



UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRONOMOS
Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética

**EVALUACIÓN OBJETIVA DE LA MOTILIDAD DE LOS
ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS DE CIERVO IBÉRICO.
RELACIONES CON LA CONGELABILIDAD Y LA CALIDAD
DEL SEMEN**

ANTONIA ELENA PEÑA HERNÁNDEZ

TESIS DOCTORAL

Albacete, 16 de diciembre de 2013

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| <u>Resumen</u> | 1 |
| <u>Introducción general</u> | 7 |
| <u>Objetivos</u> | 13 |
| <u>Capítulo 1. Material y métodos</u> | 15 |
| 1.1 Gametos | 17 |
| 1.2 Análisis de calidad seminal | 19 |
| 1.2.1 Volumen | 22 |
| 1.2.2 Concentración espermática | 20 |
| 1.2.3 Número total de espermatozoides | 21 |
| 1.2.4 Motilidad espermática | 21 |
| 1.2.5 Integridad y funcionalidad de la membrana plasmática | 27 |
| 1.2.6 Estado del acrosoma | 28 |
| 1.2.7 Morfología espermática | 29 |
| 1.3 Congelación-descongelación | 30 |
| <u>Capítulo 2. Experimentos</u> | 33 |
| 2.1 Caracterización de los parámetros objetivos de motilidad en espermatozoides epididimarios de ciervo Ibérico | 35 |
| 2.1.1 Introducción | 35 |
| 2.1.2 Diseño experimental | 43 |
| 2.1.3 Resultados | 44 |
| 2.1.4 Discusión | 49 |
| 2.2 Relación entre el análisis convencional de calidad seminal y la evaluación de la motilidad por CASA | 63 |
| 2.2.1 Introducción | 63 |
| 2.2.2 Diseño experimental | 65 |
| 2.2.3.1 Muestras recién obtenidas | 65 |
| 2.2.3.2 Muestras descongeladas | 66 |
| 2.2.3 Resultados | 67 |
| 2.2.3.1 Muestras recién obtenidas | 67 |
| 2.2.3.2 Muestras descongeladas | 70 |
| 2.2.4 Discusión | 73 |

| | |
|---|-----|
| 2.3 Evaluación de la influencia de los factores extrínsecos e intrínsecos al macho sobre los parámetros de motilidad en muestras epididimarias frescas y descongeladas | 82 |
| 2.3.1 Introducción | 82 |
| 2.3.2 Diseño experimental | 85 |
| 2.3.2.1 Muestras recién obtenidas | 86 |
| 2.3.2.1.1 Parámetros extrínsecos al macho | 86 |
| 2.3.2.1.2 Parámetros intrínsecos al macho | 86 |
| 2.3.2.2 Muestras descongeladas | 87 |
| 2.3.2.2.1 Parámetros extrínsecos al macho | 87 |
| 2.3.2.2.2 Parámetros intrínsecos al macho | 88 |
| 2.3.3 Resultados | 89 |
| 2.3.3.1 Efecto del mes en muestras recién obtenidas | 89 |
| 2.3.3.2 Efecto del mes en muestras descongeladas | 91 |
| 2.3.3.3 Efecto de la edad en muestras recién obtenidas | 93 |
| 2.3.3.4 Efecto de la edad en muestras descongeladas | 97 |
| 2.3.3.5 Efecto de los parámetros corporales en muestras iniciales | 100 |
| 2.3.3.6 Efecto de los parámetros corporales en muestras descongeladas | 102 |
| 2.3.4 Discusión | 104 |
| 2.4 Valor predictivo de la congelabilidad a partir de la determinación de los parámetros objetivos de motilidad por el sistema CASA | 121 |
| 2.4.1 Introducción | 121 |
| 2.4.2 Diseño experimental | 124 |
| 2.4.3 Resultados | 125 |
| 2.4.4 Discusión | 127 |
| <u>Capítulo 3. Conclusiones</u> | 134 |
| <u>Capítulo 4. Bibliografía</u> | 137 |
| <u>Apéndice I. Índice de abreviaturas</u> | 167 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Configuración del sistema de análisis objetivo de motilidad utilizado | 23 |
| Tabla 2. Valores medios, desviación estándar, y rangos de los principales parámetros cinéticos objetivos en muestras de epidídimo recién obtenidas | 45 |
| Tabla 3. Valores medios, desviación estándar, y rangos de los principales parámetros cinéticos objetivos después de la descongelación de las muestras epididimarias de ciervo. | 45 |
| Tabla 4. Valores medios, desviación estándar, y rangos, de los principales parámetros cinéticos objetivos después de la incubación de las muestras epididimarias de ciervo | 46 |
| Tabla 5. Valores medios y error estándar de la media de los principales parámetros objetivos de motilidad en los tres grupos de muestras estudiados | 47 |
| Tabla 6. Parámetros cuantitativos y de calidad de las muestras espermáticas obtenidas postmortem | 67 |
| Tabla 7. Correlaciones de Pearson (r) entre los principales parámetros rutinarios de calidad seminal en muestras epididimarias de ciervo ibérico | 68 |
| Tabla 8. Correlaciones de Pearson (r) entre los parámetros rutinarios de calidad y los parámetros objetivos de motilidad obtenidos mediante CASA en muestras epididimarias de ciervo ibérico | 68 |
| Tabla 9. Significación (valor de la P) de cada variable incluida en el análisis de regresión entre los parámetros objetivos de motilidad y los parámetros rutinarios de calidad | 69 |
| Tabla 10. Parámetros de calidad seminal evaluados después del proceso de congelación-descongelación de las muestras espermáticas | 71 |
| Tabla 11. Correlaciones de Pearson (r) entre los factores de calidad seminal después de la descongelación | 71 |
| Tabla 12. Correlaciones de Pearson (r) entre los parámetros rutinarios de calidad seminal a la descongelación y los parámetros objetivos motilidad medidos por CASA tras la descongelación. | 71 |
| Tabla 13. Significación de cada variable del análisis de regresión entre las velocidades objetivas, LIN y STR y los parámetros rutinarios de calidad a la descongelación | 72 |
| Tabla 14. Efecto del mes sobre los parámetros objetivos de motilidad en muestras espermáticas epididimarias descongeladas de ciervo ibérico | 91 |
| Tabla 15. Medias \pm desviación estándar de la media para los parámetros corporales estudiados | 100 |
| Tabla 16. Correlaciones de Pearson entre los parámetros corporales estudiados | 101 |
| Tabla 17. Correlaciones de Pearson entre los parámetros corporales y los parámetros de motilidad | 101 |
| Tabla 18. Influencia de los parámetros corporales en los parámetros objetivos de motilidad obtenidos mediante análisis por CASA en muestras epididimarias de ciervo ibérico | 101 |
| Tabla 19. Correlaciones de Pearson entre los parámetros corporales y los parámetros objetivos de motilidad | 103 |
| Tabla 20. Influencia de los parámetros corporales en los parámetros cinéticos objetivos obtenidos mediante análisis por CASA tras la descongelación de las muestras de epidídimo | 103 |
| Tabla 21. Valores medios de los porcentajes de MI, NAR, ENDO y NEV para los grupos de “buenos” y “malos congeladores | 125 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Retirada de las envolturas testiculares. | 18 |
| Figura 2. Placa de Petri con solución tampón fosfato salino (PBS). | 19 |
| Figura 3. Tubo colector graduado para medir el volumen. | 20 |
| Figura 4. Cámara de Bürker para medida de la concentración espermática. | 21 |
| Figura 5. Segmentación de la imagen según intensidad de grises. | 24 |
| Figura 6. Identificación de las trayectorias individuales de los espermatozoides. | 25 |
| Figura 7. Representación gráfica de VCL, VSL y VAP para cada espermatozoide. | 25 |
| Figura 8. Informe emitido por CASA con los resultados de la muestra analizada. | 26 |
| Figura 9. Evaluación de la Viabilidad mediante tinción Eosina/Nigrosina. | 27 |
| Figura 10. Espermatozoides sometidos a la prueba de endósmosis. | 28 |
| Figura 11. Evaluación del estado del acrosoma. | 29 |
| Figura 12. Espermatozoides con gota citoplasmática en posición proximal (izquierda), y gota citoplasmática en posición distal (derecha) | 29 |
| Figura 13. Descongelación de pajuelas mediante inmersión en baño térmico. | 30 |
| Figura 14. Comparación de los valores medios y error estándar de la media para VCL, VSL, VAP, LIN y STR medidos en muestras epididimarias iniciales, tras la descongelación e incubadas. | 48 |
| Figura 15. Valores medios y errores estándar de la media de ALH y BCF medidos en muestras epididimarias iniciales, después de la descongelación e incubadas. | 49 |
| Figura 16. Fotografías mostrando la grasa que recubre los riñones. | 86 |
| Figura 17. Medias \pm sem de los valores medios de VCL, VSL y VAP evaluados en meses diferentes. | 89 |
| Figura 18. Medias \pm sem de los valores medios de LIN y STR evaluados en meses diferentes. | 90 |
| Figura 19. Medias \pm sem de los valores medios de ALH y BCF evaluados en meses diferentes | 90 |

| | |
|---|-----|
| Figura 20. Medias \pm SEM para los valores medios de VCL, VSL y VAP en muestras espermáticas epididimarias descongeladas según meses. | 92 |
| Figura 21. Medias \pm SEM para los valores medios de LIN y STR en muestras espermáticas epididimarias descongeladas según meses. | 92 |
| Figura 22. Medias \pm SEM para los valores medios de ALH y BCF en espermatozoides epididimarios descongelados según meses. | 92 |
| Figura 23 Valores medios y error medio estándar de las velocidades objetivas VCL, VSL y VAP para las edades estudiadas. | 94 |
| Figura 24. Valores medios y error medio estándar de LIN, y STR en las edades estudiadas | 94 |
| Figura 25. Valores medios y error estándar de la media de ALH y BCF en las edades estudiadas | 94 |
| Figura 26. Distribución de valores de los parámetros objetivos de motilidad para los distintos grupos de edad. | 96 |
| Figura 27. Valores medios y error estándar de la media para VCL, VSL y VAP a las distintas edades después de la descongelación de las muestras epididimarias. | 97 |
| Figura 28. Valores medios y error estándar de la media para LIN y STR por edades después de la descongelación de las muestras epididimarias. | 97 |
| Figura 29. Valores medios y error estándar de la media de ALH y BCF de las muestras epididimarias descongeladas para las distintas edades. | 98 |
| Figura 30. Distribución de los valores de los parámetros objetivos de motilidad tras la descongelación para los distintos grupos de edad. | 99 |
| Figura 31. Valores medios \pm error estándar de la media de las velocidades curvilínea, de la trayectoria media, y lineal, en función de la resistencia a la criopreservación de los espermatozoides. | 126 |
| Figura 32. Valores medios \pm error estándar de la media de los índices de linealidad y rectitud en función de la resistencia de los espermatozoides a la criopreservación. | 126 |
| Figura 33. - Valores medios \pm error estándar de la media del desplazamiento angular de la cabeza y de la frecuencia de batido en función de la resistencia de los espermatozoides a la criopreservación. | 126 |

RESUMEN

El análisis de motilidad espermática es una de las pruebas más utilizadas en la valoración de la calidad seminal. Al hablar de motilidad se están considerando dos conceptos distintos, por un lado la motilidad lineal activa y por otro el porcentaje de espermatozoides móviles, y aunque estas medidas pueden definir en general la motilidad espermática, tienen el inconveniente de que la fiabilidad y la precisión de los análisis, están de alguna manera limitadas por el grado de destreza del observador y por las condiciones de medida.

Por lo tanto, la valoración subjetiva realizada con los análisis de calidad rutinarios puede estar sesgada por los técnicos, especialmente las determinaciones de motilidad, pues siendo muy susceptibles al error humano, llevan a obtener distintos grados de imprecisión. Si además se tienen en cuenta las limitaciones intrínsecas del propio proceso de evaluación de la motilidad en el microscopio óptico y, que son muchos los espermatozoides que atraviesan el campo óptico con diferentes patrones de motilidad, lo más probable es que exista una variabilidad considerable, lo que repercute directamente en la objetividad de la estimación. Además, con la valoración subjetiva de la motilidad, no es posible conocer algunos aspectos muy importantes de la misma como son la velocidad real del espermatozoide o su tipo de movimiento y trayectoria.

Aun así, en la mayoría de los trabajos es habitual realizar la evaluación de la calidad del movimiento y del porcentaje de motilidad mediante un análisis visual bajo el microscopio, habiéndose observado ciertos problemas al comparar los resultados de estas evaluaciones rutinarias con las tasas de fertilidad obtenidas mediante inseminación artificial. Esto ha puesto de manifiesto la necesidad de disponer de técnicas fiables de valoración que permitan predecir el estado de los espermatozoides y su relación con la capacidad fecundante. Así, y para intentar solucionar estos problemas, diversos laboratorios han desarrollado desde hace algunos años sistemas de evaluación objetivos de la motilidad,

destacando entre ellos los sistemas de análisis de imagen por ordenador. Estas técnicas computerizadas de imágenes, como es la tecnología CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*), son capaces de emitir informes con un número elevado de las características de motilidad de los espermatozoides individuales, además de generar las medidas con mucha más rapidez, minimizando una gran parte del factor subjetivo de los análisis rutinarios de semen y garantizando una mejor correlación con la capacidad fecundante de los espermatozoides. Asimismo, permiten acumular datos de las relaciones entre la motilidad espermática y su competencia funcional.

Dadas las numerosas ventajas descritas para esta tecnología, el laboratorio de Biología de la Reproducción de la Universidad de Castilla la Mancha incorporó a sus estudios la evaluación de los parámetros de motilidad mediante un analizador computerizado de la motilidad espermática o sistema CASA, lo que ha permitido el estudio de los parámetros objetivos de motilidad de los espermatozoides epididimarios de ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*) obtenidos post mortem llevado a cabo en esta tesis, disponiendo para ello de material seminal procedente de los epidídimos de ciervos ibéricos abatidos en su hábitat natural durante los meses de octubre a febrero en 13 fincas de caza.

Respecto a la metodología seguida, la extracción de los espermatozoides se realizó a temperatura ambiente después de separar todas las envolturas testiculares que recubren al testículo y al epidídimo realizando una serie de incisiones sobre la cola del epidídimo para arrastrar el material espermático y depositarlo en una placa de Petri. El contenido espermático de ambos testículos se diluyó y se trasvasó a un tubo colector para medir el volumen y la concentración, separando una parte para su congelación y reservando el resto para realizar la evaluación de la calidad seminal inicial.

Para determinar las medidas objetivas de los parámetros de motilidad espermática, se utilizó el *software* del sistema automatizado *Sperm Class Analyzer* a partir de una gota de suspensión espermática depositada en un portaobjetos. Se capturaron las imágenes mediante una cámara de vídeo conectada a un ordenador evitando la captura de imágenes de muestras que presentaban un porcentaje muy alto de espermatozoides estáticos, o que se encontraban muy sucias. El programa proporcionó los valores de todos los parámetros cinéticos y emitió los informes correspondientes a cada una de las muestras analizadas.

El primer objetivo de esta tesis se ha orientado a la mejora del conocimiento de las características de motilidad de los espermatozoides de ciervo ibérico obtenidos post mortem, así como a su relación con la calidad espermática evaluada inicialmente, con el fin de aplicar estos conocimientos a las técnicas de reproducción asistida, especialmente a la inseminación artificial (IA). Para ello, se caracterizaron los parámetros objetivos de motilidad para las muestras espermáticas recién obtenidas, para esas mismas muestras después de haber sido sometidas a un proceso de criopreservación, y por último después de un período de incubación de 2 horas a 37°C.

Para el segundo objetivo, se estudió otro aspecto que podría resultar interesante y que aun no ha sido estudiado en ciervo. Se compararon los resultados obtenidos en la evaluación rutinaria de calidad espermática a partir de la estimación visual por el microscopio, con los parámetros objetivos de motilidad obtenidos mediante el análisis CASA, comprobándose que la mayoría de los parámetros objetivos de motilidad están relacionados con el porcentaje total de espermatozoides móviles (MI), siendo el parámetro más afectado por el proceso de congelación-descongelación la funcionalidad de la membrana plasmática (ENDO).

Como tercer objetivo de esta tesis, se estudió la influencia de las características intrínsecas y extrínsecas al macho, sobre los parámetros objetivos de motilidad, observándose la existencia de diferencias significativas entre meses para la mayoría de los parámetros estudiados, especialmente para los índices LIN y STR. Como era de esperar, las muestras presentaron una calidad mayor en los meses de la época reproductiva de fotoperíodo decreciente, tanto en muestras recién obtenidas como descongeladas, lo que hace pensar en la conveniencia de criopreservar las muestras recogidas durante los primeros meses de la época reproductiva.

En cuanto a la influencia de los parámetros corporales de los ciervos sobre los parámetros objetivos de motilidad de los espermatozoides, las características corporales influyeron en las variables respuesta en la mayoría de los casos, habiéndose observado en esta tesis, que el perímetro torácico del animal afecta negativamente a los valores objetivos de los índices

de linealidad (LIN) y rectitud (STR), y por tanto los ciervos con mayor peso corporal presentan una menor progresividad de sus espermatozoides.

Los mayores valores para los parámetros de velocidad correspondieron a la velocidad curvilínea (VCL), seguida de las velocidades media (VAP) y lineal (VSL), presentando además diferencias muy significativas ($p < 0,001$) entre las muestras epididimarias recién obtenidas y las descongeladas. Destacar que tras el proceso de congelación-descongelación, se observó un aumento de los valores de los parámetros de motilidad de los espermatozoides, no ocurriendo lo mismo tras el período de incubación de las muestras durante dos horas a 37°C , pues en este caso se observó una pérdida de la calidad del movimiento por el descenso de todos los parámetros cinéticos estudiados.

Por último, el cuarto objetivo de esta tesis se orientó al estudio de la importancia del análisis de los parámetros objetivos de motilidad en la selección de las muestras que podrían presentar una mejor resistencia a la congelación, lo que permitiría obtener unos mejores resultados en inseminación artificial (IA). Para ello, se usó el sistema *Sperm-Class Analyzer*® (CASA) con el fin de averiguar si el análisis objetivo de los parámetros cinéticos permitía discriminar entre los machos clasificados según la calidad inicial de las muestras espermáticas como “buenos” o “malos” congeladores. Los resultados indicaron que los valores de las velocidades fueron mayores para los “buenos congeladores”, al igual que los valores del desplazamiento lateral de la cabeza y de la frecuencia de batido. No obstante, de todos los valores de motilidad estudiados mediante el análisis objetivo CASA, sólo la velocidad curvilínea (VCL) mostró diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,005$) entre los grupos de “buenos” y “malos” congeladores.

De lo anteriormente expuesto destacar que el análisis mediante CASA permite seleccionar las muestras que podrían presentar una mayor resistencia a la congelación, pues ha permitido discriminar entre machos “buenos” y “malos” congeladores. Además ha mostrado que la calidad de las muestras espermáticas es mayor durante los meses de fotoperíodo decreciente, lo que hace pensar en la conveniencia de criopreservar las muestras en los primeros meses de la época reproductiva.

INTRODUCCIÓN

La especie *Cervus elaphus*, Linnaeus 1758, cuya área de distribución abarca Europa, Asia y el Norte de África, se divide taxonómicamente en trece subespecies. El ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*; Hilzheimer 1909) solamente se encuentra en la Península Ibérica, lo que le confiere un interés especial desde el punto de vista de la conservación (Garde, 2006). La época de mayor intensidad reproductiva del ciervo ibérico se produce a comienzos de otoño, durante la última semana de septiembre y las dos primeras de octubre. Esta época se denomina berrea, momento en el que se produce el pico de actividad sexual, caracterizada porque los machos emiten bramidos para llamar la atención de las hembras y para desafiar a otros machos competidores, como paso previo a los combates (Soler, 2003; Estes, 2006).

La cría del venado en nuestro país está orientada al desarrollo de actividades cinegéticas fundamentadas en la calidad de los trofeos de los machos, desarrollándose normalmente en libertad dentro de cotos delimitados por vallados perimetrales. Esta práctica supone una fragmentación de la población original en poblaciones aisladas, lo que ha originado una interrupción del flujo genético que lleva a un incremento de las tasas de endogamia (Martínez *et al.* 2002; Soler, 2003), existiendo una correlación negativa entre los niveles de endogamia y características del semen como la motilidad espermática, la morfología o la integridad acrosómica (Roldán *et al.*, 1998, 2006; Gomendio *et al.*, 2000). Además, las altas tasas de endogamia podrían ser, al menos parcialmente, las responsables de la disminución de la calidad de los trofeos (Estes, 2006).

La caza realizada en este tipo de cotos, y muy particularmente la referida a las especies cinegéticas mayores, ha llegado a ser una actividad empresarial rentable y una fuente de recursos de especial importancia en muchas zonas rurales en las que supone un factor de desarrollo de su economía (Garde *et al.*, 2006). Esto ha llevado asociado un comercio importante de animales para repoblaciones procedentes de granjas especializadas (Giraldo y Tovar, 2002), explotaciones de cría controlada, cotos comerciales, capturaderos, etc.; por lo que este tipo de cría en granjas cinegéticas podría considerarse como una producción

ganadera alternativa para la producción de animales de gran calidad de trofeo que se liberarían en los cotos para la caza. Es sobre esta población de ciervos criados en semilibertad sobre la que se aplicarían las distintas técnicas de reproducción asistida orientadas a la mejora de los trofeos (Garde, 2006).

El empleo biotecnologías reproductivas en poblaciones naturales de ciervos había presentado un escaso desarrollo, pero en los últimos años el interés por el empleo de estas técnicas para la conservación y gestión de poblaciones naturales de ciervos, como es el caso del ciervo ibérico, se ha incrementado notablemente (Jabbour y Bainbridge, 1997) y se han realizado importantes progresos, lo que ha ocasionado que la aplicación práctica de estas tecnologías esté avanzando a buen ritmo (Garde, 2006).

En los cérvidos, de todas las técnicas de Reproducción Asistida (TRA) existentes, unas de las más difundidas han sido la Inseminación Artificial (IA) y la Fecundación *in vitro* (FIV). La IA ha sido aplicada con éxito en distintas especies de ciervos, entre las que destacamos el ciervo rojo, el reno, el gamo, y el ciervo del Padre David (Asher *et al.* 2000); pero no hay que olvidar que el desarrollo de un programa de IA en condiciones óptimas exige el conocimiento de la fisiología reproductiva de la subespecie, así como el desarrollo de una metodología adecuada de obtención-conservación de semen y de aplicación de las técnicas de IA propiamente dichas (Garde, 2006). Por este motivo, la criopreservación de los espermatozoides combinada con la IA, ha sido el método de TRA más extendido entre las especies de cérvidos, especialmente en el ciervo ibérico (Asher *et al.*, 2000).

En la primera parte de esta tesis y sabiendo que la determinación subjetiva de la motilidad espermática por sí misma no parece ser muy útil en el análisis de calidad del semen, el estudio se ha centrado en la caracterización de los parámetros objetivos de motilidad obtenidos mediante un sistema de análisis objetivo computerizado de semen (CASA). El uso de este sistema puede solucionar en parte el problema de la subjetividad al proporcionar un análisis seguro y objetivo para determinar las características de motilidad de la muestra (Mortimer, 2002), por lo que actualmente se dedica más atención a la evaluación objetiva y a la caracterización de la motilidad espermática, que a la simple determinación del índice de espermatozoides móviles totales, ya que la tecnología CASA proporciona valores de concentración y motilidad espermática más rápidamente y con mayor

precisión que los obtenidos con métodos tradicionales de evaluación seminal (Cseh, *et al*, 2003).

Además, la tecnología CASA presenta otras ventajas, una de ellas es que permite la reevaluación objetiva de muchos aspectos de los protocolos de criopreservación tales como la elección del mejor diluyente para conseguir una mayor supervivencia espermática a la descongelación. Si a las ventajas que presenta el análisis mediante CASA, se suma la aplicación de los análisis estadísticos apropiados, puede estudiarse la presencia de subpoblaciones diferentes de espermatozoides en una muestra de semen, en función de las características de motilidad presentadas por sus espermatozoides (Davis *et al.*, 1995b; Abaigar *et al.*, 1999; 2001; Quintero- Moreno *et al.*, 2002; 2003; Cremades *et al.*, 2005; Martínez-Pastor *et al.*, 2005a,c, 2010; Ramón *et al.*, 2012).

Aunque la congelación del material espermático en las distintas especies de ciervos se viene realizando desde hace bastantes años (Asher *et al.* 2000), antes de establecer un protocolo de congelación, es necesario conocer qué factores influyen en la supervivencia espermática después de la misma, por lo que en los últimos años se han estudiado una serie de mejoras en el protocolo de criopreservación de las muestras espermáticas epididimarias de ciervo ibérico (Fernández-Santos *et al.*, 2006a,b,c, 2007, 2009; Martínez-Pastor, 2009; Anel *et al.*, 2012). Sin embargo, existen otros factores que influyen en la resistencia de los espermatozoides a la congelación que no han sido estudiados. Por ello, además de mejorar el conocimiento de las características de motilidad de los espermatozoides, en este trabajo se ha planteado estudiar qué características del animal influyen en el comportamiento de los espermatozoides durante la congelación, cómo afectan factores como la edad y los parámetros corporales de los animales en la congelabilidad espermática y qué meses, del año son los adecuados para recoger las muestras espermáticas; pero sobre todo se ha puesto especial interés en ver cómo afecta el proceso de congelación-descongelación a la motilidad de los espermatozoides epididimarios de ciervo ibérico y qué parámetros objetivos de motilidad podrían darnos información sobre su resistencia a la congelación.

Esto supone no sólo que la recogida de muestras, transporte, procesado, criopreservación y aplicación sean los adecuados, sino también poder discriminar entre aquellas muestras aptas para utilizar en IA y aquellas cuya conservación no merece el gasto de recursos. Por

lo tanto, es importante que tras el análisis de las muestras espermáticas, pueda establecerse la potencialidad de la muestra en cuanto a fertilidad y capacidad de resistir el proceso de criopreservación.

En este sentido, en varias especies tanto domésticas (Curry, 2000), como silvestres (Leibo y Songsasen, 2002), se han observado diferencias entre individuos en la resistencia de sus espermatozoides al proceso de congelación-descongelación, y en el caso del ciervo ibérico también se han observado estas diferencias en los espermatozoides de epidídimo (Soler *et al.* 2003a; Estes *et al.*, 2006) así como en la fertilidad resultante de la inseminación artificial con su semen descongelado (Malo *et al.* 2005b; Gomendio *et al.* 2006a). Estos hechos han permitido clasificar a los donantes de semen de forma rutinaria como “buenos” o “malos” congeladores. Se desconocen los mecanismos que clasifican a los individuos según la sensibilidad a la congelación de sus espermatozoides, pero parecen existir diferencias fisiológicas entre los espermatozoides de diferentes machos dentro de una misma especie. Por lo tanto, las diferencias en el semen fresco que afectan a la resistencia a la congelación, podrían ser indicativas de las variaciones genéticas responsables de la capacidad de los espermatozoides a resistir los procesos de congelación (Garde, 2006).

Sin embargo, en el caso concreto de España es difícil conocer las diferencias entre venados en cuanto a la resistencia de sus espermatozoides a la criopreservación, ya que las muestras espermáticas obtenidas proceden de epidídimo. Además, tampoco hay información sobre las características que afectan a los parámetros de motilidad de sus espermatozoides frente al proceso de congelación. Por ello, otro de los objetivos de este estudio ha sido la evaluación de la influencia de determinados factores extrínsecos e intrínsecos al macho, sobre los parámetros de motilidad analizados mediante CASA antes y después de la congelación.

Por todo lo expuesto, en este trabajo se han estudiado qué factores influyen en la resistencia de los espermatozoides de epidídimo de ciervo ibérico a la congelación, así como el efecto de la criopreservación sobre los parámetros objetivos de motilidad obtenidos mediante la utilización la tecnología CASA y la comprobación del valor predictivo de los mismos respecto a la resistencia a la congelación.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Esta tesis doctoral se ha realizado con espermatozoides obtenidos del epidídimo de ciervo Ibérico obtenidos post-mortem, y los objetivos planteados han sido los siguientes:

- Caracterizar los parámetros objetivos de motilidad en espermatozoides epididimarios de ciervo Ibérico.
- Evaluar las eventuales relaciones entre el análisis convencional de la calidad seminal y la evaluación de la motilidad por CASA.
- Evaluar la influencia de los factores extrínsecos e intrínsecos al macho sobre los parámetros de motilidad en muestras frescas y descongeladas.
- Determinar el valor predictivo de la congelabilidad a partir de la determinación de los parámetros objetivos de motilidad por el sistema CASA

1. MATERIAL Y MÉTODOS

1.1. GAMETOS

Como material seminal se utilizaron los espermatozoides procedentes de epidídimos de los testículos de 195 ciervos ibéricos (*Cervus elaphus hispanicus*). Los animales fueron abatidos en su hábitat natural durante los meses de octubre a febrero de las temporadas de caza de 1999/00 y 2000/01 en diferentes fincas de caza (n=13) ubicadas en las provincias de Badajoz, Ciudad Real, Córdoba, Jaén y Toledo. En esta zona, la estación reproductiva comienza a finales de septiembre, prolongándose durante tres meses, de octubre a diciembre (Caballero, 1985; Sanz y Rodríguez, 1993; García *et al.*, 2002; Estes *et al.*, 2006). La edad de los venados osciló entre 2 y 15 años, estando el 81% de los animales en el rango de edades comprendido entre 3 y 10 años.

Los animales fueron abatidos según el plan de aprovechamiento cinegético de los cotos de caza referidos, de acuerdo con la Regulación de Aprovechamientos Española, Ley 2/93 de Castilla la Mancha, y conforme a la regulación de la Unión Europea. Para obtener los testículos, las gónadas fueron separadas del cuerpo de los animales por medio de una incisión realizada a nivel inguinal. Una vez separados, los testículos se transportaron envueltos en el escroto en el interior de bolsas de plástico a temperatura ambiente, hasta el laboratorio de Reproducción Animal de la ETSIA de Albacete. El intervalo de tiempo transcurrido entre la recogida de los testículos y la llegada al laboratorio osciló entre 3 y 6 horas, un intervalo de tiempo adecuado para evaluar las características espermáticas con anterioridad a las 12 h posteriores de la muerte del animal (Soler y Garde, 2003).

Figura 1. Retirada de las envolturas testiculares.



La extracción de los espermatozoides (Figura 1) se realizó en el laboratorio a temperatura ambiente. Para ello, se separaron mediante material quirúrgico todas las envolturas testiculares que recubren al testículo y al epidídimo. Dichas estructuras, partiendo desde fuera hacia dentro son las siguientes:

- Piel y tejido subcutáneo
- Fascia espermática externa
- Cremastérica interna
- Túnica vaginal
- Túnica albugínea.

Posteriormente, se procedió a realizar diversas incisiones con una hoja de bisturí sobre la cola del epidídimo de acuerdo al procedimiento descrito por Soler *et al.* (2003a), arrastrando con esta misma hoja el material espermático para depositarlo en una placa de Petri en la que previamente se había 1 mL de solución tampón fosfato salino (PBS) (Figura 2). El contenido espermático de ambos testículos se diluyó en PBS, puesto que se ha demostrado que no existen diferencias de calidad seminal para ambos testículos (Garde *et al.*, 1998). Los espermatozoides recogidos de la cola del epidídimo son funcionalmente maduros y tiene una capacidad de fertilización similar a la de los espermatozoides de un eyaculado (Yanagimachi, 1988).

Tras la dilución en PBS, se transvasó la suspensión espermática a un tubo colector graduado midiéndose el volumen y la concentración. A continuación, se separaron 0,5 mL del tubo colector para utilizar en el proceso de congelación, reservando el resto para realizar la evaluación de la calidad seminal inicial.

Figura 2. Placa de Petri con solución tampón fosfato salino (PBS).



1.2. ANÁLISIS DE CALIDAD SEMINAL

Los parámetros utilizados para evaluar la calidad seminal fueron los que miden características relacionadas con la motilidad espermática (porcentaje de porcentaje de espermatozoides móviles, calidad del movimiento y análisis objetivo de motilidad), con la funcionalidad e integridad de la membrana plasmática (viabilidad espermática y pruebas de endósmosis celular), con el estado del acrosoma y finalmente con la morfología espermática. También se evaluaron características cuantitativas como el volumen y la concentración.

1.2.1. Volumen (V)

Para medir el volumen (V), se arrastró el material espermático desde la cola del epidídimo hasta una placa de Petri y se transvasó a un tubo graduado (sensibilidad de 0,1 mL) en el que se realizó una contrastación macroscópica (Figura 3), midiéndose el volumen por apreciación visual.

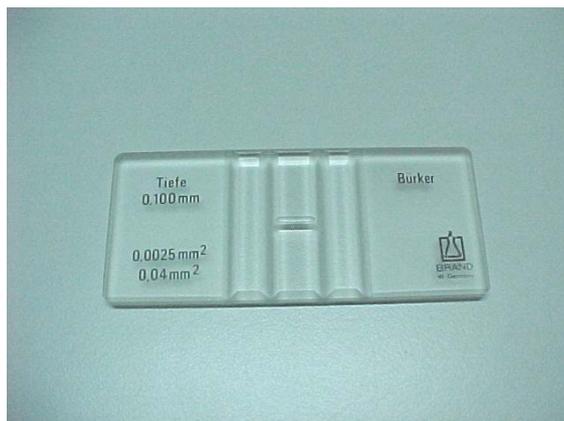
Figura 3. Tubo colector graduado para medir el volumen.



1.2.2. Concentración espermática (C)

La concentración espermática (C) se determinó mediante recuento utilizando una cámara de Bürker (Figura 4), para lo cual se siguieron las indicaciones de Evans y Maxwell (1989). Se diluyeron 5 μl de la suspensión espermática en 1000 μl de agua destilada para así provocar la muerte de los espermatozoides, mezclándose la muestra diluida homogéneamente para cargar con ella la cámara por capilaridad dejándola sedimentar durante 5 minutos antes de realizar el recuento. Se contó el número medio de espermatozoides presentes en 20 cuadrículas de la cámara y, teniendo en cuenta el volumen de la cuadrícula y la dilución utilizada, se obtuvo el número de espermatozoides por mililitro de suspensión espermática.

Figura 4. Cámara de Bürker para medida de la concentración espermática.



1.2.3. Número total de espermatozoides (NTE)

El número total de espermatozoides se obtuvo multiplicando el volumen medido, por la concentración espermática.

1.2.4. Motilidad espermática

1.2.4.1. Porcentaje de espermatozoides móviles y calidad de movimiento

Se utilizaron 20 μ l de la suspensión espermática inicial (suspensión I) que se diluyeron en 500 μ l de PBS, y esta nueva suspensión (suspensión II) se incubó durante 10 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se evaluó el porcentaje de espermatozoides móviles (MI), colocando 5 μ l de la suspensión II en un portaobjetos sobre una placa térmica (Minitub, HT 400) a 37°C, para evitar de este modo cambios de temperatura que pudieran afectar a la motilidad espermática, observando diferentes campos en un microscopio óptico (Nikon, Eclipse 400) a 10x en contraste de fases. Sobre la misma muestra se evaluó la calidad del movimiento (CM) en una escala de 0 (acinesis) a 5 (movimiento muy rápido).

1.2.4.2. Análisis objetivo de motilidad

Para obtener las medidas objetivas de los parámetros de motilidad espermática, se efectuó el análisis de motilidad utilizando el *software* del sistema automatizado *Sperm Class Analyzer V5.1* (CASA: Microptic, S.L., Barcelona, España). Para ello, después de diluir las muestras se depositaron con pipeta automática 5 μ l de la suspensión espermática en un portaobjetos precalentado sobre la placa térmica, y se visualizaron al microscopio de contraste de fases con el objetivo de 20x.

El sistema CASA contó con los siguientes elementos interconectados: microscopio de contraste de fases (Nikon, Labophot-2, Tokio, Japón) con platina termorregulable conectado a una placa térmica (Minitub, HT 400) graduada a 37°C sobre la que se atemperaron los portaobjetos utilizados como soporte de la muestra a analizar. Tras depositar una muestra de 5 μ l de semen diluido por medio de una pipeta automática, se procedió a la captura o adquisición de imágenes por el sistema CASA, mediante una cámara de vídeo en blanco y negro (CCD AVC-D7CE, Sony Corporation, Tokio, Japón) colocada sobre la platina del microscopio. La platina estaba conectada al microscopio y a un ordenador (Pentium con procesador 950 MHz) dotado con el programa informático CASA 5.1. La digitalización se realizó mediante una tarjeta Matrox Meteor II, de 512x512x8 bits (Matrox Electronic Systems Ltd., Québec, Canadá) y 256 niveles de gris.

El semen se diluyó en PBS hasta alcanzar una concentración aproximada de 20×10^6 espermatozoides/mL con el fin de conseguir campos con un número de espermatozoides comprendido entre 30–50 en el monitor. Las muestras se mantuvieron a temperatura de laboratorio (20-22°C) durante los momentos previos al análisis, siendo el tiempo transcurrido entre la colocación de la microgota y la grabación por el sistema CASA similar en todos los análisis (5-10 segundos). La frecuencia de captura de imágenes del equipo de análisis CASA utilizado en este trabajo ha sido de 25 Hz con un número de puntos de trayecto de 16.

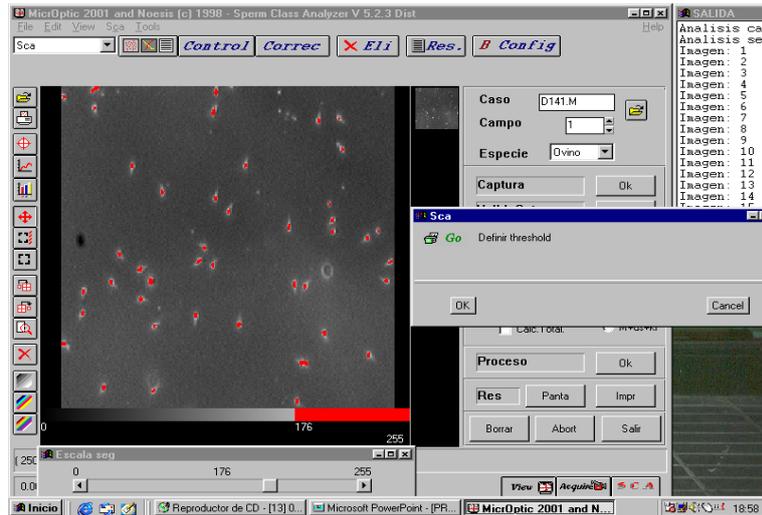
La grabación de los campos se efectuó entre las 6-10 horas *postmortem* para las muestras recién obtenidas, evitando la captura de imágenes de muestras que presentaran un

porcentaje muy alto de espermatozoides estáticos, mucha suciedad u otros problemas de este tipo que pudieran dificultar el análisis y originar imprecisiones en los resultados. Se capturaron entre 3 y 5 campos diferentes de cada muestra, utilizando un objetivo de 20x (contraste de fase negativo) hasta capturar un número aproximado de 100 espermatozoides por análisis.

Tras realizar unas valoraciones previas en las condiciones de trabajo, se estableció la configuración más adecuada (Tabla 1), se estandarizaron las condiciones de iluminación y la posición del condensador para cada proceso de captura. Para el procesado de la muestra se seleccionó la opción “partículas” del programa para limpiar las pequeñas partículas que pudieran existir en la imagen. También se seleccionó la opción “multicruces” que analiza las trayectorias cruzadas entre espermatozoides y la opción “conectividad” para evitar la rotura de las trayectorias.

Tabla 1. Configuración del sistema de análisis objetivo de motilidad utilizado

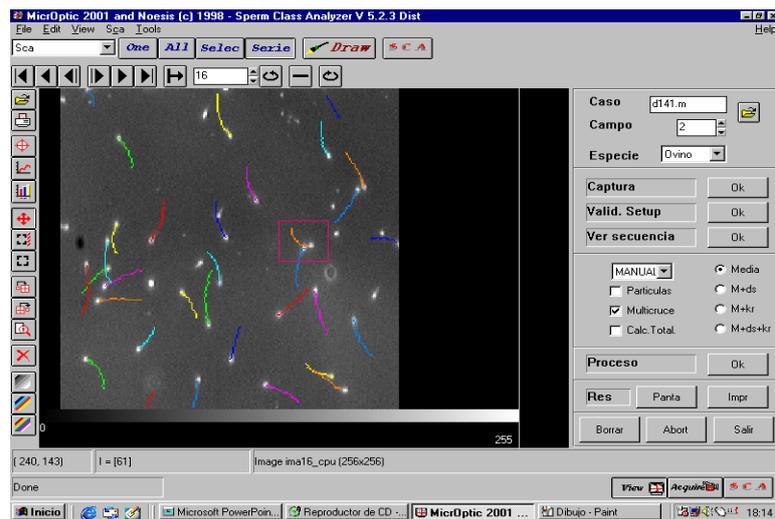
| PARÁMETROS | |
|--|---------------|
| Frames/segundo: imágenes capturadas en un segundo | 25 |
| Número de Frames: imágenes grabadas | 16 |
| Límite LLV ($\mu\text{m/s}$): velocidad máxima que presenta un espermatozoide lento | 10 |
| Límite MVV ($\mu\text{m/s}$): velocidad máxima de un espermatozoide medio | 89 |
| STR mín (%): valor utilizado para definir los espermatozoides rápidos progres. | 90 |
| Frames mínimo (ALH): nº de imágenes mínimo para que se calcule el ALH | 7 |
| Contraste de fases utilizado para grabar las imágenes | Negativo (NH) |
| Aumentos | 20x |

Figura 5. Segmentación de la imagen según intensidad de grises.

A continuación, se seleccionó manualmente el nivel de segmentación de las cabezas de los espermatozoides según su intensidad de gris, ya que el sistema es capaz de transformar una imagen con una determinada distribución de niveles de grises (de 0 a 255), en otra binaria con valores 0 y 1. La selección se realizó de forma manual sobre la primera imagen de cada campo, eligiendo el nivel de gris correspondiente a los espermatozoides (Figura 5). Se procuró seleccionar un rango lo suficientemente amplio de manera que se evitaran pérdidas de trayectorias debidas a cambios de intensidad en las sucesivas imágenes de la secuencia. El sistema CASA capturó 16 imágenes consecutivas en un tiempo de grabación que osciló entre 0,59 y 0,66 segundos, procediéndose después al análisis de las mismas.

Una vez finalizado el proceso de análisis, el *software* del sistema efectuó automáticamente la identificación de cruces, detectándose por el *software* del sistema la trayectoria de cada espermatozoide de forma automática. Posteriormente se visualizó el conjunto de trayectorias analizadas por cada campo mediante las funciones “control” y “dibujo”, con el fin de visualizar la trayectoria definida por el programa, y comprobar que se adecuaba a la trayectoria real de cada uno de los espermatozoides (Figura 6), eliminando de forma manual las trayectorias erróneas de cada uno de los campos.

Figura 6. Identificación de las trayectorias individuales de los espermatozoides.



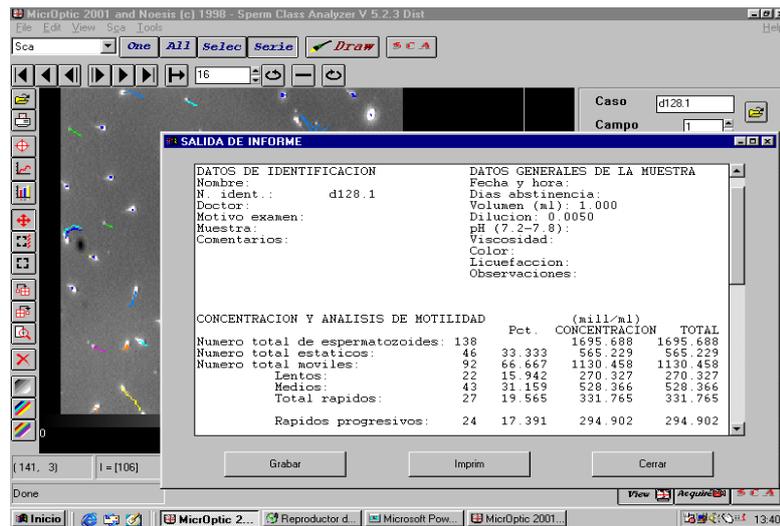
Cuando existían dudas acerca de la exactitud de alguna de las trayectorias, el programa también permitía visualizar la trayectoria individual de los espermatozoides implicados, realizando una representación gráfica de las velocidades circular, lineal y de la trayectoria media de cada uno de ellos (Figura 7).

