

UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA

# NUEVOS PROTOCOLOS PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE MACHO CABRÍO

Cristina Tomás Almenar

DIRECTORA: Eva Mocé Cervera

*Valencia, diciembre de 2007*

## RESUMEN

El objetivo general del trabajo es el desarrollo de un protocolo para la adición de ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC) al semen de caprino con el fin de modificar la membrana plasmática de los espermatozoides y mejorar la calidad de éstos post-descongelación. Para la congelación se eliminó el plasma seminal de los eyaculados y se les añadió un medio Tris-Cítrico-Glucosa suplementado con yema de huevo al 20 % y glicerol al 4%. La congelación se realizó a 3 cm sobre vapor de nitrógeno líquido durante 10 minutos. En total se han realizado siete experimentos, y se ha observado que el tratamiento de los espermatozoides de caprino con 1 mg de CLC cada  $120 \times 10^6$  de espermatozoides antes de la congelación puede mejorar la calidad de los espermatozoides de caprino post-descongelación hasta 7,9 y 12,8 puntos más en cuanto a motilidad y viabilidad respectivamente. Además no se han observado diferencias entre la adición de diferentes ciclodextrinas y parece que el uso de ciclodextrinas descongeladas puede mejorar el porcentaje de espermatozoides vivos.

---

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Papel del semen congelado en los programas de mejora genética	1
1.2. Daños que sufren los espermatozoides durante el proceso de congelación	1
1.3. Peculiaridades del semen de caprino	6
1.4. Objetivo del trabajo	7
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>8</b>
2.1. Materiales	8
2.2. Preparación de las ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC)	8
2.3. Preparación de los medios	9
2.4. Animales	9
2.5. Recuperación del semen	9
2.6. Congelación y descongelación del semen	10
2.6.1. Protocolo general de congelación	10
2.6.2. Protocolo de descongelación de las muestras	12
2.7. Valoración espermática	12
2.7.1. Motilidad espermática	12
2.7.2. Viabilidad espermática	13
2.8. Experimentos	14
2.8.1. <u>Experimento 1</u> . Comparación entre protocolos y medios de congelación	14
2.8.2. <u>Experimento 2</u> . Comparación entre alturas de congelación sobre vapor de nitrógeno líquido	16
2.8.3. <u>Experimento 3</u> . Comparación entre la adición de ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC) antes o después del lavado seminal	17
2.8.4. <u>Experimento 4</u> . Determinación de la concentración óptima de ciclodextrina saturada de colesterol (CLC)	18
2.8.5. <u>Experimento 5</u> . Comparación entre diferentes $\beta$ -ciclodextrinas saturadas de colesterol ( $\beta$ -CLC)	19

---

2.8.6. <u>Experimento 6</u> . Comparación entre $\alpha$ y $\gamma$ ciclodextrinas saturadas de colesterol y entre metil- $\beta$ -ciclodextrina preparada en el momento de su uso (fresca) y metil- $\beta$ -ciclodextrina descongelada	19
2.8.7. <u>Experimento 7</u> . Comparación entre la adición de metil- $\beta$ -ciclodextrina saturada de colesterol descongelada, antes o después del lavado del plasma seminal	20
2.9. Análisis estadístico	21
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>22</b>
3.1. <u>Experimento 1</u> . Comparación entre protocolos y medios de congelación	22
3.2. <u>Experimento 2</u> . Comparación entre alturas de congelación sobre vapor de nitrógeno líquido	24
3.3. <u>Experimento 3</u> . Comparación entre la adición de ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC) antes o después del lavado seminal	24
3.4. <u>Experimento 4</u> . Determinación de la concentración óptima de ciclodextrina saturada de colesterol (CLC)	25
3.5. <u>Experimento 5</u> . Comparación entre diferentes $\beta$ -ciclodextrinas saturadas de colesterol ( $\beta$ -CLC)	26
3.6. <u>Experimento 6</u> . Comparación entre $\alpha$ y $\gamma$ ciclodextrinas saturadas de colesterol y entre metil- $\beta$ -ciclodextrina preparada en el momento de su uso (fresca) y metil- $\beta$ -ciclodextrina descongelada	27
3.7. <u>Experimento 7</u> . Comparación entre la adición de metil- $\beta$ -ciclodextrina saturada de colesterol descongelada, antes o después del lavado del plasma seminal	28
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>30</b>
<b>5. IMPLICACIONES</b>	<b>37</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>38</b>

---

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición de la membrana plasmática de los espermatozoides en diferentes especies	3
<b>Tabla 2.</b> Composición de los medios	9
<b>Tabla 3.</b> Valores medios de volumen (mL), concentración (millones de espermatozoides/mL) y motilidad (%) de los eyaculados	12
<b>Tabla 4.</b> Protocolos de congelación del experimento	15
<b>Tabla 5.</b> Efecto del medio de congelación sobre la motilidad y viabilidad de los espermatozoides de caprino	23
<b>Tabla 6.</b> Efecto del tiempo de permanencia de las pajuelas en vapor de nitrógeno líquido durante la congelación, sobre la motilidad y viabilidad de los espermatozoides de caprino	23
<b>Tabla 7.</b> Efecto de la altura de las pajuelas sobre el nitrógeno líquido durante la congelación, sobre la motilidad y viabilidad de los espermatozoides de caprino tras la descongelación	24
<b>Tabla 8.</b> Efecto de la adición de 2 mg de metil- $\beta$ -ciclodextrina saturada de colesterol por cada $120 \times 10^6$ espermatozoides antes de la centrifugación ó después de la centrifugación, sobre la motilidad y viabilidad de los espermatozoides de caprino tras la descongelación	25
<b>Tabla 9.</b> Comparación entre la adición de diferentes concentraciones de metil- $\beta$ -ciclodextrina saturada de colesterol con un control negativo (adición de metil- $\beta$ -ciclodextrina sin colesterol) y un grupo control	26
<b>Tabla 10.</b> Comparación entre la adición de diferentes $\beta$ -ciclodextrinas saturadas de colesterol, sobre la motilidad y viabilidad de los espermatozoides de caprino	27
<b>Tabla 11.</b> Comparación entre la adición de diferentes $\alpha$ -ciclodextrinas y $\gamma$ -ciclodextrinas	28
<b>Tabla 12.</b> Comparación entre la adición de metil- $\beta$ -ciclodextrina fresca o descongelada, sobre la motilidad y viabilidad de los espermatozoides de caprino	28
<b>Tabla 13.</b> Comparación entre la adición de metil- $\beta$ -ciclodextrina descongelada, antes y después del lavado del plasma seminal, sobre la motilidad y viabilidad de los espermatozoides de caprino	29

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama del protocolo general de congelación del semen de caprino	11
<b>Figura 2.</b> Diagrama del Experimento 1. Comparación entre protocolos y medios de congelación	15
<b>Figura 3.</b> Diagrama del Experimento 2. Comparación entre diferentes alturas de congelación	16
<b>Figura 4.</b> Diagrama del Experimento 3. Adición de CLC antes o después de la fase de lavado	17
<b>Figura 5.</b> Diagrama del Experimento 4. Determinación de la concentración óptima de CLC	18
<b>Figura 6.</b> Diagrama del Experimento 5. Comparación entre diferentes $\beta$ -CLC	19
<b>Figura 7.</b> Diagrama del Experimento 6. Comparación entre $\alpha$ -CLC y $\gamma$ -CLC y entre metil- $\beta$ -CLC fresca y descongelada	20
<b>Figura 8.</b> Diagrama del Experimento 7. Comparación entre la adición de metil- $\beta$ -CLC descongelada antes o después del lavado del plasma seminal	21

## 1. INTRODUCCIÓN

### *1.1. Papel del semen congelado en los programas de mejora genética*

Es bien conocido el papel de la inseminación artificial como principal difusor en los programas de mejora genética. En este contexto, el semen congelado es una herramienta de especial importancia porque permite conservar y almacenar semen de alta calidad genética y biológica durante largos períodos de tiempo, tanto para el transporte del mismo entre largas distancias, como para el mantenimiento de especies o razas en peligro de extinción.

En la actualidad, la Asociación Española de criadores de la cabra Murciano-Granadina (ACRIMUR) viene desarrollando un programa de mejora genética de la raza mediante la elección y evaluación genética de reproductores. Uno de los principales problemas del desarrollo de programas de mejora genética en cabras es la disminución en la fertilidad con el uso de semen congelado con respecto al semen fresco y conservado a 5 °C. Con semen fresco (a 16-22 °C durante 4-6 horas máximo) pueden alcanzarse fertilidades en torno al 70-80 % (Karatzas *et al.*, 1997; Paulenz *et al.*, 2005). Con semen conservado a 5 °C hasta 36 horas, las fertilidades se sitúan cerca del 75 % (Roca *et al.*, 1997). Sin embargo, cuando se utiliza semen congelado para realizar las inseminaciones las fertilidades disminuyen a valores entre 60 -65 % (Leboeuf *et al.*, 1998; Salvador *et al.*, 2005).

### *1.2. Daños que sufren los espermatozoides durante el proceso de congelación*

La calidad del semen congelado disminuye con respecto a la del semen fresco o refrigerado, por una parte porque en general un 50 % de los espermatozoides no sobreviven al proceso de crioconservación (Curry, 2000) y porque durante el proceso de congelación los espermatozoides van a sufrir daños tanto bioquímicos (ralentización metabólica) como estructurales (cambios en la estructura de las bicapas lipídicas de las membranas tanto plasmáticas como de los orgánulos), que finalmente van a afectar a la funcionalidad de los espermatozoides alterando su capacidad de fertilización. Estos daños se deben principalmente a cambios osmóticos y a la formación de hielo intracelular (Holt, 2000).

Los lípidos de las membranas, pasan de un estado de líquido a gel (forma rígida), siendo la temperatura de cambio de fase específica para cada una de las familias de lípidos. De esta forma, conforme se va produciendo el descenso de temperatura se van a ir formando agregados lipídicos de la misma familia, que van a alterar la asociación de los lípidos con las proteínas de membrana. Además, se forman huecos (Amann, 1999) dando lugar a un desequilibrio iónico. Todo esto se traduce en un acúmulo de daños celulares durante todo el proceso de crioconservación que conlleva a una disminución de la fertilidad del semen congelado (Medeiros *et al.*, 2002).

Todas estas modificaciones que van a sufrir los espermatozoides a lo largo de todo el proceso de crioconservación se pueden minimizar de varias formas:

- a) Seleccionando los rangos y descensos de temperatura adecuados. Existen diferencias entre especies en cuanto a la susceptibilidad al choque térmico. Las diferencias entre especies se deben principalmente a diferencias bioquímicas en la composición en fosfolípidos de las membranas plasmáticas, que dependen de los ratios colesterol/fosfolípidos y cadenas de ácidos grasos poliinsaturados/saturados unidas a los fosfolípidos (Darin-Bennett y White, 1977). Lo ideal es un ratio elevado de colesterol/fosfolípidos y un ratio bajo en poliinsaturados/saturados, por una parte porque el colesterol estabiliza las membranas disminuyendo la temperatura a la cual se produce el cambio de fases de los lípidos y porque a mayor proporción de ácidos grasos insaturados existe una mayor susceptibilidad a la peroxidación. En la Tabla 1 se muestran las diferencias en composición de membrana entre diferentes especies que van a determinar su mayor o menor resistencia al choque térmico. De esta forma, los espermatozoides de conejo y de humano que presentan un alto ratio colesterol/fosfolípidos y un bajo ratio poliinsaturados/saturados van a ser más resistentes al choque térmico que los espermatozoides de caprino, toro, ovino y porcino.

