



**universidad
de león**

TESIS DOCTORAL

**Estrategias de mejora de la inseminación
artificial ovina: una perspectiva seminal**

**Ovine artificial insemination improvement
strategies: a seminal approach**

Marta Neila Montero

Programa de Doctorado: Ciencias Veterinarias y de los Alimentos

Tutora: María Mercedes Álvarez García

**Directores: Luis Anel Rodríguez, Luis Anel López y Marta
Fernández Riesco**

LEÓN, 2024

A ti,
por dedicarme lo más valioso de tu vida:
tiempo.

“Dos impulsos más, y nos vamos”

MERCEDES ÁLVAREZ

Agradecimientos

Bueno, pues aquí está: un parto distócico donde los haya, de origen fetal por supuesto. Gracias a Merce y a Luis ahora sé que casi todo puede resolverse con un par de... Fuerzas, no seáis mal pensados. Dejando a un lado las metáforas y las bromas, quiero daros las gracias por permitirme formarme en esta área tan bonita que es la reproducción, no sólo a nivel de investigación, sino también a nivel de campo y de la clínica que tanto me gusta. Aún recuerdo cuando vine a despedirme de ti, Merce, pensando que me iba de León definitivamente, y aquí estamos 7 años después. Como bien sabéis, acepté este reto con muchas dudas, y como tu última FPU, Luis, espero haber estado a la altura.

Los comienzos fueron muy duros, por diversas razones que seguro que Rafa tiene tan en mente como yo. A base de ensayo y error aprendimos a manejar una pipeta, y Luisete (lo siento, hoy voy a tomarme la licencia) nos enseñó que a veces el orden de los factores sí altera el producto. Nunca volví a echar un fluorocromo antes que el PBS, eso seguro. Qué decir también de las famosas deferectomías y de cómo hacer una ecografía testicular a un carnero entre dos, o de las clases de inglés hasta las 11 de la noche. Eso sí, creo que no pude tener mejor compañero en esta aventura. No has perdido el humor ni en los peores momentos. Gracias Rafa, por aguantarme cuando ni yo misma lo hacía, y por tirar de mí tanto física como psicológicamente (sobre todo esto último). Efectivamente, si algún día nuestros caminos laborales se separan, te voy a echar mucho de menos (y te lo digo de corazón, no por darte la razón).

Martis, aunque no me acompañaste en este viaje desde el principio y en esta última fase no hemos tenido contacto diario, gracias por estar dispuesta a ayudarme siempre que lo he necesitado. Te admiro mucho.

A Cris Soriano, porque tre' cosas te digo (en murciano, claramente): 1) de mayor quiero ser como tú, 2) ojalá haber coincidido antes, 3) sigue mandándome memes esté donde esté, aunque sea a deshoras (a ti te lo permito).

A los curritos: Rafa (sí, otra vez), Cris Palacín, Victoria y David. Rafa y Cris, hemos compartido más horas que un reloj, por lo que anécdotas tenemos unas cuántas... Nunca me olvidaré de aquel macho preñado. Eso sí que era digno

Agradecimientos

de investigar, al igual que Victoria y su perfecto maquillaje *on road* de camino a Cabárceno. David, empápate bien de esta gente, tienen mucho que enseñar.

A mis chicas de laboratorio: Patri, Ceci y Ainoa, y ahora Raquel. Gracias por vuestra ayuda y por todas las risas compartidas. Tampoco me olvidaré del día en que transformamos a Patri en una “rubia cincuentona”, ni de Ceci y su sorpresa al ver que los testículos de un perro salían a través del pene... Espero que ese día aprendieses lo que son los bulbos peneanos, aunque en tu vida profesional no vuelvas a verlo. Mi Aino, diste el callo como la que más, y eso dice mucho de tu forma de ser. Te va a ir súper bien, estoy segura de ello.

A Pedro, un pilar fundamental sin el que probablemente esta Tesis Doctoral no hubiese sido posible. Hemos compartido muchas horas de monte y de charlas, y has cuidado de mis niñas como si fueran tuyas. No puedo estarte más agradecida. Eres la persona más generosa, alegre y fuerte que conozco, y te mereces lo mejor del mundo.

A toda la plantilla del CENSYRA, Ovigén y ASSAF.E, por ayudarnos en todo lo necesario.

A los ganaderos: Nico (GDM), Eduardo (HBA), Narciso (HGA), José Antonio (JAA), Luis, Rubén y Tarzán (TSC), Miguel Ángel y Pablo (VGG), por ser también amigos y casi familia. Gracias por poner vuestros animales a nuestra disposición siempre que os lo hemos pedido. Creedme cuando os digo que celebrábamos los éxitos y sufríamos los fracasos con vosotros.

Al personal de Cabárceno, y en especial a Santi, Patri y Prieto. Gracias por vuestra ayuda y vuestros tours guiados. Aún vivo enamorada de Luena.

A Paulino, por el soporte analítico a nivel estadístico en unos diseños experimentales de todo menos sencillos. Gracias por tanta paciencia.

A los compañeros del Laboratorio de Reproducción y Espermatología Equina de la Universidad de Extremadura, por su ayuda en la ardua tarea de comprender una mínima parte del análisis de muestras y resultados de la ciencia de la fe (también llamada proteómica).

À minha família brasileira. Muito obrigada, Arlindo, por abrir as portas de seu laboratório e até mesmo de sua casa. Graças a vocês, Denise e Gildas, que

nos receberam em Fortaleza e nos ajudaram de todas as formas possíveis. Wallison, as terças e quintas-feiras da coleta seminal eram, sem dúvida, os dias mais divertidos de toda a semana. Agradeço também pelas conversas e conselhos até altas horas da noite. Eduardo, meu lindo, eu cantei no karaokê por primeira vez com você e, sem saber, você realmente me “salvou”. Obrigada por me ajudar a voltar a ser eu mesma e por ser tão atencioso. Não volte para o Brasil, você ainda tem que se casar comigo (desculpe Soriano, mas eu vi ele primeiro). Mônica, Kurt, Landerson, Thayna e família, muito obrigada por abrirem as portas de sua casa para nós desde o primeiro dia e por nos ter apresentado a Graziene, sem a qual o Brasil não teria sido o mesmo. Grazi é a minha versão brasileira e crente em Deus, e graças a ela pudemos conhecer um pouco esse país maravilhoso: a Feira da Beira Mar, o Mercado dos peixes, Beach Park e as tapioqueiras (incluindo insônia de tanto tomar café), Cumbuco em um camarote privado com Alexandre depois de assistir à missa em uma das comunidades mais perigosas do Ceará, Aguas Belas com um passeio de barco ao pôr do sol, e muito mais. Esses três meses nos marcaram tanto que ambas acabamos fazendo uma tatuagem. Prometo te visitar em breve.

A la gente y perretes del Pipican, y en especial a Nuria, Jack y Logan. Gracias por todos los paseos sanadores y consejos a nivel profesional y personal. Sois muy importantes para mí.

A mis amigos, que no son muchos, pero son de verdad. Ali, has estado más o menos presente a lo largo de toda mi vida, por lo que hemos compartido muchísimas cosas. Tengo claro que, esté donde esté, siempre vas a estar a mi lado, ahora también con Cristian, María y Martín. Martarita, mi mitad de letras, me acompañaste en una etapa tan difícil como la adolescencia y siempre has sacado un hueco para preguntar por mí. No se me ocurría mejor persona que tú para diseñar la portada de esta Tesis Doctoral, todo un reto teniendo en cuenta lo lejos que te queda el tema. Elena, Paula y Héctor, mis 50 sombras de... Va siendo hora de cambiar el nombre del grupo, ¿no? Y también de organizar una escapada, que al final ni viaje de fin de carrera ni ná de ná. Y mi piña favorita, de la que me quedo con Bertis, Lau, Pau Perero, Juanma y Paula, y Clarita. Gracias por seguir ahí.

Agradecimientos

A mi familia, porque sin ellos no estaría hoy aquí, literalmente. Gracias a ti, mamá, cumplí mi sueño de ser veterinaria. No sé qué hubiera hecho si no hubieses reclamado mis resultados de la PAU a escondidas, y si no te hubieses enfadado conmigo por querer volverme a casa. Y tú, papá, eres el mayor ejemplo de sacrificio por los demás a lo largo de toda tu vida, y en gran parte el artífice de que me embarcase en esta aventura de la Tesis Doctoral. Gracias por creer en mí hasta cuándo ni yo misma lo hacía. Espero haber sabido recompensar tu esfuerzo y dedicación de la mejor manera posible. Nano, gracias por estar ahí en mis peores momentos, y perdón por perderme algunos de los tuyos. Todavía te recuerdo con 9 añitos pidiéndome que lo intentase, aunque sólo fuese un día. Diana y Cuba, porque sois una parte muy importante de mi familia, “ohana” como me gusta decir. Gracias a vosotras superé una etapa muy dura, y me habéis acompañado de principio a fin, por lo que esta Tesis Doctoral es casi tan vuestra como mía.

A toda la gente que, de una forma u otra, ha pasado por mi vida durante todos estos años, ya sea para quedarse o no. Gracias a todos vosotros he llegado hasta aquí.

Y, por último, pero no por ello menos importante: a Carlos. No has estado a mi lado durante todo el proceso, pero sí en la traca final, y eso es todo un mérito. Has aguantado el estrés de los plazos y de la incertidumbre de después. Gracias por ser un soplo de aire fresco. Ahora viene lo mejor.

PD: Perdón si me dejo a alguien en el tintero. Es curioso porque, con todo lo que hablo, en este punto no me salen las palabras.

GRACIAS, a todos, de verdad y de corazón.

Financiación y Becas

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el grupo de investigación Itra-ULE y los experimentos se han enmarcado dentro de dos proyectos del Plan Nacional: “Estrategias para mejorar la eficacia en la inseminación artificial ovina” (AGL2017-83098-R), financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y con Luis Anel Rodríguez como Investigador Principal; y “Nuevas tecnologías aplicadas a la interpretación práctica de los déficits funcionales del espermatozoide de carnero durante la conservación líquida a 5 °C hasta 72 horas” (PID2021-1224700B-I00), financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MCIN/AEI/10.13039/501100011033/FEDER, UE) y con Luis Anel Rodríguez y Luis Anel López como Investigadores Principales.