Figura 7. Representación gráfica de VCL, VSL y VAP para cada espermatozoide.



Para terminar, el programa realizó los cálculos a partir de la información de las series grabadas y los de los valores medios del conjunto de todas las series sobre las imágenes binarias, proporcionando los valores correspondientes a cada uno de los parámetros cinéticos y emitiendo el informe correspondiente a cada una de las muestras analizadas (Figura 8).

Figura 8. Informe emitido por CASA con los resultados de la muestra analizada.



Los principales parámetros de motilidad espermática calculados a partir de la trayectoria descrita por los espermatozoides, son los detallados a continuación:

- Los parámetros reales absolutos que reflejan las características físicas de la célula en movimiento: velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad de la trayectoria media (VAP), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batido (BCF).
- Los parámetros relativos o derivados, que son combinaciones de los parámetros absolutos y reflejan el modelo de motilidad del espermatozoide: Linealidad (LIN) y rectitud (STR).

Finalizado el análisis y obtenidos los resultados, se visualizaron las secuencias de movimiento y las trayectorias descritas por los espermatozoides, pudiéndose comprobar que el análisis se había realizado correctamente.

1.2.5. Integridad y funcionalidad de la membrana plasmática

1.2.5.1. Viabilidad espermática

Para obtener los datos de viabilidad de los espermatozoides se partió de la suspensión II (20 μ l de la suspensión espermática inicial diluida en 500 μ l de PBS) evaluando la integridad de la membrana plasmática mediante una tinción con eosina-nigrosina preparada según el método descrito por Tamuli y Watson (1994).

Figura 9. Evaluación de la Viabilidad mediante tinción Eosina/Nigrosina.



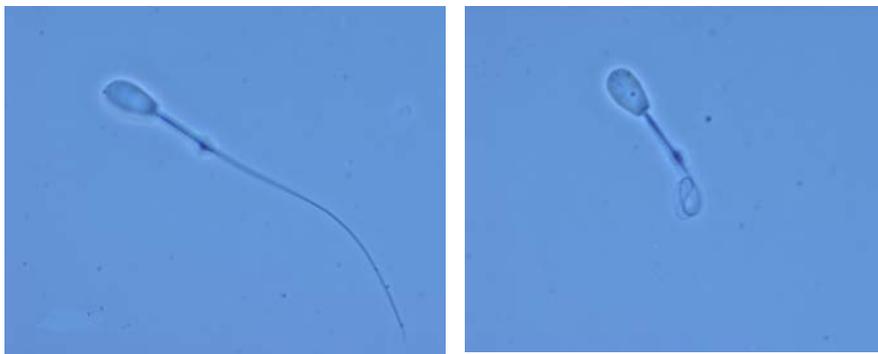
Para ello, se mezclaron 5 μ l de la suspensión II con 10 μ l de eosina-nigrosina en un portaobjetos a una temperatura de 37°C. Tras dejar incubar la muestra durante 30 segundos, se realizó un frotis que se dejó secar sobre la placa térmica. Posteriormente se observaron los frotis en el microscopio óptico a campo claro a 40x (Nikon, Eclipse 400), contándose 100 células espermáticas y determinándose el porcentaje de espermatozoides vivos (EV), que son aquellos que aparecen de color blanco por tener la membrana plasmática íntegra (Figura 9).

Por otra parte, las células que fueron incapaces de excluir la tinción de eosina-nigrosina, y que aparecieron teñidas de color rosáceo, no tenían la membrana íntegra y se consideraron como células muertas.

1.2.5.2. Prueba de endósmosis celular

Para realizar la evaluación de la funcionalidad de la membrana plasmática, se empleó la técnica descrita por Garde *et al.* (1998) para espermatozoides de ciervo. Para ello, se diluyeron 20 μl de la de suspensión espermática inicial en 200 μl de solución hipoosmótica a una presión osmótica de 100mOsm/Kg, manteniéndose a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se fijaron con una solución tampón con un 2% de glutaraldehído, en 0,165 M de cacodilato de sodio/HCl. Las muestras se evaluaron en microscopio óptico en contraste de fases a 40x (Nikon, Eclipse 400), efectuando un conteo de 100 células espermáticas para determinar el porcentaje de espermatozoides que presentaban un enrollamiento en la cola (ENDO) (Figura 10).

Figura 10. Espermatozoides sometidos a la prueba de endósmosis.



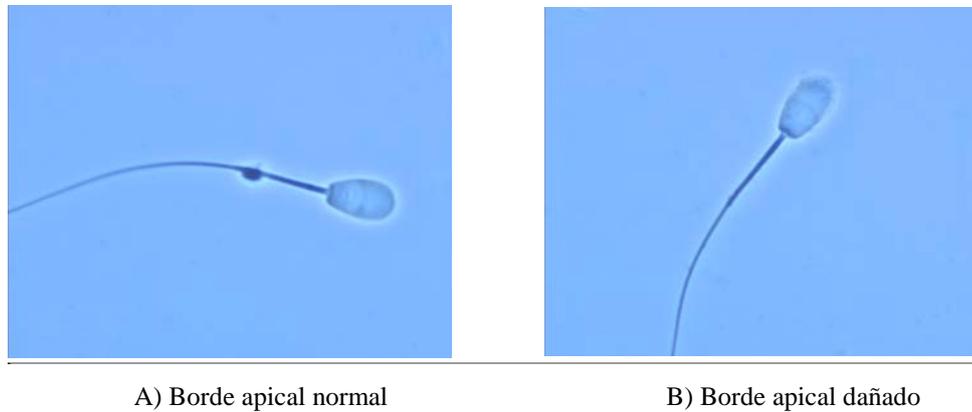
El enrollamiento de la cola es indicativo de funcionalidad de la membrana plasmática, puesto que como consecuencia del intento que realiza la célula espermática de equilibrar la presión osmótica entre los medios intra y extracelular, se produce el paso de agua a través de la membrana desde el medio extracelular hacia el interior del espermatozoide, provocando un aumento del volumen y, por tanto, un enrollamiento del flagelo (Drevius y Eriksson, 1966).

1.2.6. Estado del acrosoma

La metodología seguida para conocer el grado de integridad de la membrana del acrosoma comenzó con la dilución 5 μl de la suspensión espermática inicial en 250 μl de la solución fijadora tampón con 2% de glutaraldehído en 0,165 M de cacodilato de sodio, observándose y contándose posteriormente 100 células espermáticas en el microscopio

óptico en contraste de fases a 40x (Nikon, Eclipse 400). A partir de los resultados del conteo, se determinó el porcentaje de espermatozoides con borde apical normal (NAR), que fueron los considerados como espermatozoides con el acrosoma intacto (figura 11).

Figura 11. Evaluación del estado del acrosoma.



1.2.7. Morfología espermática

El análisis de morfología espermática se realizó sobre las mismas muestras utilizadas para valorar el estado del acrosoma. Las muestras se observaron en el microscopio óptico en contraste de fases a 40x (Nikon, Eclipse 400), determinando a partir de los resultados del conteo el porcentaje de espermatozoides normales sin gota citoplasmática (SG), el porcentaje de los que mostraban gota citoplasmática en posición proximal (GP), y gota citoplasmática en posición distal (GD) (Figura 12). Para ello se observaron y contaron 100 células espermáticas.

Figura 12. Espermatozoides con gota citoplasmática en posición proximal (izquierda), y gota citoplasmática en posición distal (derecha).

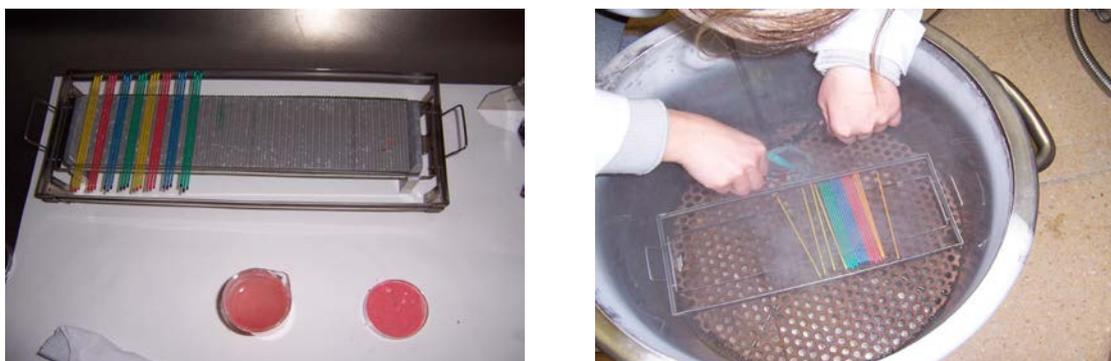


1.3. CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN

Para la criopreservación del material seminal se tomaron 0,5 mL de la suspensión inicial. El diluyente comercial utilizado fue Triladyl® con un 20% de yema de huevo, siguiéndose las recomendaciones hechas por el fabricante para la congelación de semen de bovino y de ovino. El diluyente se mezcló con la suspensión espermática inicial a temperatura ambiente, y en un solo paso se adicionó el volumen suficiente para que las pajuelas quedasen a una concentración aproximada de 100 millones de espermatozoides. La velocidad de enfriamiento hasta 5°C fue de 0,25°C/min. Posteriormente y con el fin de equilibrar las muestras seminales, se mantuvieron a esta temperatura durante 2 horas, para una vez completado este tiempo de equilibración envasarlas en pajuelas de 0,25 mL a 5°C y congelarlas durante 10 minutos sobre vapores de nitrógeno líquido. Para ello, se colocaron horizontalmente sobre una gradilla a una altura de 5 cm sobre el nivel del nitrógeno. Por último, se sumergieron en nitrógeno líquido y permanecieron almacenadas durante un tiempo mínimo de 1 año antes de ser descongeladas.

El procedimiento seguido para descongelar las pajuelas, fue la inmersión en un baño térmico (Tectron 3000543) durante 20 segundos con ClNa al 8 ‰, y a una temperatura de 37°C. Se descongelaron 2 pajuelas por cada uno de los machos evaluados, tras lo cual se realizaron todas las pruebas de calidad seminal descritas anteriormente, con la excepción de la evaluación de morfología (Figura 13).

Figura 13. Descongelación de pajuelas mediante inmersión en baño térmico.



El análisis objetivo de los parámetros de motilidad tras la descongelación de las muestras epididimarias se realizó por medio del *software* del módulo de motilidad del analizador

SCA[®]. Para ello incubaciones incubó el material espermático descongelado en el diluyente de congelación durante 2 horas a 37°C.

2. EXPERIMENTOS

2.1. PARÁMETROS OBJETIVOS DE MOTILIDAD EN ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS DE CIERVO IBÉRICO

2.1.1. INTRODUCCIÓN

Un aspecto importante dentro de la espermatozoología moderna, es el empleo de técnicas de laboratorio capaces de determinar con éxito la calidad y la capacidad fecundante de las muestras espermáticas. El Grupo de Biología de la Reproducción de la Universidad de Castilla-La Mancha ha desarrollado y adaptado numerosas pruebas para la evaluación eficaz de las distintas funciones de los espermatozoides frescos y descongelados de ciervo (Esteso *et al.*, 2003, 2006; Fernández-Santos *et al.*, 2006 a,b,c, 2007, 2009; Garde *et al.*, 2006; Martínez-Pastor *et al.*, 2009; Domínguez-Rebolledo *et al.*, 2011; García-Álvarez *et al.*, 2011; Ramón *et al.*, 2012).

El desarrollo de la tecnología de digitalización de la imagen de vídeo, llevó a su aplicación en el análisis de la motilidad espermática (Liu y Warne, 1977; Katz y Overstreet, 1981; Davis y Katz, 1989). De este modo, mediante la tecnología CASA se han conseguido realizar evaluaciones objetivas de las muestras espermáticas que han permitido a los laboratorios obtener análisis cuyos resultados son útiles, objetivos, repetibles, seguros y rápidos (Davis y Katz, 1992; Gravance y Davis, 1995; Partika *et al.*, 2012; Mortimer y Mortimer, 2013), proporcionando un valor predictivo de la fertilidad más preciso que la evaluación rutinaria del semen (Farrell *et al.*, 1998; Malo *et al.*, 2005a; Gomendio y Roldán, 2008), cuya mayor desventaja es la variabilidad obtenida en los resultados que puede llegar a alcanzar diferencias del 30 al 60% para las mismas muestras de semen realizadas por diferentes observadores y laboratorios (Jørgensen *et al.*, 1997; Coetzee *et al.*, 1999).

En la mayoría de los trabajos en los que se ha utilizado el análisis objetivo de motilidad, entre un gran número de medidas proporcionadas por el sistema CASA, se han seleccionado los parámetros que han demostrado ser más útiles en la caracterización del movimiento de los espermatozoides o en la predicción de su capacidad fecundante. Estas medidas han sido las velocidades curvilínea (VCL), lineal (VSL), de la trayectoria media (VAP), los índices de rectitud (STR) y linealidad (LIN), la amplitud del desplazamiento

lateral de la cabeza (ALH), y la frecuencia de cruce de batido de la cabeza (BCF). Entre estos parámetros, los que describen mejor el vigor de los espermatozoides son VCL, ALH y BCF, y los indicadores de su progresividad VSL, LIN y STR.

Por otro lado, algunos autores han utilizado estos parámetros de movilidad determinados de forma objetiva como índices de criorresistencia (Fernades *et al.*, 1990; McLaughlin *et al.*, 1992; Domínguez-Rebolledo *et al.*, 2011; Ramón *et al.*, 2012)

La caracterización de las propiedades de la motilidad espermática es uno de los aspectos básicos del conocimiento de la fisiología reproductiva en el ciervo ibérico y un objetivo fundamental en la aplicación de las técnicas de reproducción asistida aplicadas a esta especie. En muchos aspectos, la motilidad integra los eventos bioquímicos que ocurren en los espermatozoides (Martínez-Pastor *et al.*, 2011) y es considerada una de las características más importantes asociadas a la fertilidad (Saacke y White, 1972; Aitken *et al.*, 2004; Malo *et al.*, 2005a; Tourmente *et al.*, 2011), siendo más fértiles los machos con mayor cantidad de espermatozoides rápidos (Malo *et al.*, 2005a, 2006; Gomendio y Roldán, 2008).

En este sentido, como las trayectorias de los espermatozoides individuales están determinadas por su función flagelar, características como las velocidades de los espermatozoides, la BCF, o la ALH, pueden reflejar el estado fisiológico de cada uno de los espermatozoides de una muestra de semen (Abaigar *et al.*, 1999), apareciendo las características de motilidad del espermatozoide como una determinación directa del estado fisiológico del mismo (Roldán, 1998). Se necesita energía tanto para el movimiento como para la fecundación, y esta energía se aporta en forma de ATP sintetizado por la glicolisis en el citoplasma o a partir de la fosforilación oxidativa en la mitocondria, transfiriéndose a los microtúbulos del flagelo del espermatozoide para que pueda producirse el movimiento (Satir, 1979; Zamboni, 1982; Mahadevant *et al.*, 1997).

Por lo tanto, el flagelo es el responsable del movimiento de la célula espermática, la pieza intermedia contiene las mitocondrias capaces de generar la energía necesaria para que el espermatozoide pueda moverse y las partes principal y terminal (resto del flagelo) propulsan los espermatozoides mediante batido (Turner, 2003). Por ello, un aumento en la

longitud del flagelo supondría un aumento del empuje necesario para propulsar el espermatozoide hacia delante (Gomendio y Roldán, 1991), un aumento en el volumen de la pieza intermedia originaría un aumento en la cantidad de energía necesaria para la motilidad del espermatozoide (Malo *et al.*, 2006; Tourmente *et al.*, 2009) y un alargamiento de la cabeza del espermatozoide podría reducir la resistencia experimentada por la célula espermática, lo que implicaría un aumento de la velocidad de los espermatozoides.

De este modo, en ciervo ibérico se ha comprobado que las relaciones entre los diferentes componentes de la célula espermática podrían influir en su velocidad (Malo *et al.*, 2006; Gomendio *et al.*, 2007), habiéndose demostrado en estudios intraespecíficos, que la forma del espermatozoide ejerce una fuerte influencia en su velocidad, siendo más rápidos los espermatozoides con cabezas más alargadas, piezas intermedias más cortas y piezas terminales más largas en relación con la longitud total del flagelo. Por lo tanto, en las poblaciones naturales, la gran variación entre los machos en cuanto a la forma de sus espermatozoides conlleva diferencias en su velocidad que, a su vez, determinan las diferencias en las tasas de fertilidad (Gomendio *et al.*, 2007). Asimismo, las diferencias observadas en los porcentajes de fertilidad entre machos mostraron una fuerte asociación con las tres velocidades objetivas proporcionadas por el análisis CASA: VCL, VSL y VAP (Malo *et al.*, 2005a) y con VSL (Gomendio *et al.*, 2007; Gomendio y Roldán, 2008).

En lo que se refiere a la criopreservación espermática, la experiencia ha demostrado que los espermatozoides de las diferentes especies varían considerablemente en su criosensibilidad, existiendo además diferencias evidentes entre individuos (Yu *et al.* 2002). Por ello, es una herramienta fundamental en el desarrollo y aplicación de las TRA, especialmente cuando los espermatozoides han sido obtenidos postmortem, pues los cambios en la fisiología y morfología de los espermatozoides que lleva asociados, pueden ocasionar daños a las mitocondrias, al acrosoma y al flagelo (Wooley y Richardson, 1978), provocando una disminución de su viabilidad y de la fertilidad (Watson, 2000; Garde *et al.*, 2006).

Estas modificaciones estructurales producidas por la congelación en la membrana de las células espermáticas se asocian principalmente a la alteración de la capacidad de

abastecimiento de energía que afectaría al metabolismo celular y otras funciones (Cerolini *et al.*, 2001; Dziekonska *et al.*, 2009), siendo la motilidad de los espermatozoides especialmente sensible a tales cambios (O'Connell *et al.*, 2002). Así, la estructura responsable de la motilidad puede verse afectada como consecuencia de los cambios de permeabilidad en la membrana plasmática de la región de la cola del espermatozoide, la alteración de la disponibilidad de energía o el daño en la región del axonema. Tras la congelación se ha encontrado una gran cantidad de cristales de hielo en la mitocondria y alteraciones en la membrana de la misma, además de otros daños producidos en los brazos radiales del axonema (Courstens *et al.*, 1989; Windsor y White, 1995; O'Connell *et al.*, 2002), habiéndose demostrado que la pérdida de motilidad e integridad de la membrana de los espermatozoides se manifiesta durante la descongelación (Holt *et al.*, 1992).

Además, estos cambios fisiológicos y morfológicos en los espermatozoides pueden inducir estrés oxidativo y originar un descenso de los antioxidantes en el semen (Aisen *et al.*, 2005; Peris *et al.*, 2007), afectando a la calidad espermática a la descongelación. El estrés oxidativo tiene un papel importante en la fisiología de las células espermáticas, especialmente en el caso de los espermatozoides de epidídimo que no tienen contacto con el plasma seminal, el cual contribuye a la defensa antioxidante del semen.

Por otro lado, la variabilidad entre machos también afecta a la resistencia de sus espermatozoides a los daños derivados de la criopreservación (Esteso *et al.*, 2006; Loomis y Graham, 2008; Ramón *et al.*, 2012), lo que es posible que acentúe aún más las diferencias a la descongelación entre los machos.

Profundizando en la criorresistencia de los espermatozoides, es importante entender los factores que pueden afectarles para poder establecer protocolos de trabajo fiables. Así, Soler (2003) encontró relación entre la resistencia a la congelación de los espermatozoides de ciervo ibérico y los valores de motilidad y calidad del movimiento obtenidos después de la descongelación, habiéndose comprobado en un trabajo más reciente, que los machos que mostraban peores resultados de resistencia a la congelación se caracterizaban por presentar altos porcentajes de espermatozoides con un modelo de motilidad débil, mientras que los machos cuyos espermatozoides mostraban una buena resistencia a la congelación se caracterizaban por tener un porcentaje mayor de espermatozoides con un modelo de

motilidad progresiva e hiperactivada, así como un menor porcentaje de espermatozoides con un patrón de motilidad débil (Ramón *et al.*, 2012).

En cuanto a otras especies, en perro (Nuñez-Martínez *et al.*, 2006) y en toro (Muiño *et al.*, 2008) también se ha observado que los eyaculados que contenían una mayor proporción de espermatozoides rápidos y progresivos fueron los que mostraron una mayor resistencia a la congelación, además de una mayor longevidad tras la misma. Asimismo, en jabalí se ha comprobado que los animales cuyos eyaculados tenían una mayor calidad espermática en la descongelación, también mostraban los mayores porcentajes de morfología normal y de motilidad de los espermatozoides antes de la congelación (Roca *et al.*, 2006).

Por tanto, al ser la calidad a la descongelación uno de los factores más importantes para obtener un buen porcentaje de éxito en la IA., es fundamental estudiar las particularidades de las distintas especies con objeto de minimizar los daños producidos, consiguiendo los protocolos de congelación más adecuados a cada una de las especies. Así, en el caso de los cérvidos se ha demostrado que, incluso dentro del mismo género, las distintas especies de ciervos requieren diferentes protocolos de crioconservación (Cheng *et al.*, 2004).

Por ello, aunque la congelación de semen en cérvidos se ha venido realizando desde hace bastantes años con resultados aceptables (Jaczewski *et al.*, 1978; Krzywinski, 1981; Asher *et al.*, 2000), durante la última década se ha realizado un gran avance en el estudio y mejora de sus protocolos de criopreservación (Soler *et al.*, 2003; Fernández-Santos *et al.*, 2006abc, 2007; Garde *et al.*, 2008; Martínez-Pastor *et al.*, 2009; Dominguez-Rebolledo *et al.*, 2010ab, 2011; Anel-López *et al.*, 2012).

Continuando con los daños que experimentan los espermatozoides durante la congelación-descongelación, el origen de los mismos se ha atribuido a diversos factores tales como cambios en la temperatura, formación de cristales de hielo, daño oxidativo, alteraciones en las membranas espermáticas, daño en el ADN, toxicidad a los crioprotectores o estrés osmótico, siendo este último uno de los efectos más nocivos (Watson 1995). La respuesta de los espermatozoides a los cambios osmóticos y su habilidad para regular el volumen celular es una característica estrechamente relacionada con la congelabilidad (Holt *et al.*, 1992; Petrunkina *et al.*, 2004), y esta habilidad para regular el volumen celular está a su

vez relacionada con la motilidad espermática (Yeung y Cooper, 2001). Así, en algunas especies se ha demostrado que los daños producidos por el estrés al que se encuentran sometidos los espermatozoides durante la criopreservación (Rasul *et al.*, 2001), se manifiestan sobre todo como una pérdida de la motilidad del espermatozoide (Garde *et al.*, 2003,2008; Soler *et al.*, 2003, 2005; Cremades *et al.*, 2005; Fernández-Santos *et al.*, 2006c; 2009; Álvarez *et al.*, 2008) así como en una disminución de la integridad acrosomal (O'Connor *et al.*, 1981; Swanson *et al.*, 1997; Fernández Santos *et al.*, 2006c).

No obstante, en el caso del ciervo ibérico la calidad del movimiento mostrada después de la descongelación ha sido buena (Soler, 2003; Malo *et al.*, 2005a; Martínez-Pastor, 2005, 2009; Fernández-Santos *et al.*, 2009), aunque a pesar de haberse conseguido unos buenos resultados de motilidad, la progresividad ha sido baja (Anel *et al.*, 2012). En cuanto a otras especies de cérvidos, también se han obtenido niveles aceptables en la motilidad a la descongelación en el ciervo de Cola blanca (*Odocoileus cola blancanus*) (Jacobson *et al.*, 1989), gamo (*Dama dama*) (Asher *et al.*, 1993), ciervo Axis (*Axis axis*) (Dradjat, 1997), ciervo rojo (*Cervus elaphus*) (Fennessy *et al.*, 1990; Zomborszky *et al.*, 1999 Asher *et al.*, 2000) y ciervo de Eld (*C. eldi thamin*) (Montfort *et al.*, 1993; Ritten *et al.*, 2012).

Continuando con la estimación de la motilidad después de la descongelación de las muestras, o después de haberlas sometido a 1 o 2 horas de incubación a 37°C, se ha correlacionado positivamente con la fertilidad (Saacke y White, 1972; Roth *et al.*, 1999; Malo *et al.*, 2005a; Gomendio, 2006a; Gomendio y Roldán, 2008) y con el porcentaje de concepción mediante la aplicación de la IA en ciervo ibérico (Malo *et al.*, 2005a), ciervo de Cola blanca (Jacobson *et al.*, 1989) y en gamo (Jabbour *et al.*, 1993), comprobándose que el mantenimiento de la motilidad y de la viabilidad de los espermatozoides después del proceso de criopreservación es esencial para conseguir buenos resultados en IA con semen descongelado (Asher *et al.*, 2000). Además en ciervo ibérico se ha observado, que mejorando la resistencia durante la congelación, se aumenta la viabilidad a la descongelación de las células espermáticas descongeladas, y como consecuencia se mejoran los resultados de la IA, consiguiéndose mejores tasas de fertilidad (Fernández-Santos, 2006). Por otro lado en orix (*Oryx dammath*), Roth *et al.* (1999) obtuvieron una correlación positiva entre la longevidad de la motilidad espermática después de la descongelación y el éxito de la fecundación in vitro (FIV).

Por lo expuesto anteriormente, se han estudiado diferentes protocolos de criopreservación con objeto de optimizar el mantenimiento de la calidad espermática, para lo cual se han realizado numerosos trabajos de evaluación del efecto de la criopreservación sobre la motilidad de los espermatozoides (Ragni *et al.*, 1990; Verheyen *et al.*, 1993; Soler *et al.*, 2003a; Martínez-Pastor *et al.*, 2004b, 2005, 2009; Garde *et al.*, 2008; Domínguez-Rebolledo *et al.*, 2010ab, 2012; Anel-López *et al.*, 2012). A pesar de ello, aun no se ha conseguido estandarizar un protocolo de congelación-descongelación que optimice el mantenimiento de la calidad (Kiran *et al.*, 2004), aunque en el caso del ciervo ibérico, en los últimos años se han logrado una serie de mejoras en los protocolos de criopreservación para las muestras espermáticas epididimarias (Fernández-Santos *et al.*, 2006 a,b,c; Garde *et al.*, 2008; Martínez-Pastor *et al.*, 2009; Dominguez-Rebolledo *et al.*, 2010ab, 2012; Anel-López *et al.*, 2012).

En lo referente a la incubación de las muestras espermáticas, se realiza “*in vitro*” a la temperatura corporal de los espermatozoides después de haberlos sometido a un proceso de congelación-descongelación, para de esta forma, simular condiciones “*in vivo*” (Rota *et al.*, 1997; Peña y Linde-Forsberg, 2000).

La sensibilidad de los espermatozoides a los cambios extremos de temperatura puede dar lugar una mala supervivencia de los mismos durante la incubación (Bag *et al.*, 2004), manifestándose entonces los daños producidos durante el proceso de congelación-descongelación. Por tanto, la evaluación de la calidad seminal se estima de una forma más precisa si se realiza un seguimiento de la motilidad espermática a lo largo de un determinado período de incubación a 37 °C, en vez de una estimación puntual (Peláez, 2002), ya que la evaluación post-incubación, parece ser más discriminante que la evaluación realizada inmediatamente después de la descongelación (Soler *et al.*, 2003).

A pesar de ello, en ciervo ibérico se han conseguido resultados aceptables respecto a la calidad del semen después de someter a los espermatozoides a un proceso de incubación. Así, en un experimento realizado por Monfort *et al.* (1993) en ciervo de Eld (*Cervus eldi thamin*), la calidad espermática fue alta (60-75%) después de la descongelación, descendiendo moderadamente después de someter las muestras a 3 horas de incubación

(50-55%). En otro estudio, Anel-López *et al.* (2012) comprobaron que aunque la motilidad de los espermatozoides de ciervo ibérico descendía significativamente tras la incubación de las muestras, continuaba siendo aceptable después de 6 horas de incubación a 39°C. Respecto a los parámetros objetivos de velocidad, no descendieron significativamente con la incubación, observándose un ligero descenso de LIN y WOB (índice de oscilación) y un ligero aumento de VCL y ALH. Asimismo, en otros dos trabajos realizados también con ciervo ibérico, se comprobó que se producía un descenso significativo en la motilidad total y en los valores de VAP y ALH entre la descongelación y tras la incubación de las muestras epididimarias a 37°C durante 2 horas (Domínguez-Rebolledo *et al.*, 2011), y durante 2 y 4 horas (Mata-Campuzano *et al.*, 2012), manteniéndose el índice LIN con valores similares.

Por todo lo expuesto, en el primer experimento de esta tesis se han analizado los parámetros objetivos de motilidad de los espermatozoides mediante el sistema CASA para las muestras espermáticas de epidídimo de ciervo ibérico recién recuperadas de la cola del epidídimo, las obtenidas después del proceso de congelación-descongelación y por último tras una incubación post-descongelación de 2 h. El objetivo de este experimento ha sido caracterizar la motilidad de los espermatozoides mediante la determinación de los valores de sus principales parámetros cinéticos objetivos para su uso en inseminación artificial, así como determinar el efecto del proceso de congelación-descongelación sobre esos parámetros objetivos de motilidad.

2.1.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

CARACTERIZACIÓN OBJETIVA DE LOS PARÁMETROS DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA EN LAS MUESTRAS EPIDIDIMARIAS DE CIERVO RECIÉN OBTENIDAS

Se analizaron muestras procedentes de 195 venados, descartando 14 de las muestras por no presentar calidad suficiente para obtener resultados fiables mediante el análisis por el sistema CASA. Las muestras fueron analizadas después de prepararlas siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.4. de esta tesis. Se analizó un número medio de $92,8 \pm 44,5$ espermatozoides móviles por muestra.

CARACTERIZACIÓN OBJETIVA DE LOS PARÁMETROS DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA EN LAS MUESTRAS EPIDIDIMARIAS DE CIERVO DESCONGELADAS

Para el análisis de espermatozoides epididimarios descongelados de ciervo ibérico, se utilizaron 181 muestras, que fueron analizadas mediante el sistema objetivo CASA, inmediatamente después de su descongelación. Las muestras fueron analizadas tras prepararlas siguiendo la metodología descrita en el capítulo 1.3 de esta tesis, evaluándose un número medio de $76,7 \pm 36,5$ espermatozoides móviles por muestra.

CARACTERIZACIÓN OBJETIVA DE LOS PARÁMETROS DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA EN LAS MUESTRAS EPIDIDIMARIAS DE CIERVO DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN

El análisis objetivo de los parámetros de motilidad se realizó por medio del *software* del módulo de motilidad del analizador CASA, tras la incubación del material espermático descongelado en el diluyente de congelación durante 2 horas a 37°C.

Aunque para el análisis de espermatozoides sometidos al proceso de incubación se partió de las 181 muestras utilizadas para el análisis tras la descongelación, sólo se analizaron 167 mediante CASA, ya que el resto no tenían la calidad mínima necesaria para analizar mediante este sistema. La metodología seguida fue igual a la utilizada en semen recién obtenido y descongelado (metodología descrita en capítulo 1.3), evaluándose en este caso un número medio de $64,2 \pm 28,4$ espermatozoides móviles por muestra.

COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS OBJETIVOS DE MOTILIDAD EVALUADOS ENTRE LAS MUESTRAS EPIDIDIMARIAS DE CIERVO RECIÉN OBTENIDAS, INMEDIATAMENTE DESPUÉS DE LA DESCONGELACIÓN, Y TRAS LA POST-DESCONGELACIÓN.

Para estudiar los efectos de la criopreservación sobre los parámetros objetivos de motilidad medidos mediante CASA se realizaron análisis de comparación de medias entre los parámetros objetivos de motilidad medidos para las muestras epididimarias recién obtenidas, los obtenidos para esas mismas muestras después de la descongelación y los observados tras la incubación en el diluyente de congelación durante 2 horas a 37°C. El grado de asociación entre las motilidades observadas entre los tres grupos de muestras se realizó mediante un análisis de regresión lineal, considerándose significativa cuando $P < 0,05$.

2.1.3. RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN OBJETIVA DE LOS PARÁMETROS DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA EN LAS MUESTRAS EPIDIDIMARIAS DE CIERVO RECIÉN OBTENIDAS

Como se esperaba, los valores de velocidad más altos correspondieron a la velocidad curvilínea (111,9 $\mu\text{m/s}$), seguidos de la velocidad media (82,3 $\mu\text{m/s}$), y por último de la lineal (62,2 $\mu\text{m/s}$). Para los índices de linealidad y rectitud se obtuvieron porcentajes medios de 62,2 % y 81,4 % respectivamente, y para la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza y la frecuencia de batido, los valores medios fueron de 3,79 μm y de 13,20 Hz (tabla 2).

Tabla 2. Valores medios, desviación estándar, y rangos de los principales parámetros cinéticos objetivos en muestras de epidídimo recién obtenidas.

| Parámetros objetivos de motilidad | Media \pm desviación estándar | Rango |
|--|---|--------------|
| VCL ($\mu\text{m/s}$) | 111,9 \pm 19,6 | 67,1 – 170,9 |
| VSL ($\mu\text{m/s}$) | 69,2 \pm 19,2 | 14,7 – 140,2 |
| VAP ($\mu\text{m/s}$) | 82,3 \pm 20,7 | 27,7 – 155,7 |
| LIN (%) | 62,2 \pm 10,2 | 22,2 – 86,0 |
| STR (%) | 81,4 \pm 7,7 | 45,3 – 94,7 |
| ALH (μm) | 3,8 \pm 0,7 | 2,50 – 7,0 |
| BCF (Hz) | 13,2 \pm 1,2 | 10,4 – 22,0 |

VCL: velocidad curvilínea, VSL: velocidad lineal, VAP: velocidad de la trayectoria media, LIN: índice de linealidad, STR: índice de rectitud, ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, BCF: frecuencia de batido.

CARACTERIZACIÓN OBJETIVA DE LOS PARÁMETROS DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA EN LAS MUESTRAS EPIDIDIMARIAS DE CIERVO DESCONGELADAS

En la tabla 3 se detallan los valores medios, la desviación estándar, y los valores mínimos y máximos obtenidos para los principales parámetros cinéticos. La evaluación se realizó mediante la metodología de análisis CASA después de la descongelación de las muestras espermáticas de epidídimo. Los resultados se muestran como medias \pm desviación estándar.

Tabla 3. Valores medios, desviación estándar, y rangos de los principales parámetros cinéticos objetivos después de la descongelación de las muestras epididimarias de ciervo.

| Parámetros cinéticos objetivos | Media \pm desviación estándar | Rango |
|---------------------------------------|---|--------------|
| VCL ($\mu\text{m/s}$) | 123,4 \pm 21,8 | 68,1 – 178,8 |
| VSL ($\mu\text{m/s}$) | 79,9 \pm 20,3 | 30,6 – 146,0 |
| VAP ($\mu\text{m/s}$) | 94,0 \pm 23,0 | 11,9 – 157,5 |
| LIN (%) | 63,5 \pm 8,6 | 38,8 – 84,2 |
| STR (%) | 81,5 \pm 6,5 | 59,6 – 93,3 |
| ALH (μm) | 4,5 \pm 0,8 | 2,5 – 6,7 |
| BCF (Hz) | 13,5 \pm 0,9 | 10,0 – 16,1 |

VCL: velocidad curvilínea, VSL: velocidad lineal, VAP: velocidad de la trayectoria media, LIN: índice de linealidad, STR: índice de rectitud, ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, BCF: frecuencia de batido.

Como era de esperar, los valores de velocidad más altos después de la descongelación de las muestras corresponden a la velocidad curvilínea, seguidos de la velocidad de la trayectoria media, la cual presentó el rango más amplio de valores, y por último de la lineal. Para los índices de linealidad y rectitud se obtuvieron porcentajes medios de $63,5 \pm 8,6$ % y $81,5 \pm 6,5$ respectivamente. Por último, el valor medio de la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza fue de $4,5 \pm 0,8$ μm , y el de la frecuencia de batido fue de $13,5 \pm 0,9$ Hz.

CARACTERIZACIÓN OBJETIVA DE LOS PARÁMETROS DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA EN LAS MUESTRAS EPIDIDIMARIAS DE CIERVO DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN

En la tabla 4 se muestran los valores medios, el error estándar, y los valores mínimos y máximos obtenidos para los parámetros cinéticos mediante análisis objetivo de motilidad después de la incubación de las muestras. Los resultados se muestran como \bar{x} media desviación estándar.

Tabla 4. Valores medios, desviación estándar, y rangos, de los principales parámetros cinéticos objetivos después de la incubación de las muestras epididimarias de ciervo.

| Parámetros cinéticos objetivos | Media \pm desviación estándar | Rango |
|---------------------------------------|---|--------------|
| VCL ($\mu\text{m/s}$) | 112,3 \pm 19,6 | 68,7 – 214,1 |
| VSL ($\mu\text{m/s}$) | 60,3 \pm 19,4 | 18,8 – 135,3 |
| VAP ($\mu\text{m/s}$) | 77,3 \pm 20,8 | 38,5 – 168,7 |
| LIN (%) | 53,7 \pm 10,3 | 21,8 – 80,6 |
| STR (%) | 74,9 \pm 7,8 | 34,8 – 90,7 |
| ALH (μm) | 4,7 \pm 0,9 | 0,1 – 7,4 |
| BCF (Hz) | 13,6 \pm 1,9 | 0,1 – 17,8 |

VCL: velocidad curvilínea, VSL: velocidad lineal, VAP: velocidad de la trayectoria media, LIN: índice de linealidad, STR: índice de rectitud

Al igual que en los dos casos anteriores, los valores más altos de velocidad después del proceso de incubación corresponden a la velocidad curvilínea (112,3 $\mu\text{m/s}$), seguidos de la velocidad media (77,3 $\mu\text{m/s}$), y por último de la lineal (60,3 $\mu\text{m/s}$), mostrando unos rangos amplios en los tres casos. Para los índices de linealidad y rectitud se obtuvieron porcentajes medios de 53,7 % y 74,9 % respectivamente, siendo sus rangos más estrechos que los obtenidos para las velocidades. Por último señalar que, el valor medio de la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza fue de 4,7 μm , y el de la frecuencia de batido de 13,6 Hz.

COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS OBJETIVOS DE MOTILIDAD ENTRE LAS MUESTRAS EPIDIDIMARIAS DE CIERVO RECIÉN OBTENIDAS, INMEDIATAMENTE DESPUÉS DE LA DESCONGELACIÓN Y TRAS LA INCUBACIÓN DE LAS MISMAS.

En la tabla 5 se muestra la comparación de los parámetros cinéticos de motilidad de las muestras epididimarias de ciervo recién obtenidas, las evaluadas inmediatamente después de la descongelación y tras la incubación de las mismas. Los resultados se muestran como medias \pm error estándar de la media y pueden apreciarse gráficamente en las figuras 14 y 15.

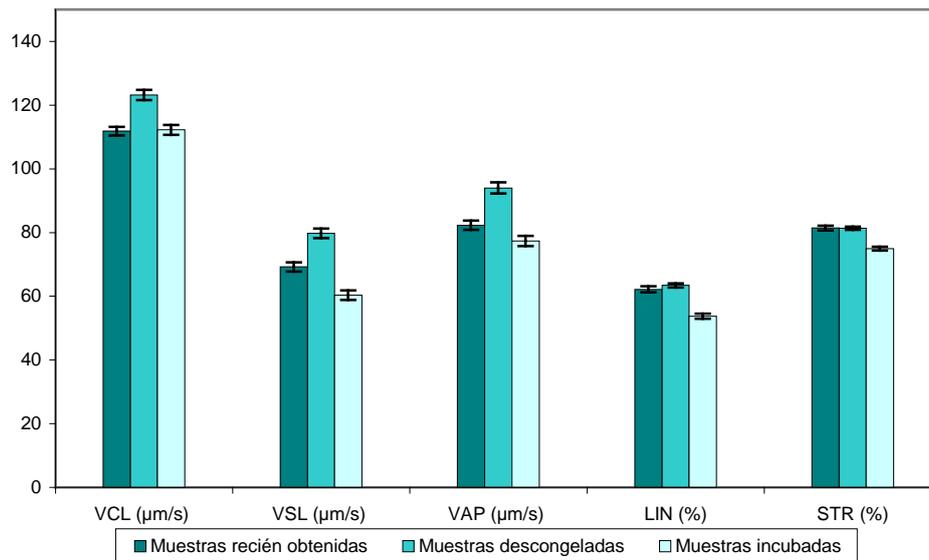
Tabla 5. Valores medios y error estándar de la media de los principales parámetros objetivos de motilidad en los tres grupos de muestras estudiados.

| Parámetros cinéticos objetivos CASA | Muestras iniciales | Muestras descongeladas | Significac. inic-desc | Muestras incubadas | Significac.desc -incub |
|--|---------------------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| VCL ($\mu\text{m/s}$) | 111,9 \pm 1,5 | 123,4 \pm 1,5 | *** | 112,3 \pm 1,3 | *** |
| VSL ($\mu\text{m/s}$) | 69,2 \pm 1,5 | 79,9 \pm 1,4 | *** | 60,3 \pm 1,3 | *** |
| VAP ($\mu\text{m/s}$) | 82,3 \pm 1,6 | 94,0 \pm 1,5 | *** | 77,3 \pm 1,4 | *** |
| LIN (%) | 62,2 \pm 0,8 | 63,5 \pm 0,6 | n.s. | 53,7 \pm 0,7 | *** |
| STR (%) | 81,4 \pm 0,6 | 81,5 \pm 0,4 | n.s. | 74,9 \pm 0,5 | *** |
| ALH (μm) | 3,8 \pm 0,1 | 4,5 \pm 0,1 | *** | 4,7 \pm 0,1 | n.s. |
| BCF (Hz) | 13,2 \pm 0,1 | 13,5 \pm 0,1 | ** | 13,6 \pm 0,1 | n.s. |

VCL: velocidad urvilínea, VSL: velocidad lineal, VAP: velocidad de la trayectoria media, LIN: índice de linealidad, STR: índice de rectitud, ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, BCF: frecuencia de batido.
(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s. no significativo)

Los valores de las tres variables de velocidad fueron más altos inmediatamente después de la descongelación que en las muestras recién obtenidas o en las incubadas tras la descongelación. Los valores más bajos corresponden a las muestras incubadas, con la única excepción de la VCL, que presenta el menor valor en las muestras recién obtenidas. Tanto VCL como VSL y VAP, presentaron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre las muestras iniciales, las evaluadas inmediatamente después de la descongelación, y tras la incubación.

Figura 14. Comparación de los valores medios y error estándar de la media para VCL, VSL, VAP, LIN y STR medidos en muestras epididimarias iniciales, después de la descongelación e incubadas.



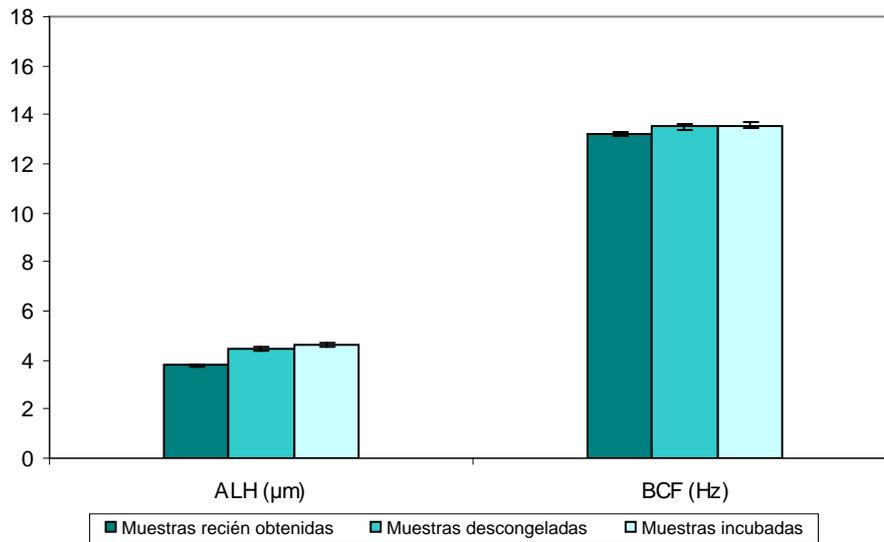
VCL: velocidad curvilínea, VSL: velocidad lineal, VAP: velocidad de la trayectoria media, LIN: índice de linealidad, STR: índice de rectitud.