**Tabla 1.** Composición de la membrana plasmática de espermatozoides en diferentes especies

Especie	Ratio colesterol/fosfolípidos	Ratio poliinsaturados/saturados
Cerdo	0,26	2,5
Caballo	0,36	-
Morueco	0,38	2,5
Toro	0,45	3,5
Caprino	0,59	-
Conejo	0,88	0,8
Hombre	0,99	1

(Darin-Bennett y White, 1977; Rana *et al.*, 1991; Parks y Lynch, 1992)

- b) Uso de crioprotectores. En los medios de congelación se incluyen sustancias crioprotectoras, que se pueden dividir en no permeables (azúcares, proteínas y lipoproteínas, que se adicionan mediante el uso de productos naturales como la yema de huevo y la leche descremada) y permeables siendo el glicerol el más utilizado. Estas sustancias crioprotectoras van a minimizar los daños que se producen durante el proceso de enfriamiento, congelación y descongelación.

Los crioprotectores no permeables, no van a atravesar la membrana plasmática y se van a quedar en el espacio extracelular, modificando la membrana plasmática o disminuyendo la temperatura de congelación del medio. Estudios recientes sugieren que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) presentes en la yema de huevo y las micelas de las caseínas y la lactosa presente en la leche descremada, son las principales responsables de disminuir los daños por enfriamiento y congelación ya que secuestran proteínas (BSP)\* presentes en el plasma seminal que tras la eyaculación inducen la pérdida de colesterol y fosfolípidos de las membranas plasmáticas. En condiciones naturales, estas proteínas favorecen la capacitación en el tracto reproductivo de la hembra, pero durante el proceso de crioconservación va a derivar en un mayor porcentaje de espermatozoides con la membrana dañada (Bergeron y Manjunath, 2006).

\* Las BSP se detectaron por primera vez en plasma seminal bovino (Bovine Seminal Plasma), se han aislado proteínas homólogas en otras especies como en caprino, y en diferentes proporciones (Bergeron y Manjunath, 2006).

Por otro lado, los crioprotectores permeables actúan disminuyendo la formación de hielo intracelular mediante la deshidratación de los espermatozoides, por mecanismos de difusión simple del agua desde el medio intracelular al extracelular por diferencias de presión osmótica. Además, los crioprotectores permeables provocan una reorganización de los lípidos y proteínas de membrana aumentando la fluidez de la misma y favoreciendo el paso de agua y por tanto, la deshidratación celular (Purdy, 2005).

Los crioprotectores permeables son sustancias nocivas para los espermatozoides debido fundamentalmente a la inducción de daños osmóticos que provocan, por ello es muy importante la concentración a la cual se añaden al medio de congelación.

El crioprotector permeable que se utiliza con mayor frecuencia es el glicerol y se usa a una concentración entre el 3 y el 9 %, con resultados óptimos para el ganado caprino cuando se utiliza a una concentración entre un 4 y un 7 % (Leboeuf, 2000).

- c) Adición de colesterol a las membranas plasmáticas. Por una parte, se sabe que el colesterol estabiliza las membranas y disminuye la temperatura a la cual se produce el cambio de fase de los lípidos de fase líquida a gel. Y por otra parte, los daños que se producen en las membranas son muy similares al estadio de la capacitación (Gillan *et al.*, 1997). Se ha observado que cuando los espermatozoides comienzan este proceso su longevidad se ve disminuida (Curry, 2000), y uno de los primeros pasos en el proceso de capacitación es la pérdida de colesterol de sus membranas. En teoría, si se consiguiera incorporar colesterol a las membranas plasmáticas, se podría alcanzar un mayor ratio colesterol/fosfolípidos y por tanto los espermatozoides descongelados deberían estar menos capacitados, y sus membranas deberían ser más estables (Mocé y Graham, 2006. Datos no publicados), alcanzando un ratio colesterol/fosfolípidos semejante al de las membranas plasmáticas de especies resistentes al choque térmico (conejo y humano con 0,88 y 0,90 respectivamente). En definitiva, se conseguiría aumentar la longevidad de los espermatozoides.

Para la adición de colesterol se pueden usar ciclodextrinas que son oligosacáridos cíclicos con una cara externa hidrofílica y una interna hidrofóbica. Las ciclodextrinas pueden saturarse previamente con colesterol, y van a servir como medio portador para incorporarlo a las membranas plasmáticas. Según las unidades de glucosa que contengan las

---

ciclodextrinas, se pueden clasificar en  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  ciclodextrinas según tengan 6, 7 u 8 unidades de glucosa, respectivamente. Se suelen utilizar derivados de las ciclodextrinas, modificados químicamente mediante la adición de grupos metilo o hidroxipropilo, porque mejoran tanto su solubilidad en agua como su capacidad para disolver compuestos hidrofóbicos (Yancey et al., 1996).

Se han observado mejoras en viabilidad y motilidad cuando los espermatozoides de caballos, burros, toros, moruecos o cerdos, son tratados con ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC) tal y como se expone a continuación.

En caballos, se han observado mayores porcentajes de espermatozoides móviles y de espermatozoides con la membrana íntegra, cuando son tratados con metil- $\beta$ -ciclodextrina saturada de colesterol previamente a la crioconservación (Combes *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2006). No obstante, Zahn *et al.* (2002), sólo observaron mejoras en la integridad de la membrana, pero no en motilidad, e incluso al inseminar con el semen tratado, el porcentaje de hembras preñadas fue menor que en el caso de las hembras inseminadas con el semen control.

En burros, Álvarez *et al.* (2006), observaron diferencias significativas tanto en motilidad como en viabilidad para espermatozoides tratados con metil- $\beta$ -ciclodextrina saturada de colesterol.

En vacuno, Purdy y Graham (2004) observaron diferencias significativas en viabilidad y motilidad entre espermatozoides tratados con ciclodextrinas saturadas de colesterol y sin ellas.

En moruecos, se han observado mejoras en la supervivencia a la crioconservación, en los espermatozoides tratados tanto con metil- $\beta$ -ciclodextrina como con 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina saturadas de colesterol (Morrier *et al.*, 2004; Mocé y Graham, 2006. Datos no publicados).

En porcino, se han encontrado aumentos en el porcentaje de mótils e integridad de la membrana y del acrosoma en espermatozoides tratados con 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (Zeng y Terada, 2000 y 2001b) y con metil- $\beta$ -ciclodextrina saturada de colesterol (Zeng y Terada, 2001a). Galantino-Homer *et al.*, (2006) observaron mejoras en cuanto a viabilidad en espermatozoides incubados con 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina y colesterol 3-sulfato, e incluso observaron una inhibición de la capacitación.

### 1.3. Peculiaridades del semen de caprino

Al contrario de lo que sucede en otras especies, en el semen de ganado caprino hay lipasas procedentes de la secreción de sus glándulas bulbouretrales que interaccionan con los componentes habituales de los diluyentes de congelación (tanto con la yema de huevo como con la leche descremada), dando lugar a sustancias tóxicas para los espermatozoides.

Cuando se usa la yema de huevo la lipasa "*Egg Yolk Coagulating enzyme*" (EYCE; Leboeuf, 2000) cataliza la hidrólisis de la lecitina en ácidos grasos y lisolecitina (sustancia tóxica para los espermatozoides), causando una mayor fusogenicidad de las membranas, favoreciendo la inducción de la reacción acrosómica y la condensación de la cromatina. Esto deriva en un mayor porcentaje de espermatozoides reaccionados y por tanto, con menor capacidad fecundante (Purdy, 2005). Por otro lado, cuando en el medio de congelación se incluye la leche descremada la lipasa BUSgp60 del plasma seminal (Leboeuf, 2000) cataliza la hidrólisis de los triglicéridos de la membrana plasmática y de la leche, dando lugar a ácidos grasos libres (como el oleico) que son muy tóxicos para los espermatozoides (Purdy, 2005). Según este último mecanismo de acción, no se podría descartar la posibilidad de que otras lipasas del plasma seminal hidrolizaran los triglicéridos de la yema de huevo, sumándose el efecto tóxico de la lisolecitina al del acúmulo de ácido oleico. En algunos estudios se baraja la posibilidad de que tanto la EYCE como la BUSgp60 sean una sola lipasa (Leboeuf, 2000).

Para disminuir en la medida de lo posible los efectos negativos de las lipasas, se pueden adoptar varias medidas:

- a) Lavado del eyaculado, para eliminar la mayor parte del plasma seminal.
- b) Disminuir la concentración de yema de huevo en el medio de dilución (normalmente se añade en un 20 %). Así, Salamon y Ritar (1982) recomiendan un 1,5 % de yema de huevo sin necesidad de hacer lavado del plasma seminal.
- c) Uso de inhibidores de las lipasas del plasma seminal (Purdy, 2005).
- d) Uso diluyentes sin triglicéridos, pero con proteínas como las caseínas de la leche (Purdy, 2005).
- e) Uso de leche de otras especies diferente a la vaca, con otra distribución de triacilglicéridos y ácidos grasos, para que las lipasas no puedan actuar (Purdy, 2005).

Lo más frecuente es el lavado seminal, mediante dilución 1:5 o 1:10 y centrifugación de 500 a 1000g durante 10-15 minutos, 1 ó 2 veces, eliminando el sobrenadante en cada una de ellas tras la centrifugación, que es donde se encuentran las enzimas (Leboeuf, 2000).

#### ***1.4. Objetivo del trabajo***

El objetivo general del trabajo es el desarrollo de un protocolo para la adición de ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC) al semen de caprino con el fin de modificar la membrana plasmática de los espermatozoides y mejorar la calidad de éstos post-descongelación.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. *Materiales*

Todos los productos químicos utilizados para la elaboración de los medios fueron de grado reactivo procedentes de Sigma-Aldrich (Madrid, España) y las soluciones de Yoduro de Propidio y SYBR-14 de Invitrogen (Barcelona, España).

### 2.2. *Preparación de las ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC)*

Para la preparación de las ciclodextrinas saturadas de colesterol se utilizó la técnica descrita por Purdy y Graham (2004). Se prepararon dos soluciones A y B. En la solución A se diluyó 1 g de la ciclodextrina a preparar en 2 mL de metanol y en la solución B se disolvieron 200 mg de colesterol en 1 mL de cloroformo. Una vez preparadas, se añadieron 0,45 mL de la solución B en la solución A, se agitó bien y se virtió sobre una placa petri de cristal, hasta su secado completo (1 ó 2 días a 37 – 39 °C en una campana de extracción).