Marta Neila Montero disfrutó de una beca del Gobierno de España (Ministerio de Educación y Formación Profesional) para desarrollar esta Tesis Doctoral, cuya referencia es FPU17/04142 y abarcó desde el 27/09/2018 hasta el 27/02/2023. Desde la finalización de dicha beca y hasta la actualidad se encuentra contratada como “Titulado Superior Investigador” a cargo del proyecto PID2021-1224700B-I00. La doctoranda también ha recibido dos becas del Gobierno de España (Ministerio de Universidades) de referencias EST21/00591 y EST22/00339, para una estancia corta en el Departamento de Medicina Animal de la Universidad de Extremadura desde el 13/09/2021 hasta el 12/12/2021, y para una estancia corta en el Departamento de Ciencia Animal de la Universidade Federal do Ceará desde el 01/07/2022 hasta el 30/09/2022.

Listado de Publicaciones

La presente Tesis Doctoral por compendio de publicaciones incluye los siguientes artículos científicos para su consideración:

- Marta Neila-Montero, Marta F. Riesco, Mercedes Alvarez, Rafael Montes-Garrido, Juan Carlos Boixo, Paulino de Paz, Luis Anel-Lopez y Luis Anel. (2021). *Centrifugal force assessment in ram sperm: Identifying species-specific impact*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 63:42.

<https://doi.org/10.1186/s13028-021-00609-8>

- Marta Neila-Montero, Marta F. Riesco, Rafael Montes-Garrido, Cristina Palacin-Martinez, César Chamorro, Paulino de Paz, Mercedes Alvarez, Luis Anel y Luis Anel-Lopez. (2022). *An optimized centrifugation protocol for ram sperm ensuring high sample yield, quality and fertility*. *Theriogenology*, 191, 179-191.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.08.006>

- Marta Neila-Montero, Mercedes Alvarez, Marta F. Riesco, Cristina Soriano-Úbeda, Rafael Montes-Garrido, Cristina Palacin-Martinez, Paulino de Paz, Luis Anel y Luis Anel-Lopez. *Seminal plasma and its modulating role on sperm quality and fertility in ovine artificial insemination*. Manuscrito en revisión.

- Marta Neila-Montero, Mercedes Alvarez, Marta F. Riesco, Cristina Soriano-Úbeda, Rafael Montes-Garrido, Cristina Palacin-Martinez, Paulino de Paz, Luis Anel y Luis Anel-Lopez. *The adaptation time to the extender as a crucial step for an accurate evaluation of ram sperm quality during the liquid storage*. *Veterinary Sciences*, 11, 132.

<https://doi.org/10.3390/vetsci11030132>

- Marta Neila-Montero, Mercedes Alvarez, Marta F. Riesco, Rafael Montes-Garrido, Cristina Palacin-Martinez, Antonio Silva-Rodríguez, Francisco E. Martín-Cano, Fernando J. Peña, Paulino de Paz, Luis Anel y Luis Anel-Lopez. (2023). *Ovine fertility by artificial insemination in the breeding season could be affected by intraseasonal variations in ram sperm proteomic profile*. *Theriogenology*, 208, 28-42.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.05.030>

Índice

Resumen	1
Summary	7
Introducción	13
Justificación y Objetivos	23
Metodología y Resultados	27
Publicación I	31
Publicación II	37
Publicación III	43
Publicación IV	49
Publicación V	55
Discusión General	61
Conclusiones	85
Conclusions	89
Bibliografía	93
Anexos	123
Listado de Abreviaturas	141

Resumen

La optimización de la inseminación artificial (AI) en la especie ovina es fundamental para aumentar su implementación, incrementando así los rendimientos productivos y la mejora genética en esta ganadería. En la presente Tesis Doctoral se analizan diferentes estrategias en este sentido, recogidas en un total de cinco artículos científicos.

Los dos primeros trabajos se centraron en definir las condiciones ideales para centrifugar el semen de carnero, teniendo en cuenta que el daño producido por este procedimiento sobre los espermatozoides es específico de cada especie. En la Publicación I se evaluó el rendimiento de tres fuerzas centrífugas (600, 3.000 y 6.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente) y sus efectos sobre la motilidad y funcionalidad de los espermatozoides. Fuerzas de centrifugación iguales o superiores a 3.000 x g indujeron daños en la calidad espermática a ambos niveles, y a 600 x g no se logró una buena compactación celular. Por ello, en la primera experiencia de la Publicación II se valoró el efecto de dos modelos de refrigeración a 15 °C (rápida o lenta) y dos diluyentes (INRA 96® y Tyrode's) sobre la tasa de recuperación, el peso del pellet y la calidad espermática tras la centrifugación del semen a 600 x g durante 10 minutos. El INRA 96® combinado con la refrigeración lenta y el Tyrode's a temperatura ambiente registraron los mejores resultados. En un segundo paso se evaluó la influencia de tres fuerzas centrífugas (600, 1.200 y 6.000 x g durante 10 minutos) sobre los mismos parámetros con INRA 96® y Tyrode's en las condiciones seleccionadas previamente. La mayor eficacia cuantitativa y cualitativa se logró a 1.200 x g en ambos medios de dilución, ya que a 6.000 x g se observaron alteraciones de la motilidad de los espermatozoides. Por último, para comprobar los efectos *in vivo* del protocolo de centrifugación se realizó una prueba de fertilidad con semen centrifugado y almacenado a 15 °C durante 6 horas. El daño producido por 6.000 x g sobre la motilidad espermática se mantuvo hasta las 6 horas, observándose además una disminución en la fertilidad tras la AI cervical. Este hecho confirmó la idoneidad del protocolo de centrifugación a 1.200 x g durante 10 minutos (en INRA 96® y a 15 °C).

En la Publicación III, en vista de la escasa y contradictoria información existente en relación a la retirada de plasma seminal (SP) como parte de los protocolos de refrigeración del semen de carnero, se investigó el papel del

mismo en la conservación seminal a medio plazo en forma líquida (hasta 48 horas a 5 °C). Para ello, en un primer paso se valoró el efecto de la adición de SP a espermatozoides epididimarios de carnero al inicio o al final de dicho protocolo de conservación, y se analizaron la motilidad y funcionalidad espermática tras 6 horas a 15 °C y 24 y 48 horas a 5 °C. Los espermatozoides mostraron una mayor calidad a las 48 horas cuando se conservaron en ausencia de SP, aunque una suplementación final con SP dio lugar a una mejora de la motilidad y funcionalidad espermáticas. Además, en una segunda experiencia se evaluó el efecto de la eliminación de SP en muestras seminales de carnero recién eyaculadas utilizando el protocolo de centrifugación previamente optimizado y en las mismas condiciones de almacenamiento. La retirada de SP disminuyó la funcionalidad de los espermatozoides tras 24 y 48 horas a 5 °C, mientras que la suplementación final tuvo efectos positivos sobre la calidad y fertilidad en AI cervical. Aunque la ausencia de SP resultó ser beneficiosa en un protocolo de conservación a medio plazo en forma líquida en un modelo espermático sin contacto previo con esta sustancia (espermatozoides epididimarios), la no constatación de este hecho en muestras seminales eyaculadas sometidas al mismo protocolo de conservación indica la posible ineficiencia del método de retirada de SP.

Los dos últimos artículos tuvieron como objetivo optimizar la evaluación de la calidad espermática en el carnero, ya que la selección de machos y eyaculados con buen potencial fecundante para su uso en la AI ovina es fundamental. En este sentido, la Publicación IV se centró en determinar el mejor momento para llevar a cabo dicha evaluación dentro de un protocolo de conservación a 15 °C durante 6 horas. Se determinaron la motilidad y funcionalidad espermáticas a 0 horas (30 °C), 3 y 6 horas (15 °C), y 24 horas (5 °C) como control positivo de daño, y se observó que ambas mejoraban a las 6 horas. Complementariamente, se investigó el factor responsable de la inestabilidad de los espermatozoides durante las primeras horas de almacenamiento líquido testando las interacciones de espermatozoides epididimarios con el SP y el diluyente (independientemente y en combinación) en las mismas condiciones de almacenamiento que en la experiencia anterior. Los espermatozoides de los grupos con diluyente mostraron una motilidad y

funcionalidad alteradas a las 0 horas, indicando que la adición del mismo actúa en un primer momento como factor desestabilizante, siendo necesarias de 3 a 6 horas de adaptación al diluyente antes de poder realizar una evaluación precisa de la calidad espermática. Finalmente, en la Publicación V, cuando se intentaron identificar algunos de los factores relativos al macho implicados en las diferentes tasas de fertilidad observadas tras la AI cervical en dos momentos de la época reproductiva (inicio y final), no se encontraron diferencias en la evaluación ultrasonográfica del complejo testicular de los carneros ni en la calidad espermática tras 6 horas a 15 °C. En cambio, un análisis del proteoma espermático detectó una menor expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo energético, las interacciones espermatozoide-ovocito y la estructura del flagelo en el momento de la época reproductiva con menor fertilidad.

De forma global, los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran la necesidad de optimizar los protocolos de manejo, conservación y análisis de calidad seminal en el carnero para diseñar estrategias realmente eficaces en la mejora de la AI ovina.

Palabras clave:

Carnero, semen refrigerado, inseminación artificial, fertilidad, centrifugación, plasma seminal, espermatozoides epididimarios, estabilización, calidad seminal, proteoma espermático.

Summary

The optimization of artificial insemination (AI) in the ovine species is crucial to increase its implementation, maximizing production performance and genetic gain in this farming. Different strategies are analyzed in this sense in the following Doctoral Thesis, compiled into a total of five scientific articles.

The first two papers focused on defining the ideal conditions for centrifuging ram semen, considering that sperm damage caused by this procedure is species-specific. Publication I evaluated the performance of three centrifugal forces (600, 3,000 and 6,000 x g for 10 minutes at room temperature) and their effects on sperm motility and functionality. Centrifugation forces equal to or greater than 3,000 x g induced a deleterious effect in sperm quality at both levels, and 600 x g not provide a successful cell packaging. Therefore, the first trial of Publication II assessed the effect of two cooling methods at 15 °C (fast or slow) and two diluents (INRA 96® y Tyrode's) on sperm recovery rate, pellet weight and sperm quality after centrifugation of semen at 600 x g for 10 minutes. INRA 96® combined with slow refrigeration and Tyrode's at room temperature registered the best results. In a second step, the influence of three centrifugal forces (600, 1,200 and 6,000 x g for 10 minutes) on the same parameters was evaluated with INRA 96® and Tyrode's under the previously selected conditions. The highest quantitative and qualitative efficiency was achieved at 1,200 x g in both extenders, since 6,000 x g impaired sperm motility. Finally, to test the *in vivo* effects of the centrifugation protocol, a fertility trial was performed using semen centrifuged and stored at 15 °C for 6 hours. The damage produced by 6,000 x g on sperm motility was maintained until 6 hours, and a decrease in fertility after cervical AI was also observed. This confirmed the suitability of the centrifugation protocol at 1,200 x g for 10 minutes (in INRA 96® and at 15 °C).

