

CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA INDUCIDA POR LA CONSERVACIÓN DE SEMEN DE CARNERO DILUIDO, REFRIGERADO O CONGELADO

SPERM CAPACITATION INDUCED BY CONSERVATION OF DILUTED, REFRIGERATED, OR FROZEN RAM SEMEN

Felipe A. Rodríguez-Almeida^{1*}, Carlos O. Ávila Cota¹, Alfredo Anchondo Garay¹, Blanca Sánchez-Ramírez² y Jorge A. Jiménez Castro¹

¹Facultad de Zootecnia, ²Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Administración de Correos 4-28, Periférico Francisco R. Almada Km. 1, 31031-3103. Chihuahua, Chihuahua, México (frodriagu@uach.mx)

RESUMEN

La refrigeración y criopreservación de los espermatozoides reducen o interrumpen su actividad metabólica y alargan su viabilidad, pero la capacitación espermática (CE) inducida en el semen de carnero puede reducir la fertilidad. Para determinar el grado de inducción de la CE y el efecto en la motilidad progresiva (MP), se evaluaron muestras de semen fresco [baño maría a 36 °C por 3 (F3) y 6 h (F6)]; refrigerado [5 °C por 3 (R3), 6 (R6) y 24 h (R24)]; y congelado [(CON) en N líquido]. Cinco eyaculados de cada uno de tres carneros jóvenes y tres adultos por raza (Pelibuey y Blackbelly), se diluyeron en solución citrato-yema y se dividieron en tres alícuotas. Se determinaron los porcentajes de MP y de espermatozoides capacitados con acrosoma intacto (patrón B) y reacción acrosomal (patrón RA), estos dos últimos por duplicado con el ensayo de la clortetraciclina. El modelo estadístico para evaluar MP incluyó efectos fijos de tipo-tiempo de preservación (PRE), raza, edad, y sus interacciones; y aleatorios de carnero y su interacción con PRE dentro de raza y edad. Para los patrones B y RA el modelo incluyó además los efectos aleatorios de eyaculado y eyaculado por PRE dentro de carnero, raza y edad. Las medias para el patrón B fueron 23.9, 30.8, 32.8, 42.5, 44.5 y 36.6 % (E.E.=2.3; $p \leq 0.01$) para F3, F6, R3, R6, R24, y CON. Hubo interacción de PRE con edad para el patrón RA; fue mayor ($p \leq 0.01$) en carneros jóvenes que en los adultos sólo en R24 (27.8 ± 1.6 vs $19.8 \pm 1.6\%$) y CON (33.9 ± 1.6 vs $26.3 \pm 1.6\%$). La MP se redujo más ($p \leq 0.01$) en F6 y CON que en los otros niveles de PRE. Con la refrigeración a 5 °C la motilidad del semen de carnero se mantuvo, pero cuando se conservó hasta 24 h, al igual que con la criopreservación, los niveles de CE inducidos cambian la fertilidad.

Palabras clave: Clortetraciclina, criopreservación, semen de carnero.

ABSTRACT

Refrigeration and cryopreservation of spermatozoa reduce or interrupt their metabolic activity and prolong their viability, but sperm capacitation (CE) induced in ram semen may reduce its fertility. In order to determine the degree of CE induction and the effect on progressive motility (MP) fresh semen samples were assessed [double boiler water bath at 36 °C for 3 (F3) and 6 h (F6)]; refrigerated [5 °C for 3 (R3), 6 (R6), and 24 h (R24)]; and frozen [(CON) in liquid N]. Five ejaculates of each of three young rams and three adults per breed (Pelibuey and Blackbelly) were diluted in citrate-yolk extender and divided proportionally in three aliquots. Percentages of MP and of capacitated spermatozoa with intact acrosome (B pattern) and acrosomal reaction (RA pattern) were determined, the two latter in duplicate with chlortetracycline assay. The statistical model for evaluating MP included fix effects of type-time preservation (PRE), breed, age, and their interactions; and random effects of ram and its interaction with PRE within breed and age. For B and RA patterns, the model included also the random effects of ejaculate and ejaculate by PRE within ram, breed and age. The means for B pattern were 23.9, 30.8, 32.8, 42.5, 44.5, and 36.6 % (E.E.=2.3; $p \leq 0.01$) for F3, F6, R3, R6, R24, and CON. There was interaction of PRE with age for RA pattern; it was greater ($p \leq 0.01$) in young rams than in adults only in R24 (27.8 ± 1.6 vs $19.8 \pm 1.6\%$) and CON (33.9 ± 1.6 vs $26.3 \pm 1.6\%$). MP was more reduced ($p \leq 0.01$) in F6 and CON than in the other levels of PRE. With refrigeration at 5 °C ram semen motility was maintained, but when it was kept until 24 h, the same as with cryopreservation, the induced CE levels change fertility.

Key words: Chlortetracycline, cryopreservation, ram semen.

INTRODUCTION

Mammalian spermatozoa undergo some structural and biochemical changes in their course through the genital tract of the female, which empower them to fertilize the oocyte. This process is sperm capacitation (CE) and is essential for

* Autor responsable.

Recibido: Febrero, 2007. Aprobado: Marzo, 2008.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 42: 399-406. 2008.

INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides de los mamíferos sufren algunos cambios estructurales y bioquímicos al recorrer el tubo genital de la hembra, que los habilitan para fertilizar al óvulo. Este proceso es la capacitación espermática (CE) y es indispensable para que ocurra la fertilización. La criopreservación del semen, según la raza en ovinos (Bag *et al.*, 2002) y edad del macho en bovinos (Januskauskas *et al.*, 1999), causa cambios en el espermatozoide, similares a los que ocurren en la CE (Bailey *et al.*, 2002; Cormier y Bailey, 2003), por lo que se le denomina criocapacitación (Vadnais *et al.*, 2005). Por tanto, cuando se aplica la fertilización *in vitro* con semen criopreservado, la etapa de la CE inducida *in vitro* puede ser innecesaria (Cormier *et al.*, 1997).