En cuanto a los índices LIN y STR, muestran valores parecidos entre las muestras recién obtenidas y las descongeladas, aunque ligeramente más altos para estas últimas. Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas entre los valores de estas variables entre las muestras incubadas y el resto ($p < 0,001$).

Los valores medios de ALH fueron más altos en las muestras epididimarias incubadas. Este parámetro presentó diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) al compararlo con el obtenido en las muestras iniciales, pero no con las descongeladas ($p > 0,05$).

Por último, el valor de BCF fue ligeramente superior en las muestras incubadas, siendo el grado de significación más bajo al compararlo con la BCF de las muestras iniciales ($p < 0,01$). Sin embargo, no hubo diferencias para esta variable entre las muestras incubadas y las descongeladas.

Figura 15. Valores medios y errores estándar de la media de ALH y BCF medidos en muestras epididimarias iniciales, después de la descongelación e incubadas.



ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, BCF: frecuencia de batido.

Es importante destacar que después de la criopreservación, los valores medios de todos los parámetros estudiados se incrementaron respecto a los valores iniciales. Sin embargo, al realizar la comparación con los parámetros de motilidad estudiados inmediatamente después de la incubación, se apreció una disminución para todos los parámetros objetivos, excepto para ALH y BCF.

2.1.4. DISCUSIÓN

En este estudio, entre un amplio número de parámetros cinéticos calculados por el sistema CASA, se han seleccionado los utilizados en la amplia mayoría de las publicaciones (VCL, VSL, VAP, STR, LIN, ALH y BCF), por ser éstos los que han demostrado ser más útiles en la caracterización del movimiento de los espermatozoides, o en la predicción de la capacidad fecundante de una muestra de semen (Barat *et al.*, 1993; Krause, 1995; Farrell *et al.*, 1998; Larsen *et al.*, 2000; Kasimanickam *et al.*, 2006; Gomendio y Roldán, 2008). Así, en algunos trabajos se ha demostrado que VCL, VSL, ALH y LIN son los parámetros objetivos que correlacionan de manera más significativa con la fertilidad de una muestra espermática (Aitken *et al.*, 1984; Barrat *et al.*, 1993; Irvine *et al.*, 1994; Paston *et al.*, 1994;

Krause, 1995; Kasai *et al.*, 2002), habiéndose indicado resultados similares con semen de ciervo ibérico (Malo *et al.*, 2005a; Gomendio *et al.*, 2007).

Por otro lado, en un estudio realizado por Ramón *et al.* (2013), se comprobó que los ciervos que mostraban una fertilidad baja, presentaban un movimiento lento y tenían espermatozoides con valores bajos de VCL y VAP. Sin embargo, los ciervos con altos índices de fertilidad presentaban un descenso en el número de espermatozoides lentos y mayores valores de VCL.

Respecto al patrón de movimiento observado en esta tesis, se puede decir que los espermatozoides frescos recuperados del epidídimo de ciervo ibérico se muestran activos, presentan una motilidad progresiva y no alteran la dirección de su trayectoria excepto cuando chocan entre ellos o se cruzan con obstáculos. Asimismo, los valores de los parámetros objetivos de motilidad observados en esta tesis son muy similares a los presentados en otros trabajos para el ciervo ibérico (Malo *et al.* 2005a; Gomendio *et al.*, 2006a), ligeramente superiores a los observados por Martínez-Pastor *et al.* (2005c) y Fernández-Santos *et al.* (2009) y mayores a los indicados por Martínez *et al.*, (2008).

Las diferencias señaladas podrían obedecer a dos razones, una estaría basada en los diferentes meses de recogida de las muestras, puesto que tanto Malo *et al.* (2005) como en este trabajo, las muestras se recogieron durante toda la época reproductiva, y por tanto también después de la berrea, cuando los parámetros de motilidad son más altos (Martínez-Pastor *et al.*, 2005a,b), mientras que en los otros casos, se recogieron en los meses de noviembre y diciembre (Fernández-Santos *et al.* 2009) y en la primera quincena de diciembre (Martínez-Pastor *et al.*, 2005c). La segunda razón podría deberse a los diferentes intervalos de tiempo transcurridos entre la muerte del animal y la llegada de los testículos al laboratorio para el análisis de las muestras. Estos tiempos fueron mayores en el estudio de Martínez *et al.* (2008), y de Martínez-Pastor *et al.* (2005a), oscilando entre 18 y 26 h post-mortem en el primer caso, y de 24 h post-mortem en el segundo; mientras que en los experimentos de Malo *et al.* (2005a), el tiempo transcurrido fue considerablemente menor, y similar al utilizado en esta tesis (entre 3 y 8 horas post-mortem).

En este sentido, algunos autores trabajando con diferentes especies han comprobado que varios parámetros de la motilidad se alteran tan pronto transcurren unas pocas horas desde la muerte del animal (Soler *et al.*, 2003a,d; Kaabi *et al.*, 2003; Hishinuma *et al.*, 2003). En el caso del ciervo ibérico, Garde *et al.* (1998) reportaron que el tiempo transcurrido entre la muerte del venado y la recogida de las muestras epididimarias influía en la calidad de las mismas. Asimismo, Fernández-Santos *et al.* (2009) comprobaron que durante las primeras 96 h desde la muerte del animal, las motilidades total y progresiva no se reducen significativamente cuando se evalúan después de la criopreservación; aunque sí muestran una disminución significativa cuando los epidídimos de los ciervos se almacenan durante 192 horas a 5°C ($P < 0,001$). Así, la pérdida de VCL y la variación de ALH y BCF observadas, podrían reflejar la desregulación de los mecanismos implicados en la motilidad espermática debido al tiempo transcurrido post-mortem, pues después de la muerte del animal, los espermatozoides sufren un proceso degenerativo en el epidídimo debido a la descomposición del tejido después de la muerte.

Por otro lado, Martínez-Pastor *et al.* (2005a) observaron que el porcentaje de acrosomas intactos, la integridad de la membrana, la viabilidad, y los parámetros objetivos de motilidad en ciervo ibérico y corzo (excepto STR en el caso del corzo) presentaron importantes correlaciones negativas respecto al tiempo transcurrido post-mortem. Además, Hishinuma *et al.* (2002) encontraron un descenso del porcentaje de motilidad en los espermatozoides de epidídimo de ciervo sika conservados a 4°C durante 24 h (41,9%), respecto a los congelados el mismo día de la recogida (58,1%).

En cuanto a la comparación con otras especies, los valores de VCL, VSL, VAP, y ALH obtenidos en el análisis objetivo de semen de epidídimo de ciervo ibérico en este estudio son, en general, inferiores a los observados en otras especies. Sin embargo no ocurre lo mismo para los valores de los índices STR, y LIN, que suelen ser similares o más altos.

Así, en hámster dorado (*mesocricetus auratus*) (Jayaprakash *et al.*, 1997) y en ratón silvestre (*apodemus sylvaticus*) (Grover *et al.*, 2005), los tres parámetros objetivos de velocidad y ALH, fueron considerablemente mayores, mientras que los de LIN, STR y BCF fueron más bajos. En rata (*rattus norvegicus*) se repiten estos resultados, si bien en este caso deben destacarse los altos valores observados para VCL, con cifras comprendidas

entre 344,64 $\mu\text{m/s}$ y 480,8 $\mu\text{m/s}$. Este modelo de movimiento con altos valores de VCL y ALH es característico de los roedores (Li-Chun *et al.*, 2004).

En el caso de espermatozoides de epidídimo de tití común (Morrell, 1997) los valores de VCL, VSL, VAP y ALH, también son mayores que los obtenidos para ciervo ibérico, aunque en este caso los valores de LIN y STR fueron similares, y solamente los de BCF fueron menores.

En el toro, los espermatozoides de epidídimo (Goovaerts *et al.*, 2006) mostraron una VCL mayor que la observada en esta tesis para ciervo ibérico (173,5 vs. 118,9 $\mu\text{m/s}$), mientras que el índice STR fue ligeramente inferior (80,5 vs. 81,41%), y ALH (6,1 vs. 3,79 μm) muy superior.

Por último, en los trabajos realizados con muestras procedentes de epidídimo en porcino, se ha podido comprobar que sus espermatozoides se caracterizan por mostrar un movimiento más curvilíneo, con trayectorias poco lineales y por tanto, los valores de VCL mostrados han sido bastante más altos a los de ciervo ibérico, siendo los índices LIN y STR más bajos (Suzuki y Nagai, 2003), lo que genera un batido de gran amplitud, con una elevada potencia pero una baja progresividad.

Por tanto, los datos señalados anteriormente indican que la mayoría de las especies animales cuyos espermatozoides epididimarios han sido analizados para los parámetros objetivos de motilidad, muestran un vigor superior a los de ciervo, pero una progresividad menor.

Respecto a la comparación según el origen de los espermatozoides, en ciervo ibérico (Martínez *et al.*, 2008) se ha comprobado que la calidad del movimiento es mucho mayor en muestras obtenidas mediante electroeyaculación que en las obtenidas post-mortem, con diferencias considerables en los valores de VCL (112 vs. 53 $\mu\text{m/s}$), VSL (88 vs. 26 $\mu\text{m/s}$), LIN (81 vs. 44%), ALH (3,9 vs. 2,1 μm), y BCF (9,5 vs. 8,2 Hz). En toro también se ha observado que los espermatozoides de epidídimo muestran valores mayores de VCL y ALH y menores de STR, además de unos porcentajes más bajos de motilidad y progresividad que los procedentes de eyaculado (Goovaerts *et al.*, 2006). Por otro lado,

Blash *et al.* (2000), manifestaron que el porcentaje de espermatozoides vivos era significativamente mayor en los espermatozoides procedentes de epidídimo, cuando se comparaban con los de eyaculado. Por tanto, hay que tener en cuenta estas diferencias entre las características de los espermatozoides de eyaculado y los procedentes de epidídimo, cuando se realizan comparaciones con otros estudios realizados en ciervo.

En relación a la criopreservación espermática, destacar que el uso de la IA con semen congelado se ha expandido considerablemente en los últimos años, siendo la combinación de la criopreservación de espermatozoides con la IA, el método de TRA que se más se ha aplicado en cérvidos (Asher *et al.* 2000). Pero la exposición de los espermatozoides a la refrigeración y al proceso de congelación - descongelación, puede afectar a su calidad inicial, siendo la motilidad uno de los parámetros más afectados (Watson, 1995), por lo que teniendo en cuenta que el conocimiento de la motilidad de los espermatozoides es fundamental por haber sido correlacionada con la fertilidad (Budworth *et al.*, 1988; Bag *et al.*, 2004; Malo *et al.*, 2005a; Gomendio *et al.*, 2007; Ramón *et al.*, 2012), es importante desarrollar un programa adecuado de IA basado en estudios preliminares sobre procedimientos de criopreservación del semen y de IA (Holt *et al.*, 1996b).

Como se ha indicado anteriormente, el proceso de congelación-descongelación suele estar asociado a un descenso del porcentaje de motilidad total, independientemente de cómo afecte a los parámetros objetivos de motilidad. Así, en esta tesis se ha observado un descenso del porcentaje de motilidad de las muestras epididimarias de ciervo tras la descongelación ($61,15 \pm 1,15$ vs. $51,32 \pm 1,19$ %); sin embargo, los valores medios de los parámetros objetivos de velocidad se han mantenido altos, observándose un aumento de VAP ($94,01$ vs. $82,28$ $\mu\text{m/s}$), VSL ($79,92$ vs. $62,16$ $\mu\text{m/s}$) y VCL ($123,38$ vs. $111,85$ $\mu\text{m/s}$). La amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) también experimentó un aumento después de la descongelación de las muestras ($4,45$ vs. $3,79$ μm), y en cuanto al resto de parámetros analizados (LIN, STR y BCF), mostraron valores similares antes y después de la criopreservación.

Estos resultados son comparables a los obtenidos por Martínez-Pastor *et al.* (2005c), quienes trabajando con muestras epididimarias de ciervo ibérico comprobaron que los parámetros VAP, ALH y BCF presentaban valores ligeramente más altos después del

proceso de criopreservación que en las muestras iniciales. Por otro lado, aunque se observó un descenso de LIN entre las muestras iniciales y en la precongelación, su valor se mantuvo entre la precongelación y después de la descongelación de las muestras. Es importante recordar, que los espermatozoides recién recuperados de la cola del epidídimo son generalmente más lentos y suelen presentar un batido flagelar débil que los procedentes de eyaculado. Sin embargo, cuando los espermatozoides entran en contacto con el diluyente, sufren algunos cambios que activan su motilidad (Gerver *et al.*, 2001; Fernández-Santos *et al.*, 2006a), lo que podría explicar en parte el aumento en algunos de los valores de los parámetros objetivos de motilidad después de la descongelación de las muestras, tal y como se observa en esta tesis.

Por otro lado, en trabajos realizados anteriormente sobre criopreservación de semen de ciervo, los resultados también presentaron una motilidad aceptable tras la descongelación en especies como el ciervo del padre David, (*Elaphurus davidianus*) (40-55%) (Asher *et al.*, 1988), el gamo (*Dama dama*) (70%) (Asher *et al.*, 1993), el ciervo chital (*Axis axis*) (60-70%) (Dradjat, 1997), el ciervo rojo (*Cervus elaphus*) (30-70%) (Asher *et al.*, 2000.; Fennessy *et al.*, 1990; Zomborszky *et al.*, 1999) y el venado de Cola blanca (*Odocoileus virginianus blancanus*) (> 50%) (Jacobson *et al.*, 1989).

Respecto a la comparación con otras especies, Peña *et al.* (2003) encontraron una respuesta a la criopreservación acorde con los resultados de esta tesis, obteniendo un descenso en el porcentaje de espermatozoides móviles en semen descongelado de verraco, al compararlo con el semen fresco, mientras que los parámetros objetivos de motilidad eran significativamente más altos en las muestras descongeladas que en las iniciales.

Además, en un trabajo llevado a cabo por Suzuki y Nagai (2003) con espermatozoides de epidídimo descongelados de verraco, los valores de VCL, BCF y ALH fueron considerablemente mayores a los observados en ciervo ibérico; aunque VAP, VSL y los índices STR y LIN fueron más bajos. Estos resultados indican que tras la descongelación, los espermatozoides de verraco presentan un movimiento más vigoroso, pero menos progresivo que los de ciervo ibérico.

En bovino se han estudiado ampliamente los efectos de la criopreservación en la función espermática. Así, Muiño *et al.* (2009) observaron que tras la descongelación de las muestras de semen, el porcentaje de motilidad total descendía moderadamente respecto al de semen fresco ($82,3 \pm 9,8\%$ vs. $75,8 \pm 12,8\%$). Además, en un trabajo posterior se indicó la existencia de una correlación positiva entre el porcentaje de espermatozoides incluidos en la subpoblación de movimiento muy rápido y muy progresivo ($VCL= 132,4 \pm 23,6$ $\mu\text{m/s}$; $LIN= 62,3 \pm 14,1$ %) y el de dicha subpoblación en semen descongelado (Muiño *et al.*, 2008).

En el caso del semen de caballo, la influencia de la criopreservación sobre los parámetros objetivos de motilidad también es similar a los obtenidos para ciervo ibérico en esta tesis, observándose un descenso en el porcentaje de espermatozoides móviles, pero un ligero incremento en los valores de la VCL y VSL después del proceso de congelación-descongelación (Warnke *et al.* 2005).

Respecto al semen de morueco, también se ha observado una disminución del porcentaje de espermatozoides móviles después de la descongelación, comprobándose además la existencia de un ligero descenso en VCL, ALH, y BCF., pero un aumento de LIN, VSL y VAP, lo que implicaría una mejora de la progresividad los espermatozoides después de la criopreservación (Puchades *et al.*, 2004).

En general, al comparar los resultados obtenidos en esta tesis con los de otros trabajos, se observa una gran variabilidad en los resultados, siendo éstos en ocasiones muy dispares, por lo que a pesar de que en muchos casos se ha obtenido una buena resistencia de los espermatozoides al proceso de criopreservación, han sido numerosos los estudios en los que se ha observado un descenso de la motilidad (Ahmad y Chaudhry, 1980; Critser *et al.*, 1987; Budworth *et al.*, 1988; Holt *et al.*, 1988; Patil *et al.*, 1998; Abaigar *et al.*, 1999; Rasul *et al.*, 2001; Brinsko *et al.*, 2003), lo que podría deberse a que después del proceso de congelación-descongelación, la función espermática puede quedar dañada (Mazur, 1984).

Por otro lado, la disparidad en los resultados en algunos casos podría deberse a las diferencias en la resistencia a la congelación entre los espermatozoides eyaculados y los

que proceden directamente del epidídimo (Gilmore *et al.*, 1998; Blash *et al.*, 2000; Leboeuf *et al.*, 2000; Martínez-Pastor *et al.*, 2006b; Yamashiro *et al.*, 2006), ya que los espermatozoides eyaculados han estado expuestos a las secreciones de las glándulas sexuales accesorias, las cuales causan alteraciones en las características de los espermatozoides (Braun *et al.*, 1994; Graham, 1994) y en su capacidad de resistencia a la congelación (Yu *et al.*, 2002).

Así, se ha demostrado en diferentes especies que los espermatozoides eyaculados son más susceptibles al “choque frío” que los epididimarios (Rath y Niemann, 1997; Blash *et al.*, 2000), e incluso que los espermatozoides procedentes del epidídimo proximal son más resistentes que los de la cola del epidídimo y los eyaculados, sugiriendo que durante la maduración espermática, ocurren cambios que los hacen más susceptibles al “choque frío”, incluyendo la pérdida de fosfolípidos de la membrana (Jhonson *et al.* 1972). En este sentido, en macho cabrío se ha comprobado que la motilidad a la descongelación de los espermatozoides de epidídimo es mayor que la de los procedentes de eyaculado (Yamashiro *et al.*, 2006),

Además, el contacto con el diluyente de congelación puede alterar la motilidad de los espermatozoides (Okamura *et al.*, 1995; De Paw *et al.*, 2003) y, en el caso de los espermatozoides procedentes de muestras epididimarias, éstos pueden sufrir algunos cambios cuando entran en contacto con el diluyente, activándose su motilidad (Gerber *et al.*, 2001; Fernández-Santos *et al.*, 2006a). En este sentido, Martínez-Pastor *et al.* (2005) comprobaron que los espermatozoides de ciervo ibérico recién recuperados de la cola del epidídimo se movían lentamente y presentaban un batido del flagelo débil y un desplazamiento lento, que en ocasiones podían hacerlos parecer inmóviles; sin embargo, esto no ocurría en las muestras de la fase de precongelación, seguramente como consecuencia de la adición del diluyente, observándose un aumento importante del porcentaje de espermatozoides móviles en precongelación al compararlo con las muestras iniciales.

En cualquier caso, a pesar del descenso del 15% en el porcentaje de espermatozoides móviles tras la descongelación, la mejora en los valores medios de los parámetros objetivos de motilidad observados en esta tesis, parece indicar que la metodología seguida en el

proceso de congelación-descongelación podría ser adecuada, posiblemente debido a la utilización de un diluyente, un crioprotector, y unas velocidades de refrigeración, congelación y descongelación adaptadas a la especie estudiada y al tipo de muestras (Mazur, 1984; Parks y Graham, 1992; Salamon y Maxwell, 1995; Watson, 1995; Watson, 2000; Holt, 2001), que en este caso han sido las procedentes de los epidídimos de ciervo ibérico. Así, se ha comprobado que el daño que experimentan los espermatozoides durante la criopreservación disminuye si se elige el diluyente de congelación apropiado.

Otra razón podría ser que, los espermatozoides de epidídimo pueden experimentar algunos cambios que activan su motilidad al entrar en contacto con el diluyente (Gerber *et al.*, 2001; Martínez-Pastor *et al.*, 2005), y una última explicación de esta aparente mejora de los parámetros de motilidad tras el proceso de congelación-descongelación, podría ser la muerte selectiva, debilitamiento o inmovilización de los espermatozoides menos móviles o con peores características después del proceso de congelación-descongelación, lo que llevaría asociado un aumento de los valores medios en los parámetros de motilidad a la descongelación al haber quedado excluidos del cálculo de la media los espermatozoides con los peores parámetros. Así, en otros trabajos también se han observado incrementos en los parámetros de motilidad, unidos a importantes reducciones del porcentaje de motilidad tras la descongelación (Fernández *et al.*, 1990; Peña *et al.*, 2003; Martínez-Pastor., 2005c; Anel *et al.*, 2012).

Como conclusión de los efectos del proceso de congelación-descongelación, en esta tesis se ha demostrado que los espermatozoides procedentes de epidídimo de ciervo ibérico presentan una buena resistencia a la criopreservación, lo que podría explicarse fundamentalmente por la utilización de un diluyente, un crioprotector, y unas velocidades de refrigeración, congelación y descongelación adaptadas a las muestras epididimarias de ciervo ibérico.

Respecto a la importancia de realizar una evaluación de las muestras después de someterlas a un proceso de incubación, en algunas especies se ha observado que la evaluación de la motilidad inmediatamente después de la descongelación no es un buen indicador del éxito de la fecundación *in vitro* (Roth *et al.*, 1999). Así, Fiser *et al.* (1991) encontraron que el uso de una prueba térmica era más sensible que las utilizadas rutinariamente para la

evaluación de semen porcino descongelado. Además, en algunas especies de cérvidos se ha comprobado, a partir de un estudio realizado con semen congelado de ciervo rojo, gamo y ciervo del padre David, que la evaluación post-incubación realizada parecía ser claramente más discriminante que la evaluación inmediatamente después de la descongelación (Soler *et al.*, 2003).

Por lo tanto, los daños producidos en la membrana durante la criopreservación pueden no manifestarse inmediatamente después de la descongelación (Catena y Cabodevila, 2003) y, sin embargo, hacerlo después de la incubación de las muestras (Bag *et al.*, 2004); por lo que las diferencias de calidad seminal antes y después de la congelación podrían estimarse de una forma más precisa evaluando la motilidad espermática a lo largo de un determinado período de incubación a 37°C (Peláez, 2002).

Otro aspecto a tener en cuenta podría ser la longevidad de la motilidad de los espermatozoides como un criterio a considerar para la identificación de las técnicas más apropiadas de criopreservación de semen (Soler *et al.*, 2003a), pues para conseguir unos buenos resultados en IA, resulta esencial el mantenimiento de la motilidad y de la viabilidad de los espermatozoides en un intervalo suficiente de tiempo.

Además, como la incubación *in vitro* a temperatura corporal puede simular condiciones *in vivo*, evaluar las muestras espermáticas antes y después de una prueba de estrés térmico, podría dar una estimación de la capacidad de supervivencia de los espermatozoides en el tracto reproductivo de la hembra (Rota *et al.*, 1997), así como de la conservación de su capacidad fecundante (King *et al.*, 1967).

En lo que respecta a esta tesis, después de comparar los valores obtenidos para los parámetros objetivos de motilidad entre las muestras espermáticas recién descongeladas y después de someterlas a 2 horas de incubación a 37°C, se ha comprobado la existencia de un descenso significativo ($p < 0,001$) en los valores de las tres variables de velocidad (VCL, VSL y VAP) y en los índices LIN y STR. Solamente los valores medios de ALH y BCF fueron ligeramente más altos después de la incubación de las muestras, aunque el aumento de estos valores no fue significativo. Por tanto, podemos decir que hay una pérdida de la

calidad del movimiento de los espermatozoides de ciervo ibérico después del proceso de incubación.

En cuanto a la comparación entre los valores de los parámetros objetivos de motilidad tras la incubación, y los valores iniciales, se observó un descenso en todos los parámetros excepto en los de VCL, ALH, y BCF, que experimentaron un ligero incremento tras la incubación, resultados que pueden asociarse al hecho de que la incubación podría inducir cierto grado de capacitación en los espermatozoides.

Comparando estos resultados con los de otros trabajos realizados también con muestras epididimarias de ciervo ibérico que siguieron la misma metodología, Ortiz (1999) observó que a pesar del descenso en todos los valores de calidad seminal después de la incubación, el porcentaje de espermatozoides móviles resistía bien el proceso y Soler (2003) encontró resultados similares trabajando también con espermatozoides de epidídimo de esta misma subespecie.

En otro estudio realizado por Fernández-Santos *et al.* (2007) con espermatozoides epididimarios descongelados de ciervo ibérico, también se produjo una pérdida de motilidad después de incubarlos durante 2 horas a 37°C. La criopreservación afecta a los espermatozoides a muchos niveles, siendo especialmente importantes las modificaciones en la membrana plasmática, con alteraciones en los lípidos que provocan efectos como mal funcionamiento enzimático o aumento de la permeabilidad. Así, en un estudio sobre el estrés oxidativo en espermatozoides de ciervo rojo se comprobó que, tras la incubación de las muestras descongeladas a 37°C durante 2 y 4 horas, la incubación por sí misma ocasionó un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y una disminución de la motilidad espermática (Domínguez-Rebolledo *et al.*, 2010, 2011).

Rota *et al.* (2005) han comprobado que los valores de los parámetros objetivos de motilidad en los espermatozoides descongelados de perro, descendían significativamente para todos los valores excepto para VCL y ALH tras su incubación durante 2 horas a 37°C. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en ciervo ibérico, aunque en el caso del semen de perro se observó un aumento de VCL tras la incubación (de $136,7 \pm 4,9$ a $157 \pm 8,2$ $\mu\text{m/s}$) que no se produjo en ciervo.

Respecto al aumento de ALH después de la incubación de las muestras, ésta podría afectar a parámetros relacionados con la capacitación como resultado de la criopreservación (Rota *et al.*, 1999); aunque hay que tener en cuenta que los espermatozoides todavía podrían regular su capacitación y reacción acrosómica a pesar de que los mecanismos de regulación espermáticos puedan estar afectados por la criopreservación, (Pons-Rejraji *et al.*, 2009).

Asimismo, Garde *et al.* (2003) evaluaron diferentes diluyentes para la congelación de semen de gacela, observando un descenso importante en la motilidad espermática y en la integridad del acrosoma y de la membrana plasmática después de incubar las muestras espermáticas durante 2 h a 37°C. No obstante hay que tener en cuenta que las muestras de semen utilizadas en este estudio para *G. cuvieri* fueron de baja calidad. Además, en los intentos de criopreservación de semen llevados a cabo en *G. dorcas* y *G. dama* (Holt *et al.*, 1996), sólo se ha conseguido un éxito limitado (Howard *et al.*, 1981, 1983).

Estas diferencias en la motilidad de los espermatozoides tras la incubación, podrían explicarse por el alto grado de variación en las características seminales a nivel interespecífico, lo que podría ocasionar diferencias en la resistencia de sus espermatozoides a la criopreservación. Así, se ha observado que la sensibilidad al choque de frío es diferente en los espermatozoides de las distintas especies animales (Parks y Lynch, 1992; Drobnis *et al.*, 1993).

Por otro lado, en un estudio sobre la motilidad y la resistencia osmótica en semen de morueco, Peris *et al.* (1999) obtuvieron resultados parecidos a los obtenidos en ciervo ibérico, pues comprobaron que se producían pequeños descensos en los valores objetivos de VCL y del índice LIN tras la incubación del semen durante 30 minutos, manteniéndose BCF con valores similares.

Estos descensos en los parámetros de motilidad durante la incubación, podría asociarse al descenso gradual de la capacidad de las mitocondrias de la pieza media del flagelo para generar ATP como consecuencia del envejecimiento mitocondrial (Cummins *et al.*, 1994; Vishwanath y Shannon, 1997), o al efecto tóxico producido por el proceso degenerativo

debido a la descomposición de los tejidos en el epidídimo a medida que transcurre el tiempo después de la muerte del animal (Turner, 2006).

En general, la presencia de mitocondrias activas es fundamental para el mantenimiento de muchas funciones espermáticas, incluyendo la regulación osmótica, la integridad de la membrana, y la maduración y capacitación (Silva y Gazella, 2006; Aitken *et al.*, 2007). Las membranas de los espermatozoides son muy susceptibles al ataque de las especies reactivas del oxígeno (ROS) debido a su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, habiéndose sugerido por parte de algunos autores, que las ROS generadas durante la incubación podrían llevar a cambios apoptóticos (Taylor *et al.*, 2004). Así, en ciervo rojo se estudiaron las relaciones entre los cambios apoptóticos en la membrana plasmática, los descensos del potencial de la membrana mitocondrial y los posibles cambios de volumen en los espermatozoides, concluyendo que la pérdida de calidad tras la incubación podría deberse a alteraciones subletales en el plasmalema precedidas por la pérdida de actividad mitocondrial. (Martínez-Pastor *et al.* 2008).

Otra explicación de los cambios en los modelos de motilidad de los espermatozoides tras la incubación podrían ser las diferencias en los niveles de Ca^{2+} , pues se ha comprobado que hay diferentes mecanismos intracelulares involucrados en la regulación de la motilidad espermática, que pueden ser característicos de cada especie, como ya se ha sugerido para el proceso de capacitación (Tardiff *et al.*, 2003; Pons-Rejraji *et al.*, 2009).

Finalmente, los resultados después de 2 horas de incubación muestran un descenso significativo ($p < 0,001$) en los valores de las tres variables de velocidad y de los índices LIN y STR respecto a los valores observados tras la descongelación, lo que supone una pérdida de velocidad y progresividad de los espermatozoides. Los únicos valores medios que se mostraron ligeramente superiores después de la incubación de las muestras fueron ALH y BCF, lo que parece indicar una disminución en la progresividad de las trayectorias. Por tanto, de lo anteriormente expuesto podría deducirse que se ha producido una disminución de la calidad del movimiento de los espermatozoides de ciervo ibérico después del proceso de incubación, cuando se compara con los valores medidos inmediatamente después de la descongelación.

Como conclusión podría decirse que, al igual que en el resto de especies estudiadas, en ciervo también se observa una pérdida de calidad en la motilidad de los espermatozoides en la evaluación posterior al proceso de incubación, aunque en el caso del ciervo ibérico podría calificarse como moderada.

2.2. RELACIÓN ENTRE EL ANÁLISIS CONVENCIONAL DE CALIDAD SEMINAL Y LA EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD POR CASA.

2.2.1. INTRODUCCIÓN

Uno de los parámetros más usados en el análisis seminal es la estimación de la motilidad, y precisamente buscando una forma de obtener datos objetivos de la motilidad de los espermatozoides, en 1979 se empezaron a utilizar los primeros sistemas semiautomáticos basados en grabaciones realizadas con videocámara y, en los años 80, se consiguieron los primeros datos sobre motilidad y morfología de espermatozoides individuales, observándose que las células con morfología anormal no se movían o lo hacían con más dificultad (Overstreet *et al.* 1981). Estos resultados fueron apoyados más tarde por Morales *et al.* (1988), al observar que los espermatozoides de individuos infértiles nadaban con mucha más lentitud que aquellos obtenidos de individuos con fertilidad normal.

La determinación subjetiva del porcentaje de espermatozoides móviles y la calidad del movimiento son parámetros muy utilizados en la valoración de la calidad seminal, existiendo una gran disparidad en los resultados obtenidos entre individuos y entre laboratorios. Por este motivo, la OMS (1993) designó los sistemas que utilizan programas informáticos como los más adecuados para obtener una información más amplia y fiable sobre la calidad seminal.

Por lo tanto, y puesto que un análisis integral es muy difícil de desarrollar debido a la gran complejidad inherente a la función espermática (Amann y Hammerstedt, 1993; Graham, 1996; Caiza de la Cueva, 1998), se han buscado otros métodos para caracterizar adecuadamente las muestras espermáticas y poder conocer su capacidad fecundante.

Estos métodos podrían ser los basados en pruebas funcionales que evalúan aspectos responsables de la interacción entre espermatozoides y ovocitos (o que las asemejan), o la utilización de métodos objetivos de análisis de semen asistidos por ordenador. Estos últimos, proporcionan una serie de parámetros de los espermatozoides que pueden ayudar a establecer los criterios necesarios para clasificar una muestra espermática (Esteso, 2006), así como a predecir su resistencia a la congelación (Davis *et al.*, 1995b; Holt, 1996; Abaigar *et al.*, 1999; Quintero-Moreno *et al.*, 2004; Martínez-Pastor *et al.*, 2005c) y su capacidad fecundante (Malo *et al.*, 2005a; 2005b; Gomendio *et al.*, 2007; Ramón *et al.*, 2013).

En el año 2000, el 79% de los laboratorios usaban métodos manuales de evaluación de semen, frente al 15% que utilizaban métodos de análisis asistidos por ordenador (CASA) (Brooks *et al.*, 2000), y a pesar de que en la actualidad la metodología CASA está reconocida como método objetivo de análisis de semen, algunos investigadores han planteado la dificultad de la estandarización y por consiguiente de la comparación de los resultados obtenidos mediante un sistema CASA entre laboratorios, poniendo como ejemplo las diversas condiciones en las que se han desarrollado los trabajos en distintas especies y en el hombre (Davis y Katz, 1992; Mortimer, 1997; De Geyter *et al.*, 1998; Abaigar *et al.*, 1999; Hiraí *et al.*, 2001). Por ello, la comparación sobre las mismas muestras entre los parámetros obtenidos por CASA y los observados visualmente en el microscopio, puede ayudar a valorar la conveniencia del uso de los sistemas CASA para evaluar de forma rápida y estandarizada la calidad de las muestras espermáticas.

En este sentido, hay diversos trabajos que indican la existencia de asociaciones entre los valores obtenidos subjetivamente y los aportados por CASA en distintas especies animales: en semen fresco y congelado de vacuno, porcino y caprino (Tuli *et al.* 1992), en humano (Johnston *et al.*, 1995; Krause, 1995; Hirano *et al.*, 2001; Álvarez 2003), en semen canino (Iguer-ouada y Verstegen, 2001; Rijsselaere *et al.* 2005), en semen de paloma (Klimowicz *et al.*, 2008) y en semen de morueco (Bravo *et al.*, 2010, 2011).

En lo que respecta al ciervo ibérico, en un estudio realizado con muestras epididimarias se comprobó que, los parámetros subjetivos de calidad evaluados después del proceso de congelación-descongelación, explicaban una mayor proporción de la variabilidad

observada en la congelabilidad que los parámetros subjetivos de las muestras iniciales (Soler, 2003).

Por lo tanto, en este apartado de la tesis se ha pensado realizar una evaluación de las distintas relaciones entre las variables de motilidad de los espermatozoides epididimarios de ciervo ibérico, utilizando además de la analítica convencional, un sistema informatizado de análisis de imágenes CASA, tanto en muestras frescas como descongeladas.

2.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

2.2.2.1. MUESTRAS RECIÉN OBTENIDAS

Después de la recogida del material espermático en PBS y de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 1.2 de esta tesis, se realizó la contrastación seminal. Se evaluaron los parámetros cuantitativos iniciales de volumen (V), concentración (C), y número total de espermatozoides (NTE), además de los parámetros de calidad inicial: porcentaje de espermatozoides móviles (MI), calidad del movimiento (CM), porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal (NAR), porcentaje de espermatozoides con membrana espermática funcional (ENDO), número de espermatozoides vivos (EV), porcentaje de espermatozoides normales con gota citoplasmática distal (GOT3), proximal (GOT2), y sin gota (GOT1).

En cuanto al análisis objetivo de motilidad, se consideraron los valores obtenidos por el sistema CASA para VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH y BCF.

Para el análisis estadístico de los resultados se trabajó con los datos procedentes de los epidídimos de 181 venados que proporcionaron 16.800 espermatozoides en muestras frescas, reduciéndose a 13.900 en muestras descongeladas. Una vez obtenidos los valores de las variables de motilidad proporcionados por el sistema CASA, junto con los datos obtenidos tras la contrastación seminal subjetiva, se archivaron en las correspondientes tablas de Microsoft Office Excel® (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) para su posterior estudio mediante el programa estadístico SPSS.

Como primer paso del análisis estadístico, se realizó un análisis descriptivo, seguido de un análisis de correlación entre los propios parámetros rutinarios de calidad, y entre éstos y los parámetros objetivos de motilidad. Después, se evaluó la influencia de los parámetros rutinarios de calidad seminal inicial sobre los parámetros objetivos de motilidad medidos por CASA, a partir de un análisis de regresión lineal.

Mediante el estudio de la correlación entre las variables espermáticas se determinaron los diferentes coeficientes de correlación lineal de Pearson, junto con los valores de significación correspondientes según el test de correlación, con el fin de comprobar si el grado de asociación lineal era estadísticamente significativo.

2.2.2.2. MUESTRAS DESCONGELADAS

Después de la recogida del material espermático en PBS, se realizó una nueva contrastación seminal según las pruebas ya descritas en el capítulo 1.2 de esta tesis. En esta contrastación posterior al proceso de congelación-descongelación, se evaluaron los parámetros cuantitativos V, C y EV, además de los parámetros de calidad MI, NAR, ENDO y EV. No se realizaron evaluaciones sobre la existencia o no de gota citoplasmática, porque durante el proceso de congelación-descongelación gran parte de las gotas citoplasmáticas suelen desprenderse de los espermatozoides (O'Connell *et al.*, 2002; Herrick *et al.*, 2004; Anel-López *et al.*, 2012).

Para el análisis objetivo de motilidad, se consideraron los valores obtenidos por el sistema CASA para VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH y BCF, que fueron evaluados inmediatamente después de la descongelación de las muestras.

En cuanto al análisis estadístico, se procedió de forma similar a lo descrito anteriormente para muestras recién obtenidas; es decir, después de realizar el análisis descriptivo, se hicieron análisis de correlación entre los parámetros rutinarios de calidad tras la descongelación, y entre éstos y los parámetros objetivos de motilidad a la descongelación. Asimismo, para evaluar la influencia de los parámetros de calidad seminal inicial sobre los parámetros objetivos de motilidad, se efectuó un análisis de regresión lineal.

2.2.3. RESULTADOS

2.2.3.1. MUESTRAS RECIÉN OBTENIDAS

La tabla 6 muestra los valores descriptivos de los parámetros cuantitativos y cualitativos de las muestras epididimarias de ciervo ibérico recién obtenidas. El número de espermatozoides clasificados como normales se valoró en un $78,96 \pm 1,13$ %.

En la tabla 7 se detallan los resultados obtenidos después de realizar un análisis de correlación entre los distintos factores rutinarios de calidad seminal. Estos análisis han evidenciado la existencia de correlaciones entre la mayoría de los parámetros estudiados, aunque casi todas las correlaciones son menores de 0,6.

Los resultados después de calcular los coeficientes de correlación de Pearson entre los factores rutinarios de calidad del semen y los parámetros objetivos de motilidad, mostraron que tanto la velocidad lineal (VSL) como el índice de rectitud (STR) están influidos significativamente por la variable porcentaje de espermatozoides móviles (MI). También se observó que el porcentaje de endósmosis positiva (ENDO) influyó significativamente en la velocidad de la trayectoria media (VAP). Por último, el porcentaje de espermatozoides con borde apical normal (NAR) influyó en la velocidad curvilínea (VCL) (tabla 8).

Tabla 6. Parámetros cuantitativos y de calidad seminal de las muestras espermáticas obtenidas postmortem.

| Parámetro seminal | Media | Desviación Estandar | Rango |
|---------------------------|---------|---------------------|----------|
| V (mL) | 1,30 | 0,3 | 1-2 |
| C (x 10 ⁶ /mL) | 1219,43 | 887,83 | 19-4840 |
| NTE (x 10 ⁶) | 1689,45 | 1585,83 | 16-10648 |
| MI (%) | 61,15 | 16,98 | 10-90 |
| CM (de 0 a 5) | 2,77 | 0,59 | 0,5-4 |
| NAR (%) | 91,36 | 11,06 | 39-100 |
| ENDO (%) | 87,31 | 7,64 | 39-99 |
| EV (%) | 89,44 | 5,95 | 68-99 |
| GOT1 (%) | 10,41 | 9,40 | 0-73 |
| GOT2 (%) | 10,78 | 16,05 | 0-98 |
| GOT3 (%) | 78,81 | 18,21 | 0-99 |

V: volumen; C: concentración; NTE: número total de espermatozoides; MI: porcentaje de espermatozoides móviles; CM: calidad del movimiento; NAR: acrosomas normales; ENDO: endósmosis positiva; EV: espermatozoides vivos; GOT1: espermatozoides sin gota citoplasmática; GOT2: espermatozoides con gota proximal; GOT3: espermatozoides con gota distal.

Tabla 7. Correlaciones de Pearson (r) entre los principales parámetros rutinarios de calidad seminal en muestras epididimarias de ciervo ibérico.

| | V | C | NTE | GOT1 | GOT2 | MI | NAR | ENDO | EV |
|-------------|----------|----------|----------|---------|----------|----------|----------|---------|----------|
| V | | 0,648** | 0,761** | -0,137* | -0,178** | -0,130 | 0,229** | 0,005 | 0,195** |
| C | 0,648** | | 0,95 | -0,122 | -0,327** | -0,002 | 0,260** | 0,021 | 0,239** |
| NTE | 0,761** | 0,957** | | -0,130 | -0,272** | -0,083 | 0,229** | -0,030 | 0,213** |
| GOT1 | -0,137* | -0,122 | -0,130 | | -0,048 | -0,010 | -0,028 | -0,138* | -0,058 |
| GOT2 | -0,178** | -0,327** | -0,272** | -0,048 | | -0,195** | -0,241** | -0,072 | -0,219** |
| MI | -0,130 | -0,002 | -0,083 | -0,010 | -0,195** | | 0,098 | 0,305** | 0,189** |
| NAR | 0,229** | 0,260** | 0,229** | -0,028 | -0,241** | 0,098 | | 0,213** | 0,339** |
| ENDO | 0,005 | 0,021 | -0,030 | -0,138* | -0,072 | 0,305** | 0,213** | | 0,323** |
| EV | 0,195** | 0,239** | 0,213** | -0,058 | -0,219** | 0,189** | 0,339** | 0,323** | |

* la correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

V: volumen; C: concentración; NTE: número total de espermatozoides; GOT1: espermatozoides sin gota citoplasmática; GOT2: espermatozoides con gota proximal; MI: porcentaje de espermatozoides móviles; NAR: acrosomas normales; ENDO: endósmosis positiva; EV: espermatozoides vivos.

Tabla 8.-. Correlaciones de Pearson (r) entre los parámetros rutinarios de calidad seminal y los parámetros objetivos de motilidad obtenidos mediante CASA en muestras epididimarias de ciervo ibérico.

| | VCL | VSL | VAP | LIN | STR | ALH | BCF |
|-------------|---------|---------|----------|--------|---------|---------|---------|
| V | 0,10 | 0,12 | 0,13 | 0,10 | 0,11 | - 0,12 | - 0,09 |
| C | 0,13 | 0,12 | 0,141 * | 0,06 | 0,01 | - 0,13 | - 0,13 |
| NTE | 0,13 | 0,140* | 0,152* | 0,09 | 0,04 | -0,150* | -0,149* |
| GOT1 | 0,00 | -0,06 | -0,06 | -0,05 | -0,04 | 0,04 | 0,07 |
| GOT2 | -0,09 | 0,08 | 0,05 | 0,157* | 0,11 | -0,06 | 0,06 |
| MI | 0,168* | 0,212** | 0,170* | 0,178* | 0,186** | 0,03 | 0,12 |
| NAR | 0,220** | 0,09 | 0,14 | -0,05 | -0,10 | 0,150* | -0,01 |
| ENDO | -0,174* | -0,149* | -0,189** | -0,06 | -0,01 | -0,04 | -0,02 |
| EV | 0,14 | 0,07 | 0,10 | 0,03 | 0,02 | 0,04 | -0,01 |

* la correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

V: volumen; C: concentración; NTE: número total de espermatozoides; GOT1: espermatozoides sin gota citoplasmática; GOT2: espermatozoides con gota proximal; MI: porcentaje de espermatozoides móviles; NAR: acrosomas normales; ENDO: endósmosis positiva; EV: espermatozoides vivos.