In Publication III, because of the scarce and conflicting information on seminal plasma (SP) withdrawal as part of ram semen refrigeration protocols, the role of SP in medium-term semen preservation in liquid form (up to 48 hours at 5 °C) was investigated. To this end, the effect of SP addition to ram epididymal sperm at the beginning or at the end of the preservation protocol was assessed in a first step, and sperm motility and functionality were analyzed after 6 hours at 15 °C, and 24 and 48 hours at 5 °C. Sperm showed higher quality

at 48 hours when stored in the absence of SP, while a final SP supplementation resulted in improved sperm motility and functionality. In addition, the effect of SP removal from freshly ejaculated ram seminal samples using the previously optimized centrifugation protocol was evaluated under the same storage conditions in a second experience. The removal of SP decreased sperm functionality after 24 and 48 hours at 5 °C, while the final supplementation had positive effects on quality and fertility in cervical AI. Although SP absence proved to be beneficial in a medium-term liquid preservation protocol in a sperm model without previous contact with this substance (epididymal sperm), the lack of this finding in ejaculated seminal samples under the same preservation protocol indicates the possible failure of the SP removal method.

The last two articles aimed to optimize sperm quality evaluation in rams, as the selection of males and ejaculates with good fertilizing potential is essential for use in ovine AI. In this regard, Publication IV focused on determining the best time to conduct this assessment within a preservation protocol at 15 °C for 6 hours. Sperm motility and functionality were determined at 0 hours (30 °C), 3 and 6 hours (15 °C), and 24 hours (5 °C) as a positive damage control, and both were found to improve at 6 hours. Additionally, the responsible factor of the sperm instability during the first hours of liquid storage was investigated testing the interactions of epididymal sperm with SP and extender (independently and in combination) under the same storage conditions used in the previous experience. Sperm from groups with diluent showed altered motility and functionality at 0 hours, indicating that extender addition initially acts as a destabilizing factor, requiring 3 to 6 hours of adaptation to the extender before an accurate assessment of sperm quality. Finally, in Publication V, when trying to identify some male factors involved in the different fertility rates obtained after cervical AI at two times of the breeding season (early and late), no differences were found in the ultrasonographic evaluation of ram testicular complex nor in the sperm quality after 6 hours at 15 °C. In contrast, a sperm proteome analysis detected a lower expression of proteins related to energy metabolism, sperm-oocyte interactions, and flagellum structure at the time of the reproductive season with lower fertility.

Overall, the results of this Doctoral Thesis demonstrated the importance of optimizing protocols for ram semen handling, preservation and quality analysis in order to design really effective strategies to improve sheep AI.

Keywords:

Ram, cooled semen, chilled semen, artificial insemination, fertility, centrifugation, seminal plasma, epididymal sperm, stabilization, semen quality, sperm proteome.

Introducción

Según datos de 2023 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, España es el primer país en importancia por número de animales de la especie ovina dentro de la Unión Europea (UE), al contar con un censo que en los últimos diez años se encuentra alrededor de los 14 millones de cabezas (24% del censo comunitario). En nuestro país, y específicamente en Castilla y León, el sector ovino presenta un alto interés social, al ejercer un bajo impacto medioambiental y fijar población en el medio rural, contrarrestando la tendencia a la despoblación de ciertas áreas geográficas. Además, si bien es verdad que Castilla y León no concentra el mayor porcentaje de animales dentro del territorio nacional, sí que lidera el ámbito productivo, tanto a nivel de carne (32% del total nacional) como de leche (56% de la leche entregada). El incremento en los rendimientos productivos por animal viene motivado por un cambio en el modelo productivo del sector, que ha sustituido a gran escala las razas autóctonas por razas foráneas mejoradas como la Assaf, y por la creciente especialización y profesionalización de la mano de obra (MAPA, 2023b, 2023a). En este escenario, la reproducción, y en concreto las técnicas de reproducción asistida (ART) como la inseminación artificial (AI), se muestran fundamentales para la mejora genética de la especie ovina. Sin embargo, su aplicación en comparación con otras especies domésticas como el bovino y el porcino es bastante escasa (Palacín *et al.*, 2012). Esto se debe a que las tasas de fertilidad que se obtienen en ovino son irregulares y bajas (Salamon and Maxwell, 1995; Anel *et al.*, 2005; Fair *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2019), ya que la aplicación vaginal de semen congelado-descongelado resulta inviable. Desde un punto de vista metodológico, el obstáculo reside en la compleja morfología del cuello del útero de la oveja, que actúa como barrera para la deposición intrauterina del semen (Halbert *et al.*, 1990; Kershaw *et al.*, 2005), siendo necesario recurrir a la AI intrauterina laparoscópica para garantizar una tasa de fertilidad aceptable cuando se utilizan este tipo de muestras (Masoudi *et al.*, 2017). Pero esta vía de aplicación tiene algunas limitaciones, como su elevado coste por la necesidad de equipamiento y personal altamente especializado (Evans *et al.*, 1987; Fernandez-Abella *et al.*, 2003). Por ello, la AI cervical con semen a 15 °C es el método más utilizado en los programas comerciales (Santolaria *et al.*, 2011). No obstante, este procedimiento también tiene varios

problemas asociados, como la reducida longevidad de los espermatozoides de carnero refrigerados (6-8 horas desde la recogida seminal), que lleva a depender de la existencia de un centro de reproducción cercano a las ganaderías para la elaboración de las dosis de semen el día de la AI (O'Hara *et al.*, 2010). Así pues, deben diseñarse nuevas estrategias para optimizar los procedimientos de AI en esta especie con el fin de aumentar su aplicación.

Por una parte, sería interesante mejorar el manejo de los eyaculados, en que la centrifugación es un procedimiento muy común. En especies con eyaculados de baja concentración, como los humanos (Wang *et al.*, 2021), los caballos (Samper and Plough, 2010) y los cerdos (Wongtawan *et al.*, 2006), se realiza de forma rutinaria para generar dosis de AI de volumen adecuado. También se lleva a cabo como parte de los protocolos de conservación seminal en el macho cabrío para eliminar el plasma seminal, ya que éste contiene una fosfolipasa que hidroliza los fosfolípidos de la membrana de los espermatozoides (Santiago-Moreno *et al.*, 2014, 2017). Además, este procedimiento podría emplearse en varias especies como método de lavado espermático para la recuperación de eyaculados obtenidos por electroeyaculación que se encuentren contaminados con orina (Gomes-Alves *et al.*, 2014), selección de aquellos espermatozoides morfológicamente normales y móviles dentro de una muestra seminal (Henkel and Schill, 2003; Sieme *et al.*, 2003; García-Álvarez *et al.*, 2010; Natali, 2011), o separación de espermatozoides que contienen cromosomas X e Y (Ollero *et al.*, 2000; Promthep *et al.*, 2016; Barros Mothé *et al.*, 2018). Sin embargo, aunque la centrifugación es un procedimiento muy sencillo, puede resultar perjudicial para la muestra seminal (Mortimer, 1991, 1994). Se ha demostrado que presenta dos problemas estrechamente relacionados: la pérdida de espermatozoides al retirar el sobrenadante (Söderquist *et al.*, 1999; Len *et al.*, 2010); y el deterioro de la función espermática debido al daño físico causado por la fuerza de centrifugación (Alvarez *et al.*, 1993), la compactación celular (Katkov and Mazur, 1998), y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el pellet (Aitken *et al.*, 1988). Está comprobado que, en humanos (Fredricsson and Kinnari, 1979; Mack and Zaneveld, 1987; Shekarriz *et al.*, 1995), ratones (Katkov and Mazur, 1998, 1999), perros (Rijsselaere *et al.*, 2002), caballos

(Hoogewijs *et al.*, 2010; Ferrer *et al.*, 2012) y cerdos (Carvajal *et al.*, 2004), el régimen de centrifugación (fuerza y duración) influye tanto en la tasa de recuperación como en la calidad espermática. El uso de fuerzas centrífugas más bajas y tiempos de centrifugación más cortos conduce a una menor tasa de recuperación debido a que no se logra una compactación celular completa, existiendo una gran pérdida de espermatozoides (según Len *et al.* (2010) de hasta el 46%) al retirar el sobrenadante. Esta situación sería inaceptable para los centros de reproducción ovinos, ya que daría lugar a una reducción importante del número de dosis de AI por eyaculado, tal y como apuntaron Ferrer *et al.* (2012) en la especie equina. Por su parte, el empleo de fuerzas centrífugas más elevadas y tiempos de centrifugación más largos produce una mayor sedimentación espermática, pero tiene un efecto nocivo sobre los espermatozoides, reduciendo su motilidad y viabilidad (Katkov and Mazur, 1998; Rijsselaere *et al.*, 2002) y produciendo daños en el DNA (Zini *et al.*, 2000). Varios autores han señalado los efectos beneficiosos de la centrifugación amortiguada sobre la calidad seminal del cerdo (Matás *et al.*, 2007) y del caballo (Ecot *et al.*, 2005; Knop *et al.*, 2005). En cambio, en otras especies como el oso pardo no se han observado estos efectos positivos, y el porcentaje de espermatozoides recuperados fue menor que con una centrifugación estándar (Nicolas *et al.*, 2012). Esto pone de manifiesto que el daño producido por la centrifugación sobre la estructura y funcionalidad de los espermatozoides es específico de cada especie. De hecho, los espermatozoides de roedores (Katkov and Mazur, 1998), perros (Rijsselaere *et al.*, 2002) y humanos (Fredricsson and Kinnari, 1979; Mack and Zaneveld, 1987) han demostrado ser muy sensibles a las fuerzas centrífugas, debiendo manipularse en condiciones cuidadosamente controladas y en todo caso a fuerzas de centrifugación inferiores a 800 x g para reducir el daño espermático. Por el contrario, los espermatozoides de otras especies como el oso pardo (Nicolas *et al.*, 2011), el cerdo (Carvajal *et al.*, 2004), el caballo (Hoogewijs *et al.*, 2010), el toro (Machado *et al.*, 2009) y el macho cabrío (Naing *et al.*, 2011) son menos sensibles a la centrifugación, permitiendo utilizar fuerzas centrífugas de hasta 9.600 x g. En el caso del carnero, los pocos estudios que han evaluado los efectos de la centrifugación del semen sobre los espermatozoides se

desarrollaron en la década de 1990 (Söderquist *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2000). En esa época el protocolo de congelación seminal para esta especie en Suecia y Noruega incluía la concentración de la muestra seminal previamente diluida mediante centrifugación de la misma a 700 x g durante 10 minutos. Aunque una publicación descartó que la centrifugación fuese perjudicial para los espermatozoides de carnero en términos de motilidad, integridad de membrana y estado de capacitación post-descongelación (Gil *et al.*, 2000), otro trabajo obtuvo tasas de fertilidad bajas que relacionó con la pérdida de espermatozoides asociada a la eliminación del sobrenadante tras la centrifugación (Söderquist *et al.*, 1999). Es decir, que es necesario desarrollar un protocolo de centrifugación optimizado para los espermatozoides de carnero que logre un equilibrio entre su rendimiento y su efecto sobre la calidad espermática y fertilidad.