Una vez evaporado el solvente, se recogió el precipitado que quedaba en la placa petri y se almacenó en botes de vidrio a temperatura ambiente hasta su uso. Momento en el cual las CLC fueron diluidas en medio de dilución (Tris-Cítrico-Glucosa; composición que se detalla en la Tabla 2) a una concentración de 50 mg/mL.

### 2.3. *Preparación de los medios*

Todos los ingredientes de los medios (Tabla 2) fueron diluidos en agua ultrapura, agitados continuamente y preparados en el laboratorio a temperatura ambiente. La osmolaridad final del medio fue de 300 mOsm y el pH final próximo a 7. La osmolaridad fue medida con un osmómetro crioscópico y el pH con un pHmetro. Una vez preparados los medios se introdujeron en tubos de plástico y se congelaron hasta el momento de su uso.

Los medios con yema de huevo se clarificaron mediante centrifugación a 12.000 g durante 20 minutos y fueron filtrados posteriormente a través de filtros de diferentes tamaños (5  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$  y 1,2  $\mu\text{m}$ ), pasando de uno a otro de forma progresiva.

**Tabla 2.** Composición de los medios

	TRIS (375 mM)	ÁCIDO CÍTRICO (124 mM)	GLUCOSA (41 mM)	GLICEROL (8 %)	Agua ultrapura	YEMA DE HUEVO 20 %
Medio de dilución	3,027 g	1,594 g	1,243 g	-	Hasta 100 mL	-
Medio de enfriamiento (Medio 1)	3,027 g	1,594 g	1,243 g	-	Hasta 100 mL	25 mL
Medio de equilibrado (Medio 2)	3,027 g	1,594 g	1,243 g	10 mL	Hasta 100 mL	25 mL

#### 2.4. Animales

En el trabajo se utilizaron un total de 10 machos cabríos de la raza Murciano-Granadina alojados en las instalaciones del CITA-IVIA (*“Centro de Tecnología Animal-Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias”*), alimentados *ad libitum* con pienso y heno.

#### 2.5. Recuperación del semen

La recogida seminal se realizó mediante vagina artificial, siendo los machos estimulados por la presencia de una hembra en celo (siempre que fue posible). El material de recogida fue atemperado a 39 – 40 °C en una estufa antes de la recuperación del semen para evitar choque térmico. Una vez recuperado, se comprobó que el semen hubiera caído en el tubo recolector, y éste se mantuvo en un baño de agua atemperado a 37 °C hasta su procesado.

---

## 2.6. Congelación y descongelación del semen

### 2.6.1. Protocolo general de congelación

#### Eliminación del plasma seminal

Tras la recuperación del semen, éste fue diluido (1:10; v:v) con el medio de dilución (Tabla 2) atemperado a 37 °C. A continuación se procedió a eliminar el plasma seminal (lavado) mediante centrifugación a 500 g durante 15 minutos a 22 °C. Después de la primera centrifugación, el sobrenadante fue eliminado y el pellet resuspendido nuevamente en 10 mL de medio de dilución, siendo centrifugado de nuevo.

Tras la segunda centrifugación, el sobrenadante se eliminó mediante succión a vacío con pipeta pasteur de cristal y posteriormente se midió la concentración espermática, para poder calcular la cantidad de semen, teniendo en cuenta que la concentración de congelación fue de 100 millones de espermatozoides por mL, y que en el volumen final de la muestra un 50 % correspondió al medio 1 más la cantidad de semen necesario y el otro 50 % correspondió al medio 2.

#### Adición de los medios 1 y 2

- a) Fase de enfriamiento: La concentración de espermatozoides fue ajustada a  $200 \times 10^6$  espermatozoides por mL con medio 1 a temperatura ambiente. Tras su adición, las alícuotas se colocaron en vasos de precipitados llenos de agua hasta 80 mL a una temperatura de 22 °C, y se introdujeron en una cámara a 5 °C, para conseguir un descenso de temperatura hasta 5 °C en dos horas.
- b) Fase de equilibrado: Transcurridas las dos horas de enfriamiento, se añadió el medio 2 (1:1; v:v) a 5 °C, y se equilibró con el semen durante 15 minutos. Las concentraciones finales de glicerol y de espermatozoides fue de 4 % (dependiendo de los experimentos) y de  $100 \times 10^6$  de espermatozoides por mL, respectivamente.

Empajuelado y sellado

Tras la fase de equilibrado, se procedió al llenado de pajuelas de 0,5 mL que fueron selladas con alcohol de polivinilo (PVA) en polvo que al entrar en contacto con el agua polimeriza quedando perfectamente selladas.

Congelación en vapor de nitrógeno líquido (vN<sub>2</sub>L)

Las pajuelas ya preparadas se pusieron en una gradilla sobre nitrógeno líquido, en una caja de poliestireno expandido a una altura de 3 cm durante 10 minutos, parámetros que fueron determinados en el experimento 1 y 2 como se detalla a continuación.

Sumersión en el nitrógeno y almacenamiento

Finalizado el tiempo de congelación, las pajuelas fueron sumergidas en el nitrógeno y fueron almacenadas en los tanques de nitrógeno hasta su uso.

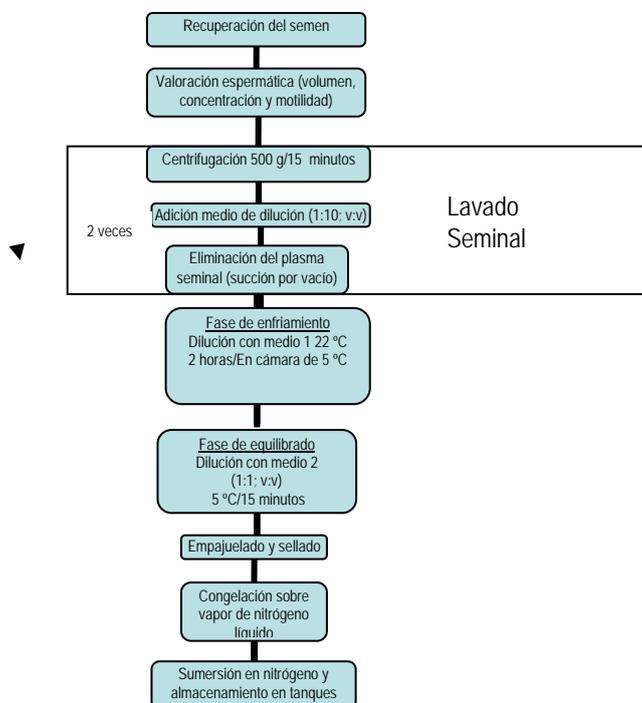


Figura 1. Diagrama del protocolo general de congelación del semen de caprino

### 2.6.2. Protocolo de descongelación de las muestras

La descongelación de las pajuelas se realizó en baño de agua atemperado a 38 – 39 °C durante 30 segundos. Posteriormente se procedió a su evaluación según se describe a continuación.

### 2.7. Valoración espermática

Tras la recuperación de los eyaculados, se anotó el volumen (mL), se estimó la concentración espermática (millones de espermatozoides/mL) y la motilidad (% de espermatozoides móviles) del semen fresco, haciendo así una primera evaluación de la calidad espermática (Tabla 3). El volumen fue medido en tubos graduados. La concentración fue medida mediante un espectrofotómetro equilibrado para caprino, introduciendo las cantidades de semen y de NaCl especificadas por el fabricante. Y la motilidad fue evaluada en un sistema CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis; ISAS, Valencia, España*).

**Tabla 3.** Valores medios de volumen (mL), concentración (millones de espermatozoides/mL) y motilidad (%) de los eyaculados

Valores medios	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN	MOTILIDAD
	1,4	3.031	80 %

En el caso de los espermatozoides descongelados se evaluaron tanto la motilidad como la viabilidad de los mismos, como se detalla a continuación.

#### 2.7.1. Motilidad espermática

La motilidad se valoró con un sistema CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis; ISAS versión 1.0.17, Proiser, Valencia, España*). Para la evaluación de este parámetro se tomó una alícuota de semen y se diluyó hasta una concentración aproximada de 15 millones de espermatozoides/mL, con diluyente Tris-Cítrico-Glucosa (Tabla 2), suplementado con 6 mg/mL de BSA (Albúmina Sérica Bovina), y se dejó incubar durante 10 minutos en un baño atemperado a 39 °C. A continuación se tomaron 10 µL de la muestra y se colocaron en una cámara de

---

Makler atemperada a 39 °C para la visualización de los espermatozoides en una video cámara monocroma Basler (*Alemania*) con un objetivo de 10 aumentos en un microscopio de contraste de fases negativo Nikon Eclipse 90i (*Tokio, Japón*) con platina térmica atemperada a 39 °C. El sistema visualiza 25 imágenes por segundo, en cada captura. Se capturaron aproximadamente 200 espermatozoides por análisis. Con un área de partícula entre 3 y 70 micras. Se consideraron espermatozoides con un movimiento progresivo aquellos con un índice de rectitud (STR) mayor del 80 %, con movimiento lento aquellos que tienen una velocidad entre 10-45 micras por segundo, con movimiento medio aquellos que tienen una velocidad entre 45-75 micras por segundo, y aquellos con una velocidad mayor a 75 micras por segundo como espermatozoides con un movimiento rápido.

### 2.7.2. Viabilidad espermática

Para la evaluación de la viabilidad espermática se empleó la citometría de flujo con tinciones vitales fluorescentes de Yoduro de Propidio (PI; solución stock de 1mg/mL en agua ultrapura) y SYBR-14 (solución madre de 10 µM en dimetilsulfóxido), según el método descrito por Purdy y Graham (2004).

Tras la descongelación de las pajuelas se hizo una primera dilución con Tris-Cítrico-Glucosa y BSA (BSA a 6 mg/mL) hasta  $30 \times 10^6$  espermatozoides/mL. A continuación, se tomó una alícuota de semen (100 µL) y fue diluida con 450 µL de una solución que contenía Tris-Cítrico-Glucosa-BSA, 2,5 µL de SYBR-14 y 2,5 µL de PI. De esta forma la concentración final de espermatozoides se encuentra alrededor de  $5 \times 10^6$  espermatozoides por mL. Las muestras una vez diluidas fueron incubadas durante 10 minutos con los dos colorantes, a temperatura ambiente, y filtradas a través de un filtro de nylon de 40 µm, antes de ser pasadas por el citómetro Coulter EPICS XL-MCL (*IZASA, Barcelona, España*) con un láser de argón a 488 nm.

La fluorescencia del SYBR-14 fue detectada por el sensor FL1 usando un filtro de paso de banda de 525 nm y el PI fue detectado por el FL3 con un filtro de paso de banda de 620 nm. Por cada muestra pasada se recogieron datos de fluorescencia de 10.000 eventos.

---

El SYBR-14 es una tinción DNA membrana permeable, que tiñe todas las células, diferenciándolas así de partículas del mismo tamaño y el PI es un colorante DNA membrana impermeable, que sólo penetra en las células muertas (que han perdido la integridad de la membrana) desplazando al SYBR-14.