Tabla 9. Significación (valor de P) de cada variable incluida en el análisis de regresión entre los parámetros objetivos de motilidad y los parámetros rutinarios de calidad.

| | MI | NAR | ENDO | CM | NTE | GOT1 | GOT2 | C |
|-----|--------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|-------|
| VCL | 0,012 | 0,003 | <0,001 | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| VSL | <0,001 | n.s. | 0,004 | n.s. | 0,029 | n.s. | n.s. | n.s. |
| VAP | | n.s. | 0,010 | <0,001 | 0,011 | n.s. | n.s. | n.s. |
| SRT | n.s. | n.s. | n.s. | <0,001 | 0,008 | n.s. | 0,006 | 0,013 |
| LIN | n.s. | n.s. | n.s. | <0,001 | 0,017 | n.s. | <0,001 | n.s. |
| ALH | n.s. | 0,041 | n.s. | 0,018 | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| BCF | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | 0,015 | n.s. | n.s. |

(* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n.s. no significativo)

Por otra parte, después de realizar un análisis estadístico de regresión múltiple con los parámetros de calidad seminal inicial como variables predictoras, y los parámetros objetivos de motilidad como variables dependientes, se pudo comprobar que a pesar de que la mayoría de las variables rutinarias de calidad seminal inicial afectaban a varios de los parámetros cinéticos estudiados, en la mayoría de los casos no lo hacían de forma significativa. Las variables independientes incluidas en los modelos que resultaron ser significativas fueron: MI, NAR y ENDO, pero NTE, CM, GOT1 y GOT2 también mostraron influencia, aunque débilmente. Las ecuaciones predictivas fueron las siguientes:

$$\begin{aligned} \text{VCL} &= (102,90 \pm 24,19) + (0,22 \pm 0,09) \text{MI} + (0,37 \pm 0,12) \text{NAR} - (0,81 \pm 0,21) \text{ENDO} \\ R^2 &= 0,138; P < 0,001 \\ \text{VSL} &= (99,93 \pm 18,89) - (0,63 \pm 0,22) \text{ENDO} + (0,33 \pm 0,09) \text{MI} + (0,002 \pm 0,001) \text{NTE} \\ R^2 &= 0,140; P < 0,001 \\ \text{VAP} &= (64,78 \pm 27,02) - (0,80 \pm 0,22) \text{ENDO} + (0,20 \pm 0,09) \text{GOT2} + (0,32 \pm 0,13) \text{NAR} + (8,19 \pm 2,46) \text{CM} \\ R^2 &= 0,217; P < 0,001 \\ \text{LIN} &= (42,79 \pm 4,7) + (0,19 \pm 0,06) \text{GOT2} + (0,21 \pm 0,06) \text{MI} \\ R^2 &= 0,121; P = 0,001 \\ \text{STR} &= (62,36 \pm 3,6) + (0,12 \pm 0,04) \text{GOT2} + (6,81 \pm 1,22) \text{CM} + (0,005 \pm 0,002) \text{NTE} - (0,007 \pm 0,003) \text{C} \\ R^2 &= 0,159; P < 0,001 \\ \text{ALH} &= (2,99 \pm 0,49) + (0,01 \pm 0,01) \text{NAR} - (0,03 \pm 0,01) \text{MI} + (0,02 \pm 0,01) \text{GOT1} \\ R^2 &= 0,101; P < 0,01 \\ \text{BCF} &= (42,17 \pm 41,58) + (0,04 \pm 0,02) \text{GOT1} \\ R^2 &= 0,108; P < 0,01 \end{aligned}$$

Respecto a las velocidades objetivas, el análisis de regresión ha mostrado la existencia de una correlación significativa con ENDO y con MI para VCL y VSL. Con CM ha resultado una relación significativa para VAP y, de VSL y VAP con NTE. No obstante hay que señalar que el valor predictivo fue bajo.

Por otro lado, los índices STR y LIN se han correlacionado con NTE, CM, y GOT 2. En estos casos el valor predictivo también ha sido bajo, pero las correlaciones han sido altamente (NTE) y muy altamente significativas (CM, GOT 2).

Por último señalar, que no se han observado relaciones significativas entre el resto de variables independientes y los parámetros objetivos de motilidad, exceptuando el caso del porcentaje de espermatozoides normales sin gota citoplasmática (GOT1) que ha mostrado una tendencia a la significación con BCF.

2.2.3.2. MUESTRAS DESCONGELADAS

En la tabla 10 se muestra la estadística descriptiva de los parámetros cualitativos correspondientes a las muestras epididimarias descongeladas.

En la tabla 11 se detallan los resultados obtenidos después de realizar un análisis de correlación entre los distintos factores de calidad seminal a la descongelación.

En la tabla 12 se detallan los resultados obtenidos después de realizar un análisis de correlación entre los parámetros rutinarios de calidad seminal y los parámetros objetivos de motilidad, tras la descongelación.

Al comparar los valores de los parámetros rutinarios de calidad, antes y después de la congelación, mostrados en las tablas 6 y 10 respectivamente, se evidencia que la calidad seminal inicial disminuye tras la descongelación de las muestras espermáticas. Asimismo, al realizar el análisis de comparación de medias entre los valores de calidad seminal de las muestras frescas y tras la descongelación, se encontraron diferencias significativas para todas las variables de calidad seminal determinadas ($p < 0,001$), siendo mayor siempre el valor de los parámetros iniciales de calidad.

Por otro lado, tras la descongelación de las muestras espermáticas se realizaron análisis de correlación entre los parámetros rutinarios de calidad seminal indicados en la tabla 11 llegándose a la conclusión de que todas las variables estaban correlacionadas entre sí

($P < 0.01$), y especialmente con MId (porcentaje de espermatozoides móviles tras la descongelación), ($r > 0,5$).

Tabla 10. Parámetros de calidad seminal evaluados después del proceso de congelación-descongelación de las muestras espermáticas.

| Parámetro | Valor medio \pm desviación estándar | Rango |
|-----------|---------------------------------------|---------|
| MId (%) | 51,32 \pm 17,61 | 0 - 80 |
| NARd (%) | 79,26 \pm 10,94 | 27 - 97 |
| ENDOd (%) | 65,25 \pm 16,50 | 16 - 99 |
| EVd (%) | 77,23 \pm 10,77 | 40 - 98 |

MId: espermatozoides móviles descongelación; NARd: acrosomas normales descongelación; ENDOd: endósmosis positiva descongelación; EVd: espermatozoides vivos descongelación .

Tabla 11. Correlaciones de Pearson (r) entre los factores de calidad seminal a la descongelación.

| | Esperm normales (NARd) | Esperm endósmosis + (ENDOd) | Espermatozoides vivos (EVd) | Espermatozoides móviles (MId) |
|---------------------------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Esp. acrosomas normales (NARd) | | 0,492 ** | 0,510 ** | 0,615 ** |
| Espermat endósmosis + (ENDOd) | 0,492 ** | | 0,496 ** | 0,526 ** |
| Espermatozoides vivos (EVd) | 0,510 ** | 0,496 ** | | 0,639 ** |
| Espermatozoides móviles (MId) | 0,615 ** | 0,526 ** | 0,639 ** | |

MId: espermatozoides móviles descongelación; NARd: acrosomas normales descongelación; ENDOd: endósmosis positiva descongelación; EVd: espermatozoides vivos descongelación.

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla 12. Correlaciones de Pearson (r) entre los parámetros rutinarios de calidad seminal a la descongelación y los parámetros cinemáticos objetivos tras la descongelación obtenidos mediante CASA.

| | VCL (\square m/s) | VSL (\square m/s) | VAP (%) | LIN (%) | STR (%) | ALH (\square m) | BCF (Hz) |
|---|----------------------|----------------------|----------|----------|---------|--------------------|----------|
| Esper. vivos (EVd) | 0,233 ** | 0,233 ** | 0,227 ** | 0,130 | 0,006 | 0,010 | - 0,065 |
| Esperm. móviles (MId) | 0,470 ** | 0,414 ** | 0,431 ** | 0,211 ** | 0,060 | 0,168 * | - 0,091 |
| Esper. acrosomas normales (NARd) | 0,281 ** | 0,317 ** | 0,278 ** | 0,207** | 0,141* | 0,049 | 0,056 |
| E.endósmosis+(ENDOd) | 0,122 | 0,117 | 0,093 | 0,039 | 0,029 | 0,046 | 0,063 |

MId: espermatozoides móviles descongelación; NARd: acrosomas normales descongelación; ENDOd: endósmosis positiva descongelación; EVd: espermatozoides vivos descongelación.

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral); * la correlación es significante al nivel 0,05 (bilateral).

Tabla 13. Significación de cada variable incluida en el análisis de regresión entre las velocidades objetivas y los índices LIN y STR, y los parámetros rutinarios de calidad a la descongelación.

| | MIId | ENDOd | NARd |
|------------|-------------|--------------|-------------|
| VCL | < 0.01 | 0,015 | n.s. |
| VSL | < 0.01 | 0,040 | 0,015 |
| VAP | < 0.01 | 0,015 | n.s. |
| LIN | 0,024 | n.s. | 0,045 |
| STR | n.s. | n.s. | 0,049 |

(n.s. no significativo)

Asimismo, se realizaron los correspondientes análisis de correlación de Pearson entre las velocidades obtenidas por CASA y los parámetros rutinarios de calidad tras la descongelación (tabla 12), comprobándose que las tres velocidades objetivas estaban relacionadas con el porcentaje de espermatozoides vivos (EVd), la porcentaje de espermatozoides móviles (MIId) y el porcentaje de espermatozoides con acrosomas normales (NARd). Asimismo, LIN se correlacionó con MIId y en menor medida con NARd. No obstante señalar, que el grado de relación o dependencia fue bajo en casi todos los casos.

En cuanto a los resultados de los análisis de regresión, en las ecuaciones predictivas y en la tabla 13 puede verse que tanto MIId como ENDOd explican las tres velocidades objetivas tras la descongelación. NARd pudo ser incluida como variable explicativa para VSL, LIN y STR, pero el resto de parámetros rutinarios de calidad después de la descongelación no presentaron una aportación significativa a ninguno de los modelos que pudiera explicar los parámetros objetivos de motilidad a la descongelación.

Las ecuaciones predictivas se detallan a continuación:

$$VCLd = (82,62 \pm 14,09) + (0,82 \pm 0,13) DMI - (0,24 \pm 0,11) DENDO$$

$$R^2=0,250; P<0,001$$

$$VSLd = (31,7 \pm 13,42) + (0,6 \pm 0,125) DMI + (0,43 \pm 0,173) DNAR - (0,215 \pm 0,104) DENDO$$

$$R^2=0,211; P<0,001$$

$$VAPd = (48,56 \pm 15,09) + (0,77 \pm 0,14) DMI - (0,285 \pm 0,12) DENDO$$

$$R^2=0,221; P<0,001$$

2.2.4. DISCUSIÓN

Los valores de las características seminales en el ciervo ibérico obtenidas en esta tesis son comparables con lo reportado por otros autores en distintas especies de cérvidos. Así, el porcentaje de espermatozoides móviles (61 %) obtenido es comparable a los observados por Garde *et al.*, (1998), Gizejewski *et al.* (1998), Soler *et al.* (2003d), Martínez-Pastor *et al.*, (2005c), Malo *et al.* (2005a) y Martínez *et al.* (2008) para espermatozoides de epidídimo de esta misma subespecie. Asimismo, se han obtenido resultados similares en estudios realizados con muestras de epidídimo de ciervo rojo europeo (Krzywinski, 1981; Miles *et al.*, 1992), ciervo de Eld (Monfort *et al.*, 1994) y ciervo rojo de Brocked (*Mazama americana*) (Diniz *et al.*, 2013). En otros trabajos como los realizados con ciervo sika (72%) (Hishinuma *et al.*, 2003), (77 %) (Cheng *et al.*, 2004), con ciervo sambar (82 %) (*cervus unicolor*) (Cheng *et al.*, 2004) y con ciervo de Cola blanca (75%) (Saenz *et al.*, 2007), se han obtenido porcentajes de motilidad más altos.

En cuanto al porcentaje de espermatozoides normales observado en ciervo ibérico (79%), ha sido muy similar a los obtenidos por Soler y Garde (2003) (75%); Malo *et al.* (2005a) (77%) y por Martínez-Pastor *et al.* (2008) (77%) para espermatozoides de epidídimo de esta misma subespecie, así como a los reportados por Saenz *et al.* (2007) (74%) para ciervo de Cola blanca, y Diniz *et al.* (2013) (74 %) para ciervo rojo de Brocked. Sin embargo, Veldhuizen encontró porcentajes superiores en semen de ciervo rojo europeo (83%) y de gamo (91%), al igual que Montfort *et al.* (1993) en espermatozoides de epidídimo de ciervo de Eld (entre 88 y 95%).

La tasa de viabilidad espermática observada en esta tesis (89%) ha sido comparable a las reportadas por Garde y Soler (2003) (83%) y por Fernández-Santos *et al.* (2007) (81%) también en ciervo ibérico, y a la comprobada por Rittem *et al.* (2012) para las subespecies de ciervo de Eld, (*cervus. eldii siamensis* (89%) y *cervus. eldii thamin* (88%). En ciervo sambar (*cevus unicolor*) EV fue algo menor (entre 70-79 %).

En cuanto al porcentaje de integridad acrosómica (NAR) obtenido (91%), ha sido del orden de los observados por Soler y Garde (2003) (92%), Malo *et al.* (2005) (87 %) y por

Martínez *et al.* (2008) (89%) también en ciervo ibérico, siendo además parecido al reportado por Hishinuma *et al.* (2003) para espermatozoides de epidídimo de ciervo sika (96%). Sin embargo, en otros casos y trabajando también con espermatozoides de epidídimo de ciervo ibérico, los porcentajes de NAR obtenidos han sido menores. (Garde *et al.* 1998 (60%), Soler y Garde 2003 (74,7%) y Fernández-Santos *et al.* 2007 (82%)).

La comparación de la tasa de respuesta al test hipoosmótico entre la observada en esta tesis (87%) y las reportadas en otros estudios, siguió una dinámica parecida, pues fue muy similar a las observadas también en ciervo ibérico por Soler (2003), (87%) y Fernández-Santos *et al.* (2007) (84%), y superior a la obtenida por Garde *et al.* (1998) (72%).

Las diferencias obtenidas con respecto a los resultados de Garde *et al.* (1998), Soler y Garde (2003) y Fernández-Santos *et al.* (2007), podrían explicarse porque en estos casos se recogieron las muestras en época de berrea, lo que pudo ocasionar la obtención de peores resultados en los análisis de las características seminales debido a que es la época en la que se produce el número máximo de cubriciones. En este sentido, McMillan *et al.* (1998) observaron que el porcentaje de espermatozoides móviles en rumiantes se incrementaba al finalizar la época de berrea, sucediendo algo parecido en ciervo rojo europeo en referencia a las proporciones de formas anormales, que fueron menores al finalizar la berrea (Gizejewski *et al.* 1998).

Asimismo, Martínez-Pastor *et al.* (2005b) comprobaron que los porcentajes de motilidad, de espermatozoides vivos y de acrosomas normales de las muestras epididimarias de ciervo ibérico, eran mayores después de la época de berrea que durante la misma. Una posible explicación podría ser la existencia de hipermaduración como consecuencia de un mayor tiempo de almacenamiento de los espermatozoides en el epidídimo, que en este caso resultaría en una mejora de la motilidad.

A pesar de que en este tipo de ungulados no hay demasiados resultados publicados, existen diferentes estudios realizados en otras especies como morueco y macho cabrío (Ollero *et al.*, 1996; Shamsuddin *et al.*, 2000) que demuestran que una elevada frecuencia de recogida de semen puede afectar a la calidad seminal, habiéndose observado en verraco un incremento de formas anormales y una disminución de la motilidad (Bonet *et al.*, 1993;

Strzezek *et al.*, 1995) por esta causa. Del mismo modo, en gacela dama (*Gazella dama mhorr*) también se relacionó el aumento de los defectos en el acrosoma con la frecuencia de recogida de semen (Holt *et al.*, 1996b).

Respecto a las relaciones encontradas entre los parámetros rutinarios de calidad, el análisis de proporcionalidad ha mostrado la existencia de correlaciones altamente significativas entre la concentración (C), el número total de espermatozoides (NTE) y el volumen (V).

El porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática en posición proximal, ha mostrado una correlación negativa con todos los parámetros rutinarios de calidad excepto con el porcentaje de espermatozoides con gota en posición distal y con ENDO. De igual modo se han observado relaciones significativas entre EV, NAR y ENDO; y también entre MI, ENDO y EV.

Estos resultados son similares a los obtenidos para muestras epididimarias de ciervo ibérico por Malo *et al.* (2005a), pues también en este caso el volumen se correlacionó con la concentración espermática y con el número de espermatozoides, observándose además una fuerte asociación entre EV y NAR. Esta asociación se observó asimismo en semen de morueco, ya que NAR y EV se correlacionaron positivamente ($p < 0,01$) tanto antes de la congelación ($r = 0,32$), como después de la descongelación ($r = 0,51$).

Esta respuesta es la que cabía esperar teniendo en cuenta que la membrana plasmática debe estar intacta para que las funciones y el metabolismo de los espermatozoides puedan ser los adecuados, por lo que porcentajes apropiados de ENDO y EV, es normal que se relacionen con valores de NAR también apropiados (Soler y Garde, 2003).

Asimismo, el hecho de que estos valores sean altos podría deberse a que por ser esenciales para la fecundación, en las poblaciones naturales se hayan seleccionado los machos cuyo semen presentaba una mayor calidad y por tanto se ha producido una estabilización en valores altos de EV y NAR (Malo *et al.*, 2005a).

La motilidad de los espermatozoides es una manifestación de la competencia estructural y funcional de espermatozoide; por lo que los porcentajes de espermatozoides móviles y

progresivos, están normalmente correlacionados de forma positiva con la integridad de la membrana plasmática (Kumi-Diaka, 1993; Rodríguez-Gil *et al.*, 1994) y la morfología normal (Ellintong *et al.*, 1993).

En lo referente a las variables de calidad inicial estudiadas en esta tesis que han mostrado estar relacionadas significativamente con algunos de los parámetros objetivos de motilidad, han sido: la calidad de movimiento (CM), el porcentaje de espermatozoides móviles (MI), el porcentaje de espermatozoides con acrosomas normales (NAR) y el porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva (ENDO).

En primer lugar, NTE se ha asociado con VAP, VSL, LIN y STR ($p < 0,05$), pero teniendo en cuenta que el número de variables incluido en el modelo de regresión ha sido alto, con el resultado obtenido no puede asegurarse que la relación sea significativa. Lo mismo ha ocurrido con la asociación entre C y VAP ($p < 0,05$).

No obstante, en otro estudio realizado también con muestras epididimarias de ciervo ibérico, Malo *et al.* (2005a) comprobaron la existencia de una fuerte asociación entre la producción espermática y las velocidades objetivas, sugiriendo además que en las poblaciones naturales de ciervo, los venados con altas tasas de fecundidad producen un número elevado de espermatozoides que nadan a gran velocidad. Asimismo, en semen de morueco se ha observado una relación significativa entre C y las velocidades objetivas VSL y VAP (Parrilla-Hernández *et al.*, 2012).

Una explicación de la relación hallada entre la concentración y la velocidad de los espermatozoides, podría ser la vinculación de ambas con una espermatogénesis apropiada.

En lo referente al porcentaje subjetivo de espermatozoides móviles, en esta tesis se ha relacionado positivamente con todos los parámetros cinéticos objetivos excepto con ALH y BCF. No obstante, la relación sólo puede considerarse significativa al nivel $p < 0,01$ con VSL y STR. Estos resultados son compatibles con los reportados por Bravo *et al.* (2011) en morueco, pues hallaron relaciones significativas ($p < 0,01$) entre MI y las tres velocidades objetivas y STR.

Pero la mayor parte de los estudios de comparación entre parámetros de semen rutinarios y objetivos se han realizado en semen humano, habiéndose encontrado correlaciones entre algunos de ellos. Así, Johnston *et al.* (1995) observaron correlaciones entre MI y las tres velocidades objetivas además de LIN. Asimismo, Krawse (1995) halló relaciones entre los valores de motilidad obtenidos por CASA y los evaluados visualmente, aunque la correlación fue baja, lo que podría deberse a que la asignación de espermatozoides a los diferentes tipos de motilidad depende de su velocidad, siendo la estimación de la velocidad por el ojo humano muy imprecisa. Álvarez (2003) también comprobó la existencia de correlaciones entre el MI y los parámetros VCL, VSL, VAP y ALH en semen humano.

En lo que respecta a la presencia de gota citoplasmática en posición distal (GOT3), en muestras espermáticas procedentes de la cola del epidídimo puede considerarse normal (Cooper y Yeung, 2003; Gizejewski, 2004; Tajik y Asan-Nejad Lamsou, 2008) ya que es una característica común en muchas especies (Salisbury, 1961; Amman *et al.*, 1982; White 1993; Garde *et al.*, 1998; Soler 2003; Gizejewski, 2004, Cooper, 2005; 2010; Martínez *et al.*, 2008; Anel-López *et al.*, 2012).

En los rumiantes, la gota citoplasmática permanece adherida a la pieza intermedia mientras el espermatozoide está en el epidídimo, produciéndose un aumento significativo del porcentaje de gota citoplasmática distal y un descenso de la proximal (GOT2) conforme las células se aproximan a la cola del epidídimo para desaparecer cuando entran en contacto con el plasma seminal durante la eyaculación (Cooper, 2005).

En el caso concreto del ciervo ibérico, se han observado diferencias importantes entre las muestras procedentes de electroeyaculación y de epidídimo (1,5% vs. 83%) (Martínez *et al.*, 2008). Asimismo, se ha comprobado que la gota citoplasmática suele perderse en una parte de los espermatozoides durante la criopreservación (Anel-López *et al.* 2012).

En lo que se refiere a esta tesis, el 79% de los espermatozoides presentaron gota citoplasmática en posición distal, siendo esta cifra similar a la obtenida en esta misma subespecie por Garde *et al.* (1998), Ortiz (1999) y Martínez *et al.* (2008), y a la observada por Gizejewski (2004) en ciervo rojo. La tasa de células espermáticas con gota proximal fue del 10%.

En cuanto a la relación entre la presencia de GOT2 con el resto de los parámetros rutinarios de calidad, se ha relacionado negativamente con V, C, NTE, MI, NAR y EV, siendo la relación en todos los casos significativa al nivel $p < 0,01$. Asimismo, la relación hallada en esta tesis para GOT2 con los parámetros objetivos de motilidad, se ha relacionado positivamente con LIN, aunque hay que decir que el índice de correlación ha sido bajo ($r=0,16$) y el nivel de significación también ($p < 0,05$).

En otros trabajos se han obtenido resultados variables. Así, en semen humano, la presencia de GOT2 se asoció a una motilidad pobre (Zini *et al.*, 1998), habiéndose relacionado además con morfologías anormales de la cabeza y pieza intermedia (Huszar y Vigue, 1993; Gómez *et al.*, 1996; Gergely *et al.*, 1999) y una menor capacidad fecundante (Keating *et al.*, 1997). Los mecanismos por los que se produce un anormal exceso de retención de citoplasma ocasionando las gotas citoplasmáticas, se ha asociado a altos niveles de peroxidación de los lípidos en los espermatozoides (Aitken *et al.*, 1994; Huszar y Vigue, 1994; Ollero *et al.*, 2000).

En verraco, la gota en posición distal en espermatozoides de eyaculado se ha relacionado con la reducción del número de gestaciones, así como del porcentaje y tamaño de la camada (Waberski *et al.* 1994), aunque hay que decir que también había presencia de gotas proximales en estos machos. Del mismo modo, se ha hallado una correlación negativa entre el porcentaje de morfoanomalías y la existencia de gotas citoplasmáticas con el índice de unión de los espermatozoides al epitelio oviductal (Petrunkina *et al.*, 2001).

Sin embargo, en otro estudio realizado con semen de verraco, se observó que algunas morfoanomalías clásicas parecían no tener demasiada importancia en el análisis de fertilidad, sobre todo en el caso de la presencia de gota citoplasmática proximal (Quintero-Moreno; 2003).

En espermatozoides de perro (Nothling *et al.*, 1997), se comprobó que las muestras que presentaban un porcentaje más alto de GOT-3 se correlacionaban positivamente con los parámetros indicadores de la progresividad de los espermatozoides (VSL, VAP, LIN y

STR), no obstante, había una relación negativa con la motilidad después de la descongelación.

Por lo tanto, hay una gran variabilidad en los resultados obtenidos al estudiar las relaciones de GOT2 y GOT3 con otros parámetros de calidad, tanto rutinarios como objetivos, de los espermatozoides.

Respecto a las diferencias con los resultados obtenidos en esta tesis, podrían deberse al distinto origen de las muestras, ya que en los trabajos referidos los espermatozoides procedían de eyaculado, no considerándose normal la presencia de gota citoplasmática (Ombelet *et al.*, 1995; Amann *et al.*, 2000; Cooper, 2005) en los mismos, pues en el caso de eyaculados, las gotas citoplasmáticas podrían estar asociadas a alteraciones de la función espermática y a espermatozoides estructural y funcionalmente inmaduros (Amann *et al.* 2000; Soler 2003; Cooper, 2005).

Como conclusión puede decirse que los parámetros rutinarios de calidad observados en esta tesis, han sido similares a los comprobados en otros trabajos para esta misma subespecie, habiéndose observado además correlaciones positivas entre los parámetros objetivos de motilidad y algunos de los parámetros rutinarios de calidad de las muestras epididimarias frescas, especialmente con el porcentaje de porcentaje de espermatozoides móviles (MI).

En cuanto al proceso de congelación-descongelación, en esta tesis se ha seguido la metodología de criopreservación de espermatozoides basada en las pautas establecidas por Ortíz (1999) para muestras epididimarias de ciervo ibérico.

En primer lugar indicar que, al igual que en trabajos anteriores (Ortiz, 1999; Soler, 2003), todos los parámetros rutinarios de calidad han disminuido de manera significativa después de la descongelación de los espermatozoides, siendo el porcentaje de respuesta al test hipoosmótico (ENDOd), el parámetro rutinario de calidad más afectado tras el proceso de congelación-descongelación, y por lo tanto la integridad de la membrana plasmática.

Además, los análisis de correlación realizados entre los parámetros rutinarios de calidad, han mostrado la existencia de asociaciones entre todos los parámetros estudiados ($r \geq 0,5$; $p < 0,01$), especialmente en el caso del porcentaje de espermatozoides móviles tras la descongelación (MI_d).

En estudios anteriores realizados en muestras epididimarias de ciervo ibérico, también se obtuvieron resultados similares. Así, tanto Ortiz (1999) como Soler (2003) y Fernández-Santos *et al.* (2007), comprobaron que después del proceso de congelación-descongelación, los parámetros rutinarios de calidad seminal disminuían significativamente con respecto a los valores iniciales para todos los parámetros evaluados. En las especies más sensibles al proceso de congelación-descongelación, el daño ocasionado podría ser físico, mientras que en especies más resistentes, como parece ser el caso del ciervo, los daños serían más bien de origen bioquímico, manifestándose en forma de sutiles alteraciones en la membrana (Nuñez-Martínez *et al.*, 2006).

Sin embargo, al comparar estos resultados con los obtenidos por otros autores en otras especies, se puede comprobar que las muestras epididimarias de ciervo ibérico conservan bastante bien las características de motilidad tras la descongelación, resultados que se corresponden con los observados en otras especies y subespecies de cérvidos como el ciervo de cola blanca (Platz *et al.*, 1982, Jacobson *et al.*, 1989), ciervo rojo europeo (Veldhuizen, 1994), ciervo sika (Hishinuma, 2003) y ciervo de Eld (Monfort *et al.*, 1993; Ritten *et al.*, 2012). Algo similar se ha observado en el caso de la integridad de la membrana plasmática, tanto en esta tesis en ciervo ibérico, como en ciervo de Cola blanca (Platz *et al.*, 1982), ciervo sika (Hishinuma, 2003) y ciervo sambar (Cheng *et al.*, 2004), pues a pesar de haber descendido tras la descongelación, el daño debido a la misma ha sido moderado. Algo similar ha ocurrido con el parámetro NAR_d en ciervo ibérico, tanto en esta tesis como en los resultados comprobados por Martínez-Pastor *et al.* (2006b).

Respecto al análisis de correlación entre los parámetros rutinarios de calidad y los parámetros objetivos de motilidad tras la descongelación, en esta tesis se ha comprobado que MI_d se asocia significativamente ($p < 0,01$) con todas las variables excepto con SRT y BCF. El porcentaje de espermatozoides con acrosomas normales (NAR_d) se ha correlacionado significativamente ($p < 0,01$) con las tres velocidades objetivas,

especialmente con VSL ($r=0,317$) y con los parámetros indicadores de la progresividad de los espermatozoides (LIN y STR), y el porcentaje de espermatozoides vivos (EVd) se ha asociado a las tres velocidades objetivas ($r=0,23$; $p<0,01$). Por último, la tasa de espermatozoides con respuesta positiva a la prueba de endósmosis (ENDOd), no mostró relación con ninguno de los los parámetros objetivos de motilidad.

2.3. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE FACTORES EXTRÍNSECOS E INTRÍNSECOS AL MACHO SOBRE LOS PARÁMETROS DE MOTILIDAD EN MUESTRAS EPIDIDIMARIAS.

2.3.1. INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo tienen un alto grado de madurez y funcionalidad (Turner, 1995), y por lo tanto pueden mantenerse criopreservados en nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización en IA (Foote, 2000). Pero antes de congelarlos deben evaluarse convenientemente para asegurarse de que se encuentran en buen estado y de que poseen la calidad necesaria. Así, hay que tener en cuenta variables como la condición de los animales y la época en la que se han obtenido los espermatozoides, las cuales pueden afectar en gran medida a la calidad de la muestra espermática (Garde *et al.*, 1998; Kaabi *et al.*, 2003)

La influencia de la época del año en la producción de semen y su calidad, se ha considerado en gran medida como un factor de gran impacto (Martínez-Pastor *et al.*, 2005b) para la mayoría de las especies que han evolucionado en climas templados y fríos, como el ciervo ibérico, pues estas especies regulan sus patrones reproductivos en base a señales ambientales, lo que origina variaciones más o menos marcadas en su comportamiento, condición corporal y parámetros reproductivos.

Marshall (1937) observó que los cambios estacionales de los ciervos rojos estaban controlados por el fotoperíodo, cuando los ciervos se trasladaron desde Escocia a Nueva Zelanda, para ser después reimportados de nuevo a Inglaterra. Sin embargo, fue Jaczewski

(1954) quien demostró experimentalmente el efecto del fotoperíodo en el crecimiento de la cuerna de los machos de ciervo.

Debido al efecto del fotoperíodo, en las especies de ciervos que habitan en zonas templadas se producen cambios estacionales en el aparato reproductor de los animales, en sus características sexuales secundarias y en su conducta sexual, relacionados con los cambios estacionales en la secreción de testosterona (ciervo de Cola blanca: Wislocki 1949; Bubenik, 1983; corzo: Sholt y Mann 1966; ciervo rojo: Lincoln 1971; reno: Whitehead y McEwan 1973; Mirarchi *et al.* 1975; ciervos de cola negra: West y Nordan 1976; Leader Williams 1979; wapiti: Haigh *et al.* 1984; gamo: Asher *et al.*, 1989).

Asimismo, los caracteres sexuales accesorios como cuerna, pelaje, musculatura y olor de los machos, se desarrollan durante los meses previos a la época de berrea junto con el aumento progresivo de las concentraciones de testosterona en sangre y en paralelo a los cambios en el comportamiento hasta la llegada del celo, cuando las concentraciones en sangre de testosterona se acercan al valor máximo estacional (Lincoln, 1985)

La razón de que el fotoperíodo sea el responsable de los cambios reproductivos estacionales, se basa en que para una latitud dada los cambios en el fotoperíodo son constantes entre años, no estando sometidos a una gran variación anual como puede ocurrir con la temperatura, las precipitaciones, la disponibilidad de alimento y otros factores ambientales que justifican la adopción de un patrón estacional (Bronson 1985).

Así, la mayoría de los ungulados presenta un período de estacionalidad reproductiva en el que los machos muestran importantes cambios en la condición corporal, el ciclo de la cuerna, la musculatura del cuello y tamaño e histología de los testículos (Hochereau *et al.*, 1978; Gosch y Fischer, 1989; Asher y Fisher, 1991; Malo *et al.*, 2005b), que están estrechamente relacionados con la actividad sexual (Lincoln, 1979; Brown *et al.*, 1991).

De hecho, las mismas hormonas controlan ambos tipos de cambios, siendo la testosterona un importante regulador tanto del crecimiento de la cuerna, como de la espermatogénesis (Lincoln y Kay, 1979; Brown *et al.*, 1991).

En el caso concreto de los cérvidos, se han observado grandes variaciones debidas a la estación en la calidad y cantidad de semen (Asher *et al.*, 1993; Gizejewski, 2004; Martínez-Pastor *et al.*, 2005b; Ungerfeld *et al.*, 2008), existiendo además un período de quiescencia testicular durante la primavera y el verano en el cual los machos son infértiles (Suzuki *et al.*, 1992; Blottner *et al.*, 1995; Asher, 1998). Esta disminución de la calidad seminal fuera del período reproductivo puede llevar también asociada una disminución de la resistencia a la congelación (Haigh *et al.*, 1984; Haigh *et al.*, 1985; Gosh y Fischer, 1989; Ciereszko *et al.*, 2000; Soler, 2003).

Pero el fotoperíodo no es el único factor que afecta a la producción espermática o a las características de motilidad, habiéndose comprobado en ungulados, que también se encuentran influenciadas por otros factores como la edad del animal, la frecuencia de eyaculación, y la genética (Amann y Almquist, 1962; Gosch y Fischer, 1989; Ollero *et al.*, 1996; Garde *et al.*, 1998; Roldán *et al.*, 1998; Garde *et al.*, 1999; Gomendio *et al.*, 2000; Anel *et al.*, 2001, Brito *et al.*, 2002; Thurston *et al.*, 2002; Soler, 2003; Gizejewski, 2004; Malo *et al.*, 2005b). Por lo tanto, la motilidad inicial de las muestras espermáticas epididimarias podría estar asociada a alteraciones funcionales y estructurales de las células espermáticas por algunos de los factores expuestos.

En lo que respecta a la congelación de espermatozoides, durante años se ha estudiado la criopreservación de muestras seminales de ciervo rojo (Jaczewski *et al.* 1978; Krzywinski 1981; Sipko *et al.* 1997), habiéndose conseguido refrigerar y congelar muestras de semen de estos animales en cautividad (Gordon 1997; Asher *et al.* 2000). Sin embargo, aunque en los últimos años ha mejorado considerablemente el uso de técnicas de reproducción asistida en los cérvidos, existen pocos trabajos en los que se haya comprobado si determinadas características de los individuos influyen sobre la resistencia a la congelación, pues algunas de ellas podrían estar relacionadas con las diferencias individuales entre animales. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de estudio y recogida de datos básicos que permitan mejorar los conocimientos existentes sobre la influencia de los parámetros intrínsecos y extrínsecos en la calidad espermática para su aplicación en la optimización de los protocolos de criopreservación de espermatozoides, especialmente en los procedentes de epidídimo. De este modo se podría comprobar si la motilidad postdescongelación en las muestras espermáticas epididimarias, podría estar

asociada a algún tipo de alteraciones de las células espermáticas por algunos de estos factores.

Por lo tanto, para intentar mejorar los resultados de la IA con semen descongelado, es importante estudiar los factores que pueden afectar a la producción espermática y a las características de motilidad de los espermatozoides después del proceso de criopreservación, pues se ha comprobado que tanto la edad (Garde *et al.*, 1998), como la condición corporal o el índice testicular (Soler, 2003; Malo *et al.*, 2005b; Martínez-Pastor *et al.*, 2008), podrían estar relacionados con la resistencia a la congelación, y en consecuencia con los parámetros de motilidad a la descongelación.

Por ello, en esta tesis se ha evaluado cómo afectan determinadas características extrínsecas e intrínsecas al macho como son el mes de recogida de los espermatozoides, la edad de los animales, su condición corporal y el índice testicular, en la calidad espermática medida a partir de los valores objetivos de motilidad obtenidos mediante CASA, tanto en muestras epididimarias frescas, como en muestras descongeladas de ciervo ibérico.

2.3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para realizar estos experimentos se utilizaron las mismas muestras espermáticas evaluadas en apartados anteriores, realizándose una primera evaluación con material seminal recién recuperado de la cola del epidídimo.

También se utilizaron las mismas muestras espermáticas evaluadas en apartados anteriores para estudiar las correlaciones entre los parámetros cinéticos objetivos después de la descongelación de las muestras, y los factores intrínsecos y extrínsecos al macho.

Tanto en muestras recién obtenidas, como en las descongeladas, el único parámetro extrínseco que se estudió fue el mes de recogida de las muestras espermáticas epididimarias, mientras que entre los factores intrínsecos al macho se evaluaron la edad, el índice de grasa renal, el perímetro torácico, y el índice testicular.

2.3.2.1 - MUESTRAS RECIÉN OBTENIDAS

2.3.2.1.1. Parámetros extrínsecos al macho.

Los meses en los que se recogieron los testículos de los machos abatidos fueron: octubre, noviembre, diciembre, enero, y febrero. Estas muestras se recogieron durante 2 temporadas de caza consecutivas: 1999/00, y 2000/01.

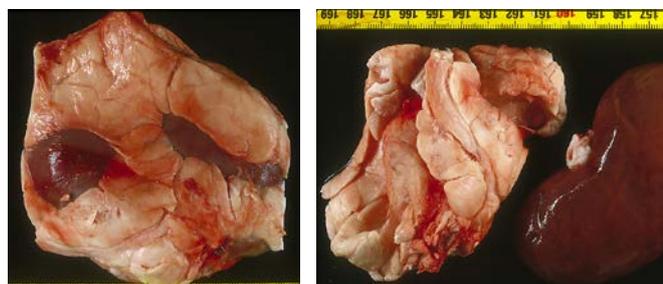
En cuanto al análisis estadístico, en primer lugar se hicieron estudios descriptivos de los parámetros objetivos de motilidad medidos mediante CASA en cada uno de los meses estudiados. Después se realizó un análisis de varianza utilizando un modelo lineal general, en el que la variable independiente fue el mes de obtención de las gónadas, y las variables dependientes los parámetros cinéticos objetivos obtenidos mediante el sistema CASA para las muestras recién obtenidas, las analizadas después de la descongelación, y por último los obtenidos después de dos horas de incubación de las muestras.

2.3.2.1.2. Parámetros intrínsecos al macho.

La edad de los venados se expresó en años y fue determinada en el laboratorio Matson's de Milltown, en Montana (EEUU). La técnica utilizada se basa en realizar una estimación de la edad a partir de determinadas líneas del cemento de los dientes (Mitchell, 1963).

En cuanto a la condición corporal, se estimó a partir de la cantidad de grasa acumulada alrededor del riñón, siendo ésta una buena indicadora de la misma (Riney, 1955). Para estimar la condición corporal de los animales, se determinó un índice indicativo de grasa renal representado por el peso de la grasa renal dividido por el peso del riñón, y expresado en porcentaje (Figura 16).

Figura 16. Fotografías mostrando la grasa que recubre los riñones



Para medir el perímetro torácico se utilizó una cinta métrica con la que se rodeó el tórax. Las dos puntas de la cinta se colocaron juntas, y se anotó la circunferencia medida. El índice testicular se calculó como la media entre el volumen y la anchura, dividiendo la cifra resultante entre el perímetro torácico.

Por último, para conocer el tamaño testicular, se midieron los perímetros y los diámetros de los testículos. La relación entre estas medidas y el perímetro torácico, nos permite calcular el índice testicular. Utilizando este índice ha podido corregirse el tamaño testicular, relacionándolo con el tamaño corporal.

En cuanto al análisis estadístico de los resultados, se realizó un análisis de correlación de Pearson entre todos estos parámetros (edad, condición corporal, y tamaño testicular), con el fin de conocer la dependencia entre ellos. Cuando resultaron ser parámetros independientes, se estudió la relación entre los parámetros objetivos de motilidad y dichos parámetros. Así, se realizó un análisis de regresión múltiple entre los parámetros intrínsecos de los animales como variables predictoras, y los parámetros objetivos de motilidad medidos mediante CASA como variables dependientes.

Por último, las muestras se clasificaron en tres grupos de edad, uno para animales menores de 4 años, otro para edades comprendidas entre 4 y 9 años, y un tercer grupo para los que superaban los 9 años de edad. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para estudiar la existencia de diferencias entre cada uno de los parámetros objetivos de motilidad y los diferentes grupos de edad, realizándose después un análisis de regresión lineal.

2.3.2.2- MUESTRAS DESCONGELADAS

2.3.2.2.1. Parámetros extrínsecos al macho.

El diseño experimental fue igual al descrito en el apartado anterior para muestras espermáticas epididimarias recién obtenidas. El objeto de este análisis fue estudiar la existencia de diferencias en los valores de los parámetros objetivos de motilidad dados por

el sistema CASA después de la descongelación, en función del mes de recogida del material seminal desde el epidídimo.

Respecto al análisis estadístico, se realizaron estudios descriptivos de los parámetros objetivos de motilidad medidos mediante CASA para cada uno de los meses estudiados. Posteriormente se hizo un análisis de varianza utilizando un modelo lineal general, cuya variable independiente fue el mes de obtención de las gónadas, siendo las variables dependientes los parámetros objetivos de motilidad obtenidos para las muestras descongeladas.

2.3.2.2.2. Parámetros intrínsecos al macho.

Como ya se ha explicado en el apartados anteriores, la edad de los venados se expresó en años y fue determinada en el laboratorio Matson's, en Montana (EEUU). La condición corporal se estimó a partir de la cantidad de grasa acumulada alrededor del riñón mediante la utilización del índice indicativo de grasa renal. Dicho índice representa el peso de la grasa renal, dividido entre el peso del riñón.

El perímetro torácico, el tamaño testicular, y los diámetros de los testículos, se midieron utilizando una cinta métrica no elástica tal y como se ha descrito en el apartado 2.3.2.1 de esta tesis. El índice testicular se calculó como la media entre la altura y la anchura de los testículos, dividiendo la cifra resultante entre el perímetro torácico.

Se hicieron análisis estadísticos descriptivos de los parámetros intrínsecos al macho, realizándose además un análisis de correlación entre estos parámetros (edad, condición corporal y tamaño testicular) con el fin de conocer la dependencia entre ellos. Cuando resultaron ser parámetros independientes, se estudió la relación entre los parámetros objetivos de motilidad y los parámetros intrínsecos mediante un análisis de regresión múltiple, siendo los parámetros corporales de los animales las variables predictoras, y los parámetros objetivos de motilidad medidos mediante CASA después de la descongelación, las variables dependientes.

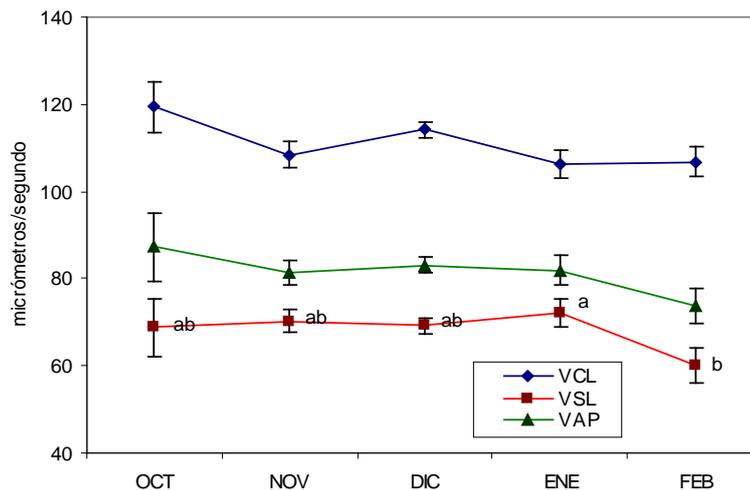
2.3.3. RESULTADOS

2.3.3.1 - EFECTO DEL MES DE OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS SOBRE LOS PARÁMETROS OBJETIVOS DE MOTILIDAD EN MUESTRAS EPIDIDIMARIAS RECIÉN OBTENIDAS

El análisis de varianza ANOVA ha mostrado que existen diferencias significativas entre los diferentes meses estudiados para los parámetros VSL, LIN, STR y ALH. En el caso concreto de LIN y STR, el efecto del mes ha sido muy altamente significativo ($p < 0,001$), y muy significativo en el caso de ALH ($p < 0,01$). Por último, el parámetro VCL ha mostrado tendencia a la significación ($p < 0,1$).

