

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE UN SURFACTANTE (Orvus ES Paste®) EN EL DILUYENTE DE CONGELACIÓN SOBRE LA CALIDAD Y LA CAPACIDAD FECUNDANTE DEL SEMEN OVINO DE PELO (*Ovis aries*) CONGELADO

Effect of Addition of a Surfactant (Orvus ES Paste®) Into Extender on the Quality and Fertilizing Ability of Frozen Tropical Hair Ram (*Ovis aries*) Spermatozoa

Deneb Cervera Paul¹, Leandro Cob¹, Juan Rivera Lorca¹, Álvaro Domínguez Rebolledo¹,
Juan José Baeza Rodríguez² y Julio Ramón Ugalde^{1*}

¹ Centro de Selección y Reproducción Ovina. Instituto Tecnológico de Conkal, Antigua carretera Mérida-Motul Km. 16.3, C.P. 97345 Conkal, Yucatán, México. ² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Mocochoá, Antigua Carretera Mérida-Motul Km. 24.5, C.P. 97454, Mocochoá, Yucatán. * julio.ramon9@gmail.com

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar *in vitro* e *in vivo* el efecto de la adición de un surfactante, Orvus ES Paste® (OEP) en el diluyente de congelación sobre la calidad del semen ovino de pelo criopreservado y su fertilidad. Se recolectó semen de tres machos Katahdin de fertilidad probada, obteniendo en tres sesiones por semana (8 semanas) tres eyaculados de cada uno (n= 72), haciendo un "pool" individual, donde cada uno fue dividido en dos partes iguales y cada una de ellas se diluyó con Triladyl® 20% yema de huevo, con 0,5% de OEP (TO) y testigo (TT) sin OEP. Las muestras se congelaron en pajuelas de 0,25 mL y se almacenaron en Nitrógeno líquido (LN₂). Los tratamientos TO y TT, se evaluaron a la descongelación y la fertilidad se midió a los 17 días (d) post inseminación cervical y al parto. Los resultados obtenidos *in vitro*, muestran que el porcentaje de espermatozoides móviles en el TO (36,05 ± 0,86%) fue diferente (P<0,05) respecto al TT (19,97 ± 0,86%). Así mismo, el porcentaje de espermatozoides vivos (con membrana plasmática intacta) en el TO (37,31 ± 1,27%) fue mayor (P<0,05) que el TT (21,98 ± 1,27%). No se observaron diferencias en morfoanomalías entre tratamientos. Por el contrario, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal fue mejor (P<0,05) en el TO (81,82 ± 1,72%) respecto al obtenido en el TT (69,99 ± 1,72%). En el experimento *in vivo*, se utilizaron 160 ovejas en dos tratamientos TO (n=

80) y TT (n= 80), inseminadas vía cervical con semen descongelado diluido con 0,5% de OEP (TO) y sin OEP (TT). El diagnóstico de gestación por radioinmunoanálisis (RIA) a los 17 d postinseminación se realizó en una muestra al azar de 50 ovejas de cada tratamiento, mientras que el porcentaje de parición (PP) se midió al parto en la totalidad de los animales. La fertilidad general promedio fue de un 43,1%. La fertilidad promedio obtenida en los primeros 17 d postinseminación se mostró favorable (P<0,05) al TO respecto al TT, siendo de 48 y 32%, respectivamente. Al parto se observó un mayor (P<0,01) PP en el TO vs. TT con un 52,5 vs. 33,7%, respectivamente. En conclusión, la adición de un surfactante (Orvus ES Paste®) a un diluyente de congelación comercial (Triladyl®) permite incrementar la sobrevivencia espermática *in vitro* y mejora la fertilidad en ovejas inseminadas por vía cervical.