Según este protocolo, el citómetro va a detectar cuatro tipos de poblaciones, el porcentaje de espermatozoides teñidos sólo con el SYBR-14 (% de vivos), el porcentaje de espermatozoides teñidos con el PI (% de muertos), porcentaje de espermatozoides teñidos con las dos tinciones (% de moribundos) y partículas no teñidas. En la práctica los moribundos se cuentan como muertos pues es sólo cuestión de tiempo el paso de una población a otra.

## 2.8. Experimentos

Todos los experimentos constan de partes comunes tales como la recuperación del semen y la evaluación de la calidad seminal, mientras que el procesado del semen para la congelación fue variando según el experimento.

En total se realizaron siete experimentos desde abril a junio del 2007, con una media de 11 machos en cada uno, con la posibilidad de repetir un macho para un mismo experimento.

Los eyaculados se trataron de forma individual, y de ellos se extrajeron las alícuotas necesarias para cada tratamiento, consiguiendo en todas ellas un volumen final de 2 mL a una concentración de 100 millones de espermatozoides/mL.

### 2.8.1. Experimento 1. Comparación entre protocolos y medios de congelación

En este primer experimento se compararon tiempos de congelación basándonos en el protocolo establecido por Leboeuf *et al.* 2000 (4-5 cm sobre vapor de nitrógeno líquido durante 4-5 minutos) y medios de congelación, sin adición de CLC.

Los tiempos a comparar fueron 5 y 10 minutos para cada medio de congelación basándonos en los malos resultados obtenidos anteriormente y en los tiempos mayores de congelación utilizados en otras especies (alrededor de 10 minutos). Los tres medios y protocolos de congelación son los que se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Protocolos de congelación del experimento 1

MEDIO	Lavado seminal (centrifugación)	% Yema de huevo	% Glicerol
A	Sí	20	4
B	Sí	20	7
C	No	2	4

Uno de los protocolos evita la fase de lavado mediante el uso de un medio con un 2 % de yema de huevo. Los otros dos protocolos utilizados mantienen la fase de lavado del plasma seminal mediante centrifugación, pero se diferencian en el porcentaje de glicerol final (4 % vs. 7 %). El esquema del experimento se detalla en la Figura 2.

La congelación, descongelación y valoración espermática se realizó tal y como ha sido descritas previamente.

Ya que los mejores resultados se obtuvieron con el medio y protocolo de congelación A (lavado de plasma seminal, medio con 20 % de yema de huevo y 4 % de glicerol) y tras 10 minutos de congelación sobre nitrógeno líquido, éste fue el protocolo elegido para el resto de los experimentos.

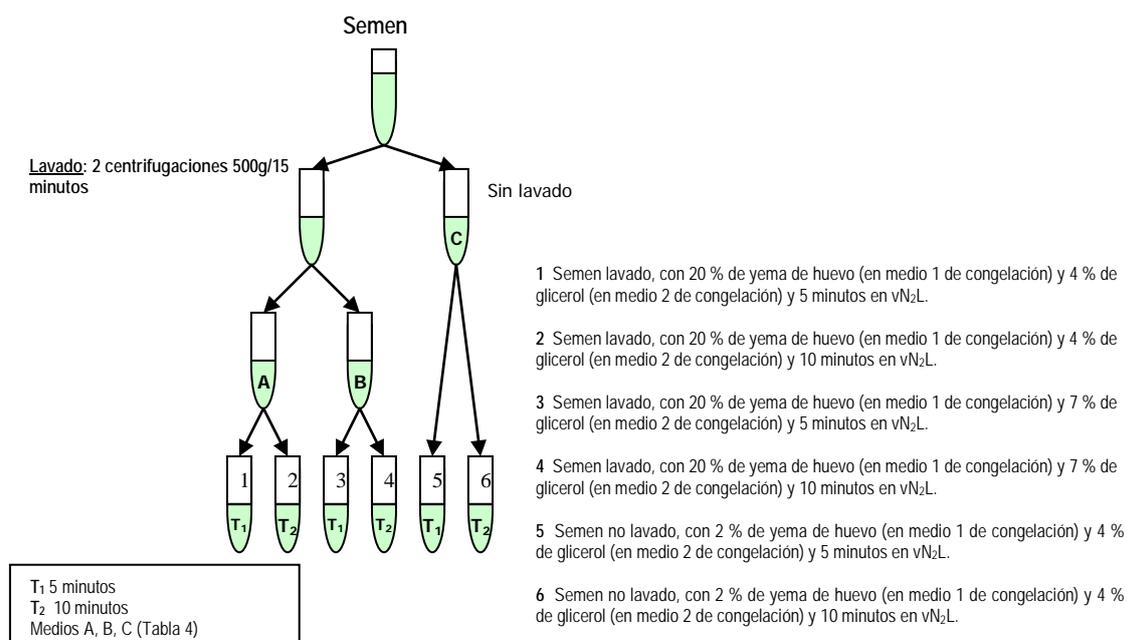


Figura 2. Diagrama del Experimento 1. Comparación entre protocolos y medios de congelación

### 2.8.2. Experimento 2. Comparación entre alturas de congelación sobre vapor de nitrógeno líquido

Una vez establecido el tiempo de congelación, evaluamos la influencia de la distancia de las pajuelas a la superficie del nitrógeno líquido durante la congelación.

Se establecieron 5 alturas diferentes de congelación 3 cm, 4,5 cm, 5 cm, 6 cm y 8 cm, escogiendo como grupo control la altura de 4,5 cm y con un tiempo de congelación de 10 minutos para todas ellas (Figura 3).

La congelación y descongelación se realizó según protocolos generales.

A partir de los resultados obtenidos establecimos una distancia óptima de 3 cm de altura sobre la superficie del nitrógeno líquido para los siguientes experimentos.

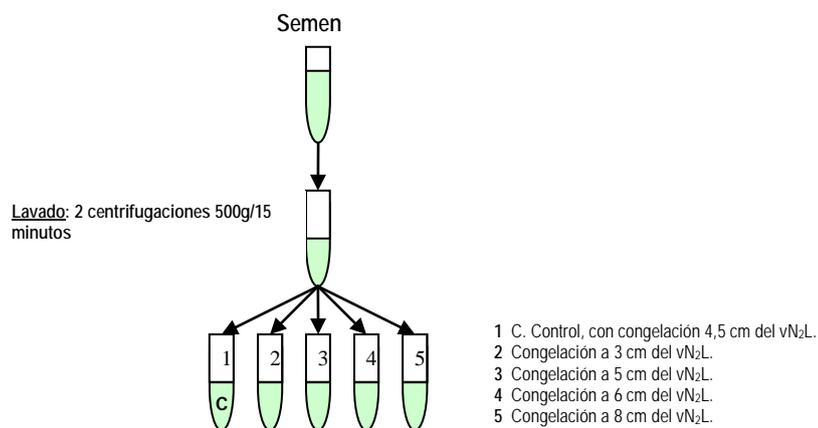


Figura 3. Diagrama del Experimento 2. Comparación entre diferentes alturas de congelación

### 2.8.3. Experimento 3. Comparación entre la adición de ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC) antes o después del lavado seminal

Una vez establecidos el medio y protocolo de congelación se determinó el momento más adecuado para la adición de las CLC a los espermatozoides (antes o después del lavado del plasma seminal).

Para ello se utilizó la metil- $\beta$ -ciclodextrina saturada de colesterol a una concentración de 2 mg de CLC por cada 120 millones de espermatozoides, porque en otras especies se ha observado que la concentración óptima está entre 1,5 y 2 mg de CLC por cada 120 millones de espermatozoides.

Los espermatozoides fueron incubados con los CLC durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Se realizaron 3 tratamientos por muestra. Una alícuota se utilizó como control (sin adición de CLC), otra alícuota fue tratada con CLC antes de la centrifugación y la otra fue tratada con las CLC tras la fase de lavado el plasma seminal (Figura 4).

Tanto la congelación como la descongelación de las muestras se realizaron según los protocolos generales descritos anteriormente. Una vez descongeladas las muestras se valoraron tanto la movilidad como la viabilidad de las mismas.

Para el resto de los experimentos se eligió la adición de CLC después de centrifugar para hacer el proceso más fácil evitando tener que medir concentraciones antes de centrifugar.

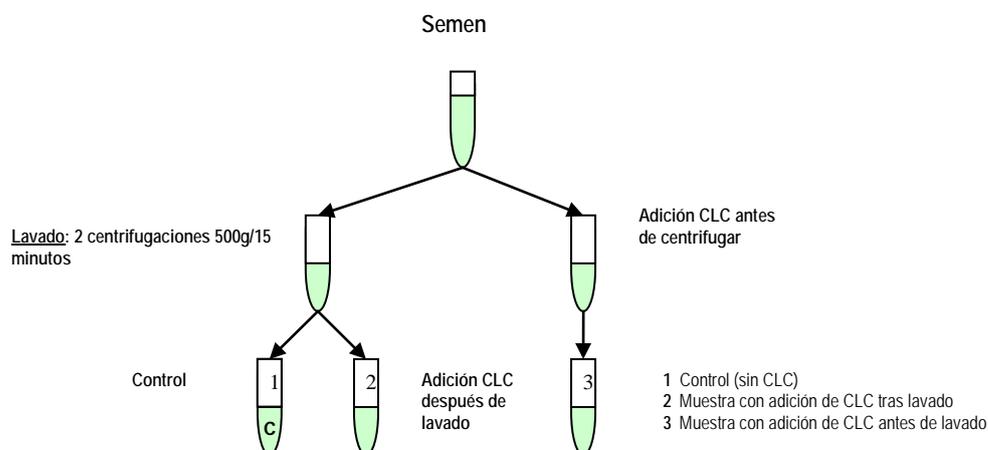


Figura 4. Diagrama del Experimento 3. Adición de CLC antes o después de la fase de lavado

#### 2.8.4. Experimento 4. Determinación de la concentración óptima de ciclodextrina saturada de colesterol (CLC)

El objetivo de este experimento fue determinar la concentración óptima de CLC, utilizando igual que en el experimento anterior la metil- $\beta$ -ciclodextrina saturada de colesterol, por su facilidad de preparación y dilución en los medios.

Para ello, se realizaron siete tratamientos por muestra, uno de ellos se utilizó como control (no tratado con CLC), otro se trató con ciclodextrina no saturada de colesterol (control negativo) y el resto fueron tratados con diferentes concentraciones de metil- $\beta$ -CLC (Figura 5).

Todo el protocolo de congelación, descongelación y evaluación de las dosis se hizo del modo habitual.

Para el resto de experimentos, se decidió tratar a los espermatozoides con 1 mg de CLC por cada 120 millones de espermatozoides.