También sería de gran utilidad el desarrollo de un protocolo de conservación seminal a medio plazo en forma líquida (48 horas a 5 °C), al permitir una mejor gestión de los centros de reproducción y facilitar el uso de las técnicas de AI al ganadero. En este sentido, resulta de especial interés el papel del plasma seminal (SP), una mezcla de secreciones provenientes de los testículos, epidídimos y glándulas sexuales accesorias que se junta con los espermatozoides de la cola del epidídimo en el momento de la eyaculación, dando lugar a lo que conocemos como semen (Leahy and de Graaf, 2012). Puesto que en la monta natural los espermatozoides se separan rápidamente del SP en el tracto reproductor femenino, inicialmente se pensó que esta sustancia servía exclusivamente como medio de transporte de los espermatozoides (Hunter, 1981). Actualmente se considera una solución controvertida en la conservación seminal debido a su compleja composición, que varía incluso entre especies muy parecidas (Juyena and Stelletta, 2012). Hasta ahora varios estudios han demostrado que el SP protege a los espermatozoides frente al estrés producido por el procesamiento y la conservación seminal mediante refrigeración o congelación en el carnero (Maxwell *et al.*, 1996; Pérez-Pé *et al.*, 2001; Muiño-Blanco *et al.*, 2008; Colás *et al.*, 2009; Leahy *et al.*, 2009, 2010; Swelum *et al.*, 2018), pero también en otras especies como el toro (Garner *et al.*, 2001), el ciervo rojo (Martínez-

Pastor *et al.*, 2006), el cerdo (Garcia *et al.*, 2010; Vadnais and Althouse, 2011), el caballo (Aurich *et al.*, 1996) y el ser humano (Twigg *et al.*, 1998; Potts *et al.*, 2000; Eini *et al.*, 2021). Por el contrario, también se han descrito efectos perjudiciales del SP sobre la motilidad y supervivencia de los espermatozoides tras la congelación-descongelación en el caballo (Moore *et al.*, 2005), el cerdo (Fernández-Gago *et al.*, 2010) y, por supuesto, el carnero (Graham, 1994; Palomo *et al.*, 2017). El SP contiene proteínas y compuestos de bajo peso molecular como Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y metales pesados que pueden ser contraproducentes y afectar a la calidad espermática en el ámbito de la conservación seminal (Garcia and Graham, 1987; Bergeron and Manjunath, 2006; Martí *et al.*, 2006). Además, diferentes autores han analizado la influencia del SP en la capacitación y envejecimiento de los espermatozoides, existiendo posturas contrarias (Manjunath and Thérien, 2002; Ledesma *et al.*, 2016; Bartmer *et al.*, 2022; Ben moula and El Amiri, 2022). En consecuencia, recientemente se ha sugerido que la retirada de SP podría ser beneficiosa para el almacenamiento líquido del semen de la mayoría de los animales de granja (Höfner *et al.*, 2020), pero hay pocos estudios acerca de ello. Se ha comprobado que la eliminación del SP tiene un efecto beneficioso sobre la conservación mediante refrigeración en espermatozoides de caballo en términos de estabilidad de membrana (Barrier-Battut *et al.*, 2013), y en espermatozoides de cerdo a través de una mayor integridad del acrosoma y tasa de fertilidad en ausencia de SP (Pavaneli *et al.*, 2019). En cambio, la retirada de SP no parece ser útil para los espermatozoides de burro refrigerados (Rota *et al.*, 2008). En el caso del carnero, sólo hay tres estudios que evalúan el efecto de la eliminación del SP mediante diferentes métodos: altas diluciones (1:15 y 200 x 10⁶ espermatozoides/mL), seguidas o no de una centrifugación a 150 x g durante 10 minutos (Rajani K. Paul *et al.*, 2018); o centrifugación del eyaculado a 720 (Rajabi-Toustani *et al.*, 2021) u 800 x g (Mata-Campuzano *et al.*, 2015) durante 10 minutos. Sin embargo, sus resultados son contradictorios, lo cual podría deberse a los diferentes métodos de lavado espermático utilizados, así como al empleo de protocolos de centrifugación no validados en esta especie. Por ello, sería interesante estudiar el efecto de la retirada de SP en el almacenamiento

líquido a medio plazo del semen de carnero empleando un protocolo de centrifugación previamente optimizado.

Finalmente, habría que indagar en por qué predecir la fertilidad de una muestra seminal sigue siendo una utopía, ya que la detección y eliminación de animales infértiles o subfértiles, así como la selección de eyaculados con buen potencial fecundante para uso en la AI ovina resulta fundamental (Rodríguez-Martínez, 2003; Kameni *et al.*, 2021). Está demostrado que las pruebas clásicas de evaluación seminal, que miden el volumen y concentración del eyaculado, la motilidad total y progresiva de los espermatozoides, y su morfología (Gadea, 2005), se encuentran poco relacionadas con la capacidad fecundante en varias especies (Gadea *et al.*, 2004; Petrunkina *et al.*, 2007; Tsakmakidis, 2010; Vasan, 2011). Por ello, y puesto que la fertilidad depende de una población heterogénea de espermatozoides que interactúan en varios niveles del tracto reproductor femenino, las envolturas del ovocito y el propio ovocito (Rodríguez-Martínez, 2003), la evaluación seminal debe incluir la comprobación de varias características importantes para la fecundación y el desarrollo embrionario, no sólo a nivel individual, sino en una gran cantidad de espermatozoides (Tsakmakidis, 2010). En los últimos años se han utilizado diversas sondas fluorescentes con el fin de evaluar varios aspectos funcionales de los espermatozoides, como la integridad de membrana y del acrosoma (Huo *et al.*, 2002; Peña *et al.*, 2007; Lybaert *et al.*, 2009), la peroxidación lipídica (Brouwers and Gadella, 2003; Domínguez-Rebolledo *et al.*, 2010), el daño en el DNA (Martínez-Pastor *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2013), la apoptosis (Martí *et al.*, 2008; Skindersoe and Kjaerulff, 2014; Gil *et al.*, 2018), y la actividad mitocondrial (Marchetti *et al.*, 2004; Sousa *et al.*, 2011), a menudo con ayuda de la citometría de flujo (Gillan *et al.*, 2005). Tras la recogida seminal, el semen se procesa para prolongar la vida útil de los espermatozoides, reduciendo o paralizando por completo su metabolismo a bajas temperaturas, ya sea en estado líquido o criopreservado (Gillan *et al.*, 2004). Sin embargo, a pesar del gran número de estudios existentes en relación al diluyente utilizado (López-Sáez *et al.*, 2000; Kasimanickam *et al.*, 2011; Quan *et al.*, 2016), los protocolos de refrigeración y congelación (Paulenz *et al.*, 2002; Anel *et al.*, 2003; Gil *et al.*, 2003), y la concentración de espermatozoides almacenada (D'Alessandro *et*

al., 2001; Gundogan *et al.*, 2010; Alvarez, Tamayo-Canul, *et al.*, 2012), el procesamiento y conservación del semen de carnero sigue induciendo daños subletales en los espermatozoides que hacen que se comporten de manera muy diferente a los espermatozoides frescos (Gillan *et al.*, 2004). Durante la conservación seminal, los espermatozoides se someten a condiciones artificiales que les provocan cierto grado de estrés osmótico, bioquímico y térmico (Gibb *et al.*, 2015; Taylor Pini *et al.*, 2018). Como resultado, sufren una serie de cambios conformacionales y metabólicos entre los que se encuentran la redistribución de la membrana plasmática, peroxidación lipídica, y alteración de la producción de ATP y de la motilidad (Rizkallah *et al.*, 2022). La estabilización de los espermatozoides mediante una velocidad de enfriamiento y un periodo de adaptación al diluyente adecuados podría evitar, o al menos reducir, estos efectos perjudiciales (Holt *et al.*, 2005). Existen numerosos estudios sobre el impacto de este tiempo de adaptación en la crioresistencia de los espermatozoides de varias especies, como el perro (Okano *et al.*, 2004; Belala *et al.*, 2016), el cerdo (Yi *et al.*, 2002; Schäfer *et al.*, 2017; Passarelli *et al.*, 2020), el toro (Leite *et al.*, 2010; Doležalová *et al.*, 2016; Murphy *et al.*, 2018; Melean *et al.*, 2022), el macho cabrío (Ahmad *et al.*, 2015) y el carnero (Purdy, 2006; Purdy *et al.*, 2010; Câmara *et al.*, 2011; Paul *et al.*, 2020; Vozaf *et al.*, 2021), con diferentes resultados. Para el semen de carnero, un periodo de adaptación al diluyente de 2-8 horas parece ser suficiente para garantizar una buena calidad post-descongelación (Tibary and Manar, 2018; Lv *et al.*, 2019), aunque también hemos observado que la calidad espermática se ve afectada por este tiempo durante el almacenamiento líquido. Nuestro grupo de investigación viene observando desde hace mucho que la evaluación de la calidad espermática en el carnero en un momento próximo a la recogida seminal es inexacta, ya que mejora con el tiempo. Aunque se ha demostrado que la composición del diluyente influye en la supervivencia de los espermatozoides durante la conservación en forma líquida, el INRA 96[®], que es el diluyente utilizado para conservar el semen ovino a 15 °C dentro de los programas comerciales de AI en España y en otros países mediterráneos, contiene una fracción altamente protectora para los espermatozoides: el fosfocaseinato nativo (NPPC) (Batellier *et al.*, 2001). En cambio, como ya se ha