Palabras clave: Inseminación artificial, fertilidad, ovinos.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate both *in vitro* and *in vivo* the effect of addition of the surfactant Orvus ES Paste™ in the freezing extender on semen quality hair sheep cryopreserved and fertility. Semen from three Katahdin rams of proven fertility was used in the study; each ram was collected three times a week (8 weeks) to make an individual pool. Each pool was divided into two parts and each one was diluted with Triladyl™, 20% egg yolk, with (TO) or without (TT) 0.5% OEP. Samples were frozen in 0.25 mL straws and stored in liquid nitrogen (LN₂). Semen quality was evaluated at thawing and fertilizing

ability was measured on progesterone in serum samples taken 17 days (d) after cervical insemination and at lambing. Percentage of motile spermatozoa *in vitro* for TO ($36.05 \pm 0.86\%$) was different ($P < 0.05$) to TT ($19.97 \pm 0.86\%$). Similarly, percentage of live spermatozoa with intact plasmatic membrane in TO ($37.31 \pm 1.7\%$) was greater ($P < 0.05$) than in TT ($21.98 \pm 1.27\%$). No differences between treatments were observed in morphologic abnormalities ($P > 0.05$). Percentage of spermatozoa with normal acrosome was greater ($P < 0.05$) in TO ($81.82 \pm 1.72\%$) as compared to TT ($69.99 \pm 1.72\%$). In the experiment *in vivo*, 160 ewes were divided into two groups TO ($n = 80$) and TT ($n = 80$), ewes were cervical inseminated with thawed semen diluted with TO or without TT OEP. Gestation diagnosis was carried out by radioimmunoassay (RIA) determination of circulating concentrations of Progesterone in plasma on day 17 post artificial insemination (AI). Blood samples were taken randomly from 50 ewes per treatment; overall lambing rate was measured at lambing. Percentage of fertility in the whole flock was 43.1%. Fertility observed during the first 17 d post AI was greater ($P < 0.05$) for TO (48%) than for TT (32%). The lambing rate was greater ($P < 0.01$) at lambing in TO (52.5%) than in TT (33.7%). In conclusion, the addition of the surfactant Orvus ES Paste™ in the freezing extender Triladyl™ increases the *in vitro* quality of thawed semen and improves fertility rate in ewes cervical inseminated.

Key words: Artificial insemination, fertility, sperm, sheep.

INTRODUCCIÓN

La congelación de semen permite conservar por tiempo indefinido el material genético de diferentes especies, sin embargo, este proceso no garantiza que al descongelado pueda ser utilizado de manera eficiente [3]. De ahí que existan numerosos estudios cuya finalidad es no solo conservar la integridad de la célula, sino además mejorar e incluso revitalizar su capacidad fecundante. La congelación produce cambios en la mayoría de los espermatozoides sobrevivientes, tales como la capacitación y la reacción acrosómica [13, 26], pudiendo comprometer la fertilidad de los espermatozoides. Sin embargo, algunos autores han descrito que estos cambios pueden ser minimizados o incluso anulados si los espermatozoides entran en contacto con sustancias estabilizadoras [7, 8], las cuales protegen a los espermatozoides durante la congelación. Se ha demostrado que la adición del Orvus Es Paste® (OEP también conocido como Equex STM paste®) y su principal componente el lauril sulfato de sodio en el medio de congelación de semen, mejora la motilidad y viabilidad espermática y protege la integridad de la membrana plasmática y del acrosoma en espermatozoides de perro (*Canis lupus familiaris*) [2, 17, 18, 22, 25] durante la congelación. Así mismo, se ha demostrado también que protege la integridad del acrosoma en espermatozoides de cerdo (*Sus scrofa domestica*) [19, 24] y gato (*Felix silvestris catus*) [4, 18]. Sin embargo, aunque el OEP es beneficioso para la congelación del semen de perro [22], gato [16] y cerdo

[19] se desconoce si también es beneficioso para congelar semen de ovino (*ovis aries*) de pelo. Por lo tanto, en el presente estudio el objetivo fue evaluar el efecto del OEP en el medio de congelación sobre la calidad del semen ovino de pelo tras la descongelación y su fertilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de trabajo

El presente trabajo se realizó en el Campo Experimental Moccochá del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y en el laboratorio de Biotecnología Reproductiva del Centro de Selección y Reproducción Ovina (CeSyRO) del Instituto Tecnológico de Conkal, que se encuentra ubicado en el km 16,3 de la antigua carretera Mérida-Motul, México, ($21^{\circ}02' LN$ y $89^{\circ}29' LO$) con un clima tropical subhúmedo (Awo) y una temperatura media anual de $26,5^{\circ}C$, con una precipitación total de 900 mm y 9 msnm [9].