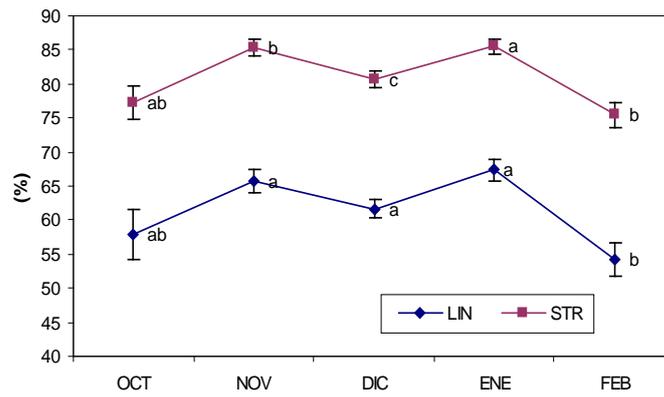
En las figuras 17, 18 y 19, se detallan los valores medios \pm el error estándar de la media en los meses de obtención de las muestras para los principales parámetros de motilidad en las muestras epididimarias recién obtenidas.

Figura 17. Medias \pm sem de los valores medios de VCL, VSL y VAP evaluados en meses diferentes.



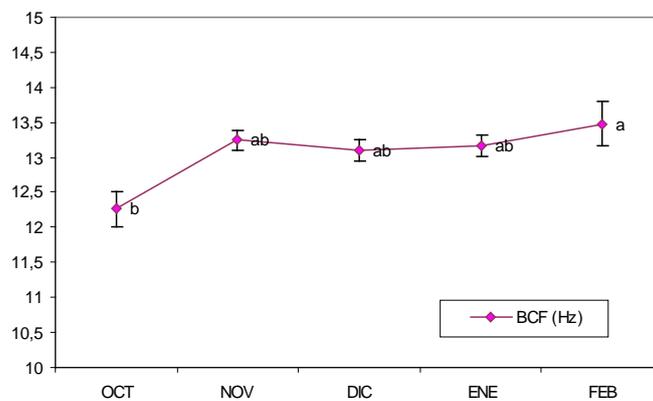
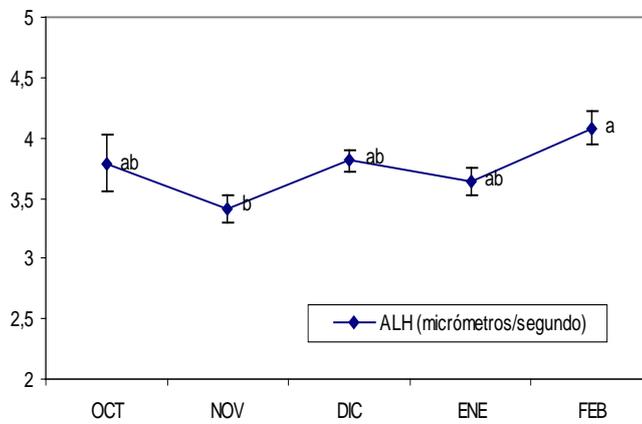
Índices diferentes (a, b) indican diferencias significativas: $P < 0,05$

Figura 18. Medias \pm sem de los valores medios de LIN y STR evaluados en meses diferentes



Índices diferentes (a, b) indican diferencias significativas: $P < 0,05$

Figura 19. Medias \pm sem de los valores medios de ALH y BCF evaluados en meses diferentes.



Índices diferentes (a, b, c) indican diferencias significativas: $P < 0,05$

Como puede observarse en las figuras 17, 18 y 19, los valores más bajos, tanto para los tres tipos de velocidades, como para LIN y STR, se midieron en febrero al final de la estación reproductiva. Los valores más altos se observaron en octubre para las tres velocidades, mientras que para LIN y STR fueron en noviembre y enero. Ocurrió lo contrario para los valores de ALH y BCF, que mostraron los valores más bajos en los meses de noviembre y octubre respectivamente, mientras que los más altos se observaron en febrero.

2.3.3.2 - EFECTO DEL MES DE OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS SOBRE LOS PARÁMETROS OBJETIVOS DE MOTILIDAD DESPUÉS DE LA DESCONGELACIÓN.

Una vez realizado el análisis de varianza, se comprobó que existe un efecto significativo del mes con los parámetros objetivos de motilidad a la descongelación, con la única excepción de la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (tabla 14). El grado de significación fue muy alto para las tres variables de velocidad, así como para el índice de linealidad.

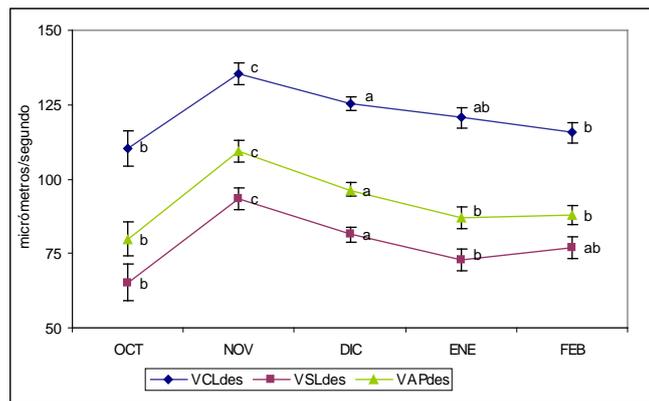
Tabla 14. Efecto del mes sobre los parámetros objetivos de motilidad en muestras espermáticas epididimarias descongeladas de ciervo ibérico.

| Mes | Variable dependiente | Significación |
|-----|----------------------|---------------|
| | VCL | *** |
| | VSL | *** |
| | VAP | *** |
| | LIN | *** |
| | STR | ** |
| | ALH | n.s. |
| | BCF | * |

(* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n.s. no significativo)

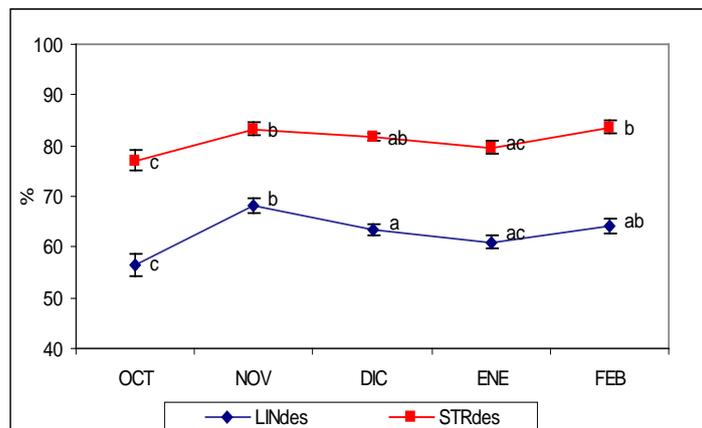
En las figuras 20, 21 y 22, se detallan los valores medios \pm el error estándar de la media de los parámetros de motilidad tras la descongelación en los meses de obtención de las muestras epididimarias de ciervo.

Figura 20. Medias \pm SEM para los valores medios de VCL, VSL y VAP en espermatozoides epididimarios descongelados según meses.



Índices diferentes (a, b, c) indican diferencias significativas: $P < 0,05$

Figura 21. Medias \pm SEM para los valores medios de LIN y STR en espermatozoides epididimarios descongelados según meses.



Índices diferentes (a, b, c) indican diferencias significativas: $P < 0,05$

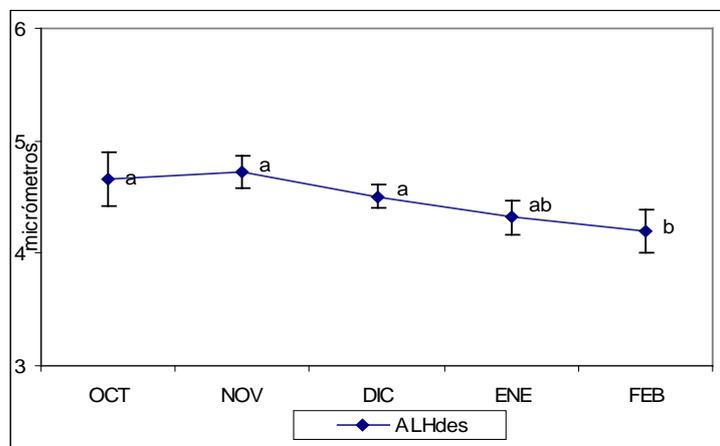
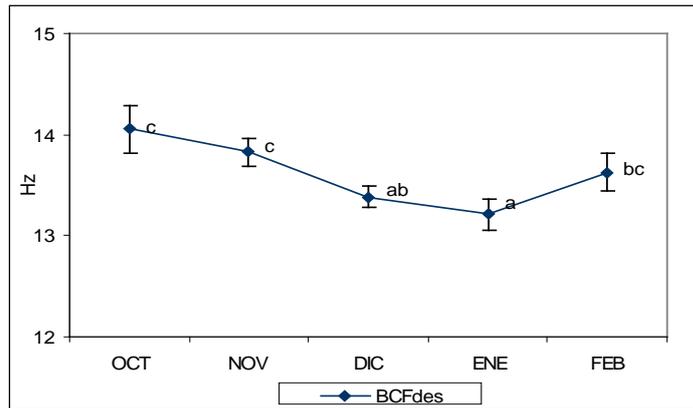


Figura 22. Medias \pm SEM para los valores medios de ALH y BCF en espermatozoides epididimarios descongelados según meses.



Índices diferentes (a, b, c) indican diferencias significativas: $P < 0,05$

En las figuras anteriores puede verse que los valores más bajos de los parámetros de VCL, VSL, VAP, LIN y STR corresponden al mes de octubre, y los más altos al mes de noviembre para todas las variables excepto para STR, cuyo valor máximo se observó en febrero. Los valores obtenidos para ALH y BCF apenas mostraron diferencias entre meses, correspondiendo los valores más bajos al mes de enero para la BCF, y al mes de febrero para ALH, mientras que los valores más altos para estos dos parámetros correspondieron a los meses de octubre y noviembre. Además, se hallaron diferencias significativas entre meses para la mayoría de las variables dependientes

2.3.3.3 EFECTO DE LA EDAD SOBRE LOS PARÁMETROS OBJETIVOS DE MOTILIDAD EN MUESTRAS EPIDIDIMARIAS RECIÉN OBTENIDAS.

En las figuras 23, 24 y 25 se muestran los valores medios y el error estándar de la media de los parámetros objetivos de motilidad obtenidos inmediatamente después de la extracción de las muestras espermáticas. Los animales tenían edades comprendidas entre los 2 y los 12 años.

Asimismo, para estudiar la influencia de las edades de los animales sobre los parámetros objetivos de motilidad, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), comprobándose que la edad no ejerce ningún efecto significativo sobre los parámetros estudiados.

Figura 23. Valores medios y error medio estándar de las velocidades objetivas VCL, VSL y VAP para las edades estudiadas.

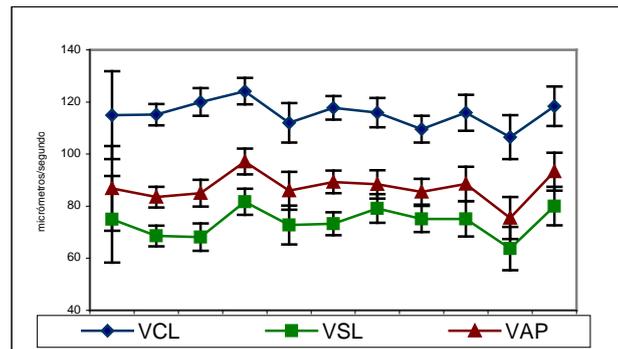


Figura 24. Valores medios y error medio estándar de LIN, y STR para las edades estudiadas.

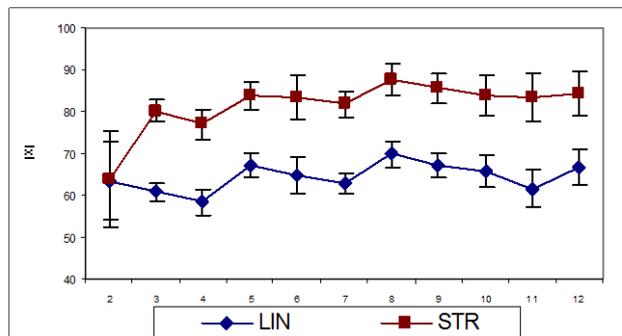
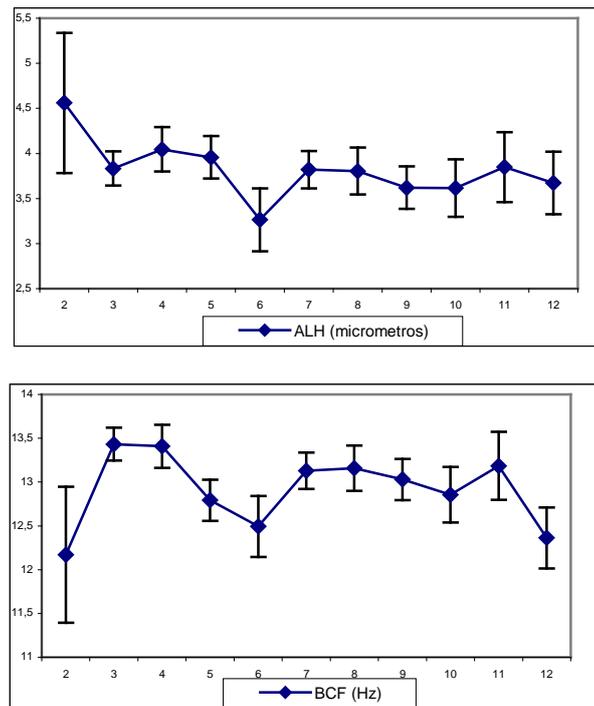


Figura 25. Valores medios y error estándar de la media de ALH y BCF para las edades estudiadas.



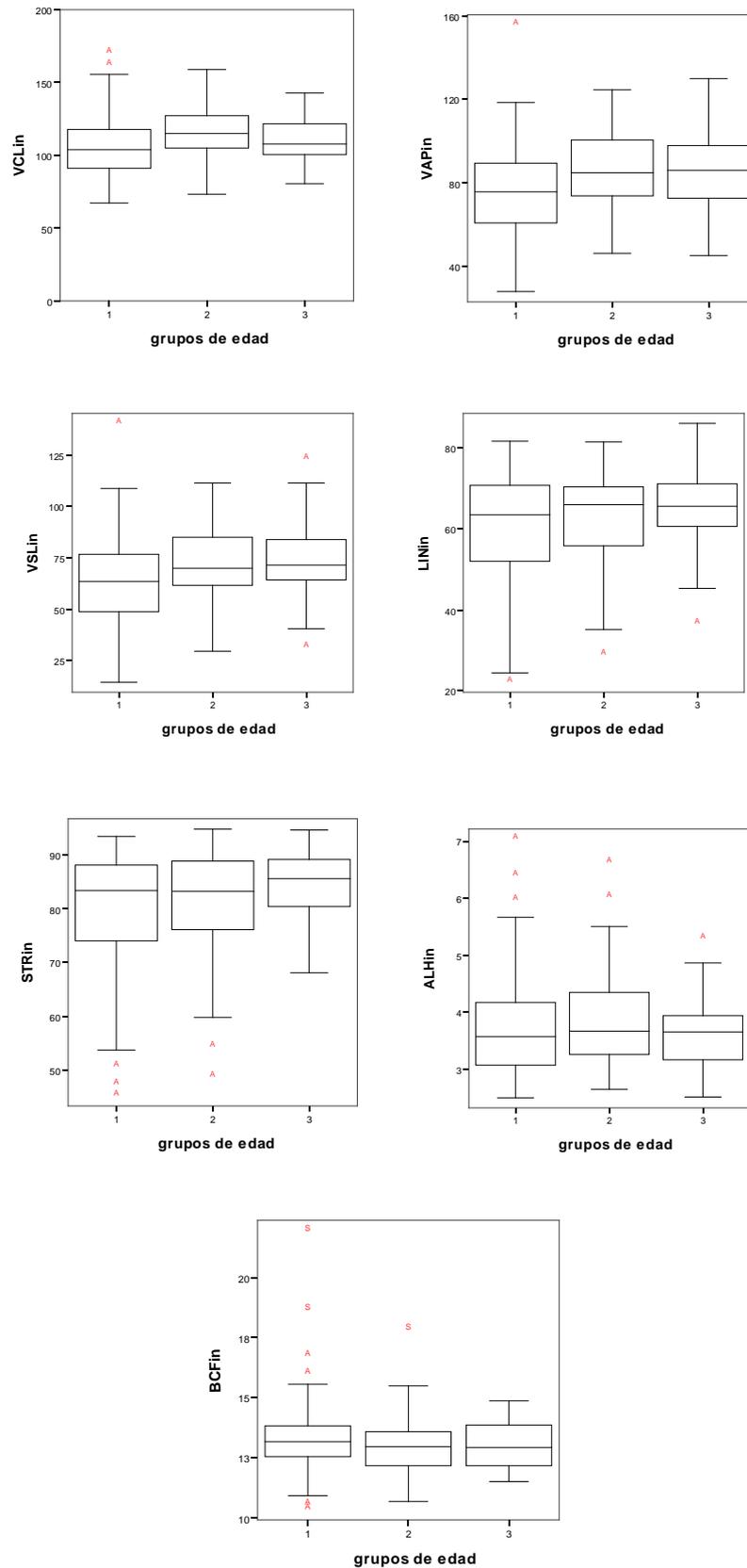
En las figuras anteriores puede comprobarse que los parámetros objetivos de velocidad con valores más altos se obtuvieron para los machos de 5 años de edad, y los más bajos para los de 11 años. Para los índices LIN y STR los valores más bajos se obtuvieron para los machos más jóvenes (de 2 a 4 años de edad), y los más altos para los ciervos de 8 años. Por último, los parámetros ALH y BCF presentaron los valores más bajos para los animales de 6 años, y los más bajos para los animales de 3-4 años. No obstante es importante señalar, que no se aprecian diferencias significativas con la edad del animal en ninguna de las medidas obtenidas mediante CASA para los parámetros objetivos descritos.

Sin embargo, al estudiar la influencia de la edad en los parámetros objetivos de motilidad después de realizar una clasificación de los animales en tres grupos de edad, se comprobó que si existían diferencias significativas para las tres velocidades objetivas (VCL, VAP, y VSL). Así, en la figura 26 se detallan los gráficos de caja correspondientes a los parámetros objetivos de motilidad para los distintos grupos de edad, en los que puede verse que el análisis ANOVA presenta diferencias significativas para VCL y VAP entre el grupo de animales menores de 3 años y el grupo de animales con edades comprendidas entre 4 y 8 años, siendo mayores en este segundo grupo. Para VSL se han obtenido diferencias significativas entre el grupo de animales menores de tres años, que presentaron los valores más bajos, y el resto.

Para el índice LIN se hallaron diferencias entre el grupo de animales menores de 3 años y el resto, resultando estas diferencias próximas a la significación. No obstante, después de realizar el correspondiente análisis de regresión entre LIN y STR como variables dependientes, y los grupos de edad como variables predictoras, se ha obtenido una relación significativa ($p < 0,05$) para ambos.

Por último, para los parámetros ALH y BCF no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos de edades.

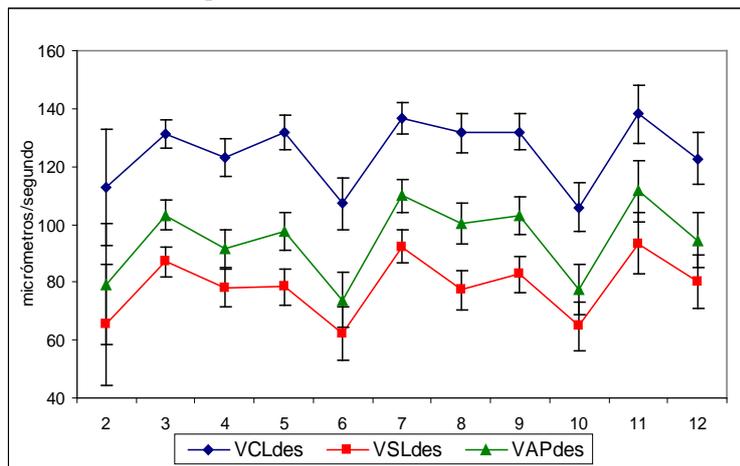
Figura 26. Distribución de valores de los parámetros objetivos de motilidad para los distintos grupos de edad.



2.3.3.4. EFECTO DE LA EDAD SOBRE LOS PARÁMETROS OBJETIVOS DE MOTILIDAD EN MUESTRAS EPIDIDIMARIAS DESCONGELADAS

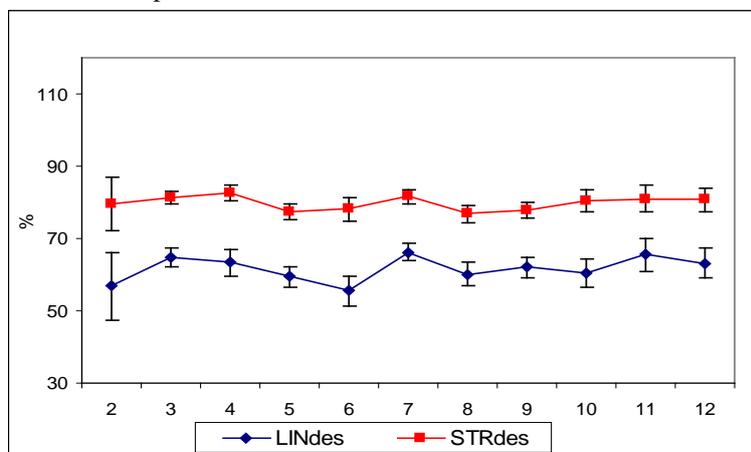
En las figuras 27, 28 y 29 se muestran los valores medios, con sus correspondientes errores estándar, para los parámetros objetivos de motilidad en función de la edad de los animales en muestras epididimarias de ciervo descongeladas. El análisis para la obtención de los valores de estos parámetros mediante el sistema CASA se realizó inmediatamente después de la descongelación de las muestras.

Figura 27. Valores medios y error estándar de la media para VCL, VSL y VAP a las distintas edades después de la descongelación de las muestras epididimarias.



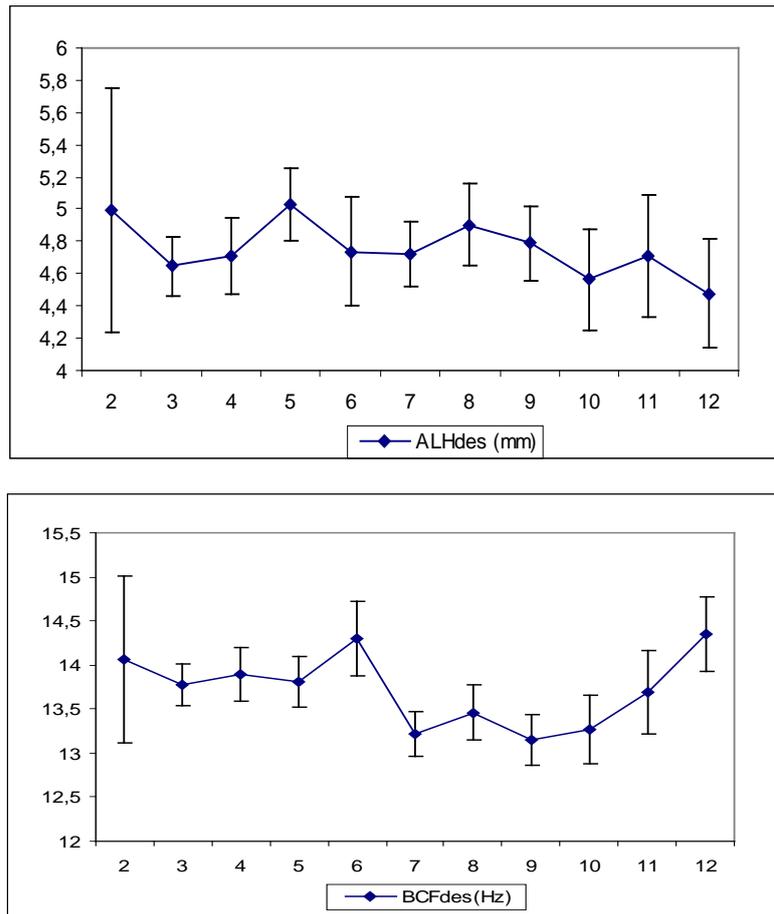
Índices diferentes (a, b, c) indican diferencias significativas: $P < 0,05$

Figura 28. Valores medios y error estándar de la media para LIN y STR por edades después de la descongelación de las muestras epididimarias



Índices diferentes (a, b, c) indican diferencias significativas: $P < 0,05$

Figura 29. Valores medios y error estándar de la media de ALH y BCF de las muestras epididimarias descongeladas para las distintas edades.



Índices diferentes (a, b, c) indican diferencias significativas: $P < 0,05$

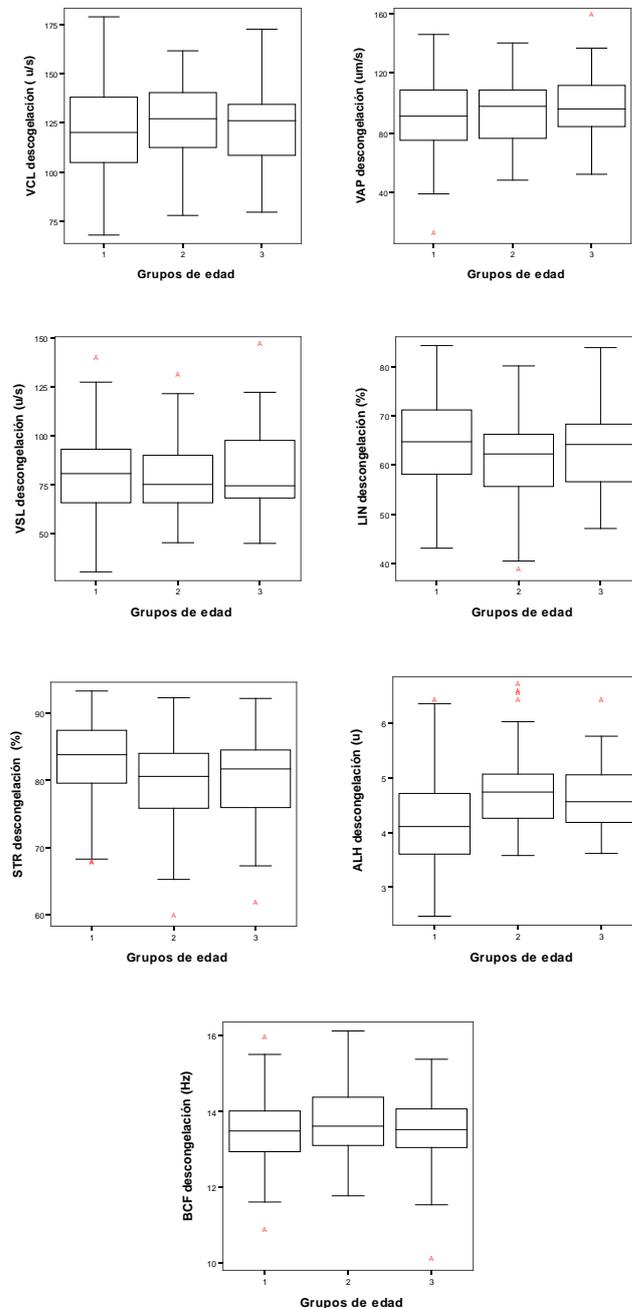
Si se observan los resultados de los gráficos anteriores, puede comprobarse que tanto los valores correspondientes a las tres clases de velocidades, como los valores de LIN, STR, ALH y BCF, apenas presentan diferencias para las distintas edades de los animales. De hecho, en el análisis de varianza realizado no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los parámetros objetivos de motilidad en función de la edad.

Sin embargo, cuando se estudió la influencia de la edad en los parámetros objetivos de motilidad tras la descongelación, pero haciendo una agrupación de los animales en tres clases de edad, se comprobó que existían diferencias significativas para LIN, STR y ALH.

En la figura 30 se detallan los gráficos de caja correspondientes a los parámetros objetivos de motilidad tras la descongelación para los tres grupos de edades. El análisis ANOVA ha mostrado diferencias significativas para LIN y STR entre los animales menores de 3 años y

el grupo de animales con edades comprendidas entre 4 y 8 años, presentando los valores más altos el grupo de animales más jóvenes. Para ALH se han hallado diferencias significativas entre el grupo de animales menores de tres años y el resto, siendo más bajos los valores obtenidos para el grupo de animales menores de 3 años.

Figura 30. Distribución de valores de los parámetros objetivos de motilidad tras la descongelación para los distintos grupos de edad.



En los casos de ALH y LIN la diferencia ha sido significativa ($P < 0,05$), y en el del índice STR ha sido altamente significativa ($P < 0,01$).

Por último, se realizaron análisis de regresión entre los grupos de edad como variable predictora, y los parámetros objetivos de motilidad tras la descongelación como variables dependientes, obteniéndose diferencias significativas para ALH ($P < 0,01$) y STR ($P < 0,00$).

2.3.3.5. EFECTO DE LOS PARÁMETROS CORPORALES SOBRE LOS PARÁMETROS OBJETIVOS DE MOTILIDAD EN MUESTRAS EPIDIDIMARIAS RECIÉN OBTENIDAS

Los resultados de los análisis descriptivos de los parámetros intrínsecos al macho se muestran en la tabla 15, detallándose el rango y el valor medio \pm desviación estándar de la media de los índices de grasa renal y testicular, y del perímetro torácico.

Tabla 15. – Medias \pm desviación estándar de la media para los parámetros corporales estudiados.

| Parámetros corporales | Media \pm Dest | Rango |
|----------------------------------|------------------------------------|---------------|
| Índice de grasa renal (%) | 19,17 \pm 13,73 | 5,5 - 83 |
| Perímetro torácico (cm) | 117,10 \pm 7,49 | 101 - 140 |
| Índice testicular (%) | 0,27 \pm 0,035 | 0,117 – 0,361 |

En la tabla 15 se recogen los resultados obtenidos después de realizar un análisis de correlación entre los parámetros corporales estudiados. Estos análisis ponen de manifiesto la existencia de correlaciones entre el perímetro torácico y el índice testicular.

En cuanto a las correlaciones halladas entre los parámetros corporales y los parámetros objetivos de motilidad, en la tabla 16 puede comprobarse la existencia de correlaciones entre el índice de grasa renal y todos los parámetros objetivos de motilidad, con la excepción de ALH y BCF, siendo negativas en todos los casos. El perímetro torácico no está correlacionado con ninguno de los parámetros objetivos estudiados, y el índice testicular ha resultado correlacionado negativamente con ALH y BCF.

Tabla 16. – Correlaciones de Pearson entre los parámetros corporales estudiados

| | Índice grasa renal | Perímetro torácico | Índice testicular |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Índice grasa renal | 1 | 0,159 | 0,136 |
| Perímetro torácico | 0,159 | 1 | 0,326 ** |
| Índice testicular | 0,136 | 0,326 ** | 1 |

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Tabla 17. Correlaciones de Pearson entre los parámetros corporales y los parámetros objetivos de motilidad.

| | VCL | VSL | VAP | LIN | STR | ALH | BCF |
|--------------------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| ÍndiceGrasaRenal | - 0,260(**) | -0,293(**) | -0,330(**) | -0,248(**) | -0,202(*) | 0,027 | 0,117 |
| Perim. torácico | 0,013 | -0,137 | -0,09 | -0,195 | -0,182 | 0,041 | -0,019 |
| Índice testicular | 0,096 | 0,128 | 0,124 | 0,093 | 0,082 | -0,169(*) | -0,145(*) |

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Para conocer de manera más detallada la relación existente entre los parámetros corporales de los ciervos y los parámetros objetivos de motilidad, en la tabla 18 se muestran los resultados observados después de realizar un análisis estadístico de regresión múltiple, utilizando los parámetros corporales como variables predictoras, y los parámetros objetivos de motilidad como variables dependientes.

Tabla 18. – Influencia de los parámetros corporales en los parámetros objetivos de motilidad obtenidos mediante metodología CASA en muestras epididimarias de ciervo.

| . | VCL(µm/s) | VSL(µm/s) | VAP(µm/s) | LIN (%) | STR (%) | ALH(µm) | BCF (Hz) |
|-----------------------------|------------------|------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| Índ. grasa renal (%) | 0,01 ** | < 0,01*** | < 0,01 *** | 0,03 * | 0,05 * | 0,97 n.s. | 0,19 n.s. |
| Per. Torácico (cm) | 0,20 n.s. | 0,31 n.s. | 0,06 n.s. | 0,01 ** | 0,05 * | 0,44 n.s. | 0,67 n.s. |
| Índ. Testicular (%) | 0,43 n.s. | 0,33 n.s. | 0,03 * | 0,6 n.s. | 0,59 n.s. | 0,008** | 0,12 n.s. |

(* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n.s. no significativo)

Las ecuaciones predictivas fueron las siguientes:

| | |
|--|---|
| VCL = (118,79±2,64) – (0,368±0,113) IGR | (F= 5,86; r ² =0,078; p=0,004) |
| VSL = (76,95±2,68) – (0,425±0,12) IGR | (F= 13,61; r ² =0,079; p=<0,001) |
| VAP = (91,58±2,73) – (0,493±0,117) IGR + (99,88±44,9) IT | (F=5,643 ; r ² =0,038; p=0,019) |
| LIN = (103,84±16,59) – (0,188±0,075) IGR – (0,325±0,143) PT | (F= 6,99; r ² =0,092; p=0,001) |
| STR = (110,36±13,3) – (0,118±0,061) IGR – (0,229±0,114) PT | (F= 6,168; r ² =0,065; p=0,01) |
| ALH = (3,68±0,92) – (4,62±1,73) IT | (F= 3,7; r ² =0,039; p=0,026) |

El análisis de regresión lineal muestra que en la mayoría de los casos los parámetros corporales influyen significativamente en las variables respuesta. Así, el índice testicular muestra una influencia positiva en VAP y negativa en ALH.

En cuanto a la influencia del perímetro torácico del animal en los índices LIN y STR, es en ambos casos negativa.

Por último, el índice de grasa renal influye en todos los parámetros objetivos de motilidad excepto en ALH y BCF, siendo en todos los casos negativa.

2.3.3.6. EFECTO DE LOS PARÁMETROS CORPORALES SOBRE LOS PARÁMETROS OBJETIVOS DE MOTILIDAD EN LAS MUESTRAS EPIDIDIMARIAS DESCONGELADAS

Los resultados de los análisis descriptivos de los índices de grasa renal y testicular, así como del perímetro torácico, ya han sido mostrados anteriormente y mostrados en la tabla 15 de esta tesis. Asimismo, en la tabla 16 de ese mismo capítulo, se han detallado los resultados de los análisis de correlación de Pearson entre los tres parámetros corporales estudiados. Dichos análisis demostraron que el perímetro torácico y el índice testicular están correlacionados positivamente (r=0,326; p<0.01).

Tabla 19. Correlaciones de Pearson entre los parámetros corporales y los parámetros objetivos de motilidad.

| | VCL | VSL | VAP | LIN | STR | ALH | BCF |
|-------------------------|-----------|--------|-----------|--------|----------|------------|--------|
| ÍndiceGrasaRenal | -0,191(*) | -0,097 | -0,196(*) | 0,020 | 0,167(*) | -0,304(**) | -0,104 |
| perim torac | -0,112 | -0,076 | -0,099 | -0,048 | -0,035 | -0,088 | -0,043 |
| Índice testi | -0,126 | -0,133 | -0,166(*) | -0,129 | -0,089 | 0,035 | 0,115 |

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* . La correlación es significante al nivel 0,05 (bilateral).

Asimismo, en la tabla 19 puede comprobarse la existencia de correlaciones entre el índice de grasa renal y varios de los parámetros objetivos de motilidad, que en el caso de VCL, VAP y ALH fueron negativas.

El perímetro torácico no está relacionado con ninguno de los parámetros objetivos estudiados, y el índice testicular resultó estar relacionado negativamente con VAP.

Para conocer con más detalle la influencia de los parámetros corporales de los animales sobre los parámetros objetivos de motilidad de las muestras de epidídimo de ciervo ibérico, en la tabla 20 se han agrupado los resultados obtenidos después de realizar un análisis estadístico de regresión múltiple entre los parámetros corporales del animal como variables predictoras, y los parámetros objetivos de motilidad como variables dependientes.

Tabla 20. Influencia de los parámetros corporales en los parámetros cinéticos objetivos obtenidos mediante análisis CASA tras la descongelación de las muestras de epidídimo.

| V. dependiente | VCL(µm/s) | VSL(µm/s) | VAP(µm/s) | LIN (%) | STR (%) | ALH(µm) | BCF (Hz) |
|--------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| V. independiente | Significac |
| Índice testicular | 0,022* | 0,028* | 0,003** | 0,04* | 0,353 n.s | 0,862 n.s. | 0,221 n.s. |
| Perímetro torácico | 0,331 n.s. | 0,556 n.s. | 0,63 n.s. | 0,516 n.s. | 0,95 n.s. | 0,901 n.s. | 0,705 n.s. |
| Índice grasa renal | 0,007** | 0,123 n.s. | 0,04** | 0,079 n.s. | 0,04* | 0,001** | 0,356 n.s. |

(* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n.s. no significativo)

Las ecuaciones predictivas fueron las siguientes:

| | |
|--|---|
| VCL = (161,17±13,19) – (0,386±0,14) IT – (107,56±46,26) IGR | (F= 5,78; r ² =0,078; p=0,007) |
| VSL = (112,17±12,8) – (100±44,89) IT | (F= 3,31; r ² =0,046; p=0,039) |
| VAP = (144,24±14,31) – (149,56±50,2) IT – (0,44±0,15) IGR | (F= 7,72; r ² =0,101; p=0,001) |
| LIN = (74,32±5,73) – (44,6±21,43) IT | (F= 2,17; r ² =0,035; p=0,118) |
| STR = (91,72±9,04) + (0,097±0,047) IGR... | (F= 1,93; r ² =0,041; p=0,127) |
| ALH = (5,01±1,01) – (0,018±0,005) IGR..... | ..(F= 4,53; r ² =0,091; p=0,005) |

El análisis de regresión lineal muestra que el perímetro torácico no tiene influencia sobre ninguno de los parámetros de motilidad.

En lo que respecta al índice testicular, influye negativamente sobre las tres velocidades objetivas (VCL, VSL y VAP) y el índice de linealidad (LIN).

Por último, el índice de grasa renal influye negativamente sobre ALH, VCL y VAP y positivamente sobre el índice STR.

4.3.4. DISCUSIÓN

En esta tesis se ha comprobado que los parámetros objetivos de motilidad de los espermatozoides de epidídimo de ciervo ibérico, varían con factores como la edad de los ciervos, el mes de recogida de los espermatozoides y con otros parámetros corporales como el índice testicular, la cantidad de grasa renal o el peso del animal. Por ello, es aconsejable conocer la calidad espermática a lo largo del año, con el fin de implantar una buena estrategia para la recolección del semen.

La mayoría de las especies cuyo origen está en las zonas de climas templados, muestran modelos de reproducción estacionales (Lincoln, 1985). En este sentido, los trabajos realizados con ungulados silvestres han puesto de manifiesto la existencia de una estacionalidad reproductiva muy marcada, siendo la actividad sexual y la espermatogénesis

muy elevadas durante la temporada reproductiva (Clutton-Brock *et al.*, 1982), lo que supone una importante restricción en la recogida de espermatozoides, afectando la estacionalidad no sólo a la cantidad, sino también a la calidad del semen (Garde *et al.*, 2006).

La testosterona se sintetiza en las células de Leydig, y aunque aún no se ha podido afirmar con rotundidad si es la testosterona la que influye específicamente sobre el desarrollo de la motilidad espermática, o si simplemente beneficia la viabilidad de los espermatozoides (Moore *et al.*, 1998), está claro que repercute en la función epididimaria, y que la luz afecta indirectamente al epidídimo mediante la acción sobre las células de Leydig. De este modo, los niveles de testosterona en el epidídimo y por lo tanto la espermatogénesis y la maduración espermática, se ven modificados dependiendo del fotoperíodo, pudiendo influir en las características de motilidad de los espermatozoides.

La estacionalidad se controla por las fluctuaciones de la hormona melatonina producida por la glándula pineal durante la noche. Por lo tanto, dependiendo del fotoperíodo, la concentración de melatonina en el cuerpo se eleva o baja, regulando la producción de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Uno de sus efectos finales es el control de los niveles de testosterona a través de pulsos de LH, que se elevan antes de la estación reproductiva alcanzando el pico durante este período, y cayendo posteriormente (Gerlach y Aurich, 2000). Dado que se necesita testosterona para la recrudescencia testicular y una espermatogénesis adecuada, este ciclo hormonal sincroniza la actividad sexual de los machos y, por consiguiente, los espermatozoides se producen sólo en el período adecuado del año (Martínez-Pastor *et al.*, 2005b).

Así, García *et al.* (2003) comprobaron por primera vez en ciervo rojo, que la glándula pineal de la hembra adulta es muy sensible a los cambios diarios y estacionales de la iluminación natural ambiental. Además, en otro estudio realizado con ciervos rojos, los machos respondieron al fotoperíodo mostrando cambios en la actividad reproductiva y en el patrón de ingesta de alimentos y del crecimiento (Suttie y Simpson 1985) y, en ciervo sika, se demostró que la manipulación artificial del fotoperíodo puede alterar el momento del ciclo de la cuerna (Goss 1969a, b; Goss y Rosen 1973).

En general, los ciervos silvestres muestran patrones reproductivos estacionales, utilizando estrategias reproductivas para sincronizar los partos de forma que las crías tengan una mayor probabilidad de supervivencia, como sucede con la mayoría de los ungulados (Ungerfeld *et al.*, 2008). Los partos en las especies de clima templado (por ejemplo, el ciervo mulo (Bowyer, 1991), ciervo de Eld (Monfort *et al.*, 1993), ciervo alpino almizclero (Xiu Xiang *et al.*, 2003), ciervo del Padre David (Brinklow, 1993), ciervo rojo (Hochereau-de Reviere y Lincoln, 1978; Clutton-Brock *et al.*, 1982; Haigh *et al.*, 1984; Asher y Fisher, 1991; Asher *et al.*, 1993; Gizejewski, 2004), ciervo de Cola blanca (Peles *et al.*, 2003; Arenas, 2011), gamo (Asher y Fisher, 1991; Asher *et al.*, 1993), ciervo de las pampas (Ungerfeld *et al.*, 2008), ciervo sika (Suzuki *et al.*, 1992) y el corzo (Gosh y Fischer, 1989; Gaillard *et al.*, 1993)) tienen lugar en primavera-verano. Estos patrones reproductivos estacionales pueden estar influenciados por diversos factores como el fotoperíodo (Bunnell, 1980), la densidad de población (Langvatn *et al.*, 2004), los efectos del cambio climático a corto (Cameron *et al.*, 1993) o largo plazo (Bowyer *et al.*, 1998), la condición física del animal durante la berrea (Adams, 1998), la fenología de la vegetación (Loe *et al.*, 2005), o los estímulos socio-sexuales (Verme *et al.*, 1987; Komers *et al.*, 1999).

El ciervo ibérico es una de las especies en las que el celo aparece concentrado durante la época de berrea, siendo evidentes los cambios en la producción y calidad espermática a lo largo del año (Martínez-Pastor *et al.*, 2005b; Malo *et al.*, 2005b). Así, en un estudio realizado por Garde *et al.* (1999) y en otros estudios realizados por Anel *et al.*, (1999, 2000) con semen de ciervo ibérico, se comprobó que los animales eran capaces de producir espermatozoides desde octubre hasta febrero, pero no había presencia de los mismos en los eyaculados del mes de mayo.

