

RESULTADOS DE FERTILIZACIÓN *In vitro* UTILIZANDO SEMEN CONGELADO DE LOS MORUECOS ASSAF

In vitro Fertilization Results Using Frozen- Thawed Sperm of the Assaf Ram

Adam Akourki¹, Lydia Gil¹, Mayela Gallegos de la Hoya², Arancha Echegaray³, Noelia Gonzalez¹, Agustín Josa¹, Emilio Espinosa¹ y Luisa Celma Meque¹

¹ Facultad Veterinaria. Departamento de Patología Animal (Reproducción). C/Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza, España.

² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Juárez del Estado de Durango. C. Constitución No. 404 Sur.

CP 34000. Durango. México. ³ Empresa Magapor SL. Martín Blesa 37. 50600 Ejea de los Caballeros. Zaragoza, España.

E-mail: adakna@yahoo.es, Tel: (+34) 976 76 1000 (extensión 4113), (+34) 606093640, Fax: (+34) 976 761612.

RESUMEN

En el presente trabajo, se analiza el efecto del animal, mes (marzo, mayo, julio y septiembre) de congelación así como el diluyente de congelación utilizado, sobre los resultados de fertilización *in vitro* (FIV). El semen fue recolectado de cinco moruecos Assaf y congelado en presencia ó en ausencia del Orvus Paste. Para las pruebas de FIV se utilizaron ovarios de hembras prepuberales sacrificadas en el matadero local de los que se obtenían los ovocitos por aspiración folicular. Los resultados del estudio estadístico pusieron en evidencia que ni el semen de morueco ni el diluyente utilizado ó el mes de realización de la congelación influían en los porcentajes observados de FIV, factores que si tenían un efecto significativo en la calidad de las dosis post descongelación.

Palabras clave: Morueco Assaf, semen congelado, Orvus Paste, fecundación *in vitro*, embriones.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of ram, month (March, May, July and September) and semen freezing on *in vitro* fertilization (IVF) results. Sperm was collected from 5 Moroccan Assaf rams and frozen in both the presence and absence of Orvus Paste. For IVF tests ovaries from prepuberal ewes were collected at a local meat packing plant from which oocytes were obtained by aspiration of the follicles. The statistical analysis indicated that no ram effect, no extender effect and no month effect have influence on the results of IVF, however there was a significant effect in relation to the semen quality post thawing.

Key words: Assaf ram, thawed sperm, Orvus Paste, *in vitro* fertilization - embryos.

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) constituye un logro importante en el mundo biotecnológico y de gran aplicación en la ganadería. A pesar del gran desarrollo en los últimos años, la IA no ha logrado superar algunos retos que han frenado su mayor expansión y aplicación especialmente en la especie ovina [13, 17]. Los trabajos en los últimos años se han centrado particularmente en aumentar la calidad de las dosis seminales utilizadas, para ello se ha realizado una mayor discriminación de los eyaculados con una máxima calidad mediante la optimización de los parámetros de contrastación o evaluación seminal; sea por los analizadores automatizados de los diferentes movimientos espermáticos [1, 14, 21], por técnicas de los marcadores fluorescentes y por la determinación de la actividad enzimática que valoran una mayor integridad de la membrana plasmática [3, 11, 12, 15, 20, 23]. Además, la evaluación seminal se han centrado en investigaciones sobre el comportamiento de los eyaculados en fertilización *in vitro*; en donde fue observada una buena correlación entre porcentaje de ovocitos penetrados *in vitro* y los parámetros seminales: motilidad y integridad de la membrana espermática [7] lo mismo también entre fertilidad *in vivo* y algunas técnicas de fertilización *in vitro* [2].

En el presente trabajo, el objetivo principal fue la evaluación de la efectividad de los eyaculados recogidos de cinco machos ovinos, contrastados y posteriormente congelados con dos diluyentes diferentes sobre los resultados de fertilización *in vitro* en diferentes épocas del año.

MATERIALES Y MÉTODOS

Congelación del semen

Cinco moruecos de 36 meses de edad de raza Assaf pertenecientes a la empresa Satgamesa de Ejea de los Caballeros (España) fueron utilizados en esta experiencia. Se colectaba dos eyaculados/día, dos días a la semana (martes y jueves) en meses alternos durante el periodo comprendido entre marzo a septiembre. La recolección del semen se realizaba en la segunda quincena del mes de reposo después que los moruecos terminaban de cubrir las ovejas durante ese mes.