Algunos cambios celulares que ocurren con la CE son: aumento en la permeabilidad y decremento en la relación colesterol:fosfolípidos en la membrana (Langlais y Roberts, 1985), aumento del Ca^{+2} intracelular y alcalinización citoplasmática (Handrow *et al.*, 1989), activación de los canales de Ca^{+2} y de Na/K (Arnoult *et al.*, 1996), generación de oxígeno reactivo (de Lamirande *et al.*, 1998), y fosforilación de la tirosina de las proteínas (Flesch *et al.*, 1999). Si estos cambios son inducidos prematuramente por la criopreservación, pueden reducir las tasas de concepción si el semen se usa en la inseminación artificial (Bailey y Buhr, 1994). La habilidad del espermatozoide capacitado para adherirse a las células epiteliales del oviducto es menor que la del espermatozoide no capacitado, *in vitro* e *in vivo* (Medeiros *et al.*, 2002; Tienthai *et al.*, 2004). Por tanto, menos espermatozoides funcionales estarían disponibles en el oviducto para fertilizar al óvulo. Cormier *et al.* (1997) y Pérez *et al.* (1997) sugieren que un proceso similar al inducido por la criopreservación puede ocurrir en los espermatozoides cuando el semen diluido se conserva en refrigeración o en fresco por 4 h o más.

Morrier *et al.* (2002) observaron que la presencia de espermatozoides con reacción acrosomal aumentó en el semen de carnero cuando el tiempo en refrigeración aumentó de 16 a 24 h. No se ha analizado simultáneamente los factores tipo y tiempo de conservación del semen en el grado de inducción de la CE en carneros. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue cuantificar la proporción de espermatozoides que sufren cambios relacionados con la capacitación inducida a diferentes tiempos cuando el semen de carnero es diluido, refrigerado o criopreservado, así como el grado de efecto en la motilidad progresiva.

fertilization to take place. Semen cryopreservation, according to breed in sheep (Bag *et al.*, 2002) and to the age of the male in cattle (Januskauskas *et al.*, 1999) causes changes in the spermatozoon, similar to those taking place in CE (Bailey *et al.*, 2002; Cormier and Bailey, 2003) for which it is called cryocapacitation (Vadnais *et al.*, 2005). Therefore, when *in vitro* fertilization is applied with cryopreserved semen, the CE phase induced *in vitro* may be unnecessary (Cormier *et al.*, 1997).

Some cellular changes occurring with CE are: increase in permeability and decrease in the cholesterol-phospholipid ratio in the membrane (Langlais and Roberts, 1985), increase of intercellular Ca^{+2} and cytoplasmic alkalization (Handrow *et al.*, 1989), activation of the Ca^{+2} channels and of Na/K (Arnoult *et al.*, 1996), reactive oxygen generation (de Lamirande *et al.*, 1998), and tyrosine phosphorylation in proteins (Flesch *et al.*, 1999). If these changes are induced prematurely by cryopreservation, the conception rates may be reduced if the semen is used in artificial insemination (Bailey and Buhr, 1994). The ability of the capacitated spermatozoon to adhere to the epithelial cells of the oviduct is lower than that of the non capacitated spermatozoon, *in vitro* and *in vivo* (Medeiros *et al.*, 2002; Tienthai *et al.*, 2004). Therefore, fewer functional spermatozoa would be available in the oviduct to fertilize the oocyte. Cormier *et al.* (1997) and Pérez *et al.* (1997) suggest that a similar process to that induced by cryopreservation may occur in the spermatozoa when the diluted semen is kept in refrigeration or fresh during 4 h or more.

Morrier *et al.* (2002) observed that the presence of spermatozoa with acrosomal reaction increased in ram semen when refrigeration time increased from 16 to 24 h. The factors type and time of semen conservation in the degree of CE induction in rams have not been analyzed simultaneously. Therefore, the objective of the present study was to quantify the proportion of spermatozoa which experience changes related to capacitation induced at different times when the ram semen is diluted, refrigerated, or cryopreserved, as well as the degree of the effect on progressive motility.

MATERIALS AND METHODS

Three young rams (about one year old) and three adults of the Pelibuey and Blackbelly breeds were used, after previously having passed a fertility test. From each ram five ejaculates were obtained with artificial vagina (Evans and Maxwell, 1990) in separate sessions for at least 3 d. From some rams two ejaculates were obtained in one single session.

Volume, appearance, and color of semen were evaluated at simple sight, and progressive motility (MP) and percentage of normal and

MATERIALES Y MÉTODOS

Se usaron tres carneros jóvenes (alrededor de un año de edad), y tres adultos, Pelibuey y Blackbelly, después de una prueba de fertilidad. De cada carnero se obtuvieron cinco eyaculados con vagina artificial (Evans y Maxwell, 1990) en sesiones separadas al menos por 3 d. De algunos carneros se obtuvieron dos eyaculados en una misma sesión.

El volumen, apariencia y color del semen se evaluaron a simple vista y su motilidad progresiva (MP) y porcentajes de células normales y vivas se determinaron al microscopio (40X) usando la tinción eosina-nigrosina. No se usaron muestras de semen con menos de 70% de MP, 85% de espermatozoides normales, 70% de espermatozoides vivos, ni con un volumen menor a 0.5 mL. La concentración espermática se midió con el hemocitómetro (Sorensen, 1982).