Asimismo, McMillan *et al.* (1998) también hallaron un aumento en el porcentaje total de espermatozoides móviles en rumiantes después de finalizar la época de celo, habiéndose comprobado en el caso concreto del alce, que la estacionalidad afectaba tanto a la cantidad como a la calidad del semen, por lo que pudieron obtenerse dosis de semen durante la estación reproductiva, pero no en junio y julio (Haiht *et al.*, 1984).

En cuanto a los resultados obtenidos en esta tesis, y comenzando por las diferencias entre meses de los parámetros objetivos de motilidad, el análisis de varianza ANOVA ha

indicado la existencia de diferencias significativas para todos los parámetros excepto para BCF y VAP, siendo el efecto del mes muy significativo ($p < 0,001$) en el caso concreto de los índices LIN y STR, lo que indica que el mes de recogida de los espermatozoides está relacionado con la linealidad de sus trayectorias, observándose una mayor progresividad durante los meses de invierno, después de la berrea.

Además, se ha comprobado que los valores más bajos para VCL, VSL y VAP se obtuvieron hacia el final de la época reproductiva, mientras que los más altos se presentaron al comienzo de la misma. Ocurrió lo contrario para ALH y BCF, cuyos valores más bajos se mostraron en octubre y noviembre respectivamente, y los más altos en febrero.

En cuanto a los índices LIN y STR, sus valores fueron aumentando después de la berrea hasta alcanzar valores máximos en pleno invierno, con dos picos similares en los meses de noviembre y enero, para descender de manera acusada en febrero. En este sentido, conviene recordar que los parámetros objetivos ALH y BCF reflejan características del movimiento de los espermatozoides que no contribuyen a la progresividad de su movimiento, por lo que valores altos de estos parámetros implicarían ineficiencia o movimiento errático de los espermatozoides (Malo *et al.*, 2005a).

Asimismo, Martínez-Pastor *et al.* (2005b) apreciaron una mejora de la calidad espermática en ciervo ibérico en el período de la estación reproductiva inmediatamente posterior a la berrea, así como un gran empeoramiento de la misma fuera de la estación reproductiva (febrero). En cuanto a los valores de los parámetros objetivos de motilidad, Martínez-Pastor *et al.* (2005b) también observaron un aumento de los valores de LIN, BCF y ALH hacia el final de la estación reproductiva, y aunque la viabilidad espermática y el estado del acrosoma fueron tan buenos o incluso mejores después de la berrea, los espermatozoides recogidos en febrero apenas presentaron motilidad. Además, en otro estudio realizado con subpoblaciones espermáticas en ciervo ibérico, encontraron diferencias entre las muestras recogidas durante la berrea y las recogidas después de la misma. Estas diferencias se atribuyeron al estado de maduración de los espermatozoides epididimarios, que podrían sufrir fenómenos de hiperactivación en el epidídimo como consecuencia de un tiempo de

permanencia en el mismo demasiado prolongado, resultando en este caso la hipermaduración en una mejoría de la motilidad (Martínez-Pastor *et al.*, 2005a).

En este sentido, hay que tener en cuenta que las ciervas pueden tener varios ciclos estrales durante la época de celo, pero conforme avanza la misma, la mayoría de ellas van quedando gestantes y los machos tienen menos oportunidades de aparearse. Los espermatozoides almacenados en la cola del epidídimo deberían ser jóvenes y completar su maduración al contactar con el plasma seminal durante la eyaculación; sin embargo, después de la berrea los espermatozoides permanecen más tiempo en la cola del epidídimo, por lo que la hipermaduración podría hacerse aparente en forma de un aumento del número de espermatozoides móviles y de los parámetros de motilidad, lo que se traduciría en un aumento de la calidad. Estas variaciones estacionales también se han observado en las subpoblaciones espermáticas de ciervo ibérico, ya que la subpoblación de movimiento no lineal desciende a lo largo de la estación reproductiva, mientras que otra subpoblación de movimiento lineal aumenta de forma más o menos proporcional (Martínez-Pastor *et al.*, 2005a).

Otra explicación de los mayores valores de los índices de linealidad y rectitud inmediatamente después de la berrea, es que podrían ser una consecuencia de los cambios espermatogénéticos ocurridos al final de la misma, en la que habría un menor número de espermatozoides, pero de mejor calidad. En este sentido, Gizejewski (2004) estudió las características del semen de ciervo obtenido mediante vagina artificial a lo largo del año y encontró algunos rasgos que puedan estar relacionados con los resultados obtenidos en esta tesis, pues cuando estudió las diferentes fracciones de los eyaculados recogidos con vagina artificial durante los periodos de celo (agosto), apareamiento (septiembre- diciembre), transición (diciembre- febrero) y post-apareamiento (febrero - abril), encontró que durante la época de celo (temporadas berrea y post-berrea en esta tesis), la fracciones eran de color amarillo y blanco, siendo la fracción blanca rica en espermatozoides. Sin embargo, durante el período de post-apareamiento (incluyendo febrero) podía obtener solamente la fracción gris (muy pobre en espermatozoides). Además, halló una mayor concentración de espermatozoides en el momento de mayor líbido (correspondiente a la berrea en esta tesis), aunque la movilidad de los espermatozoides fue mejor en ese período que en el resto del período de apareamiento, a diferencia de lo sucedido en esta tesis con los espermatozoides

del epidídimo. Este hecho podría estar relacionado con la interacción de los espermatozoides con el plasma seminal después de abandonar el epidídimo (Martínez-Pastor *et al.*, 2005b).

Continuando con los cambios en la calidad espermática durante la estación reproductiva, en un trabajo realizado con espermatozoides de epidídimo de ciervo ibérico se estudiaron las relaciones entre el tamaño y complejidad de la cuerna, el tamaño de los testículos y la producción, calidad y velocidad de los espermatozoides, comprobándose que todos ellos estaban positivamente relacionados, mejorando la calidad espermática y la velocidad de los espermatozoides durante el periodo de cuerna dura (Malo *et al.*, 2005b). Además, en otro trabajo se hallaron relaciones significativas del tamaño de la cuerna con VSL y VAP (Malo *et al.*, 2005a).

Se observaron resultados similares en otras especies de cérvidos como el gamo (Gosch y Fischer, 1989), el ciervo axis (Umapathy *et al.*, 2007) y el ciervo de Cola blanca (Arenas, 2011), cuando se estudiaron las variaciones estacionales en las características del semen y su asociación con el tipo de cuerna, comprobándose que el volumen testicular medio, la concentración de testosterona, la concentración espermática y el porcentaje de motilidad, eran más altos en el período de cuernas duras que en el período de cuernas de terciopelo o en el de pérdida de la cuerna.

Continuando con el ciervo ibérico, pero trabajando con semen procedente de electroeyaculación, Anel *et al* (2000) comprobaron que la concentración y el volumen alcanzaban los valores más altos en otoño y descendían en invierno, llegando a valores mínimos en primavera. Sin embargo, la calidad fue similar en otoño e invierno. Durante el otoño, acompaña al semen una secreción pegajosa y viscosa de color amarillo denominada "miel" cuya presencia puede afectar a su calidad, pero esta sustancia no aparece en invierno. En el caso de la electroeyaculación hay muchos factores que afectan a la calidad del semen, y aparte de la técnica de recogida y de los factores intrínsecos al macho, la estación es el más importante (Garde *et al.*, 2006).

Gizejewski (2004) obtuvo resultados comparables en ciervo rojo, comprobando que durante el período de máxima libido (desde finales de septiembre a primeros de

noviembre) mejoraban significativamente la motilidad y descendía la presencia de morfoanomalías en los espermatozoides, aumentando además el tamaño y peso de los testículos, la concentración espermática y el número total de espermatozoides. En cuanto a la duración media de la motilidad de los espermatozoides, durante el periodo reproductivo fue casi el doble que antes y después de la misma.

En lo que respecta a otras especies, en guepardo (*Acinonyx jubatus*) se observó que el tamaño de los testículos era mayor en la época reproductiva, lo que producía un cierto efecto sobre la motilidad y la integridad acrosómica, cuyo resultado es que presentaban valores más elevados en el periodo posterior al celo ($P < 0,05$) (Crossier *et al.*, 2007). En un estudio previo, Wildt *et al.* (1993) también hallaron relaciones entre el volumen testicular y la calidad seminal.

Finalmente, Loi *et al.* (1990) obtuvieron resultados análogos en muflón, comprobando que los valores máximos de velocidad de los espermatozoides se obtenían bajo fotoperíodo decreciente en noviembre, y los mínimos durante fotoperíodo creciente entre diciembre y febrero. Asimismo, Sackmann y Schöne (1990) obtuvieron valores máximos en los meses de fotoperíodo decreciente, y mínimos en los de fotoperíodo creciente.

En resumen, los resultados de esta tesis sobre el efecto de la estacionalidad en la motilidad de los espermatozoides de epidídimo de ciervo ibérico, coinciden con los obtenidos por otros autores en distintas especies de ciervos en cuanto a la evidencia de que el periodo reproductivo está sincronizado por el fotoperíodo, observándose un mayor porcentaje de espermatozoides móviles y/o una mayor calidad de movimiento de los mismos durante los meses de fotoperíodo decreciente dentro de la época reproductiva (gamo: Gosch y Fischer (1989); ciervo de Eld: Monfort *et al.* (1993); alce: McMillan *et al.* (1998); corzo: (Goeritz *et al.* (2003), Martínez-Pastor *et al.* (2005); ciervo rojo europeo: Gizejewski (2004); ciervo ibérico: Malo *et al.* (2005a,b), Martínez-Pastor *et al.* (2005a,b); ciervo axis: Umapathy *et al.* (2007); ciervo de Cola blanca: Arenas, (2011). Estos resultados están dentro de lo esperado teniendo en cuenta que la concentración de la testosterona plasmática es máxima durante la berrea, disminuyendo rápida y progresivamente a partir de este momento (Mirarchi *et al.*, 1975; Lincoln y Kay, 1979; Haigh *et al.*, 1984; Asher *et al.*, 1989; Suzuki *et al.*, 1992; Blottner *et al.*, 1996; Roelants *et al.*, 2002; Umapathy *et al.*, 2007).

En lo que respecta a la influencia de la época del año en la calidad de las muestras espermáticas descongeladas, está demostrado que la marcada estacionalidad reproductiva que presentan la mayoría de los ungulados silvestres afecta a la calidad del semen, por lo que podría esperarse que afectara igualmente a la resistencia a la congelación de los espermatozoides (Haigh *et al.*, 1984; Gosch y Fischer, 1989; Ciereszko *et al.*, 2000).

Así, los resultados de este trabajo han mostrado la existencia de diferencias significativas entre los meses de obtención de las muestras epididimarias de ciervo ibérico y todos los parámetros objetivos de motilidad después de la descongelación ($p < 0,001$ para VCL, VSL, VAP y LIN; $p < 0,01$ para STR y $p < 0,05$ para BCF), con la única excepción de la ALH. Los valores más bajos para los parámetros de velocidad, así como para los índices LIN y STR han correspondido a mediados del mes de octubre, y los más altos a mediados de noviembre; mientras que para los valores del ALH y BCF los mayores valores correspondieron a los meses de octubre y noviembre. Estos resultados están en la misma línea que los obtenidos por Soler (2003) para muestras epididimarias de esta misma subespecie, ya que también obtuvo los mayores valores medios para la congelabilidad global durante los meses de noviembre y diciembre. Por lo tanto, los valores más altos se observaron en meses de fotoperíodo decreciente como podría esperarse.

En el caso del ciervo rojo europeo, la concentración máxima de testosterona también se aprecia en los meses de fotoperíodo decreciente, comenzando a disminuir a partir de entonces hasta ser prácticamente indetectable en abril (Lincoln, 1971a,b; Lincoln *et al.*, 1970). En diferentes especies de ungulados se ha observado que el tamaño de las células de Leydig y del núcleo de las células de Sertoli es mayor durante los meses de días cortos, lo que se ha correlacionado positivamente con la concentración de testosterona (Hochereau y Lincoln, 1978; Hochereau *et al.*, 1985). Por lo tanto podría pensarse, que los niveles de testosterona fluctúan de forma parecida en ciervo ibérico y ciervo rojo, pues coinciden los meses de mayores concentraciones de testosterona en otras subespecies de ciervos, con el periodo de tiempo en el que la resistencia a la congelación es mayor para las muestras epididimarias de ciervo ibérico (meses de fotoperíodo decreciente).

La concentración de testosterona en ungulados es más alta durante los meses de fotoperíodo decreciente, y la síntesis de determinadas proteínas epididimarias depende de la presencia de andrógenos, interviniendo muchas de estas proteínas en la remodelación de la membrana de las células espermáticas, por lo que resultan imprescindibles para que los andrógenos puedan ejercer su función (Brooks y Higgins, 1980; Cooper, 1999; de Pauw *et al.*, 2003). Simultáneamente, al disminuir la síntesis de andrógenos, también lo hacen los niveles de receptores de andrógenos en las células epididimarias (Zhu *et al.*, 2000), siendo estos receptores imprescindibles para que los andrógenos puedan llevar a cabo su función. De este modo, es probable que cuando las concentraciones de testosterona comienzan a disminuir, se altere la secreción de determinadas proteínas que dependen de la secreción de esta hormona. Además, Yeung *et al.* (1999) sugirieron que algunos factores epididimarios presentes en el lumen pueden ser los responsables de que los espermatozoides adquieran la capacidad de regulación del volumen después de producirse cambios osmóticos. Si la presencia de estos factores también depende de la concentración de andrógenos, es posible obtener espermatozoides con dificultades para regular los cambios de volumen y, por lo tanto, ser más sensibles a la criopreservación al producirse cambios de volumen durante el periodo en el que la concentración de testosterona comienza a disminuir (Soler, 2003).

En cuanto a la razón de que los valores de los parámetros objetivos de velocidad obtenidos en esta tesis sean menores en octubre, siendo éste un mes en el que la concentración de testosterona debería ser máxima por coincidir con el comienzo de la berrea (Lincoln y Kay, 1979; Suzuki *et al.*, 1992; Roelants *et al.*, 2002; Malo *et al.*, 2009), podría deberse a cierta inmadurez de las células espermáticas como consecuencia de que los espermatozoides permanecen menos tiempo en el epidídimo por la mayor frecuencia de eyaculaciones durante la berrea, lo que podría conducir a un incremento de la sensibilidad a cualquier tipo de estrés, que en este caso concreto sería el provocado por el proceso de congelación-descongelación (Soler, 2003). En este sentido, en otras especies como el verraco (Bonet *et al.*, 1993; Strzezek *et al.*, 1995), o el morueco (Ollero *et al.*, 1996; Preston *et al.*, 2001), se ha demostrado que una alta frecuencia de recogidas de semen afecta negativamente a la calidad seminal (Shamsuddin *et al.*, 2000), provocando una menor resistencia de la membrana plasmática al choque frío (Strzezek *et al.*, 1995). Además, en gacela dama se ha comprobado que los machos pertenecientes a grupos en los que podían realizar montas,

presentaban un mayor porcentaje de defectos acrosómicos que los machos aislado de las hembras (Holt *et al.*, 1996).

Por otro lado, en morueco se ha comprobado que las células espermáticas resisten mejor la congelación si el semen se obtiene y congela durante fotoperíodos decrecientes (Fiser y Fairfull, 1986). En otro estudio realizado también en ovino sucedió algo similar, pues se comprobó que en el semen descongelado, el porcentaje de acrosomas dañados, la supervivencia espermática ($p < 0,01$) así como la motilidad y cinética de los espermatozoides, mejoraban durante la estación de reproducción (D'Alessandro y Martemucci, 2003).

En semen de bovino también se apreció una mayor calidad en las muestras congeladas durante la época reproductiva (Ibrahim *et al.*, 1983), pues después de la descongelación de los eyaculados, algunos de los parámetros de calidad como las morfoanomalías, el volumen, la concentración, el porcentaje de motilidad, la motilidad progresiva y el vigor de los espermatozoides, se mostraron significativamente influenciados tanto por la temporada como por el genotipo ($p < 0,05$) (Koivisco *et al.*, 2009).

En búfalo se obtuvieron resultados comparables, pues se comprobó que la motilidad tras la descongelación era peor durante el verano y mejoraba en invierno ($p < 0,01$), concluyendo que los espermatozoides podrían ser más frágiles durante el verano, lo que dificultaría la resistencia al estrés provocado por la congelación (Bahga y Khokar, 1991).

En verraco, y a pesar de que en las muestras de semen recién obtenidas no existían diferencias en la calidad seminal entre estaciones, se observaron variaciones estacionales después de la descongelación del semen tanto en los valores de motilidad espermática, como en los valores de la concentración de testosterona en sangre (Park y Yi, 2002).

En equino también se encontraron diferencias en la calidad del semen entre estaciones, siendo la motilidad espermática significativamente más alta ($p < 0,05$) en otoño, por lo que se recomendaba que la criopreservación del semen se realizara preferiblemente en esta estación (Janett *et al.*, 2003).

Por último, en un estudio realizado con semen de caprino, la motilidad de los espermatozoides, el porcentaje de espermatozoides muertos, las morfoanomalías y los defectos en el acrosoma, resultaron afectados por la estación del año ($p < 0,001$) tanto en el equilibrado a 5°C como en la post-descongelación (Ustuner *et al.*, 2009). Por otro lado, Corteel *et al.* (1988) observaron una drástica disminución de la motilidad de los espermatozoides de los machos cabríos después de la conservación del semen a baja temperatura en cualquier momento de la temporada no reproductiva.

Como conclusión, y teniendo en cuenta que la medida de las características de la motilidad espermática a partir de las observaciones de espermatozoides individuales, nos dan una idea de la capacidad funcional y de la fertilidad potencial de los espermatozoides (Mortimer, 1990), los resultados obtenidos en esta tesis hacen pensar en la conveniencia de criopreservar las muestras espermáticas obtenidas durante los dos primeros meses de la época reproductiva. En este sentido, en otro trabajo realizado con muestras epididimarias de ciervo ibérico, Martínez-Pastor (2005b) reportó que la temporada no reproductiva es un mal momento para recoger muestras espermáticas en cérvidos debido al escaso número de espermatozoides que presentan y a su reducida calidad. La actividad espermatogénica durante la temporada no reproductiva se limita exclusivamente a proliferación de las espermatogonias, mientras que la producción de esperma se activa en el período previo a la berrea debido a un aumento de los niveles de testosterona.

En lo que respecta a la relación entre la edad de los animales y los parámetros objetivos de motilidad, a pesar de que la producción espermática y las características de motilidad en ungulados parecen estar influenciadas además de por la estación del año, por la edad de los animales (gamo: Gosch y Fischer, 1989; ciervo ibérico: Garde *et al.*, 1998; Anel *et al.*, 2001; gacela: Roldán *et al.*, 1998). En esta tesis, las diferencias observadas entre los parámetros de motilidad por edades de los animales para cada año, han sido pequeñas y no significativas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Malo *et al.* (2005b) y por Martínez *et al.* (2008), quienes estudiando determinadas características de los espermatozoides de ciervo ibérico comprobaron, que la edad del macho no tenía influencia significativa en los parámetros objetivos de motilidad espermática.

En otras especies como el ciervo sika, tampoco se encontraron diferencias por edades en las características de motilidad de los espermatozoides. En dicho estudio se compararon dos grupos de edad, aunque en este caso los animales fueron mucho más jóvenes, pues en un grupo se incluyeron animales de 1 año, y en el otro de 2 años. En este sentido señalar, que la espermatogénesis y la maduración espermática en el epidídimo de los machos jóvenes puede depender de varios factores como la raza, el habitat, los recursos alimenticios, los niveles de testosterona y las oportunidades de apareamiento (Hishinuma *et al.*,2003).

Sin embargo en los resultados de esta tesis, después de reagrupar a los animales en tres grupos diferentes de edad, uno para animales menores de 3 años, otro para animales de edades comprendidas entre 4 y 8 años, y un tercero para animales mayores de 8 años, si se han observado diferencias significativas para los tres tipos de velocidades (VCL, VSL y VAP), presentando los peores resultados el grupo de animales menores de tres años.

En este sentido, en un estudio realizado por Garde *et al.* (1998) sobre espermatozoides de epidídimo de ciervo ibérico separados en grupos de edades similares a los de esta tesis, se puso de manifiesto la influencia de la edad de los animales sobre la calidad espermática dentro de la misma época del año, presentando los machos más jóvenes (2–3 años) un número mayor de formas anormales, una menor motilidad progresiva y una menor resistencia de su membrana plasmática al choque osmótico, que los machos de mayor edad. Esto podría sugerir que tanto la espermatogénesis como la maduración de los espermatozoides en el epidídimo queda limitada en los animales más jóvenes por diferentes razones. Una razón podría ser las pocas oportunidades de apareamiento de estos animales debido a la competencia por la monta con otros machos más fuertes y/o de mayor edad. Así, en otros rumiantes se ha comprobado que períodos prolongados de abstinencia sexual, han conducido a una degeneración espontánea de las células espermáticas durante su almacenamiento en el tracto reproductivo (Colas, 1984), lo que ha podido originar una pérdida de calidad. Otra razón de la menor calidad espermática observada en los animales de menor edad podría ser la indicada por Lincoln (1971) para ciervo rojo o por Haigh *et al.* (1984) para wapití. Estos autores observaron que los animales más jóvenes, alcanzan los valores máximos de testosterona dentro de la temporada reproductiva más tarde que los de mayor edad, y teniendo en cuenta que los espermatozoides fueron obtenidos al comienzo

de la época reproductiva, lo más probable es que los machos más jóvenes no hubieran alcanzado el pico en la producción de testosterona, ni hubieran completado la espermatogénesis, lo que pudo llevar asociada un empeoramiento de la calidad espermática (Matínez *et al.*, 2008).

En cuanto a lo comprobado en otras especies, en un estudio realizado con semen de guepardo por Crosier *et al.* (2007) se obtuvieron resultados comparables a los anteriores, pues después de agrupar las muestras espermáticas en tres clases de edad, se comprobó que los machos más jóvenes (menores de 2 años) presentaban un menor porcentaje de motilidad y una menor progresividad espermática que los del grupo de animales de mayor edad. Según los autores, la baja calidad de los eyaculados de los machos más jóvenes podría ser un incentivo para retrasar la reproducción de estos animales hasta al menos los 2 años de edad, especialmente si su comportamiento es inmaduro.

En toros también se ha observado que la edad afecta significativamente a la cantidad y calidad del semen, incrementándose ambas desde la pubertad hasta alcanzar valores máximos a los 3 o 4 años y manteniéndose hasta los 7 u 8 años, para después volver a decaer. El efecto de la edad sobre las variables espermáticas, es un reflejo de las variaciones de las condiciones fisiológicas de los toros, manifestándose por un incremento en la cantidad y calidad de los espermatozoides desde la pubertad hasta la madurez sexual, descendiendo después hasta el final de la vida útil de los animales (López *et al.*, 2007).

Asimismo, en muflón se ha relacionado la edad del animal con la producción seminal y con los parámetros de motilidad espermática, observándose que van aumentando significativamente con la edad ($p < 0,001$) (López, 2001). Esto mismo ocurre para los espermatozoides de morueco (Osinowo *et al.*, 1988).

Respecto a los factores intrínsecos al macho que pueden afectar a la motilidad después de la descongelación de los espermatozoides, aunque se han observado diferencias entre animales dentro de una misma especie en cuanto a la resistencia de sus espermatozoides a la congelación (Medrano, 1998, Medrano *et al.*, 2002), en muy pocos casos se ha podido demostrar cuales son las características que determinan esas diferencias individuales en la congelabilidad espermática (Soler, 2003).

En esta tesis, los resultados han mostrado que los valores correspondientes a las tres velocidades objetivas, así como al resto de parámetros objetivos de motilidad, apenas presentan diferencias para las distintas edades de los animales. Estos resultados son comparables con los obtenidos en otro trabajo realizado también sobre espermatozoides epididimarios descongelados de ciervo ibérico, en el que no se observó correlación estadística significativa entre la edad y la congelabilidad global (Soler, 2003).

Sin embargo en esta tesis, después de realizar una clasificación de los animales en tres grupos diferentes de edades, uno para animales menores de 3 años, otro para animales de edades comprendidas entre 4 y 8 años, y un tercero para animales mayores de 8 años, si se observaron diferencias significativas en los parámetros LIN, STR y ALH para el grupo de animales más jóvenes.

En cuanto a los resultados obtenidos en otras especies han sido heterogéneos. Así, en semen de toro (Karabinus *et al.*, 1990) y de caballo (Kosiniak y Bittmar, 1987) se observó una mejor calidad seminal tras la descongelación conforme aumentaba la edad de los animales, aunque hay que tener en cuenta que en estos estudios, los animales evaluados tenían una edad máxima de 4 años, ya que no se testaron machos de mayor edad.

Pero en otros casos no se han encontrado correlaciones de la edad con la motilidad de los espermatozoides. Así, trabajando con semen de toro (Vejarano *et al.*, 2005; Muiño *et al.*, 2008) no observaron influencia de la edad sobre los parámetros objetivos de motilidad; y en burro (Dorado *et al.*, 2013), se comprobó que existía cierta relación entre la calidad espermática y la edad, pero las relaciones fueron bajas y no significativas.

Sin embargo, en un trabajo realizado con semen de morueco se comprobó que tras clasificar a los animales en dos grupos de edad, uno para los animales de edades comprendidas entre 1 y 2 años, y otro para los animales de edades entre 4 y 5 años, los machos del grupo de mayor edad presentaron una menor proporción de espermatozoides con movimiento hiperactivado, presentando el grupo de animales maduros una mejor calidad seminal y una mayor fertilidad en vivo que el grupo de animales jóvenes tras la descongelación de las muestras de semen (Lymberopoulos *et al.*, 2008). Además, en otros

trabajos realizados con semen criopreservado de toro también se obtuvieron mejores resultados en animales de más edad (Karabinus *et al.*, 1990; Januskauskas *et al.*, 1999; Hallap *et al.*, 2004).

Por otro lado, en semen de gacela se encontró una correlación negativa entre la presencia de una subpoblación espermática de movimiento descoordinado y poco progresivo tras la descongelación (VSL más baja y ALH más alta) y la edad de los animales, sugiriendo que estas células son disfuncionales o al menos inusualmente criosensibles. Además la correlación sugiere que la producción de espermatozoides de mala calidad aumenta en los animales de edad avanzada. Dicha hipótesis implica que la criopreservación de semen de gacela sería mejor si se realizara con semen procedente de animales más jóvenes (Abaigar *et al.*, 1999).

Por tanto, cuando se ha estudiado la relación entre la edad de los animales y la motilidad de sus espermatozoides, se han obtenido resultados diferentes entre especies y entre autores. No obstante en el caso del ciervo ibérico, cuando se han comparado los resultados de esta tesis con los obtenidos por otros autores que han utilizado metodologías similares (Garde *et al.*, 1998; Soler, 2003; Malo *et al.*, 2005b; Martínez *et al.*, 2008), se ha observado bastante afinidad en los resultados.

Como conclusión señalar, que a pesar de que a edades avanzadas se producen alteraciones degenerativas en los testículos que podrían afectar a la composición de los espermatozoides, y por tanto a su resistencia a la congelación, los resultados obtenidos en esta tesis indican que los espermatozoides de ciervo ibérico pueden aguantar bien la criopreservación a cualquier edad, habiéndose mantenido altos los valores de los parámetros objetivos de motilidad obtenidos mediante CASA después del proceso de criopreservación.

Respecto a las relaciones entre los diferentes parámetros corporales estudiados en esta tesis, solo se han observado relaciones significativas entre el perímetro torácico y el índice testicular ($r = 0,326$, $p < 0,001$).

En lo referente a la relación entre las características corporales de los ciervos y los parámetros objetivos de motilidad tras la descongelación, los resultados de este trabajo han mostrado que en muchos casos están correlacionados de manera significativa. Así, se ha encontrado una correlación positiva entre el índice testicular y VAP ($p < 0,05$) y negativa ($p < 0,01$) con ALH.

Del resto de factores intrínsecos al macho estudiados en esta tesis, el perímetro torácico parece ser el mejor indicador del peso corporal (Álvarez, 1991; Morrison *et al.*, 1991; Khalil y Vaccaro, 2002), deduciéndose de los resultados de este trabajo que el perímetro torácico del animal solo influye (negativamente) en los valores de los parámetros objetivos de LIN y STR, por lo que podría pensarse, que los ciervos con mayor peso corporal han presentado una menor progresividad y linealidad de sus espermatozoides.

Aludiendo a los resultados obtenidos en otros trabajos, Malo *et al.* (2005a) no encontraron diferencias significativas entre el peso de los machos de ciervo ibérico y los parámetros objetivos de motilidad de sus espermatozoides. Sin embargo, el tamaño relativo de los testículos si se correlacionó significativamente con VAP y VSL, quedando próximo a la significación con VCL (Malo *et al.*, 2005b).

Con el índice de grasa renal ocurrió algo similar, ya que en los resultados de esta tesis, ha mostrado influir negativamente en todos los parámetros objetivos de motilidad excepto en ALH y BCF. Una explicación podría ser la rápida pérdida de peso que sufren los animales durante la berrea, por lo que al finalizar la misma, que es cuando se han obtenido mayores valores para VSL, LIN y STR para los espermatozoides epididimarios de ciervo ibérico, es cuando los animales tienen un menor peso, y por lo tanto seguramente presentarán menos porcentaje de grasa y un menor perímetro torácico.

De los parámetros corporales de los ciervos que podrían afectar a la calidad tras la descongelación, en esta tesis se han estudiado el índice testicular, el perímetro torácico y la condición corporal medida por el índice de grasa renal, estando este último índice relacionado con el porcentaje de grasa abdominal (Riney, 1955).

Los resultados del análisis de regresión han mostrado que las medidas del perímetro torácico no han influido significativamente en ninguno de los parámetros objetivos de motilidad tras la descongelación, pero si se ha observado cierta influencia de los otros dos parámetros corporales estudiados. Así, el índice testicular ha influido negativamente en las tres velocidades objetivas (VCL, VSL y VAP) y en el índice LIN, siendo el grado de significación bajo ($p < 0,05$). El índice de grasa renal ha influido negativamente VCL y VAP y, positivamente sobre el índice de rectitud (STR), habiéndose observado además una alta significación negativa al estudiar la influencia del índice de grasa renal sobre el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH).

Al comparar estos resultados con los obtenidos en otros trabajos, en un estudio realizado sobre ciervo ibérico se observó una influencia negativa entre el índice de grasa renal y la congelabilidad, resistiendo peor la congelación los espermatozoides de animales con un mayor índice de grasa renal (Soler, 2003).

Por tanto, y a la vista de los resultados anteriores, un aumento en la condición corporal de los machos de ciervo ibérico, podría estar asociado a una disminución del vigor de los espermatozoides pero a un ligero aumento en la progresividad de su movimiento.

No obstante en otros trabajos, como el realizado por Abaigar *et al.*, (1999) con semen de gacela, no se apreció un efecto significativo del peso de los animales ni de su condición corporal sobre los modelos de motilidad de los espermatozoides después de la descongelación.

Finalmente señalar, que no ha sido posible comparar estos resultados con los obtenidos en otros trabajos con ciervos por no existir literatura sobre el estudio de las relaciones entre la condición corporal y los valores objetivos de motilidad después de la descongelación del semen, aunque lo que sí se ha estudiado es el efecto de la condición corporal sobre la reproducción y más concretamente sobre la secreción de testosterona, habiéndose relacionado el aumento de grasa corporal con una disminución de la concentración de esta hormona (Vermeulen *et al.*, 1993; Tchernof *et al.*, 1995; Bray 1997; Tan y Pu, 2002).

El hecho de que la concentración de testosterona pudiera estar disminuida como consecuencia de un aumento del porcentaje de grasa corporal del animal, podría influir sobre la composición del espermatozoide, haciéndolo más sensible al proceso de congelación, ya que podría conducir a la ausencia de algunas proteínas esenciales en la regulación de las variaciones del volumen celular de los espermatozoides debidos a los cambios osmóticos, siendo éstas necesarias para resistir el proceso de criopreservación. Por lo tanto, el hecho de que los ciervos que contaban con un mayor porcentaje de grasa renal, tuvieran espermatozoides con peores índices de motilidad después de la descongelación, podría deberse a una menor resistencia de sus espermatozoides a la congelación, debido a la existencia de una menor concentración de testosterona.

Por último, en otro trabajo realizado con muestras epididimarias de ciervo ibérico, se observó una influencia negativa significativa de la condición corporal determinada por el índice de grasa renal sobre la congelabilidad global (Soler, 2003).

Como conclusión señalar, que el perímetro torácico no parece influir significativamente en ninguno de los parámetros de motilidad estudiados. Sin embargo, el aumento de la condición corporal en los machos de ciervo ibérico, podría asociarse con una disminución del vigor de los espermatozoides y una ligera mejoría en la progresividad de su movimiento.

2.4. VALOR PREDICTIVO DEL ANÁLISIS OBJETIVO DE MOTILIDAD PARA LA RESISTENCIA A LA CONGELACIÓN EN LA MUESTRAS ESPERMÁTICAS EPIDIDIMARIAS DE CIERVO IBÉRICO RECIÉN OBTENIDAS.

2.4.1. INTRODUCCIÓN

Los parámetros espermáticos convencionales no son suficientes para identificar a los animales cuya calidad espermática resulta muy afectada por la criopreservación, los conocidos como "pobres congeladores". Por ello, se necesitan métodos de evaluación apropiados, sensibles y rápidos capaces de realizar una evaluación de la función espermática adecuada (Esteso *et al.*, 2006). Uno de estos métodos se basa en la evaluación

de la motilidad de los espermatozoides individuales facilitada por los análisis espermáticos asistidos por ordenador (CASA), pues generan un gran conjunto de datos que pueden analizarse utilizando técnicas de agrupación de los espermatozoides en distintas subpoblaciones con significado biológico (Martínez-Pastor *et al.*, 2011).

Como se ha indicado en capítulos anteriores, la criopreservación de semen combinada con la inseminación artificial (IA) es posiblemente la técnica de reproducción asistida que más se ha aplicado en diferentes especies de cérvidos (Asher *et al.*, 2000). No obstante, existe un problema importante para la estandarización de los protocolos de criopreservación, el originado por las diferencias individuales entre animales en la respuesta al mismo tratamiento de congelación (Holt, 2000b; Soler *et al.*, 2003a). Así, los ciervos pueden mostrar diferente congelabilidad dependiendo de la estructura de su población espermática, por lo que resulta interesante caracterizar la distribución de las subpoblaciones espermáticas de cada animal e identificar qué características favorecen la congelabilidad de sus espermatozoides como una forma de predecir su resistencia a la congelación.

Por ello, los investigadores han estado muy interesados en determinar la relación entre la resistencia a la congelación y determinadas características de calidad del semen fresco como la motilidad, viabilidad, morfología o el estado del acrosoma, habiéndose comprobado que la inclusión de algunas de estas variables espermáticas medidas mediante métodos funcionales, o bien por la combinación de resultados significativos en un análisis de regresión multivariante, puede considerarse como la más discriminatoria y en algunos casos, incluso de valor predictivo (Esteso *et al.*, 2006).

Por lo tanto y dada a la importancia de conocer las subpoblaciones espermáticas, se han utilizado diferentes procedimientos estadísticos para definir las e identificarlas. Precisamente, Martínez-Pastor, *et al.* (2011) han proporcionado referencias y una discusión general sobre los métodos de clasificación comúnmente utilizados para identificar subpoblaciones espermáticas, pues en los últimos años se han desarrollado otros métodos analíticos y estadísticos de análisis “cluster” que podrían mejorar los análisis actuales de subpoblaciones espermáticas.

En la actualidad, la existencia de subpoblaciones espermáticas dentro del eyaculado de mamíferos está ampliamente aceptada por la comunidad científica (Abaigar *et al.*, 1999; Quintero-Moreno *et al.* 2003, 2004; Handl *et al.*, 2005; Martínez-Pastor *et al.* 2005a,c, 2006c; Cremades *et al.*, 2005; Núñez-Martínez *et al.* 2006; Esteso *et al.*, 2009; Flores *et al.*, 2009; Martínez-Pastor *et al.*, 2011; Ramón *et al.*, 2012); y aunque su origen no está del todo claro, algunos autores piensan que se deben a los procesos de ensamblado de los espermatozoides durante la espermatogénesis, a su diferente grado de maduración y al tiempo de permanencia en la cola del epidídimo hasta el momento de la eyaculación (Abaigar *et al.* 1999).

En el caso del ciervo ibérico se ha observado una variación considerable entre machos en la respuesta de sus espermatozoides al proceso de congelación-descongelación (Soler *et al.* 2003a; Esteso *et al.* 2006). Además, Malo *et al.* (2005a) han reportado que los porcentajes de fertilidad varían marcadamente entre machos cuando se utiliza semen descongelado.

Pero esta variación individual en la resistencia a la congelación se ha observado tanto en especies domésticas (Curry, 2000) como silvestres (Leibo y Songsasen, 2002), siendo los espermatozoides de toro (Liu *et al.*, 1998), los que mejores resultados han mostrado, mientras que los espermatozoides de verraco (Pursel y Johnson, 1976; White 1993), y morueco (Ollero *et al.*, 1998) han sufrido daños de diferente consideración utilizando protocolos específicos de criopreservación. En este contexto, los animales donantes de semen se han podido clasificar en “buenos” y “malos congeladores”, y a pesar de que los mecanismos que causan las diferencias en la criosensibilidad entre individuos aun no están claros, hay evidencias de diferencias fisiológicas entre espermatozoides de animales de la misma especie (Leibo y Bradley 1999).

Por ello, en base a la existencia de estas diferencias entre individuos, se ha podido comprobar mediante el estudio de ciertas variables predictoras y la utilización de diferentes algoritmos, que pueden formarse grupos con cierta homogeneidad interna entre espermatozoides que permiten conocer la viabilidad postdescongelación de una muestra de semen, habiéndose propuesto diferentes métodos (Davis *et al.*, 1995; Holt, 1996; Abaigar *et al.*, 1999; Quintero *et al.*, 2004; Martínez-Pastor *et al.* 2005a,c, 2006c, 2011; Núñez-

Martínez *et al.*, 2006; Ramón *et al.*, 2012). Estas variables predictoras, se basan en el conocimiento de las diferencias en algunos de los parámetros objetivos de motilidad.

De este modo, el propósito de este apartado de la tesis ha sido comprobar si a partir de los datos de motilidad proporcionados por el análisis CASA, y mediante la utilización de un análisis de “cluster”, es posible predecir la resistencia a la congelación de las muestras espermáticas epididimarias de ciervo ibérico.

2.4.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para estudiar la posibilidad de predecir la resistencia a la congelación en función de los valores de los principales parámetros objetivos de motilidad, se realizó un análisis de cluster multivariante que dividió la totalidad de las muestras espermáticas epididimarias en dos grupos diferentes en base a la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los valores individuales de MI, NAR, ENDO y EV. El primer grupo quedó formado por 41 muestras pertenecientes a animales cuyo semen presentaba peor calidad después del proceso de criopreservación, a los que se llamó “malos congeladores” y, el segundo grupo, quedó representado por las 176 muestras de los animales cuyo semen mostró tener una mejor calidad después de la criopreservación, a los que se denominó “buenos congeladores”.

Como los valores de los parámetros objetivos de motilidad obtenidos mediante análisis CASA pueden dar una indicación de diferentes modelos de motilidad para cada uno de los grupos clasificados, se buscaron diferencias significativas ($p < 0,05$) para los parámetros objetivos de motilidad entre los grupos de “buenos” y “malos congeladores”. Para ello y con el fin de estudiar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros objetivos de motilidad iniciales y las clases obtenidas de “buenos” y “malos congeladores”, se realizó un análisis de varianza (ANOVA).

2.4.3. RESULTADOS

En la tabla 21 se muestran los valores medios de los parámetros de calidad a la descongelación obtenidos para los grupos de “buenos” y “malos congeladores” después de realizar un agrupamiento mediante un análisis de Cluster.

Tabla 21. Valores medios de los porcentajes de MI, NAR, ENDO y NEV para los grupos de “buenos” y “malos congeladores”

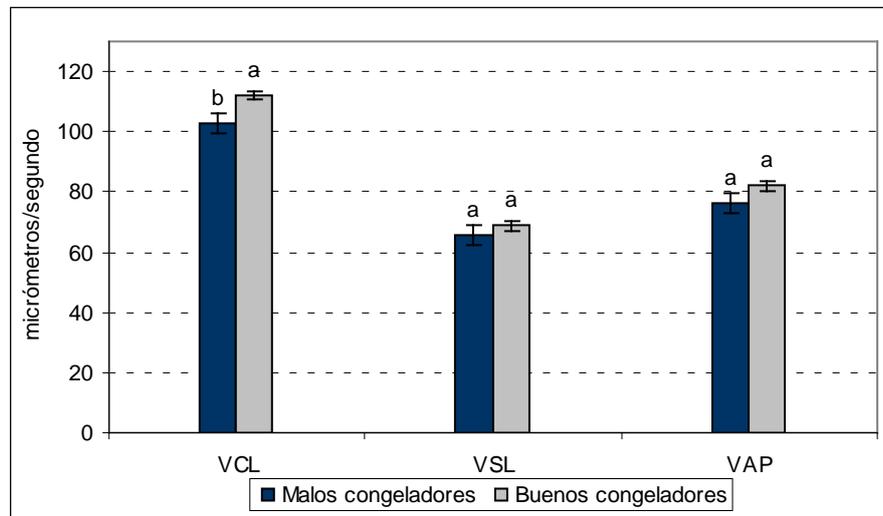
| | Buenos congeladores | Malos congeladores |
|---|---------------------|--------------------|
| Porcentaje de espermatozoides móviles (MI) | 46,16 | 88,13 |
| Acrosomas normales (NAR) | 77,85 | 87,50 |
| Endósmosis positiva (ENDO) | 49,64 | 79,75 |
| Espermatozoides vivos (NEV) | 74,50 | 88,75 |

En las figuras 31, 32 y 33 se representan los valores medios más el error estándar de la media de los principales parámetros objetivos de motilidad obtenidos para los grupos de “buenos” y “malos congeladores”. También se muestran los índices indicadores de la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de “buenos” y “malos congeladores”.

Como puede verse, apenas se aprecian diferencias entre los grupos de animales clasificados como “buenos” y “malos congeladores”. Además, estas diferencias solamente fueron significativas en el caso de la variable VCL.

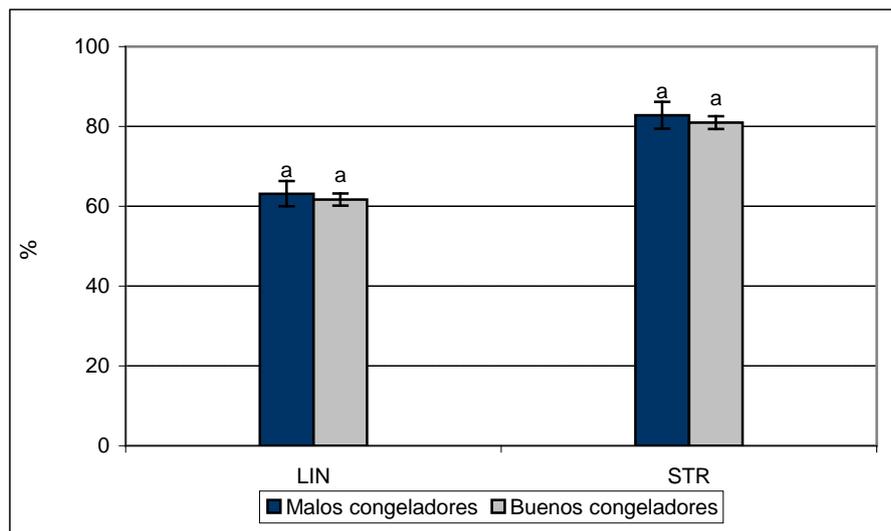
Los valores medios de las velocidades (VCL, VSL y VAP) obtenidas mediante CASA fueron mayores para el grupo de “buenos congeladores”, al igual que los valores de ALH y BCF. Para los índices LIN y STR ocurrió lo contrario, fue el grupo de “malos congeladores” el que presentó un valor ligeramente superior.

Figura 31. Valores medios \pm error estándar de la media de las velocidades curvilínea, de la trayectoria media, y lineal, en función de la resistencia a la criopreservación de los espermatozoides.



