálica presentaron resultados más bajos que el método control (congelación en tanque sobre vapores de nitrógeno líquido) y que los otros métodos estudiados (congelación en caja de poliestireno sobre vapores de nitrógeno líquido y congelación en hielo seco). Estos resultados están en la línea de los obtenidos en oryx (*Oryx dammah*) (*Roth et al.*, 1999), puesto que la calidad seminal a la descongelación de los espermatozoides no estuvo afectada por el método de congelación, obteniéndose resultados similares con hielo seco y vapores de nitrógeno



líquido. La razón de una menor calidad espermática tras la descongelación para las muestras espermáticas congeladas sobre placa metálica podrían deberse a la gran capacidad conductora de los metales. Este hecho produciría una rápida pérdida de temperatura de cualquier material que se pusiese en contacto con ellos y, por lo tanto, la cristalización de los fluidos, siendo posible la generación de un mayor daño celular. Además, la placa podría en cierto modo, impedir la congelación homogénea de las muestras, ya que las pajuelas solo tienen una superficie en contacto con ella. Finalmente, en nuestro estudio no encontramos diferencias entre congelar las muestras espermáticas sobre vapores de nitrógeno líquido en tanque o en caja de poliestireno. La congelación en caja de poliestireno presentaría algunas ventajas frente al método control puesto que requiere un material más manejable en condiciones de campo, lo que facilita la conservación de muestras espermáticas recolectadas fuera del laboratorio.



5. Conclusiones

1. La refrigeración de las muestras espermáticas epididimarias de ciervo Ibérico en pajuelas incrementa el porcentaje de espermatozoides vivos y con la mitocondria activa en relación a la refrigeración estándar (en tubo).
2. La ausencia de periodo de equilibración de las muestras espermáticas epididimarias de ciervo Ibérico da lugar a una disminución de VSL, VAP y de espermatozoides con acrosoma intacto en relación a muestras con un periodo de equilibración de 30, 60 o 120 minutos.
3. La congelación de espermatozoides epididimarios de ciervo Ibérico en caja de poliestireno reporta resultados de calidad seminal igual que los obtenidos congelando las muestras en tanque.
4. La congelación sobre placa metálica produce una disminución en los parámetros de motilidad, calidad del movimiento, acrosomas intactos, VCL, VSL, VAP, ALH, y en el porcentaje de espermatozoides vivos, apoptóticos y con mitocondria activa en relación a la congelación sobre vapores de nitrógeno líquido tanto en tanque, como en caja de poliestireno.



6. Bibliografía.

- ALAMO, D., BATISTA, M., GONZÁLEZ, F., RODRÍGUEZ, N., CRUZ, G., CABRERA, F. & GRACIA, A. (2005) Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of -152 degrees C as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology*, 63, 72-82.
- ASHER, G. W., BERG, D. K. & EVANS, G. (2000) Storage of semen and artificial insemination in deer. *Anim Reprod Sci*, 62, 195-211.
- COMIZZOLI, P., MERMILLOD, P. & MAUGET, R. (2000) Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reprod Nutr Dev*, 40, 493-504.
- DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A. E., MARTÍNEZ-PASTOR, F., BISBAL, A. F., ROS-SANTAELLA, J. L., GARCÍA-ÁLVAREZ, O., MAROTO-MORALES, A., SOLER, A. J., GARDE, J. J. & FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R. (2011) Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide, and importance of individual male variability. *Reprod Domest Anim*, 46, 393-403.
- FERNANDEZ-SANTOS, M. R., ESTESO, M. C., MONTORO, V., SOLER, A. J. & GARDE, J. J. (2006a) Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: effects of egg yolk, glycerol and cooling rate. *Theriogenology*, 66, 1931-42.
- FERNANDEZ-SANTOS, M. R., ESTESO, M. C., MONTORO, V., SOLER, A. J. & GARDE, J. J. (2006b) Influence of various permeating cryoprotectants on freezability of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: effects of concentration and temperature of addition. *J Androl*, 27, 734-45.
- FERNANDEZ-SANTOS, M. R., ESTESO, M. C., SOLER, A. J., MONTORO, V. & GARDE, J. J. (2005) The effects of different cryoprotectants and the temperature of addition on the survival of red deer epididymal spermatozoa. *Cryo Letters*, 26, 25-32.
- FERNANDEZ-SANTOS, M. R., ESTESO, M. C., SOLER, A. J., MONTORO, V. & GARDE, J. J. (2006c) Effects of egg yolk and cooling rate on the survival of refrigerated red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, 41, 114-8.
- GAÑÁN, N., GONZÁLEZ, R., SESTELO, A., GARDE, J. J., SÁNCHEZ, I., AGUILAR, J. M., GOMENDIO, M. & ROLDAN, E. R. (2009) Male reproductive traits, semen cryopreservation, and heterologous in vitro fertilization in the bobcat (*Lynx rufus*). *Theriogenology*, 72, 341-52.
- GARDE, J. J., MARTÍNEZ-PASTOR, F., GOMENDIO, M., MALO, A. F., SOLER, A. J., FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R., ESTESO, M. C., GARCÍA, A. J., ANEL, L. & ROLDÁN, E. R. (2006) The application of reproductive technologies to natural populations of red deer. *Reprod Domest Anim*, 41 Suppl 2, 93-102.
- GILMORE, J. A., MCGANN, L. E., ASHWORTH, E., ACKER, J. P., RAATH, J. P., BUSH, M. & CRITSER, J. K. (1998) Fundamental cryobiology of selected African mammalian spermatozoa and its role in biodiversity preservation through the development of genome resource banking. *Anim Reprod Sci*, 53, 277-97.
- GILLAN, L. & MAXWELL, W. M. (1999) The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *J Reprod Fertil Suppl*, 54, 271-83.
- GUIMARÃES, T., RIBEIRO, V., PAES, R., FURUGEN, A., LUZ, L., GILLI, F., MATIAS, J. A. & DEANDRADE, V. J. (2010) Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, 120, 31-38.
- HAMMERSTEDT, R. H., GRAHAM, J. K. & NOLAN, J. P. (1990) Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl*, 11, 73-88.