En las muestras de semen que cumplieron los requisitos, se tomó una alícuota de 0.25 mL de semen y se diluyó con 2.25 mL de la fracción A del diluyente. De esta parte se conservó 1 mL en baño maría a 36 °C y se tomaron alícuotas (0.25 mL) para evaluarlas a 0, 3 y 6 h. Los otros 1.5 mL de semen diluido se enfriaron a 5 °C en un periodo de 1 a 1.5 h, y se tomaron alícuotas (0.25 mL) para evaluarlas a las 3, 6 y 24 h. Las demás muestras se prepararon para congelarlas: se agregó 1 mL de la fracción A del diluyente, se determinó el número de pajillas a envasar y se agregó el resto de la fracción A del diluyente para tener una concentración de 240×10^6 espermatozoides por pajilla. Se bajó la temperatura a 5 °C en 1 a 1.5 h, se agregó la fracción B del diluyente en cuatro periodos de 15 min (10, 20, 30 y 40% de la fracción B) para tener una concentración final de 120×10^6 espermatozoides por pajilla (0.5 mL). El tiempo de equilibramiento antes del congelado fue 2 a 3 h. Después el semen se envasó en pajillas y se congeló a -120 °C por 12 min y luego a -196 °C en líquido. Para la evaluación las pajillas se descongelaron 40 s a 36 °C en baño maría. La fracción A del diluyente incluyó 2.9 g de citrato de sodio, 20% (v/v) de yema de huevo, 0.1 g de fructosa, 100 000 UI de penicilina sódica, y 100 mg de estreptomycin por cada 100 mL de agua destilada. Para la fracción B se agregó glicerol (14% v/v).

Las muestras de semen fresco, refrigerado y congelado se purificaron a través de gradientes de Percoll (45/70; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Cat: P1644). El Percoll se diluyó con medio Sperm TL stock sin albúmina (Specialty Media, (908)213-0500, E.U., www.specialtymedia.com), adicionado con solución stock de penicilina-estreptomycin + piruvato de sodio (ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA). Luego se templó a 36 °C antes de agregar el semen. En un tubo cónico de 15 mL se agregaron primero 1.5 mL de Percoll al 70% y luego 1.5 mL de Percoll al 45%, con una pipeta serológica de 2 mL y un succionador automático. Una vez agregado el semen, las muestras se centrifugaron (Precision®, Durafuge 200) 30 min a 2000 rpm y se retiró el sobrenadante de Percoll con una pipeta Pasteur hasta quedar solo el sedimento de semen, el cual se recolectó con una pipeta Eppendorf para medir la cantidad de semen y transferirlo a un tubo cónico de 15 mL. Se tomaron 10 μ L de la muestra de semen y se agregó 90 μ L de agua para evaluar la

live cells were determined under microscope (40-fold) using eosine-nigrosine staining. Semen samples with less than 70% MP, 85% of normal spermatozoa, 70% of live spermatozoa, or having a volume of less than 0.5 mL were not utilized. Sperm concentration was measured with a hemocytometer (Sorensen, 1982).

In the semen samples fulfilling the conditions, a portion of 0.25 mL of semen was diluted with 2.25 mL of fraction A of the extender. One mL of this part was kept in water bath at 36 °C and aliquots (0.25 mL) of it were taken in order to assess them at 0, 3, and 6 h. The other 1.5 mL of diluted semen were cooled down to 5 °C in a period of 1 to 1.5 h, and aliquots (0.25 mL) were assessed at 3, 6, and 24 h. The rest of the samples were prepared to be frozen: 1 mL of fraction A of the extender was added, the number of straw to fill was determined and the rest of fraction A of the extender was added to obtain a concentration of 240×10^6 spermatozoa per straw. The temperature was reduced to 5 °C in 1 to 1.5 h, extender fraction B was added in four periods of 15 min (10, 20, 30, and 40% of fraction B) in order to obtain a final concentration of 120×10^6 spermatozoa per straw (0.5 mL). The equilibration time before freezing was 2 to 3 h. Subsequently, the semen was packed in straws and frozen at -120 °C for 12 min and then at -196 °C in liquid. The straws were thawed 40 s at 36 °C in water bath for assessment. Thinner fraction A included 2.9 g of sodium citrate, 20% (v/v) egg yolk, 0.1 g fructose, 100 000 UI sodium penicillin, and 100 mg of streptomycin for every 100 mL of distilled water. For fraction B, glycerol (14% v/v) was added.

The fresh, refrigerated, and frozen semen samples were purified through Percoll gradients (45/70; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Cat: P1644). Percoll was diluted with Sperm TL stock medium without albumin (Specialty Media, (908) 213-0500, E.U., www.specialtymedia.com), added with stock solution of penicillin-streptomycin + sodium pyruvate (ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA). Afterwards it was warmed up to 36 °C before adding the semen. In a conical 15 mL tube, first 1.5 mL Percoll at 70% and then 1.5 mL of Percoll at 45% were layered with a serological pipette of 2 mL and by automatic pipette. Once the semen added, the samples were centrifuged (Precision®, Durafuge 200) for 30 min at 2000 rpm and the Percoll supernatant was removed with a Pasteur pipette until only the semen pellet was left, which was collected using an Eppendorf pipette in order to measure the amount of semen and to transfer it to a conical 15 mL tube. Ten μ L of semen sample were taken and 90 μ L of water were added in order to evaluate the spermatozoa concentration in a hemocytometer. The rest of the sediment was re-suspended with IVF-TALP medium (Specialty Media, (908) 213-0500, E.U.; www.specialtymedia.com) to obtain a concentration of 10×10^6 spermatozoa mL^{-1} and slides were prepared to assess CE.

The CE rates were assessed using the method of chlortetracycline (CTC) modified by Chamberland *et al.* (2001). An Olympus BX41 microscope was employed with epifluorescence system and V-2A filter (400-500 nm excitation, and 470 nm emission) with 40X objective. Two slides of each sample were prepared and 48 h later 100 spermatozoa were counted, which were classified with the following patterns: F, showed uniform fluorescence in all the head, which indicated non capacitated spermatozoa with intact acrosome;

concentración de espermatozoides en un hemocitómetro. El resto del sedimento se resuspendió con medio IVF-TALP (Specialty Media, (908)213-0500, E.U., www.specialtymedia.com) para obtener una concentración de 10×10^6 espermatozoides mL^{-1} y se prepararon las laminillas para evaluar la CE.