comentado, el efecto del SP sobre la función espermática sigue siendo controvertido. Así, sería interesante establecer el mejor momento para llevar a cabo una evaluación óptima de la calidad espermática en muestras seminales de carnero conservadas a 15 °C hasta 6 horas, y determinar cuál es el factor responsable de la inestabilidad de los espermatozoides durante las primeras horas de conservación en estado líquido. Además, en la última década se han incorporado al estudio de la biología espermática nuevas tecnologías, como la genómica, la proteómica y, más recientemente, la metabolómica (Long, 2020). En concreto, el análisis de las proteínas espermáticas ha permitido comprender cómo adquieren los espermatozoides su capacidad de fecundación y ha revelado numerosos cambios en el proteoma espermático relacionados con diferentes factores (Kwon, Oh, *et al.*, 2015). Se han podido identificar biomarcadores de fertilidad en varias especies domésticas (Peddinti *et al.*, 2008; Kwon, Rahman, *et al.*, 2015; Muhammad Aslam *et al.*, 2018; Hitit *et al.*, 2021), nuevas funciones de las proteínas espermáticas que controlan el desarrollo embrionario temprano (Jodar *et al.*, 2020), nuevas vías metabólicas endógenas (Amaral *et al.*, 2013), y diferencias en el proteoma de eyaculados con alta y baja motilidad (Amaral *et al.*, 2014; D'Amours *et al.*, 2018; Griffin *et al.*, 2020) y diferente capacidad para resistir a la conservación por refrigeración o congelación (Rickard *et al.*, 2015; De Lazari *et al.*, 2020; Gaitskell-Phillips *et al.*, 2021). Por otra parte, se han descrito cambios en el proteoma espermático relacionados con el protocolo de conservación seminal en diferentes especies como la equina (Martín-Cano *et al.*, 2020), la porcina (Parrilla *et al.*, 2019; Perez-Patiño *et al.*, 2019) y la ovina (He *et al.*, 2016; T. Pini *et al.*, 2018). También se han realizado estudios sobre las variaciones en el perfil proteómico de los espermatozoides en diferentes épocas del año en el macho cabrío (van Tilburg *et al.*, 2014), el cerdo (Martín-Hidalgo *et al.*, 2020) y el caballo (Wrench *et al.*, 2010). Sin embargo, no se conoce cómo varía el proteoma de los espermatozoides de carnero a lo largo del año, lo que sería de gran interés teniendo en cuenta que la estación reproductiva tiene un fuerte efecto en los resultados de fertilidad de la AI ovina (Kukovics *et al.*, 2011), incluso cuando se utiliza un tratamiento hormonal para inducir y sincronizar el celo de las ovejas (Ungerfeld and Rubianes, 2002; Knights *et al.*, 2003; deNicolo *et al.*, 2006).

Justificación y Objetivos

La aplicación de la inseminación artificial ovina es fundamental para la mejora genética de la especie, que repercute directamente en la sostenibilidad de esta ganadería al incrementar los rendimientos productivos por animal. El Objetivo General de esta Tesis Doctoral es diseñar nuevas estrategias de mejora de la inseminación artificial ovina con el fin de aumentar su difusión, centrándonos en la optimización de los protocolos de manejo, conservación y análisis de calidad del semen de carnero.

Este Objetivo General se abordará a través de los siguientes Objetivos Específicos:

- 1.** Desarrollar un protocolo de centrifugación optimizado para los espermatozoides de carnero que logre un equilibrio entre su rendimiento y efecto sobre la calidad espermática y fertilidad.
- 2.** Determinar el papel del plasma seminal en el almacenamiento líquido a medio plazo (hasta 48 horas a 5 °C) del semen de carnero utilizando un modelo espermático sin interacción previa con esta sustancia (espermatozoides epididimarios), y estudiar los efectos de la eliminación de plasma seminal previa a la conservación en muestras seminales recién eyaculadas.
- 3.** Establecer el mejor momento para llevar a cabo una evaluación óptima de la calidad espermática en muestras seminales de carnero conservadas 6 horas a 15 °C, y determinar cuál es el factor responsable de la inestabilidad de los espermatozoides durante las primeras horas de conservación en estado líquido.
- 4.** Determinar la eficacia del estudio del proteoma espermático del carnero como herramienta de evaluación de calidad espermática relacionada con la fertilidad.

Metodología y Resultados

La metodología empleada en cada artículo de esta Tesis Doctoral, así como los resultados obtenidos en cada uno de ellos, se describirán en detalle en el capítulo correspondiente.

Las Publicaciones I y II se centran en evaluar el rendimiento de diferentes protocolos de centrifugación y sus efectos sobre la calidad de los espermatozoides de carnero en términos de motilidad y funcionalidad espermática, así como de fertilidad tras la AI cervical en condiciones de campo.

La Publicación III valora el papel de SP en la conservación a medio plazo del semen de carnero en forma líquida, determinando los efectos sobre la calidad espermática de la adición de SP a espermatozoides epididimarios sin contacto previo con esta sustancia, y sobre la calidad espermática y fertilidad de la eliminación de SP del semen de carnero utilizando el protocolo de centrifugación seminal diseñado en la Publicación II.

La Publicación IV evalúa la calidad de los espermatozoides de carnero a diferentes tiempos dentro de un protocolo de preservación a 15 °C durante 6 horas, tanto en muestras seminales procesadas de la forma habitual, como en espermatozoides epididimarios suplementados con SP o/y diluyente comercial.

La Publicación V determina las tasas de fertilidad tras la AI cervical al inicio y al final de la estación reproductiva de las ovejas, así como diferentes variables del macho (volumen testicular, libido y parámetros ecográficos) y de la calidad espermática, incluyendo un estudio del proteoma de los espermatozoides.

Publicación I

**Centrifugal force assessment in ram
sperm: Identifying species-specific
impact**

Información sobre el artículo

- **Título:** Centrifugal force assessment in ram sperm: Identifying species-specific impact.
- **Autores:** Marta Neila-Montero, Marta F. Riesco, Mercedes Alvarez, Rafael Montes-Garrido, Juan Carlos Boixo, Paulino de Paz, Luis Anel-Lopez y Luis Anel.
- **Estado:** Publicado.
- **Revista:** Acta Veterinaria Scandinavica.
- **Año de Publicación:** 2021.
- **DOI:** 10.1186/s13028-021-00609-8.
- **Factor de Impacto de la revista en 2021:** 2,048.
- **Puesto en la categoría “Veterinary Sciences” en 2021:** 49/145 (Q2).
- **Política de difusión de artículos:** De acuerdo con la política de acceso abierto de Acta Veterinaria Scandinavica, este artículo está sujeto a una licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0, que permite su uso, intercambio, adaptación, distribución y reproducción en cualquier medio o formato, siempre que se cite debidamente a los autores originales y la fuente, se facilite un enlace a la licencia y se indique si se han realizado cambios.
- **Información adicional:** La Figura adicional está disponible en Anexos.

SUMMARY

Centrifugation is routinely employed in handling the ejaculates of some species, but it is not part of the commonly used protocols in ram. However, the development and implementation of new assisted reproductive technologies, alternative preservation models based on washing sperm from a cellular ageing-accelerating substance such as the seminal plasma, and basic studies in spermatology is associated with the use of centrifugation. This requires a specific evaluation of the centrifugation protocols considering the species-specific relationship with the potential damage produced by this procedure. No previous studies have determined the effect of different centrifugation forces on ram sperm. Therefore, we aimed to assess the performance of three centrifugal forces (600, 3,000 and 6,000 x g for 10 min at room temperature) and their effects on ram sperm motility and functionality at 0 h and after 2 h of incubation at 37 °C. As expected, a higher cell packaging degree was obtained at high centrifugation forces ($P \leq 0.0001$). Cell packaging was unstable at all centrifugal forces. Thus, there was a high cell resuspension rate after less than 2 min. Regarding sperm quality, there was a change in movement pattern of 3,000 x g and 6,000 x g centrifuged sperm after 2 h of incubation at 37 °C, characterized by an increase in rapid progressive motility, linearity, straightness, and beat frequency, and a decrease in medium progressive motility, curvilinear velocity, path velocity, and head lateral amplitude. Non-significant differences were obtained among the different treatments concerning the total viability. However, we observed a significant increase ($P \leq 0.05$) in the percentage of viable apoptotic sperm in the samples centrifuged at 6,000 x g at 0 h. Centrifugal forces equal to or greater than 3,000 x g induced some deleterious effects in ram sperm quality, and lower forces did not provide a successful cell packaging degree.

Keywords: centrifugation, ejaculate handling, ovine, semen.

Publicación II

**An optimized centrifugation protocol
for ram sperm ensuring high sample
yield, quality and fertility**

Información sobre el artículo

- **Título:** An optimized centrifugation protocol for ram sperm ensuring high sample yield, quality and fertility.
- **Autores:** Marta Neila-Montero, Marta F. Riesco, Rafael Montes-Garrido, Cristina Palacin-Martinez, César Chamorro, Paulino de Paz, Mercedes Alvarez, Luis Anel y Luis Anel-Lopez.
- **Estado:** Publicado.
- **Revista:** Theriogenology.
- **Año de Publicación:** 2022.
- **DOI:** 10.1016/j.theriogenology.2022.08.006.
- **Factor de Impacto de la revista en 2022:** 2,800.
- **Puesto en la categoría “Veterinary Sciences” en 2022:** 17/144 (Q1).
- **Política de difusión de artículos:** Elsevier permite a los autores incluir sus artículos total o parcialmente en su tesis doctoral, siempre y cuando se mencione debidamente. Este derecho se extiende a la publicación de su tesis en el repositorio de la Universidad, siempre que, si se incluye el artículo publicado en la revista, no pueda descargarse por separado.

SUMMARY

The optimization and implementation of artificial insemination (AI) in sheep is necessary to increase the livestock productivity through enhanced control of reproductive function. Sperm centrifugation is a common procedure in the ejaculate handling in AI and other assisted reproductive technologies (ART), as part of new methods of sperm analysis, selection or preservation. However, our research group previously established that this simple procedure might cause a large sperm loss and induce deleterious effects on the sperm function of the ovine species when high centrifugation forces are employed. To our knowledge, there are no studies on combined effect of extender and different centrifugal forces on ram sperm yield and quality. Furthermore, evidence of *in vivo* fertility rate using sperm obtained with various centrifugation forces is also lacking in this species. Thus, the objective of this work was to define the ideal conditions for ram semen centrifugation that will achieve the best quantity and quality sample to ensure unaffected fertilization ability of centrifuged ram sperm. The *Experiment 1* evaluated the effect of the centrifugation procedure of two extenders (INRA 96® and Tyrode's) and two cooling protocols (Rapid and Slow Refrigeration -35 °C to 15 °C-) on sperm recovery rate and quality (motility and kinetic parameters, viability, apoptosis and mitochondrial activity). INRA 96® combined with Slow Refrigeration and Tyrode's at room temperature registered the highest sperm recovery and quality values ($P \leq 0.05$). In *Experiment 2*, the influence of three centrifugal forces (600, 1,200 and 6,000 x g for 10 min) was assessed immediately after centrifugation on the technical performance and sperm functionality in diluted samples with INRA 96® and Tyrode's at the conditions set out in *Experiment 1*. The lowest pellet weight ($P \leq 0.05$) without harmful effect on sperm physiological status ($P > 0.05$) was achieved at 1,200 x g, since 6,000 x g induced sperm motility damage ($P \leq 0.05$) with both extenders. Finally, to ensure the total safety of the centrifugation protocol, *Experiment 3* tested in a combined *in vitro* and *in vivo* test the effect of these three centrifugal forces on ram sperm quality after dilution (INRA 96®) and liquid storage (6-8 h at 15 °C). The damage produced by 6,000 x g on sperm motility ($P \leq 0.05$) was maintained over time, coinciding with a lower fertility ($P \leq 0.05$). In conclusion, ram sperm can be centrifuged in INRA 96® extender

up to 1,200 x g for 10 min at 15 °C as secure values with high recovery rates and without detrimental effects on sperm quality and fertility.