Experimento 1 Pruebas *in vitro*

Obtención y evaluación del semen. Se colectaron 72 eyaculados de tres ovinos machos de la raza Katahdin. La colecta se realizó mediante vagina artificial y en tres sesiones por semana durante los meses de mayo-junio/2010. Únicamente se utilizaron los eyaculados evaluados mediante pruebas de rutina y que tuvieran como parámetros mínimos: 85% de espermatozoides vivos, 80% de motilidad progresiva, 85% de acrosomas intactos, 0,8 mL de volumen, una concentración de 2000×10^6 espermatozoides y menos del 15% de formas anormales, para poder proceder con la congelación del semen.

Dilución y congelación del semen. Después de hacer un pool, los eyaculados se dividieron en dos partes iguales, y cada uno se diluyó con Triladyl® (20%), agua destilada (60%), yema de huevo (20%), con 0,5% de OEP (TO) y sin OEP (TT). Tras un reposo de 4 horas (h) a $5^{\circ}C$ dentro de un cuarto frío con temperatura regulada, las muestras se envasaron en pajuelas de 0,25 mL a una concentración de (400×10^6 espermatozoides/mL). Posteriormente, las pajuelas se congelaron en vapores de nitrógeno líquido (LN_2) a 4 cm de la superficie del LN_2 por 10 segundos (seg) y luego se sumergieron en LN_2 .

Descongelación y evaluación del semen. La descongelación de las pajuelas se realizó en un baño térmico a $37^{\circ}C$ durante 30 seg, posteriormente, se muestrearon ocho pajuelas de cada tratamiento y se procedió a evaluar la calidad seminal. La motilidad progresiva se evaluó mediante la observación en un microscopio óptico de campo claro a 100x (Nikon, Eclipse 400, Japón), colocando 5 μL de la muestra espermática sobre un portaobjetos precalentado a $37^{\circ}C$ (Magapor, Megaslide, España). Se valoró el porcentaje de espermatozoides con movimiento (0-100). La viabilidad (integridad de la membrana plasmática) de los espermatozoides se evaluó mediante la tinción de eosina-nigrosina descrita por Chalah y Billard [5]. Para ello se mezclaron 5 μL de muestra de semen diluido con 10 μL

de eosina-nigrosina en un portaobjetos a 37°C. Tras dejar incubar la muestra durante 30 seg se realizó un frotis que se dejó secar sobre la placa térmica. Posteriormente, se observaron en microscopio óptico a 400x, contándose 200 células espermáticas y determinándose el porcentaje de espermatozoides vivos, que son aquellos que aparecen de color blanco presentando por tanto la membrana íntegra. Por otra parte, las células que no tenían la membrana íntegra fueron incapaces de excluir la tinción apareciendo teñidas de color rosáceo y considerándose muertas. El estado del acrosoma se evaluó, diluyendo 5 µL de la muestra espermática en 50 µL de solución fijadora tampón con 2% de glutaraldehído en 0,165 M de cacodilato de sodio. Posteriormente, las muestras se observaron en microscopio óptico a 400x, contándose 200 células espermáticas y determinándose el porcentaje de espermatozoides con borde apical normal (NAR), las cuales fueron consideradas como espermatozoides con acrosoma intacto. La morfología espermática se determinó sobre las mismas muestras utilizadas para evaluar el estado del acrosoma, contando 200 espermatozoides a 400x con microscopio de contraste de fases y calculando el porcentaje de las formas anormales.

Análisis estadístico. Los resultados para las variables: Motilidad Progresiva (%), Espermatozoides vivos (%), Morfoanomalías (%) y Acrosomas Normales (%), fueron evaluados para probar la diferencias de medias entre los dos tratamientos mediante la utilización la prueba de *t* de Student para dos muestras con varianzas iguales [15].