Las tasas de CE se evaluaron con el método de la clortetraciclina (CTC) modificado por Chamberland *et al.* (2001). Se usó un microscopio Olympus BX41 con sistema de epifluorescencia y filtro V-2A (400-500 nm de excitación, y 470 nm de emisión) con objetivo 40X. De cada muestra se prepararon dos laminillas y 48 h después se contaron 100 espermatozoides, que se clasificaron con los siguientes patrones: F, mostraron fluorescencia uniforme en toda la cabeza, lo que indicó espermatozoides no capacitados con el acrosoma intacto; B, con una banda libre de fluorescencia en la región post acrosomal que indicó espermatozoides capacitados con el acrosoma intacto; RA, con la cabeza libre de fluorescencia o con una pequeña banda de fluorescencia en la región ecuatorial, que indicó reacción acrosomal.

Los porcentajes de MP obtenidos antes de la purificación con Percoll y los porcentajes de espermatozoides con los patrones B y RA se analizaron estadísticamente con PROC MIXED (SAS, 2004a). El modelo para MP incluyó los efectos fijos de las subclases tipo-tiempo de preservación (PRE) [fresco a 3 (F3) y 6 h (F6); refrigerado a 3 (R3), 6 (R6) y 24 h (R24); y congelado (CON)], raza (Pelibuey y Blackbelly) y edad del carnero (joven y adulto), así como las interacciones dobles y triples entre estos efectos; y los efectos aleatorios de carnero y la interacción de carnero por PRE, ambos dentro de las subclases de raza por edad. En los patrones B y RA el modelo incluyó además los efectos aleatorios de eyaculado y eyaculado por PRE, ambos dentro de las subclases de carnero por raza por edad. Cuando el efecto principal del factor PRE fue estadísticamente significativo, pero no sus interacciones con otros factores, para MP se hicieron las comparaciones inicialmente planeadas: 1) promedio en semen fresco vs promedio en semen refrigerado a 3 y 6 h $[(F3 + F6)/2 \text{ vs } (R3 + R6)/2]$; 2); media del semen refrigerado a 24 h vs media del semen congelado (R24 vs CON), y se ajustaron los polinomios ortogonales: 3) tendencia lineal y 4) cuadrática en semen fresco; y 5) tendencia lineal y 6) cuadrática en semen refrigerado. Para los patrones B y RA no se incluyó la tendencia cuadrática en semen fresco, pues no se incluyó el nivel 0 h ya que todas las observaciones fueron iguales a cero. Cuando hubo interacción de PRE con edad del carnero, se analizaron las diferencias entre edades para las mismas comparaciones planeadas y los polinomios ortogonales mencionados. Dado que para el semen refrigerado los niveles de tiempo no estaban igualmente espaciados, los coeficientes de los polinomios ortogonales se generaron con la función ORPOL de PROC IML (SAS 2004b).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para MP hubo efectos ($p \leq 0.01$) de subclase tipo-tiempo de preservación y raza del carnero, pero no de edad o interacción ($p > 0.05$). En semen fresco, en promedio para las 3 y 6 h, el MP se redujo 18% más

B, with a free band of fluorescence in the post-acrosomal region, indicating capacitated spermatozoa with intact acrosome; RA, with head free of fluorescence or with a small band of fluorescence in the equatorial region, indicating acrosomal reaction.

The MP percentages, obtained before purification with Percoll and the percentages of spermatozoa with B and RA patterns were statistically analyzed with PROC MIXED (SAS, 2004a). The model for MP included the fixed effects of type-time subclasses of preservation (PRE) [fresh at 3 (F3) and 6 h (F6); refrigerated at 3 (R3), 6 (R6), and 24 h (R24); and frozen (CON), breed (Pelibuey and Blackbelly), and age of the ram (young and adult) as well as first and second order interactions among these effects; and the random effects of ram and the interaction of ram by PRE, both within the subclasses of breed by age. In B and RA patterns, the model also included the random effects of ejaculate and ejaculate by PRE, both within the subclasses of ram by race by age. When the main effect of the PRE factor was statistically significant, but not its interactions with other factors, the comparisons initially planned for MP were made: 1) mean in fresh semen vs mean in refrigerated semen at 3 and 6 h $[(F3 + F6)/2 \text{ vs } (R3 + R6)/2]$; 2); means of refrigerated semen at 24 h vs means of frozen semen (R24 vs CON); and the orthogonal polynomials were fitted: 3) linear tendency and 4) quadratic in fresh semen, and 5) linear tendency and 6) quadratic in refrigerated semen. For B and RA patterns, the quadratic trend in fresh semen was not included, because level 0 h was not included since all the observations were equal to zero. When there was interaction of PRE by ram age, the differences among ages for the same planned comparisons and orthogonal polynomials mentioned were analyzed. Given that for refrigerated semen the time levels were not equally spaced, the coefficients of the orthogonal polynomials were generated with the function ORPOL of PROC IML (SAS 2004b).

RESULTS AND DISCUSSION

For MP there were type-time subclass effects ($p \leq 0.01$) of ram preservation and breed, but not of age or interaction ($p > 0.05$). In fresh semen, for 3 and 6 h on average, MP was reduced by 18% more ($p \leq 0.01$) than in refrigerated semen; furthermore, MP remained constant in refrigerated semen ($p > 0.05$) in the assessed times, but in fresh semen it was quadratically reduced ($p \leq 0.01$), with a major reduction from 3 to 6 h (19%) than from 0 to 3 h (8%) (Table 1; Figure 1).

In frozen semen, MP was reduced drastically (average $53.7 \pm 1.9\%$) ($p \leq 0.01$) as compared to semen refrigerated for 24 h ($83.3 \pm 1.9\%$; Table 1; Figure 1). Ram spermatozoa have high metabolic rate and the diluted ram semen must not be longer than 4 h between 30 and 39 °C (Vivanco, 1998). Besides, when freezing the semen, only about 50% of the ram spermatozoa maintain their viability (Bailey and Buhr, 1994), which agrees with the MP values of the present study. With refrigeration the semen kept its progressive motility on

($p \leq 0.01$) que en el refrigerado; además la MP se mantuvo en el refrigerado ($p > 0.05$) en los tiempos evaluados, pero en el semen fresco se redujo cuadráticamente ($p \leq 0.01$), con una mayor reducción de las 3 a las 6 h (19%) que de las 0 a las 3 h (8%; Cuadro 1; Figura 1).