Una vez que el semen fue colectado, se realizaba una primera valoración de la calidad basada en el estudio de la concentración espermática, motilidad masal e individual así como porcentaje de espermatozoides vivos-muertos mediante la tinción con eosina-nigrosina. Una vez realizada esta primera valoración se pasaba a diluir mediante la técnica descrita por Fiser [5] para ello se utilizaban dos diluyentes ó fracciones: Fracción 1 del diluyente de Fiser con un 25% de yema de huevo y 2% de glicerol, que se añadía a 30°C, comenzando el descenso de temperatura durante dos horas hasta 4°C, transcurrido dicho periodo se volvía a diluir con la Fracción 2 del diluyente de Fiser con un 12% de glicerol, manteniendo las dosis 2 horas a 4°C para su equilibración, siendo finalmente congeladas las dosis en vapores de nitrógeno líquido.

La Fracción 1 según la experiencia con un 0,7% del Orvum Paste (13560/0030 Comex Trade-España) detergente de efectos beneficiosos en la congelación [4]. La calidad del semen descongelado fue valorada mediante los parámetros siguientes: Motilidad individual, viabilidad por la tinción vital eosina-nigrosina, integridad de la membrana plasmática según la técnica de Jeyendran [9], integridad del acrosoma por el método de Johnson [10] y total de morfoanomalías espermáticas.

Obtención de ovocitos

Los ovocitos fueron obtenidos de ovarios de hembras pre-puberales (3-4 meses de edad) sacrificadas en el matadero local en los meses comprendidos entre abril y octubre. Se realizó la aspiración de folículos 2-6 mm. Después de la selección de los complejos cúmulos-ovocito y posterior lavado (3 veces en 5 mL de medio M199¹ adicionado con 12 µg/ mL de estradiol² y 10% suero de oveja³), los ovocitos fueron madurados en micro gotas de 400 µL del medio de maduración (M199 suplementado con 60 µL de FSH-LH⁴ (relación 1-5), 12 µg/ mL de estradiol y 20% de suero de oveja), cubiertas de aceite mineral en un ambiente de 5% de dióxido de carbono (CO₂) y 38,5°C durante 24 h.

Procesamiento del semen descongelado

Dos pajuelas por morueco y por tratamiento se descongelaban en un baño María a 37°C durante 21 segundos. Las dosis se depositaban en tubos que contenían el medio de capacitación, SOF (Fluido oviductal sintético) suplementado con 23,8 mg de hepes⁵, 40 mg de BSA⁶ y 50 µL gentamicina⁷. Después, se cen-

trifugaba 400G durante 5 minutos. Seguidamente, se desechara el sobrenadante y se reemplazaba por la misma cantidad de medio de capacitación. Finalmente, el semen se incubaba en un ambiente de 5% de dióxido de carbono (CO₂) y 38,5°C durante 45-60 minutos. Transcurrido el periodo de incubación se valoraba la concentración de espermatozoides capacitados

Fecundación, co-cultivo y valoración de los embriones

Transcurrido la maduración, los ovocitos fueron desnudados por vortex y lavado dos veces en el medio SOF. La inseminación se realizaba con una concentración media de 1 millón de espermatozoides/ mL (contaje en cámara de Bürker y posterior cálculo) en gotas de 50 µL del medio de fecundación (SOF suplementado con 200 µl desuero de oveja, 6,4 µL lactato cálcico⁸ y 8 µL de gentamicina), luego se incubaban nuevamente por un periodo de 18-20h. Transcurrido este tiempo de co-cultivo eran puestos de nuevo en cultivo en medio SOF adicionado con 40 µL de amino ácidos esenciales y 20µL de no esenciales⁹, 100µL desuero fetal bovino¹⁰, 7'3 µL de glutamina¹¹, 16 µL de BSA y 16µL de gentamicina.

A las 48 horas de haber realizado la inseminación, los ovocitos se fijaban en una solución de alcohol- ácido acético (3:1); transcurridas 48 horas se valoraban con la tinción orceina-acético en un microscopio de contraste de fases. Se valoró la tasa de fecundación en función de la presencia o ausencia de pronúcleos, la producción de embriones, la división celular, la poliespermia, la degeneración si no existía ningún tipo de estructura, y finalmente ovocitos no identificados y ovocitos no fecundados.