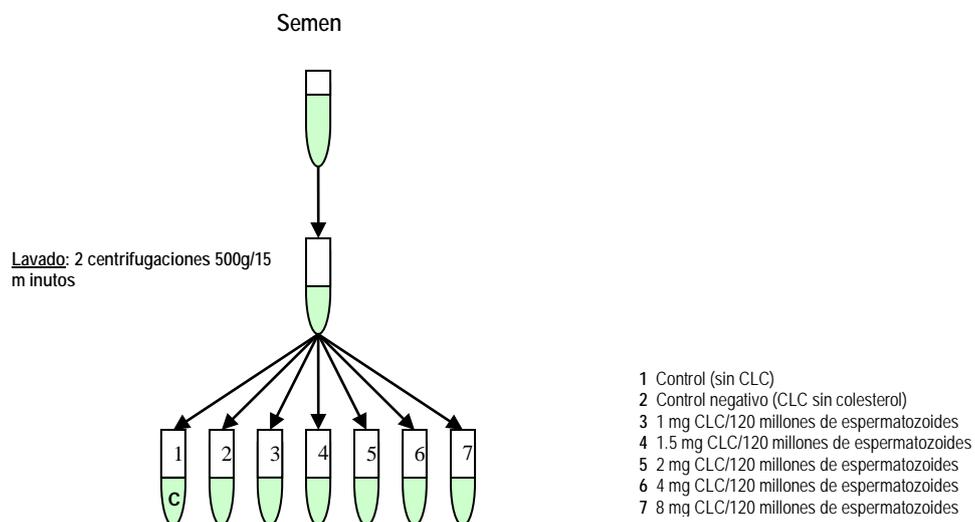


Figura 5. Diagrama del Experimento 4. Determinación de la concentración óptima de CLC



CLC por cada 120 millones de espermatozoides de  $\alpha$ -CLC, hidroxipropil- $\alpha$ -CLC,  $\gamma$ -CLC, metil- $\beta$ -CLC (fresca) y metil- $\beta$ -CLC (descongelada), como se muestra en la Figura 7.

A continuación, las muestras fueron diluidas, congeladas, descongeladas y evaluadas según se ha descrito anteriormente.

En el siguiente experimento se optó por el uso de metil- $\beta$ -CLC descongelada.

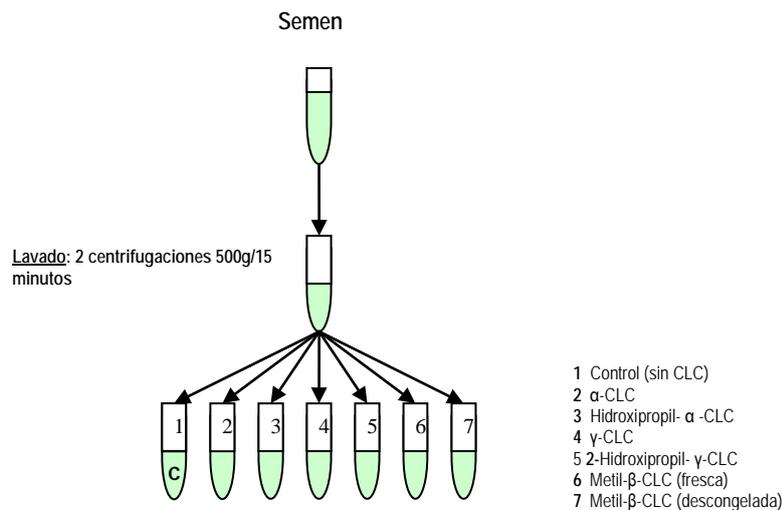
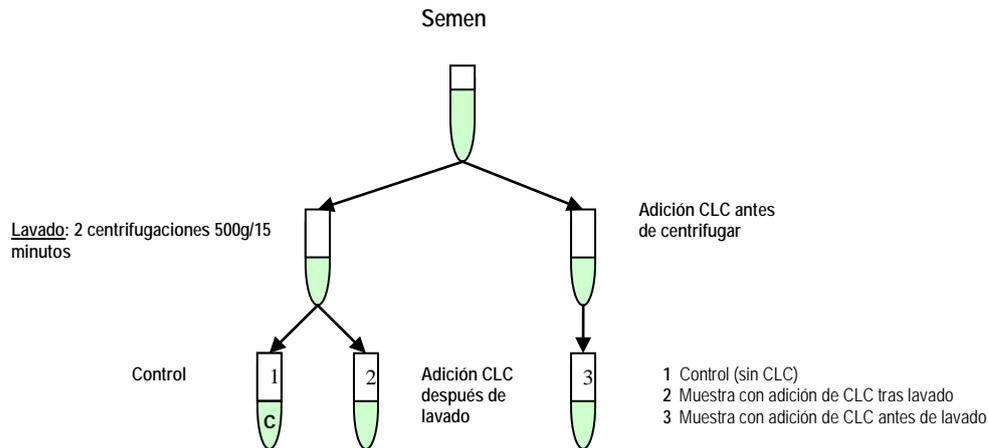


Figura 7. Diagrama del Experimento 6. Comparación entre  $\alpha$ -CLC y  $\gamma$ -CLC y entre metil- $\beta$ -CLC fresca y descongelada

2.8.7. Experimento 7. Comparación entre la adición de metil- $\beta$ -ciclodextrina saturada de colesterol descongelada, antes o después del lavado del plasma seminal

En este experimento se realizaron tres tratamientos por muestra como se detalla a continuación (Figura 8), y se compararon las diferencias entre añadir la CLC antes o después de la fase de centrifugación (eliminación del plasma seminal), con un grupo control al que no se le añadió CLC (al igual que en el experimento 3, pero esta vez con la concentración de CLC determinada en el experimento 4).

La congelación se llevó a cabo según el protocolo general de congelación, al igual que la descongelación y evaluación de las muestras.



**Figura 8.** Diagrama del Experimento 7. Comparación entre la adición de metil- $\beta$ -CLC descongelada antes o después del lavado del plasma seminal

Según los experimentos, se estableció el siguiente protocolo de adición de CLC y congelación:

- Adición de metil- $\beta$ -CLC descongelada
- Adición de CLC a una concentración de 1 mg por cada 120 millones de espermatozoides después de la centrifugación
- Congelación a 3 cm de la superficie de nitrógeno líquido durante 10 minutos.

## 2.9. Análisis estadístico

En el análisis de datos, se ha analizado el porcentaje de espermatozoides móviles, el porcentaje de espermatozoides con un movimiento progresivo y el porcentaje de espermatozoides vivos como variables. En un primer análisis exploratorio de los datos, aquellos que no se ajustaban a una distribución normal han sido transformados en arcosenos según la fórmula de Tukey (1950).

El análisis estadístico se ha llevado a cabo por un procedimiento MIXED (*The SAS System for Windows 9.0*) incluyendo la variable individuo (macho utilizado), como efecto aleatorio, para detectar posibles diferencias significativas entre tratamientos, fijando un riesgo del 5 %.

---

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Experimento 1. Comparación entre protocolos y medios de congelación

Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides móviles, progresivos y vivos, entre medios y tiempos de congelación sobre vapor de nitrógeno líquido. No obstante, la interacción entre ambos tratamientos no fue significativa.

En las muestras congeladas con el medio A (con eliminación del plasma seminal, 20 % de yema de huevo y 4% de glicerol), se observaron mayores porcentajes de espermatozoides móviles totales, progresivos y vivos que en el resto de medios (Tabla 5).

En cuanto a los tiempos de congelación sobre vapor de nitrógeno líquido, se observaron mayores porcentajes de motilidad y viabilidad cuando las pajuelas fueron congeladas durante 10 minutos, que cuando fueron congeladas durante 5 minutos (Tabla 6).

Por lo tanto, para el protocolo de los siguientes experimentos se utilizó el medio A de congelación y las pajuelas fueron congeladas durante 10 minutos sobre vapor de nitrógeno líquido.

**Tabla 5.** Efecto del medio de congelación sobre la motilidad y viabilidad de los espermatozoides de caprino

Tratamiento	MÓTILES TOTALES (%)	PROGRESIVOS (%)	VIVOS (%)
MEDIO*			
A	11,9 <sup>a</sup> ± 2,2	7,4 <sup>a</sup> ± 1,5	14,0 <sup>a</sup> ± 1,9
B	6,4 <sup>b</sup> ± 2,2	3,6 <sup>b</sup> ± 1,5	8,2 <sup>b</sup> ± 1,9
C	5,6 <sup>b</sup> ± 2,2	2,6 <sup>b</sup> ± 1,5	8,1 <sup>b</sup> ± 1,9

<sup>a,b</sup>Valores con distintos superíndices dentro de la misma columna son diferentes ( $P < 0,05$ )

\*Comparación de diferentes medios de congelación:

- A. Semen lavado, con 20 % de yema de huevo (en medio 1 de congelación) y 4 % de glicerol (en medio 2 de congelación).
- B. Semen lavado, con 20 % de yema de huevo (en medio 1 de congelación) y 7 % de glicerol (en medio 2 de congelación).
- C. Semen no lavado, con 2 % de yema de huevo (en medio 1 de congelación) y 4 % de glicerol (en medio 2 de congelación).

**Tabla 6.** Efecto del tiempo de permanencia de las pajuelas en vapor de nitrógeno líquido durante la congelación, sobre la motilidad y viabilidad de los espermatozoides de caprino

Tratamiento	MÓTILES TOTALES (%)	PROGRESIVOS (%)	VIVOS (%)
TIEMPO* (minutos)			
5	2,4 <sup>a</sup> ± 2,1	1,3 <sup>a</sup> ± 1,4	2,4 <sup>a</sup> ± 1,8
10	13,6 <sup>b</sup> ± 2,1 <sup>b</sup>	7,8 <sup>b</sup> ± 1,4	17,7 <sup>b</sup> ± 1,8

<sup>a,b</sup>Valores con distintos superíndices dentro de la misma columna son diferentes ( $P < 0,05$ )

\*Comparación de diferentes tiempos de congelación sobre vapor de nitrógeno líquido

### 3.2. Experimento 2. Comparación entre alturas de congelación sobre vapor de nitrógeno líquido

No se observaron diferencias significativas en los parámetros de motilidad (móviles totales y progresivos) ni viabilidad para las alturas de congelación estudiadas (Tabla 7). Para los siguientes experimentos se escogió la altura de 3 cm porque los resultados son ligeramente superiores (aunque no significativos) para las muestras congeladas a esta altura que para el resto de las alturas.

**Tabla 7.** Efecto de la altura de las pajuelas sobre el nitrógeno líquido durante la congelación, sobre la motilidad y viabilidad de los espermatozoides de caprino tras la descongelación

Tratamiento	MÓVILES TOTALES (%)	PROGRESIVOS (%)	VIVOS (%)
ALTURAS (cm)			
3	58,7 ± 9,6	44,7 ± 8,9	37,7 ± 6,4
4,5	50,2 ± 9,6	37,7 ± 8,9	38,7 ± 6,4
5	55,9 ± 9,6	41,4 ± 8,9	37,0 ± 6,4
6	45,7 ± 9,6	32,9 ± 8,9	37,1 ± 6,4
8	47,2 ± 9,6	31,4 ± 8,9	35,8 ± 6,4

### 3.3. Experimento 3. Comparación entre la adición de ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC) antes o después del lavado del plasma seminal

Los resultados de motilidad (móviles totales y progresivos) y viabilidad fueron muy similares entre el grupo control y las muestras tratadas con CLC, tanto antes como después del lavado del plasma seminal (Tabla 8).