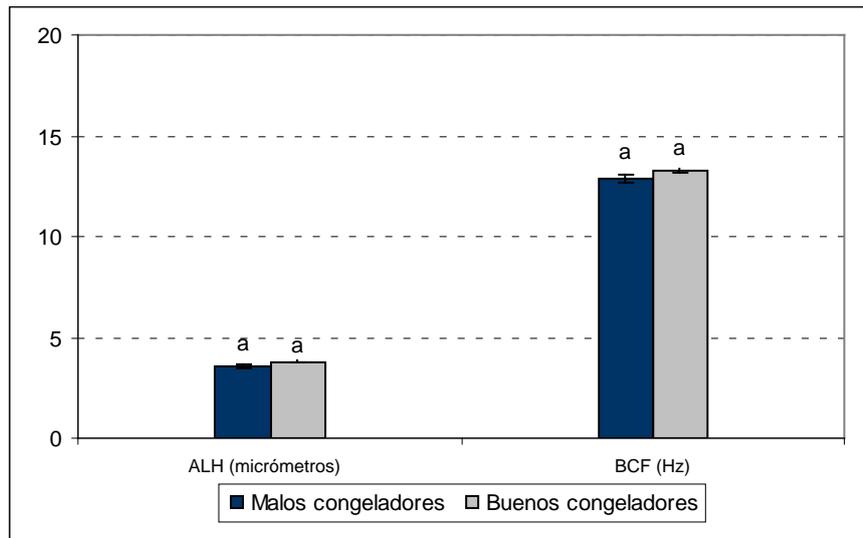
Índices diferentes (a, b) indican la existencia de diferencias significativas: $P < 0,05$

Figura 32. Valores medios \pm error estándar de la media de los índices de linealidad y rectitud en función de la resistencia de los espermatozoides a la criopreservación.



Índices diferentes (a, b) indican la existencia de diferencias significativas: $P < 0,05$

Figura 33. - Valores medios \pm error estándar de la media del desplazamiento angular de la cabeza y de la frecuencia de batido en función de la resistencia de los espermatozoides a la criopreservación.



Índices diferentes (a, b) indican la existencia de diferencias significativas: $P < 0,05$

Por otro lado, del conjunto de variables de motilidad estudiadas, los mayores valores indicadores del poder discriminante, F y R^2 correspondieron por este orden a VCL, a la VAP y ALH. No obstante, el análisis de varianza indicó que de todos los valores de motilidad estudiados mediante el análisis objetivo CASA, sólo la velocidad curvilínea presentó diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,005$) entre los grupos de animales clasificados como “buenos” y “malos congeladores”.

2.4.4. DISCUSIÓN

Muchos estudios han demostrado que el espermatozoide es una célula dinámica, con vías bioquímicas activas que modifican la fisiología espermática a largo de la maduración, la eyaculación, el transporte en el tracto genital de la hembra y la fertilización. Estos cambios afectan a la batida flagelar (Tash J, Bracho, 1998, Chamberland *et al.*, 2001) por lo que los espermatozoides muestran diferentes patrones de motilidad en el epidídimo, en el plasma seminal, en el moco cervical, en el oviducto (capacitación) y durante la penetración en el ovocito (Boyers *et al.*, 1989). En muchos sentidos, la motilidad integra los sucesos

bioquímicos que ocurren en los espermatozoides. Además, las muestras espermáticas son heterogéneas, lo que implica que los espermatozoides con motilidades diferentes coexisten en un mismo eyaculado (Katz *et al.*, 1979; Chantler *et al.*, 2004). Por lo tanto, el uso de análisis “cluster” para agrupar subpoblaciones espermáticas basadas en las características de motilidad, puede ser útil en la predicción de la congelabilidad espermática (Martínez-Pastor *et al.*, 2005c; Ramón *et al.*, 2012) o la fertilidad (Quintero-Moreno *et al.*, 2003).

El valor predictivo de la motilidad se basa en el uso de la información dada, y no en el valor intrínseco de la motilidad en sí misma (Abaigar, 1999; Holt y Van Look, 2004; Martínez-Pastor *et al.*, 2005), por lo que la idea clásica que consideraba a los eyaculados como una población homogénea, ya no es válida (Núñez-Martínez *et al.*, 2006). Por tanto, un eyaculado constituye una población heterogénea en cuanto a los distintos patrones de motilidad de los espermatozoides que lo componen, por lo que es posible formar grupos diferentes en base a los distintos modelos de motilidad, y a su reacción frente al proceso de congelación-descongelación (Abaigar *et al.*, 1999).

En lo que respecta a esta tesis, del conjunto de variables de motilidad estudiadas, solamente se han encontrado diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,005$) entre los grupos de animales “buenos” y “malos” congeladores para la velocidad curvilínea (VCL), por lo que solamente este parámetro objetivo de motilidad podría utilizarse para discriminar los machos cuyos espermatozoides podrían presentar una mayor resistencia a la congelación.

Hay varios trabajos en los que se ha comprobado que algunos parámetros objetivos de motilidad pueden usarse para discriminar entre las distintas características de una muestra de semen. Así, trabajando con semen humano se ha conseguido predecir el porcentaje de espermatozoides que continuarían siendo viables después de la criopreservación basándose en las diferencias encontradas en los valores LIN y STR entre las subpoblaciones de valor más alto y de valor más bajo de cada muestra antes de la congelación, lo que supone la existencia de una relación entre la progresión de las trayectorias de los espermatozoides y su resistencia a la criopreservación. En cuanto a las variables predictoras, VSL y LIN fueron las variables primarias, mientras que VCL y ALH fueron las variables predictivas secundarias (Davis *et al.*, 1995b).

Por otra parte, también se han observado diferencias entre "buenos" y "malos" congeladores con respecto al área y a la forma de la cabeza de los espermatozoides epididimarios de ciervo ibérico antes de su congelación, siendo las cabezas espermáticas de las muestras procedentes de machos "buenos congeladores", más alargadas y estrechas que las de los espermatozoides del grupo de "malos congeladores" (Esteso *et al.*, 2006). Cabe señalar que se observaron claras diferencias cuando las comparaciones se hicieron entre especies en función de su capacidad para resistir el choque de frío, siendo los espermatozoides de las especies menos sensibles a la criopreservación más pequeños (Garde *et al.*, 2003).

También Thurston *et al.* (1999) y Thurston *et al.* (2001b) trabajando con semen de cerdo encontraron correlaciones entre algunas subpoblaciones con distinta morfología dentro de un mismo eyaculado y la resistencia a la congelación de las mismas, observando la existencia de variabilidad en la motilidad ($P < 0,01$), la integridad de la membrana ($P < 0,01$), la integridad del acrosoma ($P < 0,01$), VCL ($P < 0,01$), STR ($P < 0,05$), BCF ($P < 0,05$), y ALH ($P < 0,01$) tras la descongelación de las muestras. Las variaciones individuales entre animales en la resistencia a la congelación podrían estar determinadas genéticamente, siendo determinados componentes biofísicos de los espermatozoides los responsables de las diferencias entre "buenos" y "malos" congeladores.

Así, en semen de cerdo se ha comprobado la existencia de una población heterogénea en función de los patrones de motilidad seguidos por los espermatozoides de un eyaculado (Abaigar *et al.*, 1999), habiéndose observado mediante un análisis de "cluster" multivariante, que los espermatozoides difieren en su patrón de motilidad, en la formación de agrupaciones, y en la reacción durante el proceso de criopreservación, incluyendo la descongelación.

En este sentido, y teniendo en cuenta que una buena resistencia al proceso de congelación-descongelación es fundamental para mantener la capacidad fertilizante de una muestra de semen, Cortés *et al.* (2001) encontraron que el análisis mediante CASA puede proporcionar una estimación aproximada de la capacidad fecundante de los espermatozoides, siendo la VCL y el índice STR los parámetros objetivos que más pueden

influir en la fertilización. A esta misma conclusión llegaron Budworth *et al.* (1988) trabajando con semen de toro.

Por otro lado, las alteraciones funcionales y estructurales de las células espermáticas que influirían negativamente en la resistencia a la congelación de las mismas, podrían asociarse con muestras espermáticas de baja motilidad (Malo *et al.*, 2005) y, por tanto, las muestras con una baja calidad inicial deberían presentar una menor resistencia a la congelación. En este sentido, Soler (2003) observó la existencia de una correlación positiva entre los parámetros subjetivos de motilidad (MI y CM) y la resistencia a la congelación, trabajando con muestras epididimarias de ciervo ibérico,

El análisis cluster se ha utilizado en algunos estudios (Cerolini *et al.*, 2001; Martínez-Pastor *et al.*, 2005) para discriminar eficazmente entre machos dependiendo de la calidad de su semen. Así, Martínez-Pastor *et al.* (2005c) consiguieron clasificar a los machos de ciervo ibérico en función de la congelabilidad de sus espermatozoides mediante un análisis de cluster, observándose una correlación significativa entre la proporción de la subpoblación lineal antes de la congelación y la recuperación de la viabilidad tras la descongelación. Encontrar relaciones entre una subpoblación determinada y la calidad espermática es uno de los objetivos de los grupos de investigación que utilizan este tipo de análisis, aunque algunas veces los resultados no han sido concluyentes (Thurston *et al.*, 2002; Quintero-Moreno, 2003; Quintero-Moreno *et al.*, 2004).

Por otro lado, en un estudio realizado con muestras epididimarias de ciervo ibérico y a pesar de que los machos no habían sido preseleccionados para la congelabilidad, se observaron diferencias considerables entre animales para la mayoría de los parámetros de calidad de los espermatozoides descongelados. Los ciervos mostraron diferentes susceptibilidades a la congelación y la incubación postdescongelación independientemente de la calidad inicial de las muestras. En este contexto, los animales de los que se obtuvieron las muestras de espermatozoides pudieron categorizarse como “buenos” y “malos congeladores”, aunque a pesar de que se han reportado experiencias similares para diferentes especies, no se han encontrado explicaciones concluyentes que justifiquen estas diferencias. Los mecanismos de las diferencias de criosensibilidad entre diferentes individuos aun no se han determinado, pero sí ha habido algunas evidencias para las

diferencias fisiológicas entre espermatozoides de individuos de la misma especie (Leibo y Bradley, 1999). Los espermatozoides de eyaculado adquieren sensibilidad al choque de frío durante su paso por el epidídimo, pero esto no explica las diferencias de los espermatozoides epididimarios macho a macho. Una posible explicación podría ser que tales diferencias reflejen propiedades de las membranas espermáticas que han sido determinadas genéticamente (Soler *et al.*, 2003).

Continuando con las correlaciones entre algunos de los parámetros de calidad del semen y la resistencia a la congelación, indicar que han sido generalmente muy débiles. Esto podría deberse a que las pruebas evaluadas fueran independientes del estrés osmótico, siendo éste el principal responsable de los cambios ocurridos en los espermatozoides durante la congelación (Curry y Watson, 1994; Noiles *et al.*, 1997). En este sentido, Garde *et al.* (2003) encontraron diferencias en la resistencia a la congelación entre distintas razas de gacelas que podrían deberse principalmente a la diferente sensibilidad al choque osmótico.

Otra posible explicación de la escasa predicción observada respecto a la resistencia a la congelación, es que alguna de las diferentes subpoblaciones presentes en la muestra de semen pueda correlacionarse con la resistencia a la congelación, no encontrándose dicha correlación cuando no se estudia para cada una de las subpoblaciones por separado, sino que se hace para la totalidad de la muestra (Soler, 2003).

Por último y como conclusión de este apartado, los resultados de los análisis “cluster” y de varianza entre los grupos de ciervos clasificados como “buenos o malos congeladores” han mostrado, que solamente la velocidad curvilínea podría utilizarse para discriminar los machos cuyos espermatozoides podrían presentar una mayor resistencia a la congelación.

3. CONCLUSIONES

- los espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo de ciervo ibérico, se muestran activos, presentan una motilidad progresiva y no alteran la dirección de su trayectoria excepto cuando chocan entre ellos o se cruzan con obstáculos. Asimismo, los valores de los parámetros objetivos de motilidad observados en esta tesis son muy similares a los presentados en otros trabajos para el ciervo ibérico.
- Los espermatozoides procedentes del epidídimo de ciervo ibérico presentan una buena resistencia a la criopreservación.
- Se ha observado una pérdida de calidad en la motilidad de los espermatozoides en la evaluación posterior al proceso de incubación (2 horas a 37°C), aunque en el caso de los espermatozoides epididimarios de ciervo ibérico podría calificarse como moderada.
- Los parámetros rutinarios de calidad que han mostrado estar relacionados significativamente con algunos de los parámetros objetivos de motilidad, han sido: el porcentaje de espermatozoides con acrosomas normales, el porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva y, especialmente, el porcentaje de espermatozoides móviles.
- Después de la descongelación, las tres velocidades objetivas (VCL, VSL y VAP) se han relacionado con el porcentaje de espermatozoides vivos (EVd), el porcentaje de espermatozoides móviles (MId) y el porcentaje de espermatozoides con acrosomas normales (NARd) tras al descongelación. Asimismo, LIN se ha relacionado con MId y, en menor medida, con NARd. El grado de relación o dependencia ha sido bajo en casi todos los casos.
- Se ha observado un mayor porcentaje de espermatozoides móviles y una mayor calidad de movimiento durante los meses de fotoperíodo decreciente. Los valores más altos para las velocidades de los espermatozoides y para los índices LIN y STR

se observaron en la post-berrea, mientras que los más bajos se presentaron al final de la estación reproductiva. Ocurrió lo contrario para ALH y BCF.

- Los resultados obtenidos en esta tesis hacen pensar en la conveniencia de criopreservar las muestras espermáticas obtenidas durante los dos primeros meses de la época reproductiva.
- Los valores de los parámetros objetivos de motilidad, apenas presentan diferencias para las distintas edades de los animales cuando se analizan año a año. Sin embargo, al clasificar a los animales en tres grupos diferentes de edades, si se observaron diferencias significativas en los parámetros LIN, STR y ALH para el grupo de animales más jóvenes.
- Los espermatozoides de ciervo ibérico pueden aguantar bien la criopreservación a cualquier edad, habiéndose mantenido altos los valores de los parámetros objetivos de motilidad obtenidos mediante CASA después del proceso de criopreservación.
- El perímetro torácico no parece influir significativamente en ninguno de los parámetros objetivos de motilidad en las muestras frescas. Sin embargo, el aumento de la condición corporal en los machos de ciervo ibérico, podría asociarse con una disminución del vigor de los espermatozoides y una ligera mejoría en la progresividad de su movimiento.
- De todos los valores de motilidad estudiados mediante el análisis objetivo CASA, solamente VCL presentó diferencias significativas entre los grupos de animales clasificados como “buenos” y “malos congeladores”, y por tanto es el único parámetro objetivo que podría utilizarse para discriminar los machos cuyos espermatozoides podrían presentar una mayor resistencia a la congelación.

4. BIBLIOGRAFÍA

- Abaigar T, Cano M, Picckard AR, Holt WV. Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize ejaculate quality in Mohor gazelles (*Gazelle dama mhorri*): effects of body weight, electroejaculation technique and short-term semen storage. *Reproduction* 2001; 122:265-273.
- Abaigar T, Holt GV, Harrison RAP, del Barrio G. Sperm subpopulations in boar (*scrofa de Sus*) and Mohor gazelles (*Gacella dama mhorri*) according to Pattern Analysis by computer-assisted analysis. *Biol Reprod* 1999; 60:32-41.
- Adams LG, Dale BW. Timing and synchrony of parturition in Alaskan caribou. *J Mammal.* 1998; 79:287-294.
- Aguado MJ, Garde J, Gracia O, Rescalvo L, Pérez-Guzmán MD, montoro V. Variaciones de las características seminales de moruecos de raza Manchega en función de la edad. VII Jornadas Int. *Reprod. Anim. E I.A* 1994; p. 108.
- Ahmad K, Chaudhry RA. Cryopreservation of buffalo semen. *Vet Rec* 1980 ;106 : 199-201.
- Aitken R.J. y Baker M.A. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod. Fertil. Dev.* 2004; 16: 581–588.
- Aitken RJ, Best FSM, Warner P. Aprospective study of the relationship between semen quality and fertility in cases of unexplained infertility. *J Androl* 1984 ; 5:297-303.
- Aitken R, Krausz C and Buckingham D. Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Mol Reprod Develop* 1994; 39:268–279.
- Aitken RJ, Nixon B, Lin M, Koppers AJ, LeeY H, Baker,M.A. Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian J. Androl.* 2007; 9: 554–564.
- Álvarez M, Gracia Macías V, F. Martínez-Pastor F, Martínez F, Borragan S, Mata M, Garde JJ, Anel L, De Paz P. Effects of cryopreservation on head morphometry and its relation with chromatin status in brown bear (*Ursus arctos*) spermatozoa. *Theriogenology* 2008; 1498–1506.
- Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl.* 1992;13:232–241.
- Alvarez JG, Storey BT. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. *J Androl* 1993 ; 14:199-209.
- Álvarez Lleó Cristina. Análisis integrado de morfología y movilidad espermática humana con el uso del sperm class analyzer. Tesis Doctoral 2003;
- Álvarez R. Determinación de pesos de becerros de doble propósito en base a mediciones corporales. Tesis de grado 1991 ; 45 pp.
- Amann RP, Hammerstdt RH. In vitro evaluation of sperm quality: An opinion. *J Androl* 1993 ; 14:397-405.

Amann RP, Almquist JO. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *J. Dairy Sci.* 1962; 45:774.

Amann RP, Hay SR, Hammersttdt RH. Yield, characteristics, motility and cAMP content of sperm isolated from seven regions of ram epididymis. *Biol Reprod* 1982; 27: 723-733.

Amann RP, Seidel GE and Mortimer RG. Fertilizing potential in vitro of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. *Theriogenology* 2000; 54:1499–1515.

Anel L, García A, Boixo JC, López-Sáez A, Anel E, Soler AJ, Martínez F, De Paz P, Álvarez m, Garde JJ. Evolución estacional de la producción espermática en el ciervo ibérico (electroeyaculación): aspectos cuantitativos. IV Jornadas Españolas de Conservación y Estudio de Mamíferos 1999 ; 20:624-626.

Anel L, García A, Martínez F, Soler AJ, Anel E, López-Sáez A, Alvarez M, Boixo JC, Paz P, Garde JJ. Evaluación preliminar de la edad como factor de variación en la electroeyaculación del ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*). IX Jornadas sobre Producción Animal. ITEA 2001 ; 22:820-822.

Anel L, Garde J, Álvarez M, García A, Martínez F, López-Sáez A, De Paz P, Soler A, Herráez P, Peña E. Production and quality in electroeyaculated semen of iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*): seasonal variations. 14 th Congr Anim Reprod 2000; 2; 18.

Anel-López, L., Alvarez-Rodríguez, M., García-Alvarez, O., Alvarez, M., Maroto-Morales, A., Anel, L., de Paz, P., Garde, J.J., Martínez-Pastor, F. Reduced glutathione and Trolox (vitamin E) as extender supplements in cryopreservation of red deer epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 2012; 135:37-46.

Ansha GA, Buckland RB. Genetic variation in fowl semen cholesterol and phospholipid levels and the relationship of these lipids with fertility of frozen-thawed and fresh semen. *Poult Sci* 1982 ; 61:623-637.

Arenas P. El fotoperiodo y su relación con la reproducción del venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en el Altiplano Potosino. Tesis para la obtención del grado de Maestro en ciencias, recursos genéticos y productividad y ganadería. Estado de México, 2011.

Asher G. Artificial breeding technologies for farmed deer. Proc 2nd World Deer Farming Congress 1998 ; pp 161-170.

Asher, GW, Adam, JL, Otway, W, Bowmar, P, van Reenan, G, Mackintosh, CG, Dratch, P. Hybridisation of Pe're David's deer (*Elaphurus davidianus*). and red deer (*Cervus elaphus*) by artificial insemination. *J. Zool.* 1988; 215: 197–203.

Asher G, Berg D, Evans G, Salamon S, Maxwell W. Storage of semen and artificial insemination in deer. *Anim Reprod Sci* 2000; 62:195–211.

Asher GW, Fisher MW: Reproductive physiology of farmed Red Deer (*Cervus elaphus*) and Fallow Deer (*Dama dama*). In *Wildlife production: Conservation and sustainable development*. Edited by Renecker LA, Hudson RJ. Fairbanks: University of Alaska Fairbanks; 1991:474-484.

Asher G, Montfort SL, Wemmer C. Comparative reproductive function in cervids: implications for management of farm and zoo populations. *J Reprod Fertil Suppl* 1999; 54: 143-156.

- Asher G, Peterson, AI y Bass, JI. Seasonal pattern of LH and testosterone secretion in adult male fallow deer, *Dama dama*. Journal of Reproduction and Fertility 1989; 85: 657-665.
- Bag S, Joshi A, Naqvi SMK, Mittal JP. Effect of post-thaw incubation on sperm kinematics and acrosomal integrity of ram spermatozoa cryopreserved in medium-sized French straws. Theriogenology 2004 ;
- Bahga CS, Khokar BS. Effect of different seasons on concentration of plasma luteinizing hormone and seminal quality vis-a-vis freezability of buffalo bulls (*Bubalus bubalis*). Int J Biometeorol 1991; 35: 222-224.
- Barrat CLR, Tomlinson MJ, Cooke ID. Prognostic significance of computerized motility analysis for in vivo fertility. Fertil Steril 1993; 60 : 520-525.
- Blanco O. Análisis objetivo de la motilidad espermática. Evaluación de los espermatozoides de verraco y su relación con la fertilidad. Tesis Doctoral 1998; 170pp.
- Blash S, Melican D, Gavin W. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goat. Theriogenology 2000; 54: 899-905.
- Blottner S, Hingst O, Meyer H. Inverse relationship between testicular proliferation and apoptosis in mammalian seasonal breeders. Theriogenology 1995; 44: 321-7.
- Blottner S, Hingst O, Meyer H. Seasonal spermatogenesis and testosterone production in roe deer (*Capreolus capreolus*). J Reprod Fertil 1996; 108: 299-305.
- Boever J, Knox D, Merilan C, Read B. Estrus induction and artificial insemination with successful pregnancy in Speke's gazelle. In: Proceedings of the 9th International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination, Madrid, Spain. 1980; 2: 565-569.
- Bonet S, Briz MD, Fradera A. Estudio comparativo entre la morfología espermática del eyaculado de verracos sometidos a extracciones de semen cada dos días y la morfología del espermatozoides procedente de las tres regiones epididimarias. Anaporc 1993; 194: 30-38.
- Bowyer RT: Timing of parturition and lactation in southern mule deer. J Mammal 1991; 72: 138-145.
- Boyers SP, Davis RO, Katz DF. Automated semen analysis. Curr Probl Obstet Gynecol Fertil 1989; 12:167-200.
- Braun J, Torres-Boggino F, Hochi S, Oguri N. Effect of seminal plasma on motion characteristics of epididymal and ejaculated stallion spermatozoa during storage at 5 degrees C. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 1994; 101: 319-322.
- Bravo JA; Montanero J; Calero R; Roy TJ. Sperm motility variables in ile de france ram measured by computer-assisted sperm analysis (CASA). XXXV Congreso de la SEOC Valladolid 2010.
- Bravo JA; Montanero J; Calero R; Roy TJ. Relations among the subjective and Computer-Assisted variables of ram sperm motility. Arch. Zootec. 2011; 60: 1087-1094.
- Brooks DE, Higgins SJ. Characterization and androgen-dependence of proteins associated with luminal fluid spermatozoa in the rat epididymis. J Reprod Fert. 1980; 59: 363-375.

Brooks AK, Quinn P, Schmidt CF, Serafy NTJr, Serafy NTSr, Schalue K. Results of the American Association of Bioanalysts national proficiency testing programme in andrology. *Human Reprod.* 2000; 15: 680-686.

Brown J, Wildt D, Raath J, de Vos V, Howard J, Janssen D. Impact of season on seminal characteristics and endocrine status of adult free-ranging African buffalo (*Syncerus caffer*). *J Reprod Fertil* 1991;92: 47-57.

Bray GA. Obesity and reproduction. *Hum Reprod* 1997; 12:26-32.

Brinklow BR, Loudon AS. Gestation periods in the Pere David's deer (*Elaphurus davidianus*): evidence for embryonic diapause or delayed development. *Reprod Fertil Dev.* 1993; 5:567-575.

Brinsko SP, Rigby SL, Lindsey AC, Blanchard TL, Love CC, Varner D D. Pregnancy rates in mares following hysteroscopic or transrectally-guided insemination with low sperm numbers at the utero-tubal papilla. *Theriogenology* 2003; 59: 1001-1009

Brito LFC, Silva AEDF, Rodrigues L, Vieira FV, Deragon LAG, Kastelic JP. Effect of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. *Anim Reprod Sci* 2002; 70:181-190.

Bronson FL Mammalian reproduction: an ecological perspective.1985; *Biology of Reproduction* 1985; 32: 1-26.

Bubenik GA. Shift of seasonal cycle in white-tailed deer by oral administration of melatonin. *Journal of Experimental Zoology* 225: 155-156.

Budworth PR, Amann RP, Chapman PL. Relationships between computerized measurements of motion of frozen thawed bull spermatozoa and fertility. *J Androl* 1988; 9: 41-54.

Bunnell FL. Factors controlling the lambing period of Dall's sheep. *Can. J. Zool.* 1980; 58. 1027-1031.

Caballero, R. 1985 Hábitat y Alimentación del Ciervo en Ambiente Mediterráneo. Madrid: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. ICONA

Caiza de la Cueva FI. Estudio sobre la resistencia al estrés osmótico de espermatozoides porcinos y equinos. Tesis Doctoral 1998.

Cancel A, Lobdell D, Mendola P, Perreault S. Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. *Hum Reprod* 2000; 15:1322-1328.

Cassani P, Beconi M. T., Flaherty CO. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. *Anim. Reprod. Sci.*2005; 86: 163-173.

Catena M, Cabodevila, J. Evaluación de semen bovino congelado. *Port Vet* 2003.

Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction* 2001; 121:395-401.

Chamberland A, Fournier V, Tardif S, Sirard M, Sullivan R, Bailey J. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology* 2001; 55: 823-35.

- Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev.* 2001; 59: 451–458
- Cheng FP, Wu JT, Chan JP, Wang JS, Fung HP, Colenbrander B. The effect of different extenders on post-thaw sperm survival, acrosomal integrity and longevity in cryopreserved semen of Formosan Sika deer and Formosan Sambar deer. *Theriogenology* 2004; 61: 1605–16.
- Ciereszko A, Dabrowski K & Ochkur SL 1996 Characteristics of acrosin-like activity of Lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 45 72–77.
- Clutton-Brock TH, Guinness FE, Albon SD. Red deer: behavior and ecology of two sexes. Chicago: Chicago U.P. 1982.
- Coetzee, K, Kruger, T., Lombard, CJ. Assessment of inter- and intra-laboratory sperm morphology readings using a Hamilton Thorne research IVOS semen analyser. *Fertil. Steril.* 1999; 71: 1–5
- Cooper TG. Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Hum Reprod* 2005; 20: 9–11.
- Cooper TG, Atkinson AD, Nieschlag E. Experience with external quality control in spermatology. *Hum Reprod* 1999; 14: 765-769.
- Cooper TG and Yeung C-H. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Techn* 2003; 61: 28–38.
- Corteel J.M., Leboeuf B., Baril G. Artificial breeding of adult goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. *Small Rumin Res.* 1988; 1: 19-35.
- 8
- Cortés S, Agustín S, González B, Sarrias O, Núñez R, Caballero P. Relación entre la movilidad espermática, los parámetros cinéticos y tasa de fecundación en FIV. Comunicación oral. 24 Congreso Nacional SEF 2001.
- Courtens JL, Ekwall H, Paquignon M, Ploen L. Preliminary study of water and some element contents in boar spermatozoa, before, during and after freezing. *J Reprod Fertil.* 1989; 87: 613–626.
- Cremades T, Roca J, Rodríguez-Martínez H, Abaigar T, Vazquez JM, Martínez EA. Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa. *J of Androl* 2005; 26 (5): 610-618.
- Critser J, Arneson B, Aaker D, Huse-Benda A, Ball D. Cryopreservation of human spermatozoa II. Postthaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fert Steril* 1987; 47: 980-984.
- Crosier AE, Marker L, Howard JG, Pukazhenthil BS, Henghali JN, Wildt DE. Ejaculate traits in the Namibian cheetah (*Acinonyx jubatus*): influence of age, season and captivity. *Reproduction, Fertility and Development* 2007, 19, 370–382
- Cseh S, Polichronopoulos T, Solti L. Prediction of Bull fertility by computer assisted semen analysis. *Reprod Fertil Dev* 2003; 16: 128-129.
- Cummins JM, Jequier AM, Kan R. Molecular biology of the human male fertility: links with ageing. *Mol Reprod Dev* 1994; 37: 345-362.

- Curry MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *J Reprod Fertil* 2000;5: 46-52.
- Curry MR, Watson PF. Osmotic effects on ram and sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology* 1994;31: 39-46.
- D'Alenssandro AG y Martemucci G. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Lecce ram. *Anim Reprod Sci.* 2003; 79: 93-102.
- Darling FF. A herd of red deer, a study in animal behavior, 1st ed. London: Oxford University Press, 1937.
- Davis RO, Drobnis EZ, Overstreet JW. Application of multivariate discriminate function, cluster, and regression analysis to models of sperm cryodamage. *Fertil Steril* 1995b;63:1051-1057.
- Davis RO, Katz DF. Standardization and comparability of CASA instruments. *J Androl* 1992;13: 81-86.
- Davis RO, Katz DF. Computer-aided sperm analysis (CASA): image digitization and processing. *Biom Artif Cells Artif Organs* 1989;17: 93-116.
- Davis RO, Siemers RJ. Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. *Reprod Fertil Dev* 1995;7: 857-869.
- De Pauw IMC, Goff AK, Van Soom A, Verberckmoes S, de Kruif A. Hormonal regulation of bovine secretory proteins derived from caput and cauda epididymal epithelial cell cultures. *J Androl.* 2003; 24: 401-407.
- De Pergola G. The adipose tissue metabolism: role of testosterone and dehydroepiandrosterone. *Int J obes Relat metab Disord* 2000; 24: 59-63.
- De Geyter Ch, de Geiter M, Koppers B, Nieschlag Diagnostic accuracy of computer assisted sperm motion analysis *Hum. Reprod* 1998; 13: 2512-2520.
- De Pauw IM, Van Soom A, Maes D, Verberckmoes S, de Kruif A. Effect of sperm coating on the survival and penetrating ability of in vitro stored bovine spermatozoa. *Theriogenology* 2003; 59:1109-1122.
- Devrius LO, Eriksson H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp Cell Res* 1996; 42: 136-156.
- Diniz L, Dos Santos E, Barbanti JM. Evaluation of semen characteristics of the species *Mazama americana* in captivity. *Animal Production Science* 2013; 53(5): 472-477.
- Ditchkoff S, Spicer L, Masters R, Lochmiller R. Concentrations of insulin-like growth factor-I in adult male white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): associations with serum testosterone, morphometrics and age during and after the breeding season. *Comp Biochem Physiol A* 2001; 129:887-895.
- Dominguez-Rebolledo AE, Fernandez-Santos MR, Bisbal A, Ros-Santaella JL, Ramón M, Carmona M, Martinez-Pastor F, Garde JJ. Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. *Reprod Fertil Dev* 2010, 856-870.

- Domínguez-Rebolledo AE, Martínez-Pastor F, Fernández-Santos MR, Del Olmo E, Bisbal AF, Ros-Santaella JL, Garde JJ. Comparison of the TBARS Assay and BODIPY C11 Probes for Assessing Lipid Peroxidation in Red Deer Spermatozoa. *Reprod Dom Anim* 2010; 45: 360–368.
- Domínguez-Rebolledo AE, Martínez-Pastor F, Bisbal AF, Ros-Santaella JL, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Soler AJ, Garde JJ, Fernández-Santos MR. Response of Thawed Epididymal Red Deer Spermatozoa to Increasing Concentrations of Hydrogen Peroxide, and Importance of Individual Male Variability: Oxidative Stress in Red Deer Spermatozoa. *Reprod Domest Anim*. 2011; 46: 393-403.
- Donnelly ET, Lewis SEM, McNally J, Thompson W. In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on FIV outcome. *Fertil Steril* 1998; 70: 305-31.
- Dorado J, Acha D, Gálvez MJ, Ortiz I, Carrasco JJ, Díaz B, Gómez-Arrones V, Calero-Carretero R. Sperm motility patterns in Andalusian donkey (*Equus asinus*) semen: Effects of body weight, age, and semen quality. *Theriogenology* 2013; 79: 1100–1109.
- Drobnis EZ, Clisham PR, Brazil CK, Wisner LW, Zhong CQ, Overstreet JW. Detection of altered acrosomal physiology of cryopreserved human spermatozoa after sperm residence in the female reproductive tract. *J Reprod Fertil* 1993; 99: 159-165.
- Dradjat, A.S. Artificial breeding and reproductive management in chital deer. 1997 PhD Thesis, University of Sydney.
- Dziekońska A, Fraser L, Strzeżek J. Effect of different storage temperatures on the metabolic activity of spermatozoa following liquid storage of boar semen. *Journal of Animal and Feed Sciences* 2009; 18: 638–649.
- Ellington JE, Varner DD, Mathison D, Ignatz GG, Padilla AW, Miller PG, Ball BA. Equine sperm and oviductal epithelial (uterine tubal) interactions in coculture. *Molecular Andrology* 1993; 101-111.
- Esteso MC. Evaluación objetiva de la morfometría de los espermatozoides de ciervo. Relaciones con la congelabilidad y calidad del semen. Tesis doctoral 2006. Universidad de Castilla la Mancha.
- Esteso MC, Fernandez-Santos MR, Soler AJ, Garde JJ. Head dimensions of criopreserved red deer spermatozoa are affected by thawing procedure. *Cryo Letters* 2003; 24: 261-268.
- Esteso MC, Fernandez-Santos MR, Soler AJ, Montoro V, Martinez-Pastor F, Garde JJ. Identification of sperm-head morphometric subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm samples. *Reprod Domest Anim* 2009; 44: 206 –11.
- Esteso MC, Fernandez-Santos MR, Soler AJ, Quintero-Moreno A, Garde JJ. Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm samples. *J Androl* 2006; 27: 663-670.
- Evans G, Maxwell W. Manejo y valoración del semen. En: inseminación artificial de ovejas y cabras 1989; pp 95-107.
- Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 1998; 49: 871-879.

Fennessy, P.F., Mackintosh, C.G., Shackell, G.H. Artificial insemination of farmed red deer (*Cervus elaphus*). Anim. Prod. 1990; 51, 613–621.

Fernandes PA, McCoshen JA, Math MC, Kredentser JV, Wodzicki AM. Quantitative analysis of the effect of freezing on donor sperm motion kinetics. Fert Steril 1990; 54: 322-327.

Fernández-Santos MR, Estes MC, Montoro V, Soler AJ, Garde JJ. Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: Effects of egg yolk, glycerol and cooling rate. Theriogenology 2006 b; 66: 1931-1942.

Fernández-Santos MR, Estes M, Montoro V, Soler AJ, Garde JJ. Influence of Various Permeating Cryoprotectants on Cryopreservation of Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: Effects of concentration and temperature of addition. J Androl , 2006c; 27: 734-745 .

Fernández-Santos MR, Estes M, Soler AJ, Montoro V, Garde JJ. Effects of egg yolk and cooling rate on the survival of refrigerated red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. Reprod Domest Anim 2006a, 41: 114–118.

Fernández-Santos MR, Martínez Pastor F, García Macías V, Estes MC, Soler AJ, de Paz P, Anel L, Garde JJ. Sperm characteristics and DNA integrity of Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) Epididymal spermatozoa frozen in the presence of enzymatic and no enzymatic antioxidants. J Androl 2007; 294-305.

Fernández-Santos MR, Martínez-Pastor F, Matias D, Domínguez-Rebolledo AE, Estes MC, Montoro V, Garde JJ. Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. Animal Reproduction Science 2009; 111: 93–104.

Fiser P, Fairfull R. Effects of changes in photoperiod on freezability of ram spermatozoa. Cryobiology 1983;20: 684-689.

Fiser P, Fairfull R. The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. Cryobiology 1986; 23: 518-524.

Fiser P, Fairfull R. The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. Criobiology 1989; 26: 64-69.

Fiser P, Hansen C, Underhill L, Marcus G. New thermal stress test to asses the viability of cryopreserved boar sperm. Cryobiology 1991; 28: 454-459.

Flores E, Fernández-Novell JM, Peña A, Rodríguez-Gil JE. The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. Theriogenology 2009; 72: 784 –97.

Foote R. Fertilizing ability of epididymal sperm from dead animals. J Androl 2000; 21:355.

Gago C, Soler C, Pérez Sánchez F, Yeung CH, Cooper TG. Effect of cetrorelix on sperm morphology during migration through the epididymis in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). Int J Androl 1998; 21: Int J Androl.

Gaillard JM, Delorme D, Jullien JM, Tatin D. Timing and synchrony of births in roe deer. J Mammal 1993; 74: 738-744.

García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Berlinguerc F, Fernández-Santos MR, Estesoe MC, Mermillof P, Ortiz JA, Ramon, Pérez-Guzmán MD, Garde JJ, Soler AJ. Effect of storage temperature during transport of ovaries on in vitro embryo production in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Theriogenology* 75 (2011) 65–72.

García AJ, Landete-Castillejos T, Zarazaga L, Garde J, Gallego L: Seasonal changes in melatonin concentrations in female Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *J Pineal Res* 2003; 34, 161–166.

García-Macías V, Martínez-Pastor F, Álvarez M, Garde JJ, Anel E, Anel L, de Paz P. Assessment of chromatin status (SCSCA^R) in epididymal and ejaculated sperm in Iberian red deer, ram and domestic dog. *Theriogenology* 2006; 66: 1921–1930.

Garde JJ. Aplicación de la biotecnología de la reproducción a la gestión de poblaciones naturales de ciervo. Discurso de ingreso en la Real Academia Nacional De Ciencias Veterinarias. Madrid, 2006.

Garde JJ. Técnicas de reproducción asistida aplicada a poblaciones cinegéticas de cérvidos. Jornada de actualización "El ciervo Ibérico: producción y manejo 2001; 20pp.

Garde JJ. Congelación de semen en la especie ovina: características biológicas de las dosis descongeladas. Tesis Doctoral 1993; 1-46.

Garde JJ, Anel E, López-Sáez A, Boixo JC, Ortiz N, Martínez F, Alvarez M, Gallego L, Anel L. Electroeyaculación en el ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*): Características espermáticas. II Congreso Ibérico de Reproducción animal 1999; 476-478.

Garde JJ, del Olmo A, Soler AJ, Espeso G, Gomendio M, Roldan ERS. Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*) *Animal Reproduction Science* 2008; 108:384–401.

Garde JJ, Martínez-Pastor F, Gomendio, Soler AJ, Fernández-Santos, Estesoe MC, García AJ, Anel L, Roldán E. The application of reproductive Technologies to natural populations of red deer. *Reprod Dom Anim* 2006; 41: 93-102.

Garde JJ, Ortiz N, García A.J, Gallego L, Landete-Castillejos T, López Sáez A. postmortem assessment of sperm characteristics of the red deer during the breeding season. *Arch Androl* 1998; 41: 195-202.

Garde JJ, Ortiz N, García A, Gallego L, Landete-Castillejos T, López Sáez A. Criopreservación postmortem de material espermático e inseminación artificial en el ciervo ibérico. *Arch. Zootec.* 1988; 47: 351-356

Garde JJ, Soler AJ, Cassinello J, Crespo C, Malo AF, Espeso G, Gomendio M, Roldán ERS. Sperm cryopreservation in three species of endangered gacelles (*Gacella cuvieri*, *G dama mhorrr*, and *G dorcas neglecta*). *Biology of reproduction* 2003; 69: 602-611.

Gerlach T, Aurich J. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Anim Reprod Sci* 2000; 58:197–213.

Gerber D, Irons E, Arlotto A, Cooper D. Quality and freezability of epididymal semen from African buffalo (*Syncerus caffer*) under field conditions. *Theriogenology* 2001; 55: 384 (Abstr.).

Gergely A, Kovanci E, Senturk L, Cosmi E, Vigue L and Huszar G. Morphometric assessment of mature and diminished-maturity human spermatozoa: sperm regions that reflect differences in maturity. *Hum Reprod* 1999; 14:2007–2014.

Gizejewski Z. Effect of season on characteristics of red deer (*Cervus elaphus L*). Semen collected using modified artificial vagina. *Reprod Biol* 2004; 4:51-66.

Gizejewski Z, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. Postmortem examination of genital organs and characteristics of epididymal spermatozoa from wild red deer stags *Cervus elaphus carpaticus* var. *montanus*. *Proc 2nd World Conf Mt Ungulates*, 1998; pp 121-128.

Goeritz F, Quest M, Wagener A, Fassbender M, Broich A, Hildebrandt TB, Hofmann RR., Blottner S. Seasonal timing of sperm production in roe deer: interrelationship among changes in ejaculate parameters, morphology and function of testis and accessory glands. *Theriogenology* 2003; 59: 1487–1502.

Gomendio M, Cassinello J, Roldán ERS. A comparative study of ejaculate traits in three endangered ungulates with different levels of inbreeding: fluctuating asymmetry as an indicator of reproductive and genetic stress. *Proc R Soc Lond B* 2000; 267: 875-882.

GomendioM, Malo AF, Garde J, Roldan ERS. Sperm traits and male fertility in natural populations. *Society for Reproduction and Fertility* 2007; 134: 19-29.

Gomendio M, Malo AF, Soler AJ, Fernández-Santos MR, Estes M, García AJ, Roldan ERS, Garde JJ. Male fertility and sex ratio at birth in red deer. *Science* 2006a; 314: 1445-1447.

Gomendio, M, Martin-Coello, J, Crespo, C, Magaña, C, Roldan, E.R.S. Sperm competition enhances functional capacity of mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006b. 103: 15113-15117.

Gomendio M, Roldán ERS. Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility 2008; *Int. J. Dev. Biol.* 52: 439-447.

Gomendio M, Roldán ERS. Sperm competition influences sperm size in mammals. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 1991; 243: 181-185.

Gómez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl* 1996; 17:276–287.

Gómez-Cuétara Aguilar C. Factores que afectan a la capacidad de congelación del semen equino. Inducción de la rescisión acrosómica en semen fresco y descongelado. Tesis doctoral 1999.

Goovaerts IG, Hoflack GG, Van Soom A, Dewulf J, Nichi M, de Kruif A, Bols PE. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton-Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. *Theriogenology*. 2006; 66(2): 323-30.

Gordon I. Controlled reproduction in deer. In: Gordon I, Controlled Reproduction in Horses, Deer and Camelids 1997; 4 of Controlled reproduction in farm animals, 1st edn. CAB International, Oxon, UK: 168–188.

Gosch B, Fischer K. Seasonal changes of testis volume and sperm quality in adult fallow deer (*Dama dama*) and their relationship to the antler cycle. *J Reprod Fert* 1989;85: 7-17.