En el semen congelado MP se redujo drásticamente (promedio $53.7 \pm 1.9\%$) ($p \leq 0.01$) comparado con el semen refrigerado 24 h ($83.3 \pm 1.9\%$; Cuadro 1; Figura 1). Los espermatozoides de carnero tienen una alta tasa metabólica y el semen diluido de carnero no debe estar más de 4 h entre 30 a 39 °C (Vivanco, 1998). Además, al congelar el semen sólo alrededor de 50% de los espermatozoides de carnero mantienen su viabilidad (Bailey y Buhr, 1994), lo cual coincide con los valores de MP del presente estudio. Con la refrigeración el semen mantuvo su motilidad progresiva en niveles similares al semen fresco a las 0 h, porque al bajar la temperatura se reduce la actividad metabólica y de motilidad, lo que aumenta la vida media del espermatozoide. La motilidad se reestablece nuevamente

Cuadro 1. Significancia para las comparaciones planeadas y los polinomios ortogonales evaluados para tipo-tiempo de preservación[†].

Table 1. Significance for planned comparisons and orthogonal polynomials assessed for type-time preservation[†].

Comparación/polonomio ortogonal [§]	Variables [¶]		
	MP	Patrón B	Patrón RA [Ⓟ]
1) (F3 + F6)/2 vs (R3 + R6)/2	<0.001	<0.001	0.430
2) R24 vs CON	<0.001	0.001	0.894
Semen fresco			
3) Tendencia lineal	<0.001	0.005	0.567
4) Tendencia cuadrática	0.015	—	—
Semen refrigerado			
5) Tendencia lineal	0.489	0.0003	0.002
6) Tendencia cuadrática	0.718	0.001	0.302

[†] Subclase tipo-tiempo de preservación del semen: diluido en fresco a 36 °C por 0 (F0), 3 (F3) y 6 h (F6); refrigerado a 5 °C por 3 (R3), 6 (R6) y 24 h (R24); congelado (CON) ♦ Type-time subclass semen preservation: diluted in fresh at 36 °C for 0 (F0), 3 (F3) and 6 h (F6), refrigerated at 5 °C for 3 (R3), 6 (R6), and 24 h (R24), frozen (CON).

[¶] MP=porcentaje de motilidad progresiva; Patrón B y RA=porcentaje de espermatozoides con el Patrón B y RA, del ensayo de CTC ♦ MP= percentage of progressive motility; B and RA pattern=percentage of spermatozoa with B and RA pattern, of CTC assay.

[§] Los coeficientes de los polinomios ortogonales se generaron con la función ORPOL de PROC IML (SAS, 2004b) ♦ Coefficients of orthogonal polynomials were generated with the ORPOL function of PROC IML (SAS, 2004b).

[Ⓟ] Estos niveles de significancia corresponden a las diferencias entre edades (joven vs adulto) para las comparaciones y los polinomios ortogonales indicados ♦ These significance levels correspond to the differences among ages (young vs adults) for the comparisons and indicated orthogonal polynomials.

similar levels as the fresh semen at 0 h, because as temperature goes down, metabolic activity and motility diminish, which increases mean lifetime of the spermatozoa. Motility is re-established when the temperature rises (30 to 39 °C), if there were no structural damages caused by thermal shock (Vivanco, 1998). Paulenz *et al.* (2002) did not observe differences in MP at monitoring semen diluted at 5 °C for 0, 6, 24, and 30 h; however, Maxwell and Salamon (1993) indicate that the fertility of the refrigerated ram semen declines quickly after 24 h. Pelibuey rams had higher MP mean ($p \leq 0.01$; $79.4 \pm 1\%$) than Blackbelly rams ($74 \pm 1\%$). Bag *et al.* (2002) report effects of breed in the MP of ram semen, and Lunstra and Echtenkamp (1982) in young bulls.

For the percentage of capacitated spermatozoa with intact acrosome (Pattern B of CTC assay), only the type-time subclass of preservation showed significant effect ($p \leq 0.01$). On average, the semen refrigerated at 5 °C had higher ($p \leq 0.01$) percentage of pattern B than the fresh semen at 36 °C for 3 and 6 h, and the one refrigerated for 24 h than the frozen semen (Table 1). Likewise, through the time, with the semen refrigeration the B pattern percentage (32.8, 42.5, and 44.5%, S.E.=2.2, for R3, R6, and R24) increased ($p \leq 0.01$) quadratically (Table 1, Figure 2). Morrier *et al.* (2002) reported similar results (34 ± 2 and $40 \pm 4\%$) for pattern B in ram semen refrigerated 3 h at 5 °C, and in frozen semen. According to Bailey *et al.* (2002),

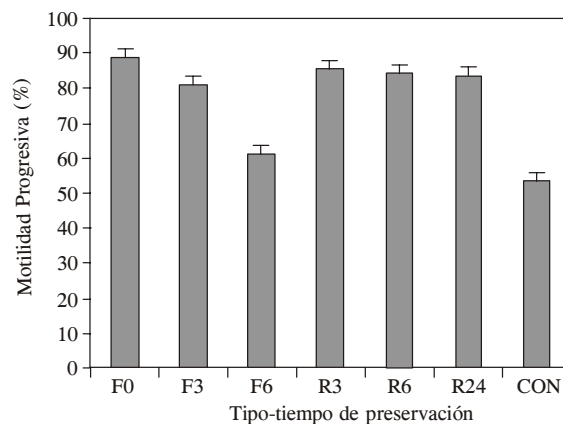


Figura 1. Medias de los porcentajes de motilidad progresiva en semen con diferentes niveles de subclase tipo-tiempo de preservación [diluido en fresco a 36 °C por 0 (F0), 3 (F3) y 6 h (F6); refrigerado a 5 °C por 3 (R3), 6 (R6) y 24 h (R24); congelado (CON)].