Keywords: artificial insemination, cooled semen, ejaculate centrifugation, fertility, ovine, sperm handling.

Publicación III

**Seminal plasma and its modulating
role on sperm quality and fertility in
ovine artificial insemination**

Información sobre el artículo

- **Título:** Seminal plasma and its modulating role on sperm quality and fertility in ovine artificial insemination.
- **Autores:** Marta Neila-Montero, Mercedes Alvarez, Marta F. Riesco, Cristina Soriano-Úbeda, Rafael Montes-Garrido, Cristina Palacin-Martinez, Paulino de Paz, Luis Anel y Luis Anel-Lopez.
- **Estado:** Manuscrito en revisión.

SUMMARY

Long-term exposure of sperm to seminal plasma (SP) during liquid storage could negatively impact sperm quality in most farm animals. Washing sperm from SP has been proposed to prolong sperm useful life during medium-term liquid preservation in an attempt to optimize artificial insemination protocols in the ovine species. Because of the scarce and conflicting information on SP withdrawal for ram sperm refrigeration, this study aimed to investigate the role of the SP in the medium-term preservation of ram sperm in liquid form. To this end, in *Experiment 1* SP was added to ram epididymal sperm without previous contact with this substance at the beginning or at the end of a 48-hour preservation protocol at 5 °C. Extended sperm showed better results in the absence than in the presence of SP in most sperm quality parameters after 48 hours. Moreover, a final SP supplementation of this experimental group resulted in the highest sperm motility and kinetic parameters, viability and mitochondrial activity. This demonstrated that SP privation could be beneficial in a medium-term ram sperm preservation protocol in liquid form, as well as a final supplementation. Therefore, we conducted *Experiment 2* to evaluate the effect of SP removal from freshly ejaculated ram semen under the same storage conditions as in *Experiment 1*. Surprisingly, SP withdrawal appeared to impair sperm functionality, leading to increased apoptosis and decreased mitochondrial activity after 24 and 48 hours at 5 °C. Conversely, a final SP supplementation of the ejaculate processed as usual had positive effects on sperm quality and fertility. To summarize, although SP absence proved to be beneficial in a medium-term liquid preservation protocol (up to 48 hours at 5 °C) in ram epididymal sperm, the lack of this finding in ram semen under the same preservation protocol indicates the possible failure of the SP removal method. Meanwhile, a SP supplementation at the end of the liquid preservation protocol has proven beneficial reaching a compromise between *in vitro* sperm quality and field fertility. These findings highlight the modulating role of SP on ram sperm quality and fertilization ability and pave the way for the improvement of medium-term semen preservation in the ovine species.

Keywords: cooled semen, epididymal sperm, ram, semen preservation, seminal plasma removal.

Publicación IV

**The adaptation time to the extender
as a crucial step for an accurate
evaluation of ram sperm quality
during the liquid storage**

Información sobre el artículo

- **Título:** The adaptation time to the extender as a crucial step for an accurate evaluation of ram sperm quality during the liquid storage.
- **Autores:** Marta Neila-Montero, Mercedes Alvarez, Marta F. Riesco, Cristina Soriano-Úbeda, Rafael Montes-Garrido, Cristina Palacin-Martinez, Paulino de Paz, Luis Anel y Luis Anel-Lopez.
- **Estado:** Publicado.
- **Revista:** Veterinary Sciences.
- **Año de Publicación:** 2024.
- **DOI:** 10.3390/vetsci11030132.
- **Factor de Impacto de la revista en 2022:** 2,400.
- **Puesto en la categoría “Veterinary Sciences” en 2022:** 29/144 (Q1).
- **Política de difusión de artículos:** De acuerdo con la política de acceso abierto de MDPI, no se requiere ningún permiso especial para reutilizar total o parcialmente un artículo publicado, incluidas figuras y tablas.

SUMMARY

Accurate assessment of ram sperm quality is crucial to optimizing assisted reproductive technologies in sheep. However, semen preservation can induce sperm damage due to osmotic, biochemical, and thermal stress. Stabilizing sperm with a suitable cooling rate and adaptation period to the extender could mitigate these effects for a more reliable evaluation. This study aimed to determine: (1) the best time to assess ram sperm quality, and (2) the factor responsible for the altered state of ram sperm during the first hours of liquid storage. In *Experiment 1*, ejaculated sperm were diluted and assessed for sperm motility and functionality at four preservation times: 0, 3, 6, and 24 h as sperm damage control. Both sperm motility and functionality improved after 6 h. *Experiment 2* investigated the factor responsible for sperm quality change by testing the interactions of seminal plasma and extender with sperm from epididymides independently and in combination. The evaluation of sperm was performed as in *Experiment 1*. Sperm in groups containing the extender showed altered motility at 0 and 24 h, and lower functionality at 0 h. Thus, we could assume that extender addition initially alters ram sperm, causing sublethal damage that is reversible after 3 to 6 h of semen preservation. In conclusion, ram sperm require an adaptation time of 3 to 6 h to the extender before an accurate quality assessment can be conducted. This has practical implications for reproduction centers, enabling better workflow organization and optimal expression of ram sperm attributes when cervical artificial insemination is routinely performed.

Keywords: cooled sperm, membrane stability, ovine, semen preservation, stabilization.

Publicación V

**Ovine fertility by artificial
insemination in the breeding season
could be affected by intraseasonal
variations in ram sperm proteomic
profile**

Información sobre el artículo

- **Título:** Ovine fertility by artificial insemination in the breeding season could be affected by intraseasonal variations in ram sperm proteomic profile.
- **Autores:** Marta Neila-Montero, Mercedes Alvarez, Marta F. Riesco, Rafael Montes-Garrido, Cristina Palacin-Martinez, Antonio Silva Rodríguez, Francisco E. Martín-Cano, Fernando J. Peña, Paulino de Paz, Luis Anel y Luis Anel-Lopez.
- **Estado:** Publicado.
- **Revista:** Theriogenology.
- **Año de Publicación:** 2023.
- **DOI:** 10.1016/j.theriogenology.2023.05.030.
- **Factor de Impacto de la revista en 2022:** 2,800.
- **Puesto en la categoría “Veterinary Sciences” en 2022:** 17/144 (Q1).
- **Política de difusión de artículos:** Elsevier permite a los autores incluir sus artículos total o parcialmente en su tesis doctoral, siempre y cuando se mencione debidamente. Este derecho se extiende a la publicación de su tesis en el repositorio de la Universidad, siempre que, si se incluye el artículo publicado en la revista, no pueda descargarse por separado.

SUMMARY

It is important to note that seasonality could affect ram reproductive parameters, and therefore, fertility results after artificial insemination. In this work, 1) we assessed fertility rates after cervical artificial insemination of 11,805 ewes at the beginning (June 21st to July 20th) and at the end (November 20th to December 21st) of the reproductive season in the Assaf breed for the last four years, and 2) we aimed to identify male factors influencing the different reproductive success obtained depending on the time at the mating season in which ovine artificial insemination was performed. For this purpose, we evaluated certain ram reproductive and ultrasonographical parameters as well as we performed a multiparametric and proteomic sperm analysis of 6-19 rams at two very distant points in the mating season (July as Early Breeding Season –EBS– and November as Late Breeding Season –LBS–). Rutinary assessments carried out in the ovine reproduction centers (testicular volume, libido, sperm production and mass motility) showed non-significant differences ($P \geq 0.05$) between both studied times, as well as the ram ultrasonographic evaluation (Resistive and Pulsatility Index as Doppler parameters; and pixels mean gray level, and hypoechoic areas percentage and density as echotexture parameters). However, at level of sperm functionality, although sperm quality appeared non-significantly lower ($P \geq 0.05$) in the EBS, we identified a significantly different ($P < 0.05$) sperm proteomic profile between the seasonality points. The following proteins were identified with the lowest abundance in the EBS with a fold change > 4 , a $P = 2.40e-07$, and a $q = 2.23e-06$: Fibrous Sheath-Interacting Protein 2, Disintegrin and Metalloproteinase Domain-Containing Protein 20-like, Phosphoinositide-Specific Phospholipase C, Tektin 5, Armadillo Repeat-Containing Protein 12 Isoform X3, Solute Carrier Family 9B1, Radial Spoke Head Protein 3 Homolog, Pro-Interleukin-16, NADH Dehydrogenase [Ubiquinone] 1 Alpha Subcomplex Subunit 8, Testis, Prostate and Placenta-Expressed Protein, and Acyl Carrier Protein Mitochondrial. In conclusion, while our basic analyses on male and sperm quality showed similar results between the beginning and the end of the breeding season, on a proteomic level we detected a lower expression of sperm proteins linked to the energy metabolism, sperm-oocyte interactions, and flagellum structure in the

EBS. Probably, this different protein expression could be related to the lower fertility rate of Assaf ewes after cervical artificial insemination at this time. More importantly, sperm proteins can be used as highly effective molecular markers in predicting sperm fertilization ability related to intraseasonal variations.

Keywords: cervical insemination, cooled semen, proteomic analysis, seasonality, sheep, sperm proteome.

Discusión General

La ganadería ovina ha aumentado notablemente sus beneficios en las últimas décadas debido a la mejora de la eficiencia reproductiva de los animales y a la ganancia genética resultantes de la aplicación de ART como la AI (Amiridis and Cseh, 2012; Naitana and Ledda, 2020). No obstante, su uso no está muy extendido debido a las bajas tasas de fertilidad que se obtienen en la AI por vía vaginal con semen descongelado como consecuencia de las peculiaridades estructurales y funcionales del tracto reproductor de la oveja, que impiden la deposición intrauterina de la dosis de AI (Naqvi *et al.*, 1998; Sánchez-Partida *et al.*, 1999; Cognié *et al.*, 2003). Así, en situaciones específicas que requieren el uso de semen congelado-descongelado es necesario recurrir a la AI intrauterina laparoscópica para garantizar una fertilidad aceptable (Hill *et al.*, 1998; Anel *et al.*, 2005), aunque lo más habitual dentro de los programas comerciales es la aplicación de semen refrigerado a 15 °C durante 6-8 horas por vía vaginal (López-Sáez *et al.*, 2000). Dado que estos dos modelos difieren sustancialmente del procedimiento de AI ideal (aplicación de semen descongelado por vía vaginal), es necesario desarrollar estrategias para mejorar los procedimientos de AI en esta especie con el fin de aumentar su rendimiento y difusión.