Como nuestro objetivo es el desarrollo de un protocolo para la adición de CLC, en el siguiente experimento se determinó la concentración óptima de CLC para los espermatozoides de caprino, ya que la falta de respuesta en este experimento podría deberse al uso de una concentración de CLC inadecuada para esta especie. Además, para el resto de experimentos decidimos tratar a los espermatozoides con CLC después de la centrifugación, ya que esto nos permitiría medir la concentración de espermatozoides sólo tras el lavado.

**Tabla 8.** Efecto de la adición de 2 mg de metil- $\beta$ -ciclodextrina saturada de colesterol por cada  $120 \times 10^6$  espermatozoides antes de la centrifugación ó después de la centrifugación, sobre la motilidad y viabilidad de los espermatozoides de caprino tras la descongelación

Tratamiento	MÓTILES TOTALES (%)	PROGRESIVOS (%)	VIVOS (%)
Control	56,2 $\pm$ 5,3	43,2 $\pm$ 4,8	49,3 $\pm$ 3,5
CLC antes de centrifugación	55,6 $\pm$ 5,3	42,4 $\pm$ 4,8	52,0 $\pm$ 3,6
CLC después de centrifugación	54,4 $\pm$ 5,3	39,4 $\pm$ 4,8	54,9 $\pm$ 3,5

#### 3.4. Experimento 4. Determinación de la concentración óptima de ciclodextrina saturada de colesterol (CLC)

Se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en el porcentaje de espermatozoides móviles (móviles totales y progresivos) y vivos entre el grupo control negativo (muestras tratadas con ciclodextrinas no saturadas de colesterol) y las muestras tratadas con 1 mg de CLC por cada  $120 \times 10^6$  de espermatozoides (37 % vs. 67 % y 28 % vs. 57 % de espermatozoides móviles totales y vivos, respectivamente; Tabla 9). No obstante, no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y los grupos tratados con CLC, aunque se observa un incremento en el porcentaje de espermatozoides móviles y vivos cuando los espermatozoides son tratados con 1 mg de CLC por cada  $120 \times 10^6$  espermatozoides.

Por lo tanto, la concentración óptima de CLC para esta especie parece ser de 1 mg/ $120 \times 10^6$  espermatozoides. Así, fue ésta la concentración elegida para el resto de experimentos.

**Tabla 9.** Comparación entre la adición de diferentes concentraciones de metil- $\beta$ -ciclodextrina saturada de colesterol con un control negativo (adición de metil- $\beta$ -ciclodextrina sin colesterol) y un grupo control

Tratamiento mg/120x10 <sup>6</sup> espermatozoides	MÓTILES TOTALES (%)	PROGRESIVOS (%)	VIVOS (%)
Control	59,4 <sup>ab</sup> ± 5,3	48,9 <sup>a</sup> ± 4,7	44,4 <sup>ab</sup> ± 4,6
Control negativo	37,2 <sup>c</sup> ± 5,3	28,9 <sup>b</sup> ± 4,7	28,0 <sup>b</sup> ± 4,6
1 mg	67,3 <sup>a</sup> ± 5,3	53,1 <sup>a</sup> ± 4,7	57,2 <sup>a</sup> ± 4,6
1,5 mg	57,0 <sup>ab</sup> ± 5,3	43,5 <sup>ab</sup> ± 4,7	45,8 <sup>ab</sup> ± 4,6
2 mg	59,5 <sup>ab</sup> ± 5,3	41,4 <sup>ab</sup> ± 4,7	43,7 <sup>ab</sup> ± 4,6
4 mg	57,8 <sup>ab</sup> ± 5,3	43,0 <sup>ab</sup> ± 4,7	34,2 <sup>b</sup> ± 4,6
6 mg	51,3 <sup>b</sup> ± 5,3	38,3 <sup>ab</sup> ± 4,7	43,0 <sup>ab</sup> ± 4,6

<sup>a,b,c</sup>Valores con distintos superíndices dentro de la misma columna son diferentes ( $P < 0,05$ )

### 3.5. Experimento 5. Comparación entre diferentes $\beta$ -ciclodextrinas saturadas de colesterol ( $\beta$ -CLC)

La calidad de los espermatozoides post-descongelación fue similar entre las muestras control y las tratadas con distintas  $\beta$ -CLC, como se aprecia en la Tabla 10. La triacetil- $\beta$ -ciclodextrina saturada de colesterol funciona peor que el resto de las  $\beta$ -CLC.

Tabla 10. Comparación entre la adición de diferentes  $\beta$ -ciclodextrinas saturadas de colesterol, sobre la motilidad y viabilidad de los espermatozoides de caprino

Tratamiento	MÓTILES TOTALES (%)	PROGRESIVOS (%)	VIVOS (%)
Control	63,0 <sup>a</sup> $\pm$ 6,5	46,5 $\pm$ 5,8	43,9 <sup>a</sup> $\pm$ 5,2
$\beta$ -ciclodextrina	59,7 <sup>a</sup> $\pm$ 6,5	45,6 $\pm$ 5,8	37,0 <sup>ab</sup> $\pm$ 5,2
$\beta$ -ciclodextrina hydrata	55,7 <sup>a</sup> $\pm$ 6,5	44,3 $\pm$ 5,8	38,3 <sup>ab</sup> $\pm$ 5,2
Metil- $\beta$ -ciclodextrina	60,2 <sup>a</sup> $\pm$ 6,5	47,6 $\pm$ 5,8	42,1 <sup>ab</sup> $\pm$ 5,2
2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina	58,2 <sup>a</sup> $\pm$ 6,5	46,5 $\pm$ 5,8	39,1 <sup>ab</sup> $\pm$ 5,2
Triacetil- $\beta$ -ciclodextrina	48,1 <sup>b</sup> $\pm$ 6,5	39,8 $\pm$ 6,0	32,5 <sup>b</sup> $\pm$ 5,2
2-hidroxietil- $\beta$ -ciclodextrina	60,8 <sup>a</sup> $\pm$ 6,5	48,8 $\pm$ 6,0	44,7 <sup>a</sup> $\pm$ 5,2

<sup>a,b</sup>Valores con distintos superíndices dentro de la misma columna son diferentes ( $P < 0,05$ )

### 3.6. Experimento 6. Comparación entre $\alpha$ -ciclodextrinas y $\gamma$ -ciclodextrinas saturadas de colesterol y entre metil- $\beta$ -ciclodextrina preparada en el momento de su uso (fresca) y metil- $\beta$ -ciclodextrina descongelada

La adición de  $\alpha$  y  $\gamma$  ciclodextrinas antes de la crioconservación no mejoró la calidad de las muestras post-descongelación (Tabla 11).

Asimismo si se compara solamente la muestra control con las muestras tratadas con metil- $\beta$ -ciclodextrina preparada en ese momento (fresca) y metil- $\beta$ -ciclodextrina descongelada, tampoco se observan diferencias en el porcentaje de espermatozoides móviles. No obstante, al tratar a los espermatozoides con metil- $\beta$ -ciclodextrina descongelada se observa un incremento significativo en el porcentaje de espermatozoides vivos con respecto al grupo control (36,5 % vs. 45,6 %; Tabla 12).

Tabla 11. Comparación entre la adición de diferentes  $\alpha$ -ciclodextrinas y  $\gamma$ -ciclodextrinas

Tratamiento	MÓTILES TOTALES (%)	PROGRESIVOS (%)	VIVOS (%)
Control	53,5 <sup>a</sup> ± 6,5	41,3 <sup>a</sup> ± 5,7	35,8 ± 5,2
$\alpha$ -ciclodextrina	35,0 <sup>b</sup> ± 6,5	25,6 <sup>b</sup> ± 5,7	40,5 ± 5,2
Hidroxipropil- $\alpha$ -ciclodextrina	42,0 <sup>b</sup> ± 6,5	31,0 <sup>b</sup> ± 5,7	37,4 ± 5,2
$\gamma$ -ciclodextrina	43,3 <sup>ab</sup> ± 6,5	33,0 <sup>b</sup> ± 5,7	36,4 ± 5,2
2-hidroxipropil- $\gamma$ -ciclodextrina	44,8 <sup>ab</sup> ± 6,5	32,7 <sup>b</sup> ± 5,7	38,0 ± 5,2
Metil- $\beta$ -ciclodextrina	38,7 <sup>b</sup> ± 6,5	28,0 <sup>b</sup> ± 5,7	34,9 ± 5,2

<sup>a,b</sup>Valores con distintos superíndices dentro de la misma columna son diferentes ( $P < 0,05$ )

Tabla 12. Comparación entre la adición de metil- $\beta$ -ciclodextrina fresca o descongelada, sobre la motilidad y viabilidad de los espermatozoides de caprino

Tratamiento	MÓTILES TOTALES (%)	PROGRESIVOS (%)	VIVOS (%)
Control	46,0 ± 5,4	34,0 ± 5,0	36,5 <sup>b</sup> ± 4,8
Metil- $\beta$ -ciclodextrina fresca	42,4 ± 5,4	31,9 ± 5,1	39,0 <sup>b</sup> ± 4,8
Metil- $\beta$ -ciclodextrina descongelada	47,9 ± 5,4	35,5 ± 5,0	45,6 <sup>a</sup> ± 4,8

<sup>a,b</sup>Valores con distintos superíndices dentro de la misma columna son diferentes ( $P < 0,05$ )

### 3.7. Experimento 7. Comparación entre la adición de metil- $\beta$ -ciclodextrina saturada de colesterol (CLC) descongelada, antes o después del lavado del plasma seminal

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la adición de CLC antes o después del lavado del plasma seminal. Sin embargo, los espermatozoides tratados con metil- $\beta$ -ciclodextrina saturada de colesterol después del lavado presentaron mayores porcentajes de espermatozoides móviles, progresivos y vivos (diferencias estadísticamente significativas), con respecto al grupo control (Tabla 13).

**Tabla 13.** Comparación entre la adición de metil- $\beta$ -ciclodextrina descongelada, antes y después del lavado del plasma seminal, sobre la motilidad y viabilidad de los espermatozoides de caprino

Tratamiento	MÓTILES TOTALES (%)	PROGRESIVOS (%)	VIVOS (%)
Control	41,8 <sup>b</sup> ± 6,2	30,0 <sup>b</sup> ± 5,9	40,4 <sup>b</sup> ± 4,7
Antes	44,2 <sup>ab</sup> ± 6,2	32,8 <sup>ab</sup> ± 5,9	47,7 <sup>a</sup> ± 4,7
Después	48,3 <sup>a</sup> ± 6,2	37,1 <sup>a</sup> ± 5,9	49,0 <sup>a</sup> ± 4,7

<sup>a,b</sup>Valores con distintos superíndices dentro de la misma columna son diferentes ( $P < 0,05$ )

---

## 4. DISCUSIÓN

Como en todo programa de mejora, la inseminación artificial constituye una herramienta fundamental para el avance de la misma, ya que permite la inseminación de muchas hembras con el eyaculado de un macho con genes favorables. Asimismo, el uso de semen congelado facilita la difusión del material genético porque separa la recuperación del semen de la inseminación en el espacio y en el tiempo, facilitando su transporte entre largas distancias, ofreciendo así la posibilidad de almacenar y conservar semen de especies en peligro de extinción o de machos fallecidos genéticamente mejorantes durante largos períodos de tiempo.