Figure 1. Means of progressive motility percentages in semen with different levels of type-time preservation subclasses (diluted in fresh at 36 °C for 0 (F0), 3 (F3), and 6 h (F6); refrigerated at 5 °C for 3 (R3), 6 (R6), and 24 h (R24), frozen (CON)).

al subir la temperatura (30 a 39 °C), si no hubo daños estructurales causados por un shock térmico (Vivanco, 1998). Paulenz *et al.* (2002) no observaron diferencias en MP al monitorear semen diluido a 5 °C por 0, 6, 24 y 30 h; sin embargo, Maxwell y Salamon (1993) indican que la fertilidad del semen refrigerado de carnero declina rápidamente después de las 24 h. Los carneros Pelibuey tuvieron un promedio mayor de MP ($p \leq 0.01$; $79.4 \pm 1\%$) que los Blackbelly ($74 \pm 1\%$). Bag *et al.* (2002) reportan efectos de raza en la MP del semen de carnero, y Lunstra y Echternkamp (1982) en toretes.

Para el porcentaje de espermatozoides capacitados con acrosoma intacto (Patrón B del ensayo de CTC), sólo la subclase tipo-tiempo de preservación mostró un efecto significativo ($p \leq 0.01$). En promedio, el semen refrigerado a 5 °C tuvo mayor ($p \leq 0.01$) porcentaje de patrón B que el semen en fresco a 36 °C por 3 y 6 h, y el refrigerado por 24 h que el semen congelado (Cuadro 1). Asimismo, a través del tiempo, con la refrigeración del semen aumentó ($p \leq 0.01$) cuadráticamente (Cuadro 1 y Figura 2) el porcentaje de Patrón B (32.8, 42.5 y 44.5%, E.E. = 2.2, para R3, R6 y R24). Morrier *et al.* (2002) reportaron resultados similares (34 ± 2 y $40 \pm 4\%$ para el patrón B en semen de carnero refrigerado 3 h a 5 °C y en semen congelado. Según Bailey *et al.* (2002), estos resultados se deben a los cambios en la membrana celular causados por las temperaturas de refrigeración y de congelación usadas para la criopreservación, lo cual aumenta los niveles intracelulares de Ca^{+2} (Bailey y Buhr, 1994), como ocurre en la CE (Cormier y Bailey, 2003). También en el semen mantenido 3 h a 36 °C hubo un proceso de CE inducida en $23.9 \pm 2.2\%$ para el patrón B, y ésta aumentó ($p \leq 0.01$) a $30.8 \pm 2.2\%$ a las 6 h. Pérez *et al.* (1997) mencionan que la CE se puede presentar también en el semen de carnero almacenado sin diluir; ellos encontraron 30 a 35% de espermatozoides con patrón B después de 4 h de almacenamiento a 20 °C, resultados similares a los del presente estudio. Cormier *et al.* (1997) observaron 19% de patrón B en semen fresco de bovino a las 4 h a 23 °C.

En espermatozoides capacitados con reacción acrosomal (patrón RA del ensayo de CTC), hubo un efecto de la interacción ($p \leq 0.01$) de tipo-tiempo de preservación por edad, pero no de la raza del carnero ($p \leq 0.05$). Al transcurrir el tiempo de preservación y el tipo de preservación pasó de la dilución en fresco a la refrigeración y luego al congelado, los espermatozoides con el patrón RA aumentaron de 6 a más de 26% (Figura 3), y este incremento fue mayor para los carneros jóvenes que para los adultos en semen refrigerado por 24 h y semen congelado (27.7 ± 1.5 vs $19.8 \pm 1.5\%$ y 33.8 ± 1.6 vs $26.3 \pm 1.5\%$). El efecto de la interacción se debió al marcado incremento lineal

these results are due to the changes in the cell membrane caused by the temperatures of refrigeration and freezing used for cryopreservation, which increases intracellular Ca^{+2} levels (Bailey and Buhr, 1994), as occurs in CE (Cormier and Bailey, 2003). As well in the semen kept for 3 h at 36 °C, there was a process of CE induced in $23.9 \pm 2.2\%$ for pattern B, and this increased ($p \leq 0.01$) to $30.8 \pm 2.2\%$ at 6 h. Pérez *et al.* (1997) mention that CE may also appear in stored undiluted ram semen. They found 30 to 35% of spermatozoa with B pattern after 4 h of storage at 20 °C, results similar to those of the present study. Cormier *et al.* (1997) observed 19% of pattern B in fresh bovine semen at 4 h at 23 °C.

In capacitated spermatozoa with acrosomal reaction (RA pattern of CTC assay), there was an effect of interaction ($p \leq 0.01$) of preservation type-time by age, but not of ram breed ($p \leq 0.05$). As preservation time passed by and the type of preservation went from dilution in fresh to refrigeration and afterwards to freezing, the spermatozoa with RA pattern increased from 6 to more than 26% (Figure 3), and this increase was higher for young rams than for adults in semen refrigerated for 24 h and frozen semen (27.7 ± 1.5 vs $19.8 \pm 1.5\%$ and 33.8 ± 1.6 vs $26.3 \pm 1.5\%$). The effect of interaction was due to the marked linear increment ($p \leq 0.01$) with conservation time in refrigerated semen of young rams, compared to that of adults (Table 1,

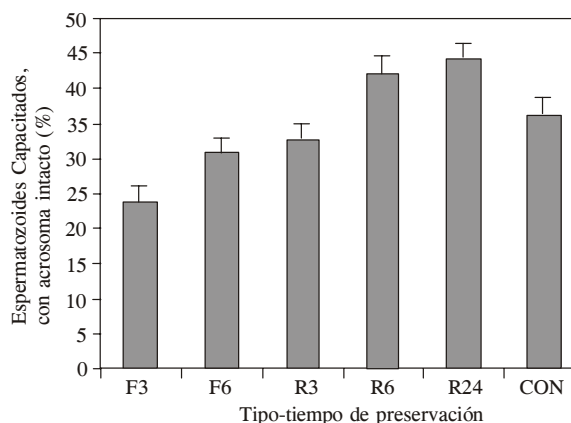


Figura 2. Medias de los cuadrados mínimos para porcentajes de espermatozoides capacitados, con acrosoma intacto (Patrón B del ensayo de CTC) en semen con diferentes niveles de subclase tipo-tiempo de preservación [diluido en fresco a 36 °C por 3 (F3) y 6 h (F6); refrigerado a 5 °C por 3 (R3), 6 (R6) y 24 h (R24); congelado (CON)].