Experimento 2. Pruebas *in vivo*

Obtención, evaluación y congelación del semen. Se utilizaron los tres mismos machos de la raza Katahdin de fertilidad probada, los cuales fueron colectados mediante vagina artificial. Se recolectaron tres eyaculados de cada uno haciendo un "pool" individual, posteriormente, fue dividido y diluido de manera similar al experimento 1. Todos los eyaculados fueron evaluados mediante pruebas de rutina, tanto macroscópicas como microscópicas. Las muestras de semen diluido se envasaron en pajillas de 0,25 mL con una concentración de 200×10^6 de espermatozoides por dosis. El semen una vez empajuelado se sometió al mismo método de congelación del experimento 1.

Sincronización del estro. En verano, un total de 160 ovejas de la raza Pelibuey, Blackbelly, Santa Cruz, Katahdin y Dorper, adultas, múltiparas y secas fueron distribuidas en dos grupos equilibrados por raza, peso vivo y condición corporal. Así mismo, fueron sincronizadas mediante la inserción de esponjas vaginales impregnadas con 20 mg de Acetato de Flurogestona micronizada (FGA; Chronogest®; Intervet, México) durante 14 d. A la retirada de las esponjas se aplicó una dosis intramuscular de 200 unidades internacionales (UI) de gonadotropina coriónica equina (eCG; Folligon®, Intervet, México).

Inseminación Artificial. A las 48 h de la retirada de las esponjas, las ovejas fueron inseminadas por vía cervical, con semen descongelado, con (TO; n= 80) y sin (TT; n= 80) OEP.

La dosis inseminante fue de 1 pajueta/inseminación (200×10^6 de espermatozoides).

Diagnóstico de gestación. La fertilidad (F) promedio se midió en dos tiempos; diagnóstico de gestación a los 17 d postinseminación y porcentaje de parición (PP) en el total de los animales. Con el fin de medir la concentración de progesterona (P_4) plasmática mediante radioinmunoensayo (RIA) en 100 ovejas (50 ovejas de cada tratamiento escogidas al azar) se tomó una muestra de sangre (5 mL) a los 17 d postinseminación, (IA) considerando como gestantes aquellas cuya concentración se mostró por encima de los 2 ng/mL. El análisis de la P_4 plasmática se realizó por el método directo, la sensibilidad del análisis fue de 0,05 ng/mL y los coeficientes de variación intra e interanálisis para una referencia de 1,37 ng/mL fueron de 15,3 y 18,6%, respectivamente.

Análisis estadístico. Los resultados para las variables: Fertilidad a los 17 d postinseminación (F) y Porcentaje de parición (PP), fueron evaluados para probar la diferencias entre las proporciones ajustando una regresión logística (logit) de los dos tratamientos mediante la utilización del método de estimación de Máxima Verosimilitud Restringida [15].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados "*in vitro*" del semen descongelado en los diferentes tratamientos se resumen en la TABLA I. El porcentaje de espermatozoides móviles del TO fue diferente ($P < 0,05$) al TT siendo de $36,05 \pm 0,86\%$ y $19,97 \pm 0,86\%$, respectivamente. Por otro lado se observó que, el porcentaje de espermatozoides vivos (con membrana plasmática intacta) en el TO ($37,31 \pm 1,27\%$) fue también diferente ($P < 0,05$) con respecto al TT ($21,98 \pm 1,27\%$). Para las morfoanomalías no se encontraron diferencias entre tratamientos. Sin embargo, en cuanto al porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal, el TO ($81,82 \pm 1,72\%$) fue diferente ($P < 0,05$) del TT ($69,99 \pm 1,72\%$). El efecto de algunos aditivos sobre las membranas de las células espermáticas parece estar ligado a la constitución del diluyente, particularmente a la presencia de lecitina aportada por la yema de huevo [11]. En semen porcino, Pursel y col. [19] observaron un efecto protector del OEP al 1-1,5% en diluyente Beltsville F5 (BF5) con 20% de yema de huevo, mientras que al 0,1% y sin yema de huevo, la motilidad e integridad de los acrosomas se vieron afectados. Tales resultados refuerzan la hipótesis sustentada por Graham y col. [12], de que el OEP ejerce su acción benéfica más bien a través de la alteración de los constituyentes de la yema de huevo que por un efecto directo sobre las membranas celulares.