Para determinar estas tasas, se dividió el número total de ovocitos en la categoría correspondiente por el número total de ovocitos inseminados.

Análisis estadístico

Se aplicó el modelo lineal múltiple del programa SPSS 8,0 Windows [18] para valorar los efectos: morueco, mes y diluyente sobre los resultados de la calidad seminal y de FIV. Las medias se comparaban entre sí por la prueba de Duncan para las variables morueco y mes, y por el test T de Muestras Independientes para la variable diluyente.

RESULTADOS

En las TABLAS I y II, se observa que no existe una influencia significativa del morueco sobre los resultados de fertilización *in vitro*, pero que sin embargo existe una alta diferencia estadística (P<0,001) en la calidad seminal de las pajuelas entre los cinco animales estudiados.

Con relación al mes de congelación del semen, se puede ver que tampoco el mes influyó en los parámetros de fertilización *in vitro* (TABLA I) aunque los meses de marzo y mayo tuvieron los peores resultados al momento de la descongelación del semen (25,66 y 20,83% de motilidad individual; 18,82 y 19,49% de viabilidad; 20,99 y 21,99% de endósmosis; 43,83

TABLA I
ANÁLISIS LINEAL MÚLTIPLE DE LA CALIDAD SEMINAL Y DE LOS RESULTADOS DE FECUNDACIÓN *in vitro*

Efecto	M.I	Viab	Endos	Acros	Morf.t	T.fec	T.emb	T.divis	T.polisp	T.no.id	T.deg	T.no.fec
Morueco	***	***	**	***	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Diluyente	***	***	***	***	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Mes	***	**	***	***	***	ns	ns	ns	*	ns	*	ns

M.I: motilidad individual; Viab: viabilidad; Endos: endosmosis positiva; Acros: integridad del acrosoma; Morf.t: morfoanomalías totales; T.fec: tasa de fecundación; T.emb: tasa de producción de embriones; T.divis: tasa de división celular; T.polisp: tasa de ovocitos polispermicos; T.no.id: tasa de ovocitos no identificados; T.deg: tasa de ovocitos degenerados; T.no.fec: tasa de ovocitos no fecundados; ns: no significativo; *: Significativo (P<0,05); **: Muy significativo (P< 0,01); ***: Altamente significativo (P <0,001).

TABLA II
CALIDAD SEMINAL EN FUNCIÓN DEL MORUECO (Medias y errores estándares)

Morueco	M.I.	Viab	Endos	Acros	Morf
8200	38,79±,26 ^a	3,71±,52 ^a	2,55±,70 ^a	6,47±1,58 ^a	4,58±,70 ^c
8204	3,03±,26 ^b	2,16±,52 ^b	2,82±,70 ^a	5,55±,58 ^b	5,77±,70 ^b
8205	2,72±,26 ^c	1,20±,52 ^c	2,44±,70 ^a	3,36±,58 ^c	7,33±,70 ^a
8437	2,68±,26 ^c	1,40±,52 ^c	2,60±,70 ^a	3,70±,58 ^d	7,49±,70 ^a
8439	2,26±,36 ^c	1,28±,59 ^c	1,16±,77 ^b	3,51±,65 ^d	7,20±,77 ^a

M.I: motilidad individual; Viab: viabilidad; Endos: endosmosis positiva; Acros: integridad del acrosoma; Morf.tot: morfoanomalías totales. Letras literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa (P< 0,05).

y 34,09% de acrosoma y 71,36 y 69,86% de las morfoanomalías, de manera respectiva). No obstante, el porcentaje de ovocitos poliespermicos fue mínimo en el mes de marzo (10,09%) y que la tasa de ovocitos degenerados fue la más baja en los meses de marzo y julio (11,83 y 10,87%, respectivamente). Todo ello se observa en la TABLA III.

En el caso del diluyente utilizado para la congelación seminal, se observó que la adición del Orvum Paste mejoró significativamente (P<0,05) la calidad del semen congelado (33,93% vs. 22,57% de motilidad individual; 27,72% vs. 16,39% de viabilidad; 29,65% vs. 21,26% de endosmosis; 53,57% vs. 35,61% de la integridad del acrosoma y 56,15% vs. 72,36% de morfoanomalías). Sin embargo, esta mejora no se reflejó en la fertilización de los ovocitos (TABLA V).