En la actualidad, la Asociación Española de criadores de la cabra Murciano-Granadina (ACRIMUR) viene desarrollando un programa de mejora genética de la raza mediante la elección y evaluación genética de reproductores. A pesar de que los resultados obtenidos con el uso de semen congelado son muy buenos (alrededor del 60 %; Salvador *et al.*, 2005), éstos son inferiores a los que se obtienen con semen conservado en estado líquido (70-80 %; Roca *et al.*, 1997; Karatzas *et al.*, 1997; Paulenz *et al.*, 2005).

Estos resultados se pueden mejorar aumentando la eficacia de la técnica. Hay estudios que demuestran que aumentando la profundidad de deposición del semen congelado en el momento de la inseminación se pueden mejorar significativamente las fertilidades, alcanzando valores muy similares a los obtenidos con semen fresco (Leboeuf *et al.*, 2000; Salvador *et al.*, 2005). Sin embargo, aumentar la profundidad presenta inconvenientes, por un lado se requiere de una mayor especialización por parte del inseminador y por otro, la anatomía del cuello del útero presenta una serie de pliegues circulares que van a dificultar el paso de la pistola de inseminación a través de él. En el caso de utilizar la inseminación artificial intrauterina (mediante laparoscopia), se requiere mayor especialización y los costes aumentan.

Por otro lado, también se pueden mejorar los resultados aumentando la calidad de los espermatozoides congelados. Se ha estimado que alrededor del 50 % de los espermatozoides resultan irreversiblemente dañados tras la descongelación. Además, los espermatozoides que sobreviven presentan unas características completamente distintas a los de los espermatozoides frescos, por lo que se requiere inseminar con un mayor número de espermatozoides por dosis, y

---

depositarlos más profundamente en el tracto reproductivo de la hembra, acercando además el momento de la inseminación al de la ovulación.

Durante el proceso de criopreservación del semen, los espermatozoides son sometidos a condiciones de estrés (osmótico, mecánico y descenso de la temperatura; Holt, 2000) que van a derivar en una serie de cambios estructurales y funcionales que, en último término, van a producir una disminución de la calidad de los espermatozoides tras la descongelación. Estos daños se pueden minimizar haciendo uso de sustancias crioprotectoras y seleccionando los rangos y descensos de temperatura adecuados para cada especie. En los últimos años se ha conseguido minimizar los daños en los espermatozoides mediante la modificación de su membrana plasmática.

El uso de crioprotectores en los medios de congelación disminuye en gran medida los daños. En los diluyentes se incluyen crioprotectores permeables (azúcares, proteínas y lipoproteínas, que se añaden mediante el uso de productos naturales como la yema de huevo y la leche descremada) y no permeables (siendo el glicerol el más utilizado).

A los daños que sufren en general los espermatozoides durante la criopreservación, hay que sumarle las peculiaridades que presenta el semen de caprino. En su plasma seminal hay fosfolipasas procedentes de la secreción de las glándulas bulbouretrales, que van a interferir con la yema de huevo o la leche descremada, incluidas habitualmente en los medios de congelación por su acción crioprotectora, dando lugar a sustancias tóxicas para los espermatozoides. Para disminuir la acción de las lipasas sobre la yema de huevo y la leche descremada, se pueden utilizar dos estrategias, eliminar el plasma seminal de los eyaculados mediante centrifugación o disminuir el porcentaje de yema de huevo incluido en el medio.

En los protocolos de congelación de ganado caprino como crioprotector no permeable se suele incluir la yema de huevo en un 20 % con lavado del plasma seminal o en un 1,5 % sin lavado del plasma seminal (Salamon y Ritar, 1982). El glicerol es el crioprotector permeable más comúnmente utilizado a una concentración óptima entre un 4 y un 7 % (Leboeuf, 2000). Asimismo, en caprino para la congelación en caja de poliestireno expandido, se recomienda una altura de 3 - 5 cm sobre vapor de nitrógeno líquido durante 4 - 8 minutos (Purdy, 2005).

---

Con el objetivo de mejorar el protocolo de congelación y establecer valores óptimos, en los dos primeros experimentos se compararon diferentes medios, tiempos de congelación y alturas de congelación. En nuestro experimento, observamos mejores resultados en cuanto a motilidad y viabilidad, en espermatozoides congelados sin plasma seminal con un 20 % de yema de huevo y un 4 % de glicerol en el medio, y congelando durante 10 minutos a una altura comprendida entre 3 y 8 cm sobre el vapor de nitrógeno líquido. Seguramente esto es debido a que al eliminar el plasma seminal de los eyaculados se consigue eliminar el efecto negativo de las lipasas y al añadir la yema de huevo en un 20 %, obtenemos un medio con un mayor porcentaje de sustancias crioprotectoras. Por otro lado, parece ser que la concentración óptima de glicerol para nuestros machos se sitúa en torno a un 4 % y que el tiempo de permanencia de las pajuelas sobre el vapor de nitrógeno líquido es más importante que la altura (para un tiempo de 10 minutos).

En cuanto a la eliminación del plasma seminal, hay cierta controversia acerca de su beneficio. Nuestros resultados son similares a los que obtuvieron Cabrera *et al.* (2005), con un mayor porcentaje en espermatozoides móviles, cuando se eliminaba el plasma seminal y se incluía la yema de huevo en un 12 %, frente a los eyaculados enteros y con un 1,5 % de yema de huevo en el medio (25,7 % vs. 5,3 %). Choe *et al.* (2006), detectó un mayor porcentaje de espermatozoides vivos en las muestras lavadas que en las no lavadas (56 % vs. 3 %). Sin embargo, contrastan con los obtenidos por Tuli y Holtz (1994), que observaron disminuciones significativas tanto en motilidad como en viabilidad, en muestras a las que se les eliminó el plasma seminal y fueron congeladas con un 20 % de yema de huevo. Y con Azerêdo *et al.* (2001) que obtuvo mejores resultados cuando no se eliminó el plasma seminal y la yema de huevo se incorporó en un 2,6 % al medio de congelación. Estas diferencias observadas pueden deberse a diferentes concentraciones en lipasas dentro del plasma seminal entre razas (Roca *et al.*, 1997).

Cabe señalar, que los bajos resultados obtenidos en el primer experimento contrastan con los obtenidos en los experimentos siguientes. Estos bajos resultados podrían ser debidos a la disminución en la frecuencia de recuperación de los machos, ya que en los siguientes experimentos se les comenzó a recuperar de forma rutinaria a un ritmo de dos extracciones de semen por semana.

---

La membrana plasmática de los espermatozoides juega un papel muy importante en el mantenimiento de la estructura y funcionalidad celular, y constituye una de las estructuras más dañadas durante la congelación. Existen diferencias entre especies en cuanto a termorresistencia, debidas principalmente a diferencias bioquímicas en el ratio colesterol/fosfolípidos y ratio ácidos grasos poliinsaturados/saturados en la composición de sus membranas, siendo lo ideal un ratio elevado de colesterol/fosfolípidos y un ratio bajo en poliinsaturados/saturados, como se indica en la introducción. Por otra parte, durante la crioconservación la membrana plasmática de los espermatozoides sufre cambios muy similares al estadio de la capacitación (Gillan *et al.*, 1997), donde tiene lugar una pérdida de colesterol. En teoría, si se consiguiera aumentar la cantidad de colesterol en las membranas plasmáticas, los espermatozoides deberían ser más resistentes al choque térmico y estar menos capacitados (Mocé y Graham, 2006. Datos no publicados), mejorando así su calidad tras la descongelación. El contenido en colesterol de las membranas es fácilmente manipulable mediante el uso de ciclodextrinas. Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos, que si se saturan previamente con colesterol son capaces de actuar como medio portador para incorporarlo a las membranas plasmáticas.

En este trabajo, se ha estudiado el desarrollo de un protocolo para la adición de colesterol a las membranas plasmáticas de los espermatozoides de caprino, mediante el uso de diferentes ciclodextrinas saturadas de colesterol. La adición de ciclodextrinas saturadas de colesterol a los espermatozoides ha sido estudiada en otras especies y se ha observado mejoras en su motilidad y viabilidad. En caballos (Combes *et al.*, 2000), en cerdos (Zeng y Terada, 2001a; 2001b), en toros (Purdy y Graham, 2004), en burros (Álvarez *et al.*, 2006) y en moruecos (Morrier *et al.*, 2004; Mocé y Graham, 2006. Datos no publicados) se han observado mejoras tanto en el porcentaje de mótils totales como en el de vivos entre los espermatozoides tratados con CLC antes de la crioconservación y los no tratados.

En primer lugar tratamos de determinar el momento más adecuado para la adición de las CLC (antes o después de la centrifugación). Para ello, se escogió una ciclodextrina y una concentración habitualmente utilizadas con otras especies (Mocé y Graham, 2006. Datos no publicados). No obstante, no se observó una mejora en la calidad de los espermatozoides tras el tratamiento con CLC. Esta falta de respuesta fue posiblemente debida a la concentración de CLC utilizada (2 mg de CLC por cada  $120 \times 10^6$  de espermatozoides), ya que podría no ser óptima para

---

el tratamiento de los espermatozoides de esta especie. Tal vez podría ser debido a que en caprino la concentración de colesterol en la membrana plasmática es mayor que en las especies en las que se han añadido las CLC (0,59 vs. 0,26, 0,36 y 0,45; en cerdo, caballo, morueco y toro respectivamente), y requieren una menor concentración de CLC para alcanzar niveles óptimos de colesterol.

Cuando se determinó la concentración óptima de CLC, ésta se sitúa alrededor de 1 mg de CLC por cada  $120 \times 10^6$  de espermatozoides. En toros (Purdy y Graham, 2004), que poseen una concentración de colesterol en la membrana plasmática similar a caprino, obtuvieron valores similares con la adición de metil- $\beta$ -CLC a una concentración de 1,5 mg de CLC por cada  $120 \times 10^6$  de espermatozoides. Además, se observan diferencias significativas entre los espermatozoides a los que se les añade ciclodextrina sin saturar de colesterol tanto, con el grupo control como con los espermatozoides a los que se les añade las ciclodextrinas saturadas de colesterol. Estas diferencias se deben a que las ciclodextrinas captan colesterol de las membranas plasmáticas, desestabilizándolas. De hecho, se sabe que las ciclodextrinas se pueden usar como promotores de la reacción acrosómica en los espermatozoides, lo que supone una pérdida de colesterol en sus membranas y por tanto, una disminución de su longevidad (Iborra *et al.*, 2000).