Por sí solo, el efecto de agregar 0,5% de OEP al medio de congelación (Triladyl®) tuvo un efecto considerable de la mejora de calidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides tras la congelación, en comparación cuando no se agregó OEP al diluyente. Estos resultados coinciden con los de Akourki y col. [1] así como Helleman y Jara [14] quienes

TABLA I
RESULTADOS “In vitro” DEL SEMEN DESCONGELADO DILUIDO CON TRILADYL®
Y 5% DE ORVUS ES PASTE® (OEP) (TO) O SIN OEP (TT)

Tratamiento	Motilidad Progresiva (%)	Espermatozoides vivos (%)	Morfoanomalías (%)	Acrosomas Normales (%)
TO	36,05 ± 0,86 ^a	37,31 ± 1,27 ^a	7,77 ± 4,43 ^a	81,82 ± 1,72 ^a
TT	19,97 ± 0,86 ^b	21,98 ± 1,27 ^b	9,13 ± 5,49 ^a	69,99 ± 1,72 ^b

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (P<0,05).

encontraron de igual forma una mejora de la viabilidad en muestras espermáticas de ovinos a la descongelación cuando el OEP estaba presente en el medio de congelación, encontrando principalmente una mejoría en la motilidad y un mayor número de acrosomas intactos. Del mismo modo se encontró que, la adición de 0,5% de Equex STM paste® al diluyente de congelación mejora la motilidad y la viabilidad espermática en semen de perro [18, 22] después de la congelación.

Los resultados “in vivo” de la F a los 17 d postinseminación se muestran en la TABLA II. La F promedio obtenida en todo el experimento fue de un 43,1%. Se puede observar que la F promedio obtenida en los primeros 17 d postinseminación mostró una tendencia favorable (P<0,1) al tratamiento TO respecto al obtenido en el TT, siendo de un 48 vs. 32%, respectivamente, y aunque ambos resultados son mayores a los obtenidos en trabajos realizados anteriormente por Domínguez y col. [6], quienes reportan una F del 29,4% con semen fresco y un 20% con semen descongelado, vía cervical con el mismo diluyente utilizado en este trabajo, pero suplementado con plasma seminal. Por otra parte, aunque en este experimento todos los animales fueron manejados de manera similar, y en el entendido de que el estrés térmico no fue una variable y si un efecto fijo sobre ambos tratamientos, cabría la posibilidad de un efecto detrimental de la temperatura regional media (35°C) observada en el verano, que probablemente causó una reducción de la F durante los primeros 17 d postinseminación. El efecto de las altas temperaturas, que en algunas épocas y años determinados que se registran en las zonas tropicales ha sido estudiado, tanto en vacunos [23] como en pequeños rumiantes [10], en estos trabajos se muestra una sensible reducción de la F del orden de entre un 10 hasta un 35%, debido a un incremento de la mortalidad embrionaria [20].

En la TABLA III, se presentan los resultados del porcentaje de parición (PP) del total de las ovejas de ambos tratamientos (n= 160), donde se observa un PP mayor (P<0,01) del TO vs. TT con un 52,5 vs. 33,7%, respectivamente. El resultado obtenido en el TO y en el TT son menores a los reportados por Ramón y col. [21], quienes obtuvieron un 61% de PP en ovejas inseminadas vía cervical, con semen congelado después de un celo inducido por efecto macho más progesterona y un 43% de PP en ovejas sincronizadas con FGA e inseminadas a tiempo fijo; por el contrario, el resultado en el TO resultó mayor al obtenido por Domínguez y col. [6], en el cual el PP

TABLA II
FERTILIDAD (F) A LOS 17 DÍAS POSTINSEMINACIÓN
POR VÍA CERVICAL CON SEMEN CONGELADO DILUIDO
CON TRILADYL® Y 5 % DE ORVUS ES PASTE®
(OEP) (TO) O SIN OEP (TT)

Tratamiento	No.	+ No.	- No.	F (%)
TO	50	24	26	48,0 ± 3,91*
TT	50	16	34	32,0 ± 3,77

* P<0,05.