DISCUSIÓN

Efecto morueco

Según la TABLA I no se encontró diferencia significativa en los resultados de FIV en función del morueco. Esto no concuerda con los resultados obtenidos por Fukui y col. [6], al observar un efecto significativo del morueco, no sólo sobre la tasa de fecundación y de poliespermia, sino también sobre el porcentaje de división celular. Estos autores reportaron una variación de un 43 a un 89% en la tasa de fecundación, de 44 a 86% en producción de embriones de 2 células y de 44 a 85% de división a 4 células, utilizando semen de la raza Clun Forest.

Hay que considerar además, que la capacidad fecundante *in vitro* de los machos, está condicionada por la época

del año, la edad del animal, calidad del semen, así como por el número de eyaculados utilizados entre los animales [8]. Por otra parte, la mejor tasa de fertilización se logra inseminando los ovocitos con semen fresco, frente al semen congelado [8]. Es posible entonces, que la discrepancia con Fukui y cols. se deba a que ellos utilizaron semen fresco para la fertilización *in vitro* y no semen congelado.

Efecto mes

En la raza Ile de France, se observó que la estación del año no afectó los resultados de fertilidad *in vitro* obtenidos con semen congelado [8]. Según estos autores, el porcentaje de ovocitos fertilizados fue de 58 y 64% en época reproductiva y de anestro. Lo anterior, corrobora la ausencia del efecto mes de congelación, sobre los porcentajes de ovocitos fertilizados *in vitro*, así como la división y producción de embriones obtenidos en el presente trabajo.

No se han encontrado referencias bibliográficas respecto a la influencia del mes sobre la calidad de los ovocitos obtenidos a partir de ovarios de matadero y por consiguiente sobre los resultados fecundación. En nuestro caso tampoco se observó ninguna variación al respecto, ni ninguna interacción entre el mes de recogida de los ovarios y el mes de recogida del semen.

Diluyente de congelación

En estudios previos realizados en 1978 por Pursel y col. [16] demostraron que el porcentaje de ovocitos fertilizados mediante inseminación artificial en la cerda, se incrementaba significativamente de 34,7 a 65,3% al añadir un 0,5% del Orvum Paste en la congelación del semen verraco [16]. En caninos, se

TABLA III
INFLUENCIA DEL MES SOBRE LOS DIFERENTES PARÁMETROS SEMINALES (Medias y errores estándares)

Mes	M.I.	Viab	Endos	Acr	Morf	Poliesp	Deg
Marzo	25,66±2,11 ^b	18,82±1,42 ^b	20,99±1,58 ^b	43,83±1,47 ^b	71,36±1,58 ^a	10,09±2,15 ^b	11,83±3,27 ^b
Mayo	20,83±2,11 ^b	19,49±1,42 ^b	21,99±1,58 ^b	34,09±1,47 ^c	69,86±1,58 ^a	13,50±2,15 ^{ab}	13,32±3,27 ^{ab}
Julio	33,55±2,04 ^a	25,01±1,37 ^a	29,99±1,53 ^a	55,11±1,42 ^a	52,72±1,53 ^c	17,32±2,08 ^b	10,87±3,16 ^b
Sept	31,47±1,89 ^a	24,02±1,27 ^a	27,79±1,42 ^a	44,34±1,32 ^b	64,24±1,42 ^b	11,55±1,93 ^{ab}	22,13±2,93 ^a

M.I: motilidad individual; Viab: viabilidad; Endos: endosmosis positiva; Acros: integridad del acrosoma; Morf.tot: morfoanomalías totales; Poliesp: poliespermia; Deg: degenerados. Letras literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa (P <0,05).

TABLA IV
CALIDAD SEMINAL SEGÚN EL DILUYENTE UTILIZADO EN LA CONGELACIÓN (Medias y errores estándares)

Diluyente	M.I.	Viab	Endos	Acros	Morf tot
Control	22,57±1,44 ^b	16,39±0,97 ^b	21,26±1,08 ^b	35,61±1,00 ^b	72,36±1,08 ^a
Paste	33,93±1,44 ^a	27,72±0,97 ^a	29,65±1,08 ^a	53,57±1,00 ^a	56,15±1,08 ^b

M.I: motilidad individual; Viab: viabilidad; Endos: endosmosis positiva; Acros: integridad del acrosoma; Morf.tot: morfoanomalías totales. Letras literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa (P <0,05).