- Goss RJ. Photoperiodic control of antler cycles in deer. I. Phase shift and frequency changes. *Journal of Experimental Zoology* 1969a; 170: 311-324.
- Goss RJ. Photoperiodic control of antler cycles in deer. II. Alterations in amplitude. *Journal of Experimental Zoology* 1969b; 171: 223-234.
- Goss RJ y Rosen JK. The effect of latitude and photoperiod on the growth of antlers. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1973. Supplement 19, 111-118.
- Graham J. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology* 1994; 41: 1151-1162.
- Graham J. Cryopreservation in stallion spermatozoa. *Vet Clin North Ame* 1996;12: 131-147.
- Gravance CG, Davis RO. Automated sperm morphometry analysis (ASMA) in the rabbit. *J Androl* 1995; 16: 88-93.
- Grover A, Smith CE, Gregory M, Cyr DG, Sairam MR, Henno L. Effects of FSH receptor deletion on epididymal tubules and sperm morphology, numbers, and motility. *Mol Reprod Dev* 2005; 72: 135-144.
- Hafez ESE. Reproducción e inseminación artificial en animales. Nueva editorial Interamericana 1989; 694 pp.
- Haigh JC. Artificial insemination of two white tailed deer. *JAVMA* 1984;185: 1446-1447.
- Haigh JC, Barth A, Bowman P. An evaluation of extenders for wapiti, (*Cervus elaphus*), semen. *J Zoo Anim Med* 1986;17:129-36.
- Haigh JC, Barth AD, Cates WF, Glover GJ. Electro-ejaculation and semen evaluation of wapiti. *R Soc N Z* 1985; 22:197-203.
- Haigh JC, Cates WF, Glover GJ, Rawlingst NC. Relationships between seasonal changes in serum testosterone concentrations, scrotal circumference and sperm morphology to male wapiti (*Cervus elaphus*). *J Reprod Fert* 1984; 70: 413-418.
- Hammoud AO, Wilde N, Gibson M, Parks A, Carrell DT, Meikle AW. Male obesity alteration in sperm parameters. *Fertil Steril* 2008; 90 (6): 2222-5.
- Herrick JR, Bartels P, Krisher RL. Postthaw evaluation of in vitro function of epididymal sperms from four species of free-ranging African bovinds. *Biol Reprod* 2004; 71: 948-958.
- Hidalgo M. Estudio del efecto de la congelación-descongelación sobre los parámetros morfométricos del espermatozoide de macho cabrío. Tesis doctoral 2003.
- Hirai M, Boersma A, Hoefflich A, Wolf E, Foll J, Aumüller R, Braun J. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): Relation to fertility and seminal plasma growth factors. *J Androl* 2001; 22: 104-110.
- Hirano Y, Shibahara H, Obara H, Suzuki T, Takamizawa S, Yamaguchi C, Tsunoda H, Sato I. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2001; 18: 213-218.

Hishinuma M, Suzuki K, Sekine J. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4° C. *Theriogenology* 2003;59: 813-820.

Hochereau-de Reviere MT, Lincoln GA. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. *J Reprod Fert* 1978; 54: 209-213.

Hochereau-de Reviere MT, Perreau C, Lincoln GA. Photoperiodic variations of somatic and germ cell populations in the Soay ram testis. *J Reprod Fert Dev* 1985;74: 329-334.

Holt C, Holt WV, Moore HDM. Choice of operating Conditions to Minimize Sperm Subpopulation Sampling Bias in the Assessment of Computer-Assisted Semen Analysis Boae Semen by. *J Androl* 1996a; 15.

Holt W, Morris GJ, Coulson G, North RD. Direct observation of cold-shock effects in ram spermatozoa with the use of a programmable cryomicroscope. *J Exp Zool* 1988; 246: 305-314.

Holt WV. Germoplasm cryopreservation in elephants and wildt ungulates. In: *Cryobanking the genetic resource. Wildlife conservation for the future?*. Taylor and Francis 2001; pp 319-348.

Holt WV. Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. *Reprod Dom Anim* 1996;31: 17-24.

Holt WV, Abaigar T, Jabbour HN. Oestrous synchronization, semen preservation and artificial insemination in the Mohor gazelle (*Gazella dama mhorr*) for the establishment of a genome resource bank programme. *Reprod, Fert and Dev* 1996b; 8: 1215-1222.

Holt WV, Head MF, North RD. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *Biol Reprod* 1992; 46: 1086-1094.

Holt WV, North RD. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol Reprod* 1994; 51: 414-424.

Holt WV Van Look KJW Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality *Reprod* 2004; 127: 527-535.

Howard J, Pursel VG, Wildt D, Chakraborty P, Bush M. Comparative of various extenders for freeze-preservation of semen from selective captive wild ungulates. *J Am Vet Med Assoc* 1981; 179:1157-1161.

Howard JG, Wildt DE, Chakraborty P, Bush M. Reproductive traits including seasonal observations on semen quality and serum hormone concentrations in the dorcas gazelle. *Theriogenology* 1983; 20: 221-234.

Huszar G y Vigue L. Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa *Journal of Andrology* 1994; 15 71-77.

Huszar G, Vigue L. Incomplete development of human spermatozoa is associated with increased creatine phosphokinase concentration and abnormal head morphology. *Mol Reprod Dev* 1993; 34: 292-298.

- Ibrahim M, Abdel H, Tóth BL, Abdin M. Effect of season and bacterial contamination on semen quality, freezability, and fertility of hungarian simmental insemination bulls. *acta Vet Hung* 1983; 31: 81-85.
- Iguer-ouada M, Verstegen JP. Validation of the sperm quality analyzer (SQA) for dog sperm analysis. *Theriogenology* 2001;55: 1143-1158.
- Irvine DS y Aitken, RJ., 1994. Seminal fluid analysis and sperm function testing. *Clinical Andrology* 1994; 23: 725-748.
- Irvine DS, Macleod IC, Templeton AA, Masterton A, Taylor A. a prospective clinical study of the relationship between the computer-assisted assessment of human semen quality and the achievement of pregnancy in vivo. *Hum Reprod* 1994;9: 2324-2334.
- Jabbour HN, Argo CMcG., Brinklow BR. Loudon A.S.I., Hooton J. Conception rates following intrauterine insemination of European (*Dama dama dama*) fallow deer does with fresh or frozen-thawed (*Mesopotamian_Dama dama*) mesopotamica.fallow deer spermatozoa. *J. Zool. London* 1993; 230: 379-384.
- Jacobson H, Bearden H, Whitehouse D. Artificial insemination trials with white-tailed deer. *J Wildl Manage* 1989;53: 224-227.
- Jaczewski, Z. The effect of changes in length of daylight on the growth of antlers in deer (*Cervus elaphus L.*). *Folia Biologica Praha* 1954; 2: 133-143.
- Jaczewski Z, Morstin J, Kossakowski J, Krzywinski A. Freezing the semen of red deer stags. In: *Proceedings of the 8th International Congress of Animal Reproduction and AI, Krakow 1978*; 4: 994-997.
- Janett F, Thun R, Niederer K, Burger D, Hässig M. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology* 2003; 60: 453-461.
- Januskauskas A, Zilinskas H. Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. *Vet ir Zootec* 2002; 17.
- Jayaprakash D, Santosh K, Shivaji S. Pentoxifylline stimulates hyperactivation and acrosome reaction in spermatozoa of golden hamsters: changes in motility kinematics. *Human Reprod.* 1997; 12: 2192-2199.
- Jeyendran R, Van Der Ven H, Perez-Pelaez M, Crabo B, Zanaveld I. developmen of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship with other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984;70: 219-228.
- Johnson LA, Pursel, VG, Gerrits RJ, Thomas CH. Free amino acid composition of porcine seminal, epididymal and seminal vesicle fluids. *J. Anim. Sci.*1972; 66-77.
- Jones RC, Stewart DL. The effects of cooling to 5 degrees C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1979;56: 233-238.
- Kaabi M, de Paz P, Alvarez M, Anel E, Boixo J, Rouissic H. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology* 2003; 56 :1-2.

Jørgensen N, Auger J, Giwercman A, Irvine DS, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Le Bon C, MacDonald E, Pekuri AM, Scheike T, Simonsen M, Suominen J, Skakkeboek NE. Semen analysis performed by different laboratory teams: an intervariation study. *Int J Androl*. 1997; 20(4): 201-8.

Karabinus DS, Evenson DP, Jost LK, Baer RK, Kaproth MT. Comparison of semen quality in young and mature Holstein bulls measured by light microscopy and flow cytometry. *J Dairy Sci* 1990; 73: 2364-2371.

Kasai T, Ogawa K, Mizuno K, Nagai S, Uchida Y, Ohta S, Fujie S, Suzuki K, Hirata S, Hoshi K. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential sperm motility, and fertility potential. *Asian J Androl* 2002; 4: 97-103.

Kasimanickam R, Nebel RL, Peeler ID, Silvia WL, Wolf KT, McAllister AJ, Cassell BG. Breed differences in competitive indices of Holstein and Jersey bulls and their association with sperm DNA fragmentation index and plasma membrane integrity. *Theriogenology*. 2006; 66(5):1307-15.

Katz DF, Erickson RP, Nathanson M. Beat frequency is bimodally distributed in spermatozoa from t/t12 mice. *J Exp Zool* 1979; 210: 529–35.

Katz D, Overstreet JW. Sperm motility assessment by videomicrography. *Fert Steril* 1981;35: 188-193.

Keating J, Grundy CE, Fivey PS, Elliott M, Robinson J. Investigation of the association between the presence of cytoplasmic residues on the human sperm midpiece and defective sperm function. *J Reprod Fertil* 1997; 110: 71–77.

Khalil R, Vaccaro L. peso y mediciones corporales en vacas de doble propósito: su interrelación y asociación con valor genético para tres características productivas. *Zootecnia Trop* 2002; 20: 11-30.

King LM, Denise R, Holsberger, Donogue AM. Correlation of CASA Velocity and Linearity Parameters With Sperm Mobility Phenotype in Turkeys. *J. Androl* 2000; 21: 65-71.

King GJ, Macpherson JW. Boar Semen Studies: II. Laboratory and Fertility Results of a Method for Deep Freezing. *Can J Comp Med Vet Sci* 1967; 31: 46-47.

Kiran P, Nallella MD, Rakesh K, Sharma PD, Shyam SR, Allamaneni MD, Nabil A, Ashok A. Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. *Fertil Steril* 2004; 82: 4.

Klimowicz MD, Nizanski W, Batkowski F, Savic MA. The comparison of assessment of pigeon semen motility and sperm concentration by conventional methods and the CASA system (HTM IVOS). *Theriogenology*. 2008; 70(1):77-82.

Komers PE, Birgersson B, Ekvall K: Timing of estrus in fallow deer is adjusted to the age of available mates. *Am Nat*. 1999; 153: 431-436.

Kosiniak K, Bittmar A. Analysis of the physiological processes connecte with sexual maturation of stallions. *Pol Archi Wet* 1987; 27: 5-20.

Krause W. The significance of computer-assisted semen analysis (CASA) for diagnosis in andrology and fertility prognosis. *Hum Reprod* 1995; 10: 60-66.

Krzywinski A. Freezing of post-mortem collected semen from moose and red deer. *Acta Theriol* 1981; 26: 424-426.

- Kumi-Diaka J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology* 1993; 39: 1279-1289.
- Langvatn R, Mysterud A, Stenseth NC, Yoccoz NG: Timing and synchrony of ovulation in red deer constrained by short Northern summers. *The American Naturalist* 2004; 163: 763-772
- Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH, Zhou Y, Skakkebaek NE, Giwercman A, Team, TDFPPS. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Hum Reprod* 2000; 15: 1562-1567.
- Leader-Williams N. Age related changes in the testicular and antler cycles of rein deer, *Rangifer tarandus*. *J. Reprod. Fert.* 1979, 57: 117-126.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 2000; 62: 113-141.
- Leibo SP, Bradley L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Cagnon C, ed. *The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications*. Vienna, Ill: Cache River Press; 1999: 501-516.
- Leibo SP; Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology* 2002; 57: 303-326.
- Li-Chun X, Ning-Yu Z, Ru L, Ling S, Xin-Ru W. Joint action of phoxim and fenvalerate on reproduction in mal. *Asian J Androl* 2004; 6: 337-341.
- Lincoln GA. The seasonal reproductive changes in the red deer stag (*Cervus elaphus*). *Journal of Zoology* 1971; 163: 105-123.
- Lincoln GA. Puberty in seasonally breeding male, the red deer stag (*Cervus elaphus*). *J Reprod Fertil* 1971b; 25: 41-54.
- Lincoln GA. Seasonal breeding in deer. In *Biology of Deer Production*. 1985; Bulletin 22, pp.165-179. Eds. P.F. Fennessy and K.R Drew. The Royal Society of New Zealand, Bulletin 22, Wellington.
- Lincoln GA. The seasonal reproductive changes in the red deer stags (*Cervus elaphus*). *J Zool Lond* 1971a; 163: 105-123.
- Lincoln GA, Kay R. Effect of season of LH and testosterone in intact and castrated red deer stag (*Cervus elaphus*). *J Reprod Fertil* 1979; 55:75-80.
- Lincoln GA, Youngson RW, Short RV. The social and sexual behaviour of the red deer stag. *J Reprod Fertil Suppl* 1970; 11: 71-103.
- Liu DY, Baker HWG. Calcium ionophore-induced acrosome reaction correlates with fertilization rates in vitro in patients with teratozoospermic semen. *Hum Reprod* 1998; 13: 905-910.
- Liu YT, Warne PK. Computerized evaluation of sperm cell motility. *Comp Biomed Res* 1977; 10: 127-138.
- Liu Z, Foote RH, Brockett CC. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. *Cryobiology* 1998; 37: 219-230.

Loe LE, Bonenfant C, Mysterud A, Gaillard JM, Langvatn R, Klein F, Calenge C, Ergon T, Pettorelli N, Stenseth NC: Climate predictability and breeding phenology in red deer: timing and synchrony of rutting and calving in Norway and France. *Journal of Animal Ecology*. 2005; 74: 579-588.

Loi P, Filia F, Ledda S, Cappai P, Marongiu A, Naitana S. Andamento circannuale delle caratteristiche quanti-qualitative dell'ejaculato nel muflone. IX SIPAOC 1990;4: 10-11.

Loomis PR, Graham JK: Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim Reprod Sci* 2008; 105 119-128.

López-Sáez A. Estudio de los parámetros reproductivos en el muflón macho (*Ovis gmelini musimon*). Tesis Doctoral 2001. Universidad de Castilla la Mancha.

López, A; Pérez-Clariget, R; Álvarez, F; Queirolo D; Burgueño, J. Influencia de factores medioambientales sobre la producción espermática en toros del Uruguay. Sitio Argentino de Producción Animal APPA - ALPA Cusco, Perú 2007. Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.

Mahadevan MM, Miller MM, Moutos DM. Absence of glucosa decreases human fertilization and sperm movement characteristic *in vitro*. *Hum Reprod* 1997; 12: 119-123.

Malo AF, Garde J, Soler A, García A, Gomendio M, Roldán ERS. Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biol Reprod* 2005a; 72: 822-829.

Malo AF, Gomendio M, Garde J, Lang-Lenton B, Soler AJ, Roldán ERS. Sperm design and sperm function. *Biol. Lett.* 2006; 2: 246-249.

Malo AF, Roldán ERS, Garde JJ, Soler AJ, Vicente J, Gortazar C, Gomendio M. What does testosterone do for red deer males?. *Proc. R. Soc. B* 2009; 276.

Malo AF, Roldán ERS, Garde J, Soler A, Gomendio M. Antlers honestly advertise sperm production and quality. *Proc R Soc Lond B* 2005b; 272: 149-157.

Marín P, Lönn L, Adersson B, Olbe L, Bengtsson B, Björntorp P. Assimilation of triglycerides in subcutaneous and intraabdominal adipose tissues *in vivo* in men: effects of testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1018-1022.

Martínez F, Martínez-Pastor F, Álvarez M, Fernández-Santos R, Esteso M, de Paz P, Garde J, Anel L. Sperm parameters on male Iberian red deer: electroejaculation and post-mortem collection. 2008. 70: 216-226.

Martínez F, Martínez-Pastor F, Anel L, Soler A, Anel E, García A, Álvarez M, Gallego L, Garde J. Seminal characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) depending on casting time. 15th. Congr. On Anim. Reprod. And A.I. Porto Seguro 2004.

Martínez-Pastor F. Obtención postmortem y calidad de los espermatozoides de la cola del epidídimo del ciervo rojo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*). Tesis Doctoral. Universidad de León Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales. Departamento de Biología Celular y Anatomía. 2003.

- Martinez-Pastor F, Diaz-Corujo A, Anel E, Herraéz P, Anel L, de Paz P. Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. *Theriogenology* 2005a; 64: 958–74.
- Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Alvarez M, Chamorro C, Herraéz P, de Paz P, Anel L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology* 2006c; 65: 471– 85.
- Martínez-Pastor F, García-Macías V, Álvarez M, Herráez P, Anel L, de Paz P. Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. *Biol Reprod* 2005c; 72: 316-327.
- Martínez-Pastor F, Guerra C, Kaabi M, Díaz AR, Anel E, Herráez P, De Paz P, Anel L. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on post-mortem time. *Theriogenology* 2006a; 63: 24-40.
- Martinez-Pastor F, Guerra C, Kaabi M, Garcia-Macias V, de Paz P, Alvarez M. Season effect on genitalia and epididymal sperm from Iberian red deer, roe deer and Cantabrian chamois. *Theriogenology* 2005b; 63: 1857–75.
- Martínez-Pastor F, Martínez F Álvarez, Maroto-Morales M ,García-Alvarez O, Soler AJ, Garde JJ, de Paz P, Anel L. Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa obtained by electroejaculation. *Theriogenology* 2009; 71: 628–638
- Martínez-Pastor F, Martínez F, García-Macías V, Esteso M, Anel E, Fernández-Santos M, Soler A, Soler A, de Paz P, Garde J, Anel L. A pilot estudy on post-thawing quality of iberian red deer spermatozoa (epididimal and electroejaculated) depending on glycerol concentration and extender osmolality. *Theriogenology* 2006b; 66: 1165-1172.
- Martínez-Pastor F, Tizado EJ, Garde JJ, Anel L, de Paz P. Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology* 2011; 75: 783-95.
- Marshall, F.H.A. On the change over in the oestrous cycle in animals after transference across the equator, with further observations on the incidence of the breeding seasons and the factors controlling periodicity. *Proceedings of the Royal Society, (London)* 1937; B122: 413-428.
- Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Del Olmo E, Fernández-Santos MR, Garded JJ, Martínez-Pastor F. Quality, oxidative markers and DNA damage (DNA) fragmentation of red deer thawed spermatozoa after incubation at 37 °C in presence of several antioxidants. *Theriogenology* 2012; 78: 1005–1019.
- Mazur P. Freezing of living cells: mechanims and implications. *Am J Physiol* 1984; 247: 125-142.
- McLaughlin EA, Ford WCL, Hull MGR. Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1992; 92: 527-534.
- McMillan W, Shackell G, Vishwanath R, Fielden E, Smith J. Comparative reproductive performance. *Reproductive management of grazing ruminants in New Zealand* 1998; 12: 43–64.
- Medarano A. The importance of individual variation in boar semen cryopreservation. Thesis 1998; 203 pp.
- Medrano A, Watson PF, Holt W. Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Reproduction* 2002; 123: 315-322.

Miles P, Sympson P, Allende R. Recuperación de espermatozoides de ciervo colorado postmortem (*Cervus elaphus* Lin) y su criopreservación en nitrógeno líquido. *Rev Arg Prod Anim* 1992; 12: 57-64.

Mirarchi RE, Scanlon PF., Kirkpatrick RL, Schrek CR. Variation in androgen level in white tailed deer in relation to the antler cycle and breeding season. *Journal of Animal Science* 1975; 40: 185.

Mitchell B. Determination of age in Scottish red deer from growth layers in dental cement. *Nature* 1963; 198-3504.5.6. Análisis estadístico.

Monfort SL, Asher GW, Wildt DE, Wood TC, Schiewe MC, Williamson LR, Bush M, Rall WF. Successful intrauterine insemination of Eld's deer (*Cervus eldi thamin*) with frozen-thawed spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1993; 99: 459-465.

Monfort SL, Williamson LR, Wemmer C, Wildt DE. Intensive management of the Burmese brow-antlered deer (*Cervus eldi thamin*) for effective captive breeding and conservation. *Intl. Zoo Yrbk* 1994; 32:44-56.

Moore HDM, Samayawardhena LA, Brewis IA. Sperm maturation in vitro: co-culture of spermatozoa and epididymal epithelium. *J reprod and Fertil Supplem* 1998; 53: 23-31.

Morales P, Katz DF, Overtreet JW, Samuels SJ, Chang RJ. The relationship between the motility and morphology of spermatozoa in human semen. *J Androl* 1988; (9) 241-247.

Morrell JM. CASA as an aid to selecting sperm suspensions for artificial insemination in *Callithrix jacchus*. *International journal of andrology*, 1997; 20: 287-296.

Morrison R, Navarrete M, Orijuela J, Otte E. Salud y productividad en bovinos de la costa norte de Colombia. *Revista Mundial de Zootecnia* 1991; 68: 43-46.

A. Mortimer D, Mortimer ST. Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) of Sperm Motility and Hyperactivation. *Methods in Molecular Biology*. Volume 927, 2013, pp 77-87

Mortimer D. Objective analysis of sperm motility and kinematics. In: *The CRC Handbook of Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility* 1990; pp: 97-133.

Mortimer ST. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update* 1997; 3: 403-439.

Mortimer ST. Practical application of computer-aided sperm analysis (CASA). In: *9th International Symposium on Spermatology* 2002; October 6-11: p.79.

Muñoz R., Tamargo C., Hidalgo A, Peña, AI. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Animal Reproduction Science*.2009; 109: 27-39.

Muñoz-Blanco T, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod Domest Anim*. 2008 Oct;43 Suppl 4: 18-31.

Ninoska B, Bohada E. Características de un buen reproductor bovino. FONAIAP Div 1993.

Noiles EE, Thompson KA, Storey BT. Water permeability, L_p , of the mouse sperm plasma membrane and its activation energy are strongly dependent on interaction of the plasma membrane with the sperm cytoskeleton. *Cryobiology* 1997; 35: 79-92.

- Nothling JO, Gerstenberg C, Volkmann DH. Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. *J Reprod Fert Suppl* 1997;51: 109-116.
- Núñez-Martínez I, Morán JM, Peña FJ. Two step cluster procedure after Principal Component Analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. *J Androl* 2006.
- O'Connell, McClure N, Lewis SEM. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod* 2002; 17: 704-709.
- O'Connor MT, Amann RP, Saacke RG. Comparisons of computer evaluations of spermatozoal motility with estándar laboratory tests and their use for predicting fertility. *J Anim Sci* 1981; 17: 50-60.
- Okamura N, Tajima Y, Soejima A, Masuda H & Sugita. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry* 1985: 9699-9705.
- Ollero M, Muñio-Blanco T, López-Pérez MJ, Cebrián Pérez, JA. Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and sucesive ejaculations. *Int J Androl* 1996; 19: 287-292.
- Ollero M, Pérez-Pe R, Mulno-Blanco T, cebrián-Pérez JA. Improvement of ram spermatozoa cryopreservation protocols assessed heterogeneity analysis. *Cryobiology* 1998; 37: 1-12.
- Ollero M, Powers RD and Alvarez JG. Variation of docosahexaenoic acid content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications for sperm lipoperoxidative damage. *Mol Reprod Dev* 2000; 55: 326-334.
- Ombelet W, Menkveld R, Kruger TF, Steeno O. Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. *Hum Reprod* 1995; 1: 543-557.
- Ortiz N. Estudio de las características espermáticas y de la criopreservación en espermatozoides epididimarios de ciervo ibérico obtenidos postmortem. Tesis Doctoral 1999; 283pp.
- Osinowo OA, Ahmed MS, Ekpe GA. Semen quality and sperm output of Yansaka rams at different ages. *Theriogenolgy* 1988; 29: 381-386.
- Overstreet J, Price MJ, Blazak WF, Lewis EL, Katz DF. Simultaneous assessment of human sperm motility and morphology by videomicrography. *J Urol* 1981;126: 357-360.
- Parck CS, Yi YJ. Comparison of semen characteristics, sperm freezability and testosterone concentration between Duroc and Yorkshire boars during seasons. *Anim Reprod Sci* 2002; 73: 53-61.
- Parks JE, Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 1992; 38: 209-222.
- Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 1992; 29: 255-266.
- Parrilla-Hernandez S, Deleuze S, Van Den Berghe F, Ponthier J. Raw semen concentration directly influences CASA velocity pathways. *Journal of Equine Veterinary Science* 2012; 32 (8): 505.

Paston MJ, Sakar S, Oates RP, Badawy S. Computer-aided semen analysis variables as. *Archs Androl* 1994; 33: 93-99.

Patil SB, Jayaprakash D, Shivaji S. Cryopreservation of semen of tigers and lions: Computerized analysis of the motility parameters of the spermatozoa. 1998.

Pélaez J. Criopresevación de semen porcino: Aportaciones al estudio de la calidad seminal y la capacidad fecundante. Tesis Doctoral 2002.

Peles D, Rhodes E, Smith MH. Spermatozoa numbers and characteristics of associated organs in male white-tailed deer during the breeding season. *Acta Theriologica*. 2003; 48: 123- 130.

Peña A. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83: 209-224.

Pena, F.J., A. Johannisson, M. Wallgren. and H. Rodriguez-Martinez. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim. Reprod. Sci.* 2003; 78: 85-98.

Peña A, Linde-Forsberg C. Effects of Equex one or two step dilution, and two freezind and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Tehriogenology* 2000; 54: 859-875.

Peris SI, Bilodeau JF, Dufour M, Bailey JL: Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 878-892.

Peris S, Solanes D, Rodriguez-Gil JE, Rigau T. La actividad ATP-asa dependiente de Na⁺ y K⁺ interviene en la motilidad y la resistencia osmótica de los espermatozoides de morueco. *ITEA* 1999; 20: 609-612.

Petrunkina AM, Gehlhaar R, Drommer W, Waberski D and Topfer-Petersen E. Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. *Reproduction* 2001; 121: 889–896.

Petrunkina AM, Gröpper B, Günzel-Apel AR, Töpfer-Petersen E. Functional significance of the cell volume for detecting sperm membrane changes and predicting freezability in dog semen. *Reproduction* 2004; 128: 829-842.

Platz C, Magyar S, Crider N, Densmore M, Wiley G, Bowen M, Templeton J, Kraemer D. Cryopreservation of electroejaculated and epididymal spermatozoa in white tail deer. *Am Assoc Zoo Vet* 1982; 127-129.

Pontbriand D, Howard J, Schiewe M, Stuart L, Wildt D. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 1989; 26: 341-354.

Pons-Rejraji H, Bailey JL, Leclerc P. Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. *Reprod Fertil Dev*. 2009; 21 (4): 525-37.

Preston BT, Stevenson IR, Pemberton JM, Wilson K. Dominant rams lose out by sperm depletion. *Nature* 2001;409: 681-682.

Puchades S, Marco-Jimenez M, Rodriguez M, Vicente JS. Adiestramiento y caracterización seminal de moruecos de la raza ovina Guirra. *Arch Zootec* 2004; 53: 225-228.

- Pursel V, Johnson L. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology* 1974; 1: 63-68.
- Quintero-Moreno A. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Tesis Doctoral 2003.
- Quintero-Moreno A, Madrigal O, Gallardo F, Ramió L, Peña A, Miró J, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. Subpoblaciones espermáticas en mamíferos. *Biol Reprod* 2003; 8: 47-49.
- Quintero-Moreno A, Miró J, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 2003; 59: 1973-1990.
- Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology* 2004; 61: 673-90.
- Ragni G, Caccamo AM, Serra AD, Guercilena S. Computerized slow-staged freezing of semen from men with testicular tumors of Hodgkin's disease preserves sperm better than standard vapor freezing. *Fertil Steril* 1990;53: 1072-1075.
- Ramón M, Martínez-Pastor F, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Soler AJ, Jiménez-Rabadán P, Fernández-Santos MR, Bernabéu R, Garde JJ. Taking advantage of the use of supervised learning methods for characterization of sperm population structure related with freezability in the Iberian red deer. *Theriogenology*.2012; 77: 1661-72.
- Ramón M, Pérez-Guzmán MD, Jiménez-Rabadán P, Estesó MC, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Anel-López L, Soler AJ, Fernández-Santos R, Garde JJ. Sperm Cell Population Dynamics in Ram Semen Turing the Cryopreservation Process. *PLOS ONE* | www.plosone.org. 2013; 8:Issue 3, e59189.
- Rasul Z, Ahmad N, Anzar M. Changes in motility characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of Buffalo spermatozoa. *JAndrol* 2001; 22: 278-283.
- Rijsselaere T, Van Soom A, Tanghe S, Coryn M, Maes D, de Kruif A. New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology* 2005; (3):706-19.
- Riney T. Evaluating condition of free-ranging red deer (*Cervus elaphus*), with special reference to New Zealand. *NZJ Sci Tech* 1955; 36: 429-463.
- Rittem S, Tipkantha DTW, Thongtip BSN. Effects of Semen Extender on Motility and Movement Patterns of Frozen-thawed Eld's Deer (*Cervus eldi*) Spermatozoa *Thai J Vet Med*. 2012; 42: 527-532.
- Roca J, Hernández M, Carvajal G, Vázquez JM, Martínez EA. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J Anim Sci*. 2006; 84: 2692-9.
- Rodríguez H, Bustos E. Seasonality and freezability vs routine parameters in stallion semen. *Histol Histopathol* 1996; 11: 427-430.
- Rodríguez Gil JE, Monserrat A, Rigau T. Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology* 1994; 42: 815-829.

Roelants H, Schneider F, Göritz F, Streich J, Blotner S. Seasonal changes of spermatogonial proliferation in roe deer, demonstrated by flow cytometric analysis of c-kit receptor, in relation to follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and testosterone. *Biol Reprod* 2002; 66: 305–12.

Roldán ERS, Cassinello J, Abaigar T, Gomendio M. Inbreeding, fluctuating asymmetry and ejaculate quality in a endangered ungulate. *proc R Soc Lond B* 1998; 265: 243-248.

Roldan ERS, Gomendio M, Garde JJ, Espeso G, Ledda S, Berlinguer F, del Olmo A, Soler AJ, Arreguil L, Crespo C, González R. Inbreeding and Reproduction in Endangered Ungulates: Preservation of Genetic Variation through the Organization of Genetic Resource Banks. *Reprod Dom Anim* 2006; 41 (Suppl. 2), 82–92.

Rota A, Peña Ai, Linde-Forsberg C, Rodríguez-Martínez H. In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim Reprod Sci* 1999; 57: 199-215.

Rota A, Rota A, Martini M, Milani C, Romagnoli S. Evaluation of dog semen after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. *Reproduction Nutrition Development* 2005; 45, 29–37.

Rota A, Ström B, Linder-Forsberg C, Rodríguez-Martínez H. Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38 °C. *Theriogenology* 1997; 47: 1093-1101.

Roth TL, Bush LM, Wildt DE, Weiss RB. 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 vapour. *Biol Reprod* 1999; 60: 493-498.

Saacke RG y White JM. Semen quality test and their relationship to fertility. In: Proc. 4th NAAB Tech. Con. Artif. Insemination. *Reprod.* 1972; pp. 22-27.

Sackmann HJ, Schöne P. spermaquantitat und-Quqlitat Eines Muffelwidders (*Ovis ammon musimon*, Pallas 1811) im Hahresverlauf. *Zeitschrift fur Jagdwissenschaft* 1990; 36: Zeitschrift fur Jagdwissenschaft.

Saenz JR. Cryopreservation Of White-Tail Deer Epididymal Sperm For Artificial Insemination. Tesis doctoral 2007. The Interdepartmental Program of Animal and Dairy Sciences. B.S., New Mexico State University.

Salamon S, Maxwell W. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement.. *Anim Reprod Sci* 1995; 38: 1-36.

Salisbury GW, VanDemark NL, Logde JR. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos 1961; 831 pp.

Shamsuddin M, Amiri Y, Bhuiyan MU. Characteristics of back semen with regard to ejaculate numbers, collection intervals, diluents and preservation periods. *Reprod Dom Anim* 2000; 35:53-57.

Sholt, RV y Mann T. The sexual cycle of a seasonally breeding marnnal, the roebuck (*Capreolus capreolus*). *Journal of Reproduction and Fertility* 1966; 12: 337-351

Silva P, Gadella B. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 2006; 65: 958–978.

Sipko T, Rott N, Abilov A, Prisiazhniuk V, Shishova N, Kombarova N. The conservation of the genetic resources of deer (*Cervidae*) by the cryopreservation of their germ cells. *Isu Akad Nauk Ser Biol* 1997; 5: 546–555.

Soler AJ. Estudio de la congelabilidad de las muestras espermáticas de ciervo ibérico obtenidas post-mortem: fuentes de variación. 2003; Universidad de Castilla-La Mancha. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal.

Soler AJ, Astore V, Sestelo A, Rivolta M, Jácome LN, Garde JJ. Effect of thawing procedure on cryosurvival of deer spermatozoa: work in progress. *Theriogenology* 2003c; 60 (3): 511-520.

Soler AJ, Fernández-Santos, MR, Esteso MC, Garde JJ. Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5 °C in the epididymis for several days. *Theriogenology* 2005; 64: 1503–1517.

Soler AJ, García A, Fernández-Santos, MR, Esteso MC, Garde JJ. Effects of thawing procedure on postthawed in vivo fertility and in vitro viability of red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at - 196°C. *J Androl* 2003a; 24: 58-68.

Soler AJ, Garde JJ. Relationship between the characteristics of epididymal red deer spermatozoa and penetrability into zona-free hamster ova. *J Androl* 2003; 24: 393-400.

Soler AJ, Pérez-Guzmán MD, Garde JJ. Storage of Red Deer Epididymides for four days at 5°C: Effects on Sperm Motility, Viability, and Morphological Integrity. *Journal Of Experimental Zoology* 2003b; 295: 188–199.

Songsasen N, Leibo SP. Cryopreservation of mouse spermatozoa: Relationship between survival after cryopreservation and osmotic tolerance of spermatozoa from three strains of mice. *Cryobiology* 1997;35: 255-269.

Spiropoulos S. Computerized semen analysis (CASA): Effect of semen concentration and chamber depth on measurements. *Arch of Androl* 2001; 46: 37-42.

Storey BT, Noiles EE., Thompson K.A. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 1998; 37: 46–58.

Strzezek J, Kordan W, Glogowski J, Wsocki P, Borkowski K. Influence of semen collection frequency on sperm quality in boars, with special reference to biochemical markers. Influence of semen collection frequency on sperm quality in boars, with special reference to biochemical markers 1995; 30: 85-94.

Strzezek J, Krzywinski A, Swidowicz K. Seasonal changes in the chemical composition of red deer (*Cervus elaphus*) semen. *Anim Reprod Sci* 1985; 9: 195–204.

Suttie JM y Simpson AM. Photoperiodic control of appetite, growth, antlers, and endocrine status of red deer. In *Biology of Deer Production* 1985; pp 492-432. Eds P.F. Fennessy and KR Drew. The Royal Society of New Zealand, Bulletin 22, Wellington.

Suzuki M, Kaji K, Nigi H. Annual changes of testis size, seminiferous tubules and plasma testosterone concentration of wild Sika deer (*Cervus nippon yezoensis* Heude, 1884) in Hokkaido. *J Vet Med Sci* 1992; 54: 551-556.

- Suzuki K, Nagai T. In vitro fertility and motility characteristics of frozen–thawed boar epididymal spermatozoa separated by Percoll. *Theriogenology* 2003; 60: 1481–1494.
- Swanson, WF, Wildt, DE. Strategies and progress in reproductive research involving small cat species. *Int. Zoo Yb.* 1997; 35: 152–159.
- Taggart DA, Leigh CM, Steele VR, Breed WG, Temple-Smith PD, Phelan J. Effect of cooling and cryopreservation on sperm motility and morphology of several species of marsupial. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8: 673-679.
- Tamuli M, Watson PF. Use of simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Anim Reprod Sci* 1994; 35: 247-254.
- Tan RS, Pu SJ. Impact of obesity on hypogonadism in the andropause. *Int J Androl* 2002; 25: 195-201.
- Tash J, Bracho G. Identification of phosphoproteins coupled to initiation of motility in live epididymal mouse sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 557– 63.
- Tardif AL, Farrell PB, Trouern-Trend V, Simkin ME, Foote RH. Use of Hoechst 33324 stain to evaluate live fresh and frozen bull sperm by computer assisted analysis, *J Androl* 1998; 19: 201-206.
- Tajik P y Hassan-Nejad Lamsou M. R. Assessment of epididymal sperm obtained from dromedary camel. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University* 2008; 9: 46-49.
- Tardiff S, Dube C, Bailey JL. Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein phosphorylation is only associated with calcium. *Biol Reprod* 2003; 68: 207-213.
- Taylor, S. L., Weng, S. L., Fox, P., Duran, E. H., Morshedi, M. S., Oehninger, S., and Beebe, S. J. Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. *Mol. Hum. Reprod.* 2004; 10: 825–834.
- Tchernof A, Després JP, Belanger A, Dupont A, Prud'homme D, Moorjani S, Lupien PJ, Labrie F. Reduced testosterone and adrenal C19 steroid levels in obese men. *Metabolism* 1995;44: 513-519.
- Thurston LM, Siggins K, Mileham AJ, Watson PF, Holt WV. Identification of Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism Markers Linked to Genes Controlling Boar Sperm Viability Following Cryopreservation. *Biot and Biol Sci Res Cou* 2001a.
- Thurston LM, Watson PF, Holt W. semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation?. *Cryoletters* 2002; 23: 255-262.
- Thurston LM, Watson PF, Holt WV. Sources of variation in the morphological characteristics of sperm sub-populations objectively assessed by a novel automated sperm morphology analysis system. *J Reprod Fertil* 1999; 117: 271-280.
- Thurston LM, Watson PF, Mileham AJ, Holt W. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by fourie shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J Androl* 2001b; 22: 382-394.
- Tourmente M, Gomendio M, Roldan ERS. Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. *BMC Evol Biol* 2011; 11: 12-21

- Tourmente M, Gomendio M, Roldan ERS, Gjojalas L & Chiaraviglio M. Sperm competition and reproductive mode influence sperm dimensions and structure among snakes. *Ev Evolution* 2009; 63: 2513–2524.
- Tuli RK, Schmidt-Baulain R, Holt W. Computer assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen-thawed semen of bull ,boar and goat. *Theriogenology* 1992; 38: 487-490.
- Turner, R M. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod. Fertil. Dev.* 2006; 18, 25–38.
- Turner T. On the epididymis and its role in the development of the fertile ejaculate. *J Androl* 1995;16: 292–8.
- Turner RM. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? *J. Androl.* 2003; 24: 790–803.
- Umaphathy G, Sontakke S, Reddy A, Shivaji S. Seasonal variations in semen characteristics, semen cryopreservation, estrus synchronization, and successful artificial insemination in the spotted deer (*Axis axis*). *Theriogenology* 2007; Volume 67, Issue 8: 1371-1378.
- Ungerfeld R, González-Pensado S, Bielli A, Villagrán M, Olazabal D, Pérez W. Reproductive biology of the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*): a review. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 2008; 50:16.
- Veldhuizen F. Studies cryopreservation of semen of farmed red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*). Tesis of Master 1994; 159pp.
- Verheyen G, Pletinex I, Van Steirtegham A. Effect of freezing methods, thawing temperature, and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm. *Hum Reprod* 1993;8: 1672-1684.
- Verme LJ, Ozoga JJ, Nellist JT: Induced early estrus in penned white tailed does. *J Wildl Manage.* 1987, 51: 54-56.
- Vermeulen A, Kaufman Jm, Deslypere JP, Thomas G. Attenued luteinizing hormone (LH) pulse amplitude but normal LH pulse frequency, and its relation to plasma adrogens in hypogonadism of obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76: 1140-1146.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2002; 57: 149-179.
- Viswanaath R, Shannon P. Do sperm cells age? A review of the physiological change in sperm during storage at ambient temperature. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9: 321-331.
- Waberski D, Meding S, Dirksen G, Weitze KF, Leiding C and Hahn R. Fertility of long-term-stored boar semen: influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. *Anim Reprod Sci* 1994; 36: 145–151.
- Warnke C, Tuchscherer A, Alm H, Kanitz W, Blottner S, Torner H. Characterisation of movement pattern and velocities of stallion spermatozoa depending on donor, season and cryopreservation. *Acta Vet Hung* 2005; 51: 395-408.

- Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 481-492.
- Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7: 871-891.
- White IG. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation. *Reprod Fertil Dev*. 1993; 5: 639-658.
- Whitehead PE y McEwan EJ. Seasonal variation in the plasma testosterone concentration of reindeer and caribou. *Canadian Journal of Zoology* 1973; 51: 651-658
- Wildt, D. E., Grisham, J. Basic research and the cheetah SSP program. *Zoo Biol*. 1993; 12: 3-4.
- Windsor DP, White I. Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial insemination or frozen storage. *Anim Reprod Sci* 1995; 40: 43-58.
- Wislocki, G.B. Seasonal changes in the testes, epididymes and seminal vesicles of deer investigated by histochemical methods. *Endocrinology* 1949; 44: 167-189.
- Wooley DM, Richardson DW. Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing. *J Reprod Fert* 1978; 53: 389-394.
- XiuXiang M, QiSen Y, Lin X, ZuoJian F, YingWen J, PeiMing W. The temporal estrous patterns of female alpine musk deer in captivity. *Appl Anim Behav Sci*. 2003; 82 : 75-85.
- Xu XF, De Pergola G, Bjorntorp P. Testosterone increases lipolysis and the number of beta-adrenoceptors in male rat adipocytes. *Endocrinology* 1991; 128: 379-382.
- Yamashiro H, Kumamoto K, Wang H, Yamashita Y, Terada T. Effect of semen collection in extender solution on the characteristics of goat spermatozoa. *Journal Reprod Dev* 2006; 52: 397-406.
- Yanagimachi R. Mammalian Fertilization. In: *The Physiology of Reproduction* 1988; pp. 135-185.
- Yeung CH, Cooper TG. Effects on de ion-channel blocker quinine on human sperm volume, kinematics and mucus penetration, and the involvement of potassium channels. *Molecular Human Reproduction* 2001; 7: 819-828.
- Yeung C, Weinbauer G, Cooper T. Responses of monkey epididymal sperm of different maturational status to second messengers mediating protein tyrosine phosphorylation, acrosome reaction, and motility. *Mol Reprod Dev* 1999; 54: 194-202.
- Yu I, Songsasen N, Godke RA, Leibo SP. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology* 2002; 44: 62-78.
- Zamboni L. The ultrastructure pathology of the spermatozoon as a cause of infertility-the role of the electron-microscopy in the evaluation of semen quality. *Fert Steril* 1982, 48 :711-734.
- Zhu LJ, Hardy MP, Inigo IV, Huhtaniemi I, Bardin CW, Moo-Young AJ. Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study. *Biol Reprod*. 2000; 63: 368-376.

Zini A, O'Bryan MK, Israel L y Schlegel PN. Human sperm NADH and NADPH diaphorase cytochemistry: correlation with sperm motility. *Urology* 1998; 51: 464–4468.

Zomborszky Z, Zubor T, Tóth J, Horn P. Sperm collection from shot red deer stags (*Cervus elaphus*) and the utilization of sperm frozen and subsequently thawed. *Ac Vet Hung* 1999; 47:263-270.

APÉNDICE I. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

CASA: modelo de análisis asistido por ordenador (*Computer-Assited Sperm Analysis*).

PBS: solución tampón fosfato salino.

Parámetros absolutos que reflejan las características físicas de la célula en movimiento:

VCL: velocidad curvilínea.

VSL: velocidad rectilínea.

VAP: velocidad de la trayectoria media.

ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza.

BCF: frecuencia de batido.

Parámetros relativos o derivados, que son combinaciones de los parámetros absolutos y que reflejan el modelo de movilidad del espermatozoide:

LIN: índice de linealidad.

STR: índice de rectitud.

NAR: espermatozoides con borde apical normal.

ENDO: espermatozoides con membrana espermática funcional. Endósmosis positiva.

EV: número de espermatozoides vivos.

SEM: error medio estándar.

TRA: técnicas de reproducción asistida.

FIV: fecundación in vitro.

IA: inseminación artificial.

GOT3: espermatozoides normales con gota citoplasmática distal.

GOT2: espermatozoides normales con gota citoplasmática proximal.

GOT1: espermatozoides normales sin gota citoplasmática.

ROS: especies reactivas al oxígeno.

NTE: número total de espermatozoides.

MI: espermatozoides móviles.

CM: calidad del movimiento del espermatozoide.

SG: espermatozoides normal sin gota citoplasmática.

GP: espermatozoides con gota citoplasmática posición proximal.

GD: espermatozoides con gota citoplasmática distal.

MI_d: espermatozoides móviles tras la descongelación.

NAR_d: acrosoma normal tras la descongelación.

END_{Od}: endósmosis positiva tras la descongelación.

EV_d: espermatozoides vivos tras la descongelación.

ANOVA: análisis de la varianza en estadística.

SPSS: Software estadístico (*Statistical Package for the Social Sciences*).

LH: hormona leutinizante.

GnRH: hormona liberadora de gonadotropina.

ETSIA: escuela técnica superior de ingenieros agrónomos.