TABLA III
PORCENTAJE DE PARICIÓN (PP) EN OVEJAS
INSEMINADAS POR VÍA CERVICAL CON SEMEN
CONGELADO DILUIDO CON TRILADYL® CON 5% DE
ORVUS ES PASTE® (OEP) (TO) O SIN OEP (TT)

Tratamiento	No.	+ No.	- No.	PP (%)
TO	80	42	38	52,5* ± 3,43
TT	80	27	53	33,7 ± 3,33

* P<0,01.

fue de 41,1 y 20,0% con semen descongelado y diluido con y sin plasma seminal, respectivamente.

No se observaron diferencias en prolificidad entre ambos tratamientos (1,25 vs 1,27).

CONCLUSIÓN

La adición de un surfactante (Orvus ES Paste®) a un diluyente de congelación comercial (Triladyl®) permite incrementar la sobrevivencia espermática *in vitro* y mejora la fertilidad en ovejas inseminadas por vía cervical.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al CONACYT por el financiamiento de este trabajo a través de los proyectos CONACYT-SAGARPA-2004-C01-150/A-1 y CONACYT 66939.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AKOURKY, A.; GIL, L.; GALLEGOS de la H, M.; ECHEGARAY, A.; GONZALEZ, N.; JOSA, A.; ESPINOSA, E.; CELMA M, L. Resultados de fertilización *in vitro* utilizando semen congelado de los moruecos Assaf. **Rev. Científ. FCV-LUZ**. XIV(5): 451-456. 2004.
- [2] ALHAIDER, A.K.; WATSON, P.F. Cryopreservation of dog semen: The use of Equex STM Paste and its effect on plasma membrane ?uidity. **Cryobiol.** 53:420. 2006.
- [3] AX, R. L.; DALLY, M.; DIDION, B. A.; LENZ, R.W.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D.; HAFEZ, B.; BELLIN, M.E. Inseminación Artificial. En: **Reproducción e Inseminación Artificial en Animales**. E.S.E. Hafez y B. Hafez (Eds.) McGraw-Hill Interamericana. Pp 387-400. 2002.
- [4] AXNER, E.; HERMANSSON, U.; LINDE-FORSBERG, C. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.** 84: 179-191. 2004.
- [5] CHALAH, T.; BRILLARD, J.P. Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescent (SYBR-14/IP). **Theriogenol.** 50: 487-493. 1998.
- [6] DOMINGUEZ, R.A.; NAVARRETE, S.L.; CRUZ, T.A.; AGUIAR, L.A.; EROSA, D.S.; BOLIO, O.R.; GONZALEZ, P.E.; PAREDES, M.L.; RAMON, U.J. Fertilidad en ovejas de pelo inseminadas con semen congelado rediluido en plasma seminal. **Rev. Científ. FCV-LUZ**. XVII (1):73-76. 2007.
- [7] EL-ALAMY, M.; FOOTE, R.H. Freezability of spermatozoa from finn and dorset rams in multiple semen extenders. **Anim. Reprod. Sci.** 65: 245-254. 2001.
- [8] GADEA, J.; GUMBAO, D.; CANOVAS, S.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F.A.; GRULLÓN, L.A.; GARDON, J.C. Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the *in vitro* fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. **J. Androl.** 31(1): 40-49. 2008.
- [9] GOBIERNO DEL ESTADO DE YUCATÁN. Los municipios de Yucatán, México. Centro Nacional de Estudios Municipales (CNEM). Pp 458. 1998.
- [10] GONZALEZ-STAGNARO, C. Control y manejo de los factores que afectan al comportamiento reproductivo de los pequeños rumiantes en el medio tropical. In: **Isotope and related techniques in animal production and health**. IAEA-SM-318/41. Pp 405-421. 1991.