La centrifugación es una de las técnicas más comunes en la preparación de muestras seminales de varias especies, tanto a nivel experimental como práctico (Carvajal *et al.*, 2004). Si bien es cierto que en la especie ovina no es un procedimiento que se emplee con demasiada frecuencia, cobrará más importancia con el desarrollo e implementación de la AI y otras ART. Sin embargo, la centrifugación puede afectar al rendimiento de los eyaculados como consecuencia de la pérdida de espermatozoides que se produce al retirar el sobrenadante (Söderquist *et al.*, 1999; Len *et al.*, 2010) y del daño físico causado a la población espermática (Alvarez *et al.*, 1993), que es específico de cada especie (Carvajal *et al.*, 2004). Por tanto, el objetivo de la Publicación I y II de la presente Tesis Doctoral fue definir las condiciones ideales para la centrifugación del semen de carnero que lograsen un equilibrio entre su rendimiento y su efecto sobre la calidad espermática y fertilidad. En la Publicación I investigamos los efectos de tres fuerzas centrífugas (600, 3.000 y 6.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente) sobre la motilidad y

funcionalidad de los espermatozoides de carnero, así como su rendimiento mediante la determinación del grado de compactación celular. Para empezar, realizamos un estudio de correlación de Pearson para averiguar si la motilidad masal o la concentración espermática de los eyaculados afectaba a dicho grado de compactación. Nuestra hipótesis era que la respuesta al protocolo de centrifugación podía ser diferente en función del macho, al igual que ocurre en el oso pardo (Alvarez, Nicolas, *et al.*, 2012), y en el carnero en aspectos como la congelabilidad (Ramón, Pérez-Guzmán, *et al.*, 2013). Esta hipótesis se descartó al obtener coeficientes de correlación de Pearson (r) no significativos inferiores a $\pm 0,59$ en todos los casos. Así, observamos que el grado de compactación celular aumentaba significativamente a medida que aumentaba la fuerza centrífuga, obteniendo un grado de compactación máximo a 6.000 x g. Por su parte, la concentración de espermatozoides en la superficie del sobrenadante inmediatamente después del proceso de centrifugación fue alrededor de 0 en todas las fuerzas centrífugas. Sin embargo, a los 2 minutos esta concentración aumentó considerablemente en todos los grupos experimentales, pero especialmente y como era de esperar, en las muestras centrifugadas a 600 x g. Esto indicaba que la compactación celular era inestable, e incluso fue posible visualizar la rapidez con la que se deshizo el pellet, probablemente debido a la elevada motilidad de los espermatozoides de carnero, apreciable incluso macroscópicamente tal y como describió Rothschild (1948). Lo anterior dificultaría el manejo de los eyaculados en los centros de reproducción, debido al poco tiempo disponible para eliminar el sobrenadante antes de la resuspensión del pellet, resultando en una considerable pérdida de espermatozoides. A su vez, los análisis de calidad espermática mostraron un cambio en el patrón de movimiento de los espermatozoides centrifugados a 3.000 y 6.000 x g tras someter las muestras a una prueba de estrés térmico (incubación a 37 °C durante 2 horas), caracterizado por un aumento en el porcentaje de espermatozoides progresivos rápidos (FPM), linealidad (LIN), rectitud (STR), y frecuencia de batido del flagelo (BCF), y una disminución del porcentaje de espermatozoides progresivos medios (MPM), velocidad curvilínea (VCL), velocidad de trayectoria (VAP), y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH). Tradicionalmente, una

alta VCL y ALH y una baja LIN u oscilación (WOB) se han empleado como marcadores cinemáticos del estado de hiperactivación espermática, que viene determinado por cambios en el patrón de batido flagelar, aunque las tendencias observadas en dicho estado son opuestas a las obtenidas en nuestro trabajo (Mortimer, 1997; Cancel *et al.*, 2000). La hiperactivación se ha utilizado a su vez como marcador del estado de capacitación espermática en varias especies de mamíferos, como el hámster (Yanagimachi, 1970), el ratón (Fraser, 1977), la cobaya (Yanagimachi, 1972; Barros *et al.*, 1973), el conejo (Cooper *et al.*, 1979), el murciélago (Lambert, 1981), el delfín (Fleming *et al.*, 1981), el perro (Mahi and Yanagimachi, 1976), el carnero (Cummins, 1982) y el ser humano (Kay and Robertson, 1998). En consecuencia, podríamos pensar que fuerzas centrífugas elevadas inhiben la capacidad de hiperactivación y capacitación de los espermatozoides de carnero, muy importantes para la fecundación (Mortimer, 1997). Esta idea se ve respaldada en parte por el aumento de FPM a ambas fuerzas centrífugas, ya que las trayectorias no hiperactivas y progresivas son equivalentes según estudios previos en diferentes especies (Mortimer, 1997). Los espermatozoides hiperactivados suelen moverse en grandes círculos debido al patrón asimétrico de batido flagelar, lo que reduce su movimiento progresivo (Kay and Robertson, 1998). No obstante, para demostrar esta teoría serían necesarios nuevos estudios que analicen la capacitación espermática a estas fuerzas centrífugas. Con respecto a la evaluación de la funcionalidad espermática, en la última década se han desarrollado numerosos protocolos de citometría de flujo que han permitido la evaluación simultánea de múltiples parámetros mediante la combinación de diferentes sondas (Peña *et al.*, 2016; Gil *et al.*, 2018). Determinar la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides es fundamental, ya que esta estructura les protege de las amenazas extracelulares y les permite adaptarse a una gran variedad de condiciones fisiológicas, como la capacitación y la reacción acrosómica (Gadella, 2008; Tapia *et al.*, 2012). El uso de Zombie Violet™ Fixable Viability Kit nos permitió identificar los espermatozoides viables a través de la integridad de su membrana, no observándose diferencias en la viabilidad total entre las diferentes fuerzas de centrifugación. Sin embargo, el protocolo de centrifugación para los espermatozoides de carnero debe optimizarse para que

la motilidad y la viabilidad no se vean alteradas, teniendo en cuenta otros parámetros importantes en la conservación espermática, como la muerte prematura por apoptosis, que puede comprometer la capacidad de fecundación del espermatozoide (Said *et al.*, 2006; Dogan *et al.*, 2013). La apoptosis es un proceso importante en el desarrollo de las células germinales masculinas, ya que organiza su producción y funcionalidad desde las primeras etapas de diferenciación gonadal hasta el momento de la fecundación (Aitken and Baker, 2013). Así, puede activarse como mecanismo de eliminación de espermatozoides anormales, con daños en el DNA o pérdida en el potencial de membrana mitocondrial (Barroso *et al.*, 2006), pero también en respuesta a estrés o agresiones ambientales (Martí *et al.*, 2006). Además, se ha observado que la alteración de los procesos apoptóticos está estrechamente relacionada con la infertilidad masculina (Lin *et al.*, 1997; Sinha Hikim *et al.*, 1998). Entre los métodos utilizados para detectar la apoptosis espermática se incluye el análisis de las caspasas activadas, como en el caso del CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent. En este análisis más exhaustivo, las caspasas 3 y 7, proteasas de cisteinil-aspartato que ejecutan la descomposición de proteínas estructurales y del DNA, se activaron en un mayor porcentaje de espermatozoides en las muestras centrifugadas a 6.000 x g inmediatamente tras la centrifugación. Por último, también fue interesante el uso de CellROX™ Deep Red, ya que las mitocondrias son muy sensibles al estrés espermático (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2008, 2009). En este sentido, el porcentaje de espermatozoides viables con alto contenido en ROS, y en concreto en anión superóxido, mostró una tendencia a la baja a medida que aumentaba la fuerza de centrifugación. Esto podría ser algo negativo, ya que la producción de anión superóxido se ha relacionado con una intensa actividad mitocondrial en lugar de con estrés oxidativo en espermatozoides (Plaza Davila *et al.*, 2015), aunque la localización de las ROS es otro factor a tener en cuenta. Dichos compuestos pueden localizarse en las mitocondrias como consecuencia de su actividad, pero también en el núcleo induciendo daños en el DNA (Valcarce and Robles, 2016). En nuestro estudio, la distribución de ROS se observó mediante microscopía confocal, confirmando únicamente la tinción de la pieza intermedia de los espermatozoides, lugar donde se encuentran las mitocondrias. Por ello,

concluimos que las fuerzas centrífugas altas reducían la actividad mitocondrial de los espermatozoides de carnero y asumimos esto como un efecto negativo, pues en caballos se ha demostrado que los espermatozoides más fuertes tienen una intensa actividad mitocondrial, y que las mitocondrias constituyen el epicentro de regulación de la mayoría de los procesos que permiten al espermatozoide mantenerse en un estado óptimo (Peña *et al.*, 2009). Es decir, que fuerzas de centrifugación iguales o superiores a 3.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente inducen daños en la funcionalidad de los espermatozoides de carnero sin que se logre una compactación celular adecuada. En este escenario, dentro de la Publicación II, analizamos diferentes factores que podrían mejorar las tasas de recuperación espermática: la refrigeración rápida o lenta, y el empleo de un medio de dilución transparente como el Tyrode's en lugar del INRA 96® para facilitar la visualización de la interfase entre el sobrenadante y el pellet. El frío se ha utilizado para inmovilizar los espermatozoides antes de la centrifugación del semen en caballo (Cochran *et al.*, 1984; Vidament *et al.*, 2000) y macho cabrío (Ritar and Salamon, 1982), ya que los espermatozoides refrigerados tienen un metabolismo más bajo que dificulta su movimiento (Vishwanath and Shannon, 2000). Atendiendo a los resultados obtenidos en estas especies, la refrigeración de las muestras seminales de carnero previamente a su centrifugación podría traducirse en una mayor compactación celular, y por tanto, en menores pérdidas espermáticas (Cochran *et al.*, 1984). Como era de esperar, el grado de compactación celular y la pérdida de espermatozoides con INRA 96® fueron significativamente mayores y menores, respectivamente, cuando las muestras se sometían a refrigeración, ya fuera rápida o lenta, sin modificar ninguno de los parámetros de motilidad y funcionalidad espermática estudiados. Con Tyrode's, por el contrario, no existieron diferencias en el rendimiento, pero la motilidad total (TM) y progresiva (PM), así como la viabilidad, fueron significativamente inferiores en ambos protocolos de centrifugación que incluían una refrigeración previa. Los espermatozoides de carnero son más sensibles al shock por frío que los de otras especies como los humanos, monos o conejos (Muiño-Blanco *et al.*, 2008), por lo que la composición de los diluyentes es fundamental para una buena refrigeración (Quan *et al.*, 2016). El