TABLA V
EFFECTOS DEL DILUYENTE DE CONGELACIÓN SOBRE LOS RESULTADOS DE FECUNDACIÓN *IN VITRO* (Medias y errores estándares)

Diluyente	Total ovocitos	T.fec (%)	T.emb (%)	T.divis (%)
Control	1035	28,91 +/-2,21 ^a	23,36 +/-2,15 ^a	14,47 +/-1,98 ^a
Paste	976	29,76 +/-2,21 ^a	25,71 +/-2,15 ^a	15,08 +/-1,98 ^a

T.fec: tasa de fecundación; T.emb: tasa de producción de embriones; T.divis: tasa de división. Letras literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa (P <0,05).

obtuvo un 90% de fertilidad cuando se inseminó por vía intrauterina con semen diluido y congelado con Orvum Paste; comparado con el 0% de fertilidad en las hembras inseminadas con semen no tratado [22]. Por otra parte, durante el test de unión entre espermatozoides y zona pelúcida, que se utiliza para valorar la capacidad fecundante del macho, en perros se logró el mayor número de espermatozoides adheridos a la zona pelúcida con semen de perro congelado con Orvum Paste que en ausencia de este [19]. En el presente trabajo, no se encontró diferencia significativa en la fertilidad utilizando ó no el Orvum Paste en la congelación del semen. Es posible que resultados presentados en esta investigación difieran de estas publicaciones, a causa de la diferencia en la especie animal en la que se ha trabajado y el tipo de fertilidad valorada ya que, en dichos estudios, se valora fertilidad *in vivo* y no *in vitro*.

CONCLUSIONES

En las presentes condiciones de trabajo, se concluye que durante las 48 horas de co-cultivo, la tasa de fecundación, el desarrollo embrionario así como el porcentaje de división celular no fueron afectados por el macho donador de semen,

el mes de congelación y la presencia ó no del Orvum Paste en el diluyente de congelación.