- HEROLD, F. C., DE HAAS, K., COLENBRANDER, B. & GERBER, D. (2006) Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl or AndroMed. *Theriogenology*, 66, 1123-30.
- HOLT, W. V. (1984) Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoon. *Int Rev Cytol*, 87, 159-94.
- HOLT, W. V. (2000) Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, 62, 3-22.
- HOLT, W. V., MEDRANO, A., THURSTON, L. M. & WATSON, P. F. (2005) The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology*, 63, 370-82.
- KOSHIMOTO, C. & MAZUR, P. (2002) Effects of cooling and warming rate to and from -70 degrees C, and effect of further cooling from -70 to -196 degrees C on the motility of mouse spermatozoa. *Biol Reprod*, 66, 1477-84.
- M.G. IVANOVA-KICHEVA, N. B., B. SOMLEV (1997) Cryopreservation of canine semen in pellets and 5-ml aluminium tubes using three extenders. *Theriogenology*, 48, 1343-1349.
- MEMON, A., WAHID, H., ROSNINA, Y., GOH, Y., EBRAHIMI, M. & NADIA, F. (2012) Effect of Ascorbic Acid Concentrations, Methods of Cooling and Freezing on Boer Goat Semen Cryopreservation. *Reprod Domest Anim*.
- MEYERS, S. A. (2005) Spermatozoal response to osmotic stress. *Anim Reprod Sci*, 89, 57-64.
- MORTIMER, D. & MORTIMER, S. T. (1988) Influence of system parameter settings on human sperm motility analysis using CellSoft. *Hum Reprod*, 3, 621-5.
- MUIÑO, R., FERNÁNDEZ, M. & PEÑA, A. I. (2007) Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reprod Domest Anim*, 42, 305-11.
- PEÑA, F. J., JOHANNISSON, A., WALLGREN, M. & RODRIGUEZ MARTINEZ, H. (2003) Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci*, 78, 85-98.
- PUKAZHENTHI, B., SANTYMIRE, R., CROSIER, A., HOWARD, J. & WILDT, D. E. (2007) Challenges in cryopreserving endangered mammal spermatozoa: morphology and the value of acrosomal integrity as markers of cryo-survival. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 65, 433-46.
- ROTH, T. L., BUSH, L. M., WILDT, D. E. & WEISS, R. B. (1999) Scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*) spermatozoa are functionally competent in a heterologous bovine in vitro fertilization system after cryopreservation on dry ice, in a dry shipper, or over liquid nitrogen vapor. *Biol Reprod*, 60, 493-8.
- SALAMON, S. (1968) Deep freezing of ram semen: recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods of freezing. *Aust J Biol Sci*, 21, 351-60.
- SOLER, A. J., ESTESO, M. C., FERNANDEZ-SANTOS, M. R. & GARDE, J. J. (2005) Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5 degrees C in the epididymis for several days. *Theriogenology*, 64, 1503-17.
- SOLER, A. J., GARCIA, A. J., FERNANDEZ-SANTOS, M. R., ESTESO, M. C. & GARDE, J. J. (2003a) Effects of thawing procedure on postthawed in vitro viability and in vivo fertility of red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196 degrees C. *J Androl*, 24, 746-56.
- SOLER, A. J., PÉREZ-GUZMÁN, M. D. & GARDE, J. J. (2003b) Storage of red deer epididymides for four days at 5 degrees C: effects on sperm motility, viability, and morphological integrity. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*, 295, 188-99.
- SOLER, A. J., POULIN, N., FERNANDEZ-SANTOS, M. R., COGNIE, Y., ESTESO, M. C., GARDE, J. J. & MERMILLOD, P. (2008) Heterologous in vitro fertility evaluation of



cryopreserved Iberian red deer epididymal spermatozoa with zona-intact sheep oocytes and its relationship with the characteristics of thawed spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, 43, 293-8.

STOOPS, M. A., BOND, J. B., BATEMAN, H. L., CAMPBELL, M. K., LEVENS, G. P., BOWSHER, T. R., FERRELL, S. T. & SWANSON, W. F. (2007) Comparison of different sperm cryopreservation procedures on post-thaw quality and heterologous in vitro fertilisation success in the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Reprod Fertil Dev*, 19, 685-94.

THOMAS PGA, L. R., BURNS JM, HAHN CN (1993) A comparison of three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, 1199-1205.

WATSON, P. F. (1995) Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, 7, 871-91.

WATSON, P. F. (2000) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, 60-61, 481-92.

WATSON, P. F. & MARTIN, I. C. (1976) Artificial insemination of sheep: the effect of semen diluents containing egg yolk on the fertility of ram semen. *Theriogenology*, 6, 559-64.