INRA 96[®], además de incluir sales, azúcares y antibióticos, también tiene NPPC (α , β y κ -caseínas), que previene el daño causado por el shock por frío en los espermatozoides (Bergeron and Manjunath, 2006) al reducir la pérdida de lípidos de la membrana espermática (Manjunath, 2012). En lo que respecta al Tyrode's, se había observado que la incubación de espermatozoides de toro y cerdo en una solución de base iónica a baja temperatura disminuía su motilidad y viabilidad (Maxwell and Johnson, 1997; Barati *et al.*, 2011), ya que el bicarbonato induce la desestabilización de la membrana espermática (Harrison and Gadella, 2005). La reducción de la temperatura afecta a la actividad de la bomba de Na^+/K^+ de manera que aumenta la concentración intracelular de Na^+ , lo que es perjudicial para la supervivencia de los espermatozoides (Vishwanath and Shannon, 2000). Nuestros resultados confirmaron que el Tyrode's tampoco protege a los espermatozoides de carnero de la refrigeración. Sin embargo, incluimos este diluyente en nuestro trabajo porque se había demostrado que la centrifugación en medios transparentes mejoraba las tasas de recuperación sin efectos perjudiciales sobre la calidad espermática en el caballo (Ecot *et al.*, 2005; Knop *et al.*, 2005). De hecho, la pérdida de espermatozoides en las muestras control sin refrigerar fue significativamente menor con el Tyrode's que con el INRA 96[®], lo que confirma que la centrifugación en un medio transparente mejora el rendimiento de la técnica al permitir una mejor visualización de la interfase entre el sobrenadante y el pellet. No obstante, las muestras diluidas con Tyrode's mostraron cambios en el patrón de motilidad incluso a temperatura ambiente, que coincidían con los registrados por Rigby *et al.* (2001) en la especie equina en presencia de SP, sugiriendo una aparente interacción entre el SP y la composición del diluyente. Padilla y Foote (1991) hipotetizaron que esta interacción estaba condicionada por la relación Na^+/K^+ en el SP, pero esta relación puede variar entre especies, entre machos dentro de una misma especie, e incluso entre eyaculados de un mismo macho (Killian *et al.*, 1993; Aurich *et al.*, 1996). Así, en base a todo lo anterior, definimos como condiciones óptimas para llevar a cabo la centrifugación del semen de carnero el uso de INRA 96[®] como diluyente y la refrigeración lenta previa a la centrifugación, al coincidir además con lo empleado de forma habitual en los programas comerciales de AI en esta especie. Alternativamente, si no se

dispone del equipamiento necesario para llevar a cabo este protocolo, propusimos el uso de Tyrode's a temperatura ambiente, ya que no difirió significativamente del INRA 96[®] combinado con una refrigeración lenta en ninguno de los parámetros de calidad espermática estudiados. A continuación, evaluamos el efecto de tres fuerzas de centrifugación (600, 1.200 y 6.000 x g durante 10 minutos) utilizando ambos diluyentes en las condiciones seleccionadas previamente. A nivel de pérdidas espermáticas, los dos diluyentes fueron altamente efectivos a todas las fuerzas centrífugas, algo normal cuando los procedimientos se habían optimizado para ello en el paso anterior. En cambio, el peso del pellet registró una disminución a fuerzas de centrifugación más bajas con el INRA 96[®] que con el Tyrode's (1.200 vs. 6.000 x g). Esto es importante de cara al desarrollo de nuevos métodos de conservación espermática que consideran la eliminación del SP, tal y como se plantea en la Publicación III de esta Tesis Doctoral, o para estudios de fisiología espermática. En cuanto a la funcionalidad de los espermatozoides, al igual que en el Publicación I, observamos que la centrifugación a 6.000 x g inducía algunos daños con ambos diluyentes, mientras que las muestras centrifugadas a 600 y 1.200 x g mantenían una calidad espermática similar a las muestras control sin centrifugar. Teniendo en cuenta además los resultados obtenidos a nivel de rendimiento, establecimos como óptima la centrifugación a 1.200 x g en INRA 96[®], pero diseñamos una prueba de fertilidad de campo utilizando el semen centrifugado tras su almacenamiento líquido a 15 °C durante 6 horas para garantizar la total seguridad del protocolo de centrifugación. Hasta ahora, el efecto de la centrifugación sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides de distintas especies se ha estudiado poco, y se han obtenido resultados incoherentes y contradictorios. La fertilidad del caballo (Pickett *et al.*, 1975) y del gallo (Sexton, 1973) no se vio afectada por fuerzas centrífugas bajas (310 x g durante 3 minutos y medio y 552 x g durante 10 minutos, respectivamente), pero la fertilidad del toro se redujo significativamente cuando el semen se centrifugó a 270 x g durante 3 minutos (Pickett *et al.*, 1975). En el carnero observamos que las fuerzas de centrifugación bajas no tenían efecto sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides, pero que tanto fertilidad como fecundidad disminuían a 6.000 x g, coincidiendo con una

reducción significativa de FPM y LIN. Varios trabajos realizados hasta la fecha han encontrado relación entre la fertilidad *in vivo* y la motilidad espermática *in vitro* utilizando técnicas de evaluación visual o computerizada (CASA) en humanos (Macleod and Irvine, 1995), conejos (Brun *et al.*, 2002), caballos (Love, 2011), cerdos (Holt *et al.*, 1997; Tardif *et al.*, 1999; Gadea, 2005; Broekhuijse *et al.*, 2012; Henning *et al.*, 2014), toros (Farrell *et al.*, 1998; Januskauskas *et al.*, 2003; Kasimanickam *et al.*, 2007) y carneros (David *et al.*, 2015; Yániz *et al.*, 2015). En los estudios más antiguos se utilizaban la TM o PM como indicadores de calidad y fertilidad. Sin embargo, en los últimos 20 años se han identificado diferentes subpoblaciones espermáticas en distintas especies de mamíferos, como el hámster (Holt, 1995), la gacela (Abaigar *et al.*, 1999), el ciervo rojo (Martinez-Pastor, Diaz-Corujo, *et al.*, 2005), el perro (Rigau *et al.*, 2001), el caballo (Quintero-Moreno *et al.*, 2003), el cerdo (Holt *et al.*, 1996; Abaigar *et al.*, 1999; Hirai *et al.*, 2001; Thurston *et al.*, 2001) y el carnero (Bravo *et al.*, 2011), basándose en las características de motilidad de los espermatozoides individuales. En este sentido, la presencia de una subpoblación rápida y lineal se ha propuesto como buen indicador de la calidad (Martinez-Pastor, Garcia-Macias, *et al.*, 2005; Martínez-Pastor *et al.*, 2011) y de la fertilidad (Ramón, Soler, *et al.*, 2013) de la muestra seminal, ya que los espermatozoides implicados en el proceso de fecundación deben ser capaces de recorrer rápidamente el tracto reproductor de la hembra para llegar al ovocito (David *et al.*, 2015). Por ello, la predominancia de una subpoblación lenta y no lineal a 6.000 x g sería un buen indicador de baja eficiencia reproductiva.

La Publicación III de la presente Tesis Doctoral pretendió determinar el papel del SP en la conservación a medio plazo del semen de carnero, puesto que se ha sugerido que la exposición prolongada de los espermatozoides al SP durante el almacenamiento líquido puede ser perjudicial para su integridad y función en la mayoría de los animales de granja (Höfner *et al.*, 2020), pero existen pocos estudios y con resultados contradictorios acerca de la retirada de SP en los protocolos de conservación seminal mediante refrigeración en esta especie (Mata-Campuzano *et al.*, 2015; Rajani K. Paul *et al.*, 2018; Rajabi-Toustani *et al.*, 2021). Con este fin, evaluamos en primer lugar el efecto de la

adicción de SP autólogo (derivado del mismo carnero que los espermatozoides) a espermatozoides epididimarios al inicio de un protocolo de preservación a 5 °C durante 48 horas. En la cola del epidídimo los espermatozoides permanecen inmóviles, metabólicamente inactivos y en un estado de latencia debido a un bajo pH, una alta tensión de CO₂, una baja tasa de Na⁺/K⁺, y la presencia de inhibidores específicos de la motilidad espermática (Carr and Acott, 1984). En el momento de la eyaculación, los espermatozoides epididimarios se mezclan con el SP, y esto activa su actividad metabólica y su motilidad como resultado de la dilución de los factores inhibidores y del aporte de sustancias activadoras específicas como iones inorgánicos, ácido cítrico, sales orgánicas, proteínas, y azúcares para la respiración aeróbica y anaeróbica (Mann, 1964). Así, esperábamos que el grupo experimental con SP añadido tuviera una mayor motilidad y funcionalidad espermática que el grupo control sin SP. Sin embargo, el grupo control mostró mejores resultados que el grupo con SP en la mayoría de los parámetros de calidad espermática determinados tras 48 horas a 5 °C, sin existir diferencias entre ambos grupos a las 24 horas. Nuestros resultados concuerdan con toda la bibliografía existente sobre la suplementación con SP de los espermatozoides epididimarios de carnero durante el almacenamiento líquido, independientemente de la temperatura. Rickard y colaboradores (2014) demostraron que la presencia o ausencia de SP no tenía ningún efecto sobre la motilidad de los espermatozoides epididimarios de carnero inmediatamente después de su recogida o en un corto período de tiempo (6 horas a 37 °C), tal y como observamos nosotros. Por otra parte, Dott *et al.* (1979) señalaron que la suplementación de espermatozoides epididimarios de carnero con SP tenía un primer efecto estimulante y después perjudicial sobre la motilidad (tras una incubación de 22 horas a 30 °C). Por último, Rajabi-Toustani *et al.* (2021) observaron mayores porcentajes de motilidad e integridad de membrana en los espermatozoides epididimarios de carnero en ausencia de SP a las 36 horas de almacenamiento a 5 °C. Todos estos resultados evidencian el efecto negativo de la exposición prolongada al SP sobre la función espermática *in vitro*. Ahora bien, dado que el SP tiene un papel regulador en la capacitación espermática y en la reacción acrosómica, en la interacción espermatozoide-ovocito (Luna *et al.*, 2015), y en la respuesta inmune de la

hembra frente a los espermatozoides y al embrión (Robertson, 2005, 2007), creímos necesario simular lo que ocurre en la monta natural mediante una suplementación final con SP durante un breve período de tiempo (30 minutos). En este sentido, observamos que las muestras privadas de SP durante el almacenamiento y suplementadas al final del mismo presentaban mayor motilidad y parámetros cinéticos que el