Figure 2. Least squares means for percentage of capacitated spermatozoa with intact acrosome (B Pattern of CTC assay) in semen with different levels of the type-time preservation subclass [diluted freshly at 36 °C for 3 (F3) and 6 h (F6), refrigerated at 5 °C for 3 (R3), 6 (R6), and 24 h (R24); frozen (CON)].

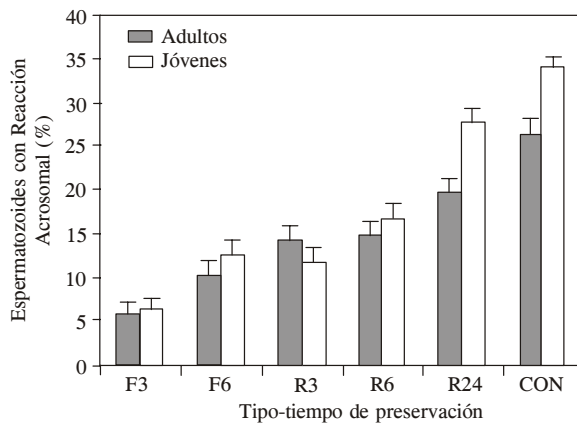


Figura 3. Medias de los cuadrados mínimos para porcentajes de espermatozoides con reacción acrosomal (patrón RA del ensayo de CTC) en semen de carneros adultos y jóvenes con diferentes niveles de subclase tipo-tiempo de preservación [diluido en fresco a 36 °C por 3 (F3) y 6 h (F6); refrigerado a 5 °C por 3 (R3), 6 (R6) y 24 h (R24); congelado (CON)].

Figure 3. Least squares means for percentages of spermatozoa with acrosomal reaction (RA pattern of CTC assay) in adult and young ram semen with different levels of the type-time preservation subclass [diluted freshly at 36 °C for 3 (F3) and 6 h (F6); refrigerated at 5 °C for 3 (R3), 6(R6), and 24 h (R24); frozen (CON)].

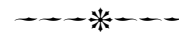
($p \leq 0.01$) con el tiempo de conservación en el semen refrigerado de carneros jóvenes, comparado con el de los adultos (Cuadro 1; Figura 3). Este efecto de la edad en el patrón RA fue reportado en toros por Lunstra y Echternkamp (1982) y por Januskauskas *et al.* (1999). Según Dott *et al.* (1979) y Corteel (1980), el efecto de la edad en la viabilidad y motilidad de los espermatozoides se debe al grado de madurez de las glándulas sexuales accesorias en el macho. La concentración de proteínas en el plasma seminal aumentó significativamente de los 7 a los 13 meses de edad, mejorando la viabilidad y motilidad de los espermatozoides (Lunstra y Echternkamp, 1982). Pérez *et al.* (1997) observaron 7% de espermatozoides con reacción acrosomal después de almacenar el semen de carnero 4 h a 20 °C, y Morrier *et al.* (2002) reportaron 14, 10, 15 y 25% de patrón RA en semen refrigerado (5 °C) por 3, 8, 16 y 24 h. Un semen apto para inseminación artificial debe tener al menos 45 a 50% de espermatozoides intactos (la diferencia con respecto a la suma de espermatozoides con los patrones B y RA) (Ax *et al.*, 2005), lo cual no ocurre con los promedios observados en el presente estudio para el semen refrigerado 24 h (R24) y el congelado (CON). Ésto indica que el semen de muchos de los sementales con estos esquemas de preservación no es apto para la inseminación artificial.

Figure 3). This effect of age in the RA pattern was reported for bulls by Lunstra and Echternkamp (1982) and by Januskauskas *et al.* (1999). According to Dott *et al.* (1979) and Corteel (1980), the effect of age on viability and motility of spermatozoa is due to the degree of maturity of the accessory sexual glands in the male. The protein concentration in seminal plasma significantly increased from 7 to 13 months of age, improving spermatozoa viability and motility (Lunstra and Echternkamp, 1982). Pérez *et al.* (1997) observed 7% of spermatozoa with acrosomal reaction after storing ram semen for 4 h at 20 °C, and Morrier *et al.* (2002) reported 14, 10, 15, and 25% of RA pattern in refrigerated semen (5 °C) during 3, 8, 16, and 24 h. Suitable semen for artificial insemination must have at least 45 to 50% of intact spermatozoa (the difference with respect to the sum of spermatozoa with B and RA patterns) (Ax *et al.*, 2005), which does not occur with the means observed in the present study for refrigerated semen during 24 h (R24) and frozen semen (CON). This indicates that the semen of many sires with these preservation schemes is not suitable for artificial insemination.

CONCLUSIONS

Storage time reduces motility percentage in fresh ram semen, but it does not in refrigerated semen up to 24 h, whereas in frozen semen sperm motility is reduced by approximately 50%. Low temperatures applied for semen cryopreservation, storage at 36 °C, and refrigeration of diluted ram semen generate spermatozoa with premature capacitation. Diluted semen keeps well in fresh the first 3 h. With refrigeration at 5 °C for 24 h, the same as with cryopreservation, sperm capacitation levels are induced, that change fertility in programs of artificial insemination programs; this is more critical in young rams than in adults rams. Fresh semen must be used during the first 3 or 4 h, otherwise, it must be refrigerated; if artificial insemination will be made at 24 h or afterwards, semen must be frozen.