- [11] GONZALEZ, R.; ROSALES, M., PEREA, F.; VELARDE, J.; SOTO, E.; PALOMARES, R.; HERNANDEZ, H.; PALASZ, A.T. Conception rates using Brahman bull semen frozen in milk based extender containing egg yolk or soybean lipids: a field study in a tropical environment. **Reprod. Fertil. Develop.** 16(1-2):170-171. 2004.
- [12] GRAHAM, E.F.; RAJAMANNAN, A.H.J.; SCHMEHL, M.K.L.; MAKI- JAURILA, M.; BOWER, R.E. Preliminary report on procedure and rationale for freezing boar spermatozoa. **A.I. Dig.** 19:12-14. 1971.
- [13] GREEN, C.E.; WATSON, P.F. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. **Reprod.** 122: 889-898. 2001.
- [14] HELLEMANN, C.; JARA, C. Efecto de un surfactante sobre la integridad de espermatozoides ovinos crioconservados. **Arch. Med. Vet.** 29(1): 153-160. 1997.
- [15] LITTELL, R. C.; MILLIKEN, G. A.; STROUP, W. W.; RUSSELL, D.; SCHABENBER, O. SAS for Mixed Models. Second Edition. Cary, NC, USA. 813 pp. 2006.
- [16] MIZUTANI, T.; SUMIGAMA, S; NAGAKUBO, K.; SHIMIZU, N.; OBA, H.; HORI, T.; TSUTSUI, T. Usefulness of addition of orvus es paste and sodium lauryl sulfate to frozen feline semen. **J. Vet. Med. Sci.** 72: 23-27. 2010.
- [17] PEÑA, A.I.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenol.** 54: 859-875. 2000.
- [18] PEÑA, A.I.; LOPEZ-LUGILDE, L.; BARRIO, M.; BECERRA, J.J.; QUINTELA, L.A.; HERRADON, P.G. Studies on the intracellular Ca²⁺ concentration of frozen-thawed dog spermatozoa: influence of Equex from different sources, two thawing diluents and post-thaw incubation in capacitating conditions. **Reprod. Dom. Anim.** 38: 27-35. 2003.
- [19] PURSEL, V.G.; SHULMAN, L.L.; JOHNSON, I.A. Effect of orvus es paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar semen, **J. Anim. Sci.** 47: 198-202. 1978.
- [20] RAMON, J.P. Factores de mortalidad embrionaria en ovejas. **Agrocien.** 31(1): 113-120. 1997.
- [21] RAMON, U.J.; CASTRO, U.R.; CERVERA, P.D.; VICTORIA, S.I.; VARGAS, M.G.; PIÑA, A.R. Fertilidad de ovejas inseminadas con inducción previa al estro mediante efecto macho y progesterona. **VI Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos**. Querétaro. 09/09-11. México. Pp 187. 2009.
- [22] ROTA, A.B.; STROM, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during *in vitro* incubation at 38°C. **Theriogenol.** 47: 1093-1101. 1997.
- [23] THATCHER, W.W.; KNICKERBOCKER, J.J.; BARTOL, F.F.; BAZER, F. W.; ROBERTS, R.M.; DROST, M. Ma-

- ternal recognition of pregnancy in relation to the survival of transferred embryos: endocrine aspects. **Theriogenol.** 23: 129-143. 1985.
- [24] TOYAMA, Y.; ITOH, Y. Ultrastructures of frozen-thawed boar spermatozoa. **J. Reprod. Dev.** 41: 9-13. 1995.
- [25] TSUTSUI, T.; HASE, M.; HORI, T.; KOMORIYA, K.; SHIMIZU, N.; NAGAKUBO, K.; KAWAKAMI, E. Effect of addition of Orvus ES paste to frozen canine semen extender on sperm acrosomes. **J. Vet. Med. Sci.** 62: 537-538. 2000.
- [26] WATSON, PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.** 7: 871-891. 1995.