REFERENCIA DE LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS UTILIZADAS

1. M7528 SIGMA chemical co. St. Louis USA.
2. E-8875.
3. S2263 SIGMA chemical co. St. Louis USA.
4. F-2293 y L-9523 SIGMA chemical co. St. Louis USA.
5. H-9136 SIGMA chemical co. St. Louis USA.
6. A-3311 SIGMA chemical co. St. Louis USA.
7. G1397 SIGMA chemical co. St. Louis USA.
8. C8356 SIGMA chemical co. St. Louis USA.
9. M-7145 y B-6766 SIGMA chemical co. St. Louis USA.
10. N4637 SIGMA chemical co. St. Louis USA.
11. G5763 SIGMA chemical co. St. Louis USA.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto EUREKA ABROCYL, y se ha desarrollado con la colaboración de la Empresa Satgamesa (España), que ha aportado los moruecos que han sido sometidos a estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANEL, E.; ANEL, L.; BOIXO, J.C.; CARBAJO, M.; DOMÍNGUEZ, J.C.; CHAMORRO, C.; OLMEDO, J.A.; CELORRIO, I. Automated evaluation of frozen-thawed ram semen. **13th Int. Cong. Anim. Reprod.** Sydney, 26-28 Junio, 2: 2-8. 1996.
- [2] CHOUDHRY, T.M.; BERGER, T.; DALLY, M. *In vitro* fertility evaluation of cryopreserved ram semen and its correlation with relative *in vivo* fertility. **Therio** 43:1195-1200. 1995.
- [3] DE LAS HERAS, M.A.; VALCARCEL, A.; FURNUS, C.; PÉREZ, L.; MOSES, D.; BALDASSARRE, H. Changes in sperm-bound amidase activity suggest subtle damage to ram sperm acrosomes by freezing/thawing, not detected by light microscopy. **Anim. Reprod. Scien.** 45(1-2):81-9. 1996.
- [4] EL-ALAMY, M.A.; FOOTER, H. Sperm output and hormone concentrations in Finn and Dorset rams exposed to long- and short- day lighting. **Therio** 56(5): 839- 54. 2001.
- [5] FISER, P.S.; AINSWORTH, L.; FAIRFUL, R.W. Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram spermatozoa. **Therio** 28: 599- 607. 1987.
- [6] FUKUI, Y.; GLEW, A.M.; GANDOLFI, F.; MOOR, R.M. Ram- specific effects on *in vitro* fertilization and cleavage of sheep oocytes matured *in vitro*. **J. Repr. Fert.** 82: 337-340. 1988.
- [7] GARDE, J.; GUTIÉRREZ, A.G.; ARTIGA, C.; PÉREZ G.M.; MONTORO, V.; VÁZQUEZ, I. Comparación del Test de hamster con otras metodologías de contrastación seminal en la evaluación del semen congelado de morueco. **5º Simposio Internacional de Reprodução Animal**, Luso, Portugal, 30 Septiembre-2 Octubre, Volumen II.: 286-291. 1993.
- [8] GUÉRIN, Y.; COGNIE, Y.; POULIN, N. Fertilizability of freshly ejaculated or frozen ram semen *in vitro*. **Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction** (Free Communications 313-482), Vol. 3. The Hague, The Netherlands, 23-27 Agosto. 1418-1420 pp. 1992.
- [9] JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J.D. Development of ram assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J. Repr. Fert.** 70:219-228. 1984.
- [10] JOHNSON, L.; BERNDTSON, W.E.; PICKETT, B.W. An improved method for evaluating acrosomes of bovine spermatozoa. **J. Anim. Sci.** 42:951-954. 1976.
- [11] LÓPEZ, A.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Efecto de la temperatura y del tiempo de incubación sobre la evaluación de la integridad de la membrana en semen congelado de carnero. **Archiv. Reproduc. Anim.** 10:30-35. 1999.
- [12] MARGALIT, I.; RUBINSTEIN, S.; BREITBART, H. A novel method for evaluating the acrosomal status of mammalian spermatozoa. **Arch. Androl.** 39(2):87-99. 1997.
- [13] MAXWELL, W.M.C.; SALOMON, S. Liquid storage of ram semen: a Review. **Reprod. Fertil. Dev.** 5: 613-38. 1993.
- [14] MOSES, D.F.; DE LAS HERAS, M.A.; VALCARCEL, A.; PEREZ, L.; BALDASSARRE, H. Use of computerized motility analyser for the evaluation of frozen-thawed ram spermatozoa. **Androl** 27(1): 25-9. 1995.
- [15] NISHIKIMI, A.; YAMADA, M.; MINAMI, N.; UTSUMI, K. Evaluation of the acrosomal status of bovine spermatozoa using concanavalin a lectin. **Therio** 48(6):1007-1016. 1997.
- [16] PURSEL, V.G.; SCHULMAN, L.L.; JOHNSON, L.A. Effect of orvus ES paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed board sperm. **J. Anim. Sci.** 47(1):198-202. 1978.
- [17] SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Anim. Repro. Sci.** 62:77-111. 2000.
- [18] SPSS para Windows. Versión 8,0 Chicago: SPSS Inc. [programa informático en CD-ROM]. Disponible en SPSS Inc. Página web de SPSS disponible en: <<http://www.spss.com/>>. 1997.
- [19] STROM-HOLST, B.; LARSSON, B.; LINDEFORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zone pellucida binding assay. **J. Reprod. Fert.** 119:201-206. 2000.
- [20] SUKARDI, S.; CURRY, M.R.; WATSON, P.F. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. **Anim. Reprod. Sci.** 46(1-2):89-96. 1997.

- [21] SUTTIYOTIN, P.; THWAITES, C.J. Comparison of a swim-up technique with the Hamilton Thorn Motility Analyser for measurement of sperm velocity and motility. **Reprod. Fertil. Dev.** 4(2):153-60. 1992.
- [22] TSUTSUI, T.; HASE, M.; TANAKA, A.; FUJIMURA, N.; HORI, T.; KAWAKAMI, E. Intrauterine and intravaginal insemination with frozen canine semen using an extender consisting of orvus ES paste-supplemented egg yolk tris-fructose citrate. **J. Vet. Med. Sci.** 62(6):603-606. 2000.
- [23] VALCARCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; PÉREZ, L.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing by simultaneous Lectin/Hoechst 33258 staining. **Anim. Reprod. Sci.** 45(4):299-309. 1997.