End of the English version—



CONCLUSIONES

El tiempo de almacenamiento reduce el porcentaje de motilidad en el semen fresco de carnero, pero no en el semen refrigerado hasta por 24 h, mientras que en el semen congelado la motilidad espermática se reduce aproximadamente 50%. Las bajas temperaturas aplicadas

para la criopreservación del semen, el almacenamiento a 36 °C y la refrigeración del semen diluido de carnero dan origen a espermatozoides con capacitación prematura. El semen diluido se conserva bien en fresco las primeras 3 h. Con la refrigeración a 5 °C por 24 h, al igual que con la criopreservación, se inducen niveles de capacitación espermática que cambian la fertilidad en programas de inseminación artificial; esto es más crítico en carneros jóvenes que en adultos. El semen fresco debe usarse las primeras 3 ó 4 h, de lo contrario se debe refrigerar; si la inseminación artificial se hará a las 24 h o después, se debe congelar.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT, México, por el apoyo financiero brindado a través del proyecto SAGARPA-2004-C01-167.

LITERATURA CITADA

- Arnoult, C., Y. Zeng, and H. M. Florman. 1996. ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J. Cell Biol.* 134: 637-645.
- Ax, R. L., A. R. Cropp, B. Pollard, S. N. Faber, T. C. McCauley, G. R. Dawson, y D. Fish. 2005. Uso de hormonas para incrementar las tasas de gestación. *Memorias del Día Internacional del Ganadero Lechero. DIGAL A. C. Delicias, Chihuahua, México.* pp: 1-20.
- Bag, S., A. Joshi, P. S. Rawat, and J. P. Mittal. 2002. Effect of initial freezing temperature on the semen characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa in a semi-arid tropical environment. *Small Ruminant Res.* 43:23-29.
- Bailey, J. L., and M. M. Buhr. 1994. Cryopreservation alters the Ca²⁺ flux of bovine spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci.* 74: 45-51.
- Bailey, J., A. Morrier, and N. Cormier. 2002. Semen cryopreservation: successes and persistent problems in farm species. *In: Amino Acids: Meat, Milk and More! Improving Animal Production with Reproductive Physiology. Symp. Can. Soc. Animal Sci., Quebec, Canada.* pp: 87-95.
- Chamberland, A., V. Fournier, S. Tardif, M. A. Sirard, R. Sullivan, and J. L. Bailey. 2001. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology* 55: 823-835.
- Cormier, N., and J. L. Bailey. 2003. A differential mechanism is involved during heparin and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 69:177-185.
- Cormier, N., M. A. Sirard, and J. L. Bailey. 1997. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J. Andrology* 18: 461-468.
- Corteel, J. M. 1980. Effets du plasma seminal sur la survie et la fertilité des spermatozoides conservés *in vitro*. *Reprod. Nutri. and Develop.* 20:1111-1123.
- de Lamirande, E., C. Tsai, A. Harakat, and C. Gagnon. 1998. Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcoline, and biological fluid ultrafiltrates. *J. Andrology* 19:585-594.
- Dott, H. M., R. A. Harrison, and G. C. Foster. 1979. The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. *J. Reprod. Fertility* 55:113-124.
- Evans, G., y W. M. Maxwell. 1990. *Inseminación Artificial en Ovejas y Cabras.* Josefina Illadera del Portal (trad). Acribia. Zaragoza, España. 204 p.
- Flesch, F. M., B. Colenbrander, L. M. van Golde, and B. M. Gazella. 1999. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262:787-792.
- Handrow, R. R., N. L. First, and J. J. Parrish. 1989. Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *J. Exp. Zoo.* 252:174-182.
- Januskauskas, A., J. Gil, L. Söderquist, M. G. M. Háárd, M. Ch. Háárd, A. Johannisson, and H. Rodríguez-Martínez. 1999. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology* 52:641-658.
- Langlais, J., and K. D. Roberts. 1985. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res.* 12:183-224.
- Lunstra, D. D., and S. E. Echterkamp. 1982. Puberty in beef bulls: acrosome morphology and semen quality in bulls of different breeds. *J. Anim. Sci.* 55:638-648.
- Maxwell, W. M., and S. Salamon. 1993. Liquid storage of ram semen: review. *Reprod. Fertility Develop.* 5:613-638.
- Medeiros, C. M. O., F. Forell, A. T. D. Oliveira, and J. L. Rodrigues. 2002. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? *Theriogenology* 57:327-344.
- Morrier, A., F. Castonguay, and J. L. Bailey. 2002. Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci.* 82:347-356.
- Paulenz, H., L. Söderquist, R. Pérez-Pé, and K. Andersen Berg. 2002. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology* 57:823-836.
- Pérez, L. J., A. Valcárcel, M. A. de las Heras, D. Moses, and H. Baldassarre. 1997. The storage of pure ram semen at room temperature results in capacitation of a subpopulation of spermatozoa. *Theriogenology* 47:549-558.
- SAS Institute Inc. 2004a. *SAS/STAT® 9.1 User's Guide.* SAS Institute Inc., Cary, N. C., U.S.A. pp: 2659-2852.
- SAS Institute Inc. 2004b. *SAS/IML® 9.1 User's Guide.* SAS Institute Inc., Cary, N. C., U.S.A. pp: 832-838.
- Sorensen, Jr. A. M. 1982. *Reproducción Animal: Principios y Prácticas.* Ramón Elizondo Mata (trad). McGraw-Hill. pp: 157-186.
- Tienhai, P., A. Johannisson, and H. Rodríguez-Martínez. 2004. Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Anim. Reprod. Sci.* 80:131-146.
- Vadnais, M. L., R. N. Kirkwood, D. J. Specher, and K. Chow. 2005. Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. *Anim. Reprod. Sci.* 90:347-354.
- Vivanco, M. H. W. 1998. *Inseminación artificial en ovinos. Memorias del Seminario Internacional: Aplicaciones de Técnicas Biotecnológicas en la Reproducción de Ovinos y Caprinos.* Universidad Autónoma Chapingo, México. pp: 135-194.