Una vez determinada la concentración óptima de CLC, se pasó a evaluar la adición de diferentes CLC. Se suelen utilizar derivados de las ciclodextrinas, porque mejoran tanto su solubilidad en agua como su capacidad para disolver compuestos hidrofóbicos (Yancey *et al.*, 1996). Además, de los derivados de CLC se sabe que las  $\beta$ -ciclodextrinas son las que presentan mayor afinidad para capturar colesterol, seguidas de las  $\gamma$  y las  $\alpha$ -ciclodextrinas (Mocé y Graham, 2006; datos no publicados). Por ello, se usó la metil- $\beta$ -ciclodextrina en los primeros experimentos. Sin embargo, en este trabajo no se han observado diferencias entre diferentes  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\beta$ -ciclodextrinas.

Por otra parte, para facilitar el manejo durante los experimentos, se comparó entre la adición de CLC fresca (preparada en ese momento) con la adición de CLC descongelada, y se observó un mayor porcentaje de espermatozoides vivos tras la descongelación cuando los espermatozoides fueron tratados con CLC descongelada. Tal vez esto sea debido a que tras la congelación/descongelación de las CLC, aumenta la solubilidad de las CLC en el medio, de forma que puedan interactuar mejor con los espermatozoides.

---

Los resultados obtenidos indican que la adición de ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC) a los espermatozoides de caprino puede mejorar su motilidad y viabilidad, hasta 7,9 y 12,8 puntos más (respectivamente) en comparación con las muestras control, añadiéndolas a una concentración de 1 mg de CLC por cada  $120 \times 10^6$  de espermatozoides. Además, el porcentaje de espermatozoides vivos mejora si se utiliza CLC congelada/descongelada para el tratamiento de los espermatozoides.

Partiendo de este protocolo, en el último experimento se volvió a comparar la diferencia entre añadir las CLC antes o después de la centrifugación, y en este caso se observó que la adición después del lavado mejora tanto motilidad total como el porcentaje de espermatozoides vivos.

Dentro de la variabilidad de los datos obtenidos en todos los experimentos, hay que tener en cuenta que los experimentos se han hecho con muestras de eyaculados individuales, no con pools. Y se sabe que existen diferencias individuales, entre machos que congelan bien sus espermatozoides y machos que no (Holt, 2000; Moore *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2007).

Como conclusión, basándonos en los resultados de este trabajo, recomendamos el lavado de los eyaculados para eliminar el plasma seminal, incluyendo la yema de huevo en un 20 % y el glicerol en un 4 % en los medios de congelación y congelando durante 10 minutos a una altura entre 3 y 8 cm sobre vapor de nitrógeno líquido. Además, según los parámetros de motilidad y viabilidad, las ciclodextrinas saturadas de colesterol descongeladas y añadidas después de la centrifugación (del lavado del plasma seminal) pueden mejorar la calidad de los espermatozoides tras el proceso de crioconservación.

En la práctica, se han utilizado parámetros de viabilidad y motilidad para evaluar los experimentos, en este caso puede ser útil, pero hay que tener en cuenta que estas evaluaciones no son capaces de detectar todas las alteraciones que se producen en los espermatozoides ni de valorar la fertilidad de los mismos. Esto es debido a que hay muchos factores implicados en el potencial de fecundación que no dependen sólo de los espermatozoides, sino que dependen también de la hembra, ya que en su tracto reproductivo tienen lugar procesos tan importantes como la capacitación, para que el espermatozoide adquiera capacidad fecundante. Por otra parte, influyen también factores de manejo, tales como la destreza del inseminador, la

profundidad de deposición del semen o el tratamiento de sincronización de las hembras (y la detección del celo).

En futuros trabajos, debería evaluarse otros aspectos de funcionalidad espermática en los espermatozoides enriquecidos con colesterol, tales como los procesos de capacitación de los espermatozoides, su resistencia osmótica o su resistencia a la incubación. Además, debería evaluarse su capacidad fecundante mediante test de adherencia a la zona pelúcida, test de fecundación *in vitro* y en último lugar, evaluar la fertilidad *in vivo*, mediante inseminaciones artificiales con semen crioconservado tratado con ciclodextrinas saturadas de colesterol.

#### 4. IMPLICACIONES

Al igual que en otras especies, se puede conseguir mejorar la calidad de los espermatozoides de caprino post-descongelación mediante la adición de ciclodextrinas saturadas de colesterol antes de la crioconservación. Esto podría suponer un paso más para lograr una mejora en la eficacia de las inseminaciones con semen congelado con respecto al semen conservado en estado líquido.

Por otra parte, y teniendo en cuenta la elevada variabilidad que existe entre machos en cuanto a congelabilidad, el desarrollo de un protocolo para mejorar la calidad de los espermatozoides tras la descongelación puede permitirnos la inclusión en los esquemas de mejora, de machos con caracteres mejorantes cuyos espermatozoides son menos resistentes a la congelación (y que de otra forma pueden ser eliminados del programa por no cumplir los requisitos mínimos de calidad seminal tras la descongelación).

---

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez A.L., Serres C., Torres P., Crespo F<sup>a</sup>, Mateos E., Gómez-Cuétara C., 2006. Effect of Cholesterol-Loaded Cyclodextrin on the Cryopreservation of Donkey Spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. Accepted for publication.
- Amann R.P., 1999. Cryopreservation of sperm. *Encyclopedia of Reproduction*, Academic Press volume 1, 773-783.
- Azerêdo G.A., Esper C.R., Resende K.T., 2001. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Ruminant Research* 41, 257-263.
- Bergeron A., Manjunath P., 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development* 73, 1338-1344.
- Cabrera F., González F., Batista M., Calero P., Medrano A., Gracia A., 2005. The effect of removal of seminal plasma, egg yola level and season on sperm freezability of Canary buck (*Capra hircus*). *Reproduction in domestic animals* 40, 191-195.
- Choe C.Y., Kim J.G., Cho S.R., Son D.S., Kim Y.K., Balasubramanian S., Choe S.Y., Rho G.J., 2006. Influence of seasons, extenders, slow and rapid freezing on seminal characters in Korean native bucks. *Reproduction in domestic animals* 41, 55-60.
- Combes, G. B., Varner, D. D., Schroeder, F., Burghardt, R. C., Blanchard, T. L., 2000. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 56, 127-132.
- Curry M. R., 2000. Crypreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction* 5, 46-52.
- Darin-Bennett A., White I.G., 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 14, 466-470.
- Galantino-Homer H.L., Zeng W.X., Megee S.O., Dallmeyer M., Voelkl D., Dobrinski I., 2006. Effects of 2-Hidroxipropil- $\beta$ -Cyclodextrin and Cholesterol on Porcine Sperm Viability and Capacitation Status Following Cold Shock or Incubation. *Molecular Reproduction and Development* 73, 638-650.
- Gillan L., Evans G., Maxwell W. M. C., 1997. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development* 9, 481-487.

- Hernández M., Roca J., Calvete J.J., Sanz L., Muiño-Blanco T., Cebrián-Pérez J.A., Vázquez J.M., Martínez E.A., 2007. Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *Journal of Andrology* 28, 689-697.
- Holt W.V., 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47-58.
- Iborra A., Companyó M., Martínez P., Morros A., 2000. Cholesterol efflux promotes acrosome reaction in goat spermatozoa. *Biology of reproduction* 62, 378-383.
- Karatzas G., Karagiannidis A., Varsakeli S., Brikas P., 1997. Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology* 48, 1049-1059.
- Leboeuf B., Manfredi E., Boue P., Piacère A., Brice G., Baril G., Broqua C., Humblot P., Terqui M., 1998. Artificial insemination of dairy goats in France. *Livestock Production Science* 55, 193-203.
- Leboeuf B., Restall B., Salamon S., 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 62, 113-141.
- Medeiros C.M.O., Forell F., Oliveira A.T.D., Rodrigues J.L., 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology* 57, 327-344.
- Moore A.I., Squires E.L., Graham J.K., 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Criobiology*.
- Morrier A., Thériault M., Castonguay F., Bailey J. Effect of cholesterol loaded methyl- $\beta$ -cyclodextrin on ram sperm during cryopreservation, cold-shock and artificial insemination. *Proceedings of the Society for the study of reproduction meeting*. Vancouver, Canada. Abstract 636.
- Parks J.E., Lynch D.V., 1992. Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29, 255-266.
- Paulenz H., Söderquist L., Adnøy T., Soltun K., Sæther P.A., Fjellsøy K.R., Berg K.A., 2005. Effect of cervical and vaginal insemination with liquid semen stored at room temperature on fertility of goats. *Animal Reproduction Science* 86, 109-117.
- Purdy P.H., Graham J.K., 2004. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* 48, 36-45.
- Purdy P. H., 2005. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*.
- Purdy P.H., Fox M.H., Graham J.K., 2005. The fluidity of Chinese hamster ovary cell and bull sperm membranes after cholesterol addition. *Criobiology* 51, 102-112.

- Rana A.P.S., Majumder G.C., Misra S., Ghosh A., 1991. Lipid changes of goat sperm plasma membrana during epididymal maturation. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1061, 185-196.
- Ritar A.J., Salamon S., 1982. Effects of plasma seminal and its removal and of egg yolk in the diluents on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.* 35, 305-312.
- Roca J., Carrizosa J.A., Campos I., Lafuente A., Vázquez J.M., Martínez E., 1997. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5 °C. *Small Ruminant Research* 25, 147-153.
- Salvador I., Viudes-de-Castro M.P., Bernacer J., Gómez E.A., Silvestre M.A., 2005. Factors affecting pregnancy rate in artificial insemination with frozen semen during non-breeding season in Murciano-Granadina gotas: a field assay. *Reproduction in domestic animals* 40, 526-529.
- Torres P., Serres C., Gómez-Cuétara C., Santiago I., Mateos E., Álvarez A.L., 2006. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on motility and plasma membrana integrity of cooled stallion sperm. *Animal Reproduction Science*. Accepted for publication.
- Tuli R.K., Holtz W., 1994. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and got-release from boer goat spermatozoa. *Theriogenology* 42, 547-555.
- Yancey P.G., Rodriguez W.V., Kilsdonk E.P.C., Stoudt G.W., Johnson W.J., Phillips M.C., Rothblat G.H., 1996. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. *J. Biol. Chem.* 271, 16026-16034.
- Zahn F.S., Papa F.O., Dell'Aqua Jr., 2002. Cholesterol incorporation on equine sperm membrana: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. *Theriogenology* 58, 237-240.
- Zeng W. X., Terada T., 2000. Freezability of boar spermatozoa is improved by exposure to 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Reproduction, Fertility and Development* 12, 223-228.
- Zeng W. X., Terada T., 2001a. Effect of Methyl-Beta-Cyclodextrin on Cryosurvival of Boar Spermatozoa. *Journal of Andrology* 22, 111-118.
- Zeng W. X., Terada T., 2001b. Protection of boar spermatozoa from cold shock damage by 2-hydroxypropil-beta-ciclodextrin. *Theriogenology* 55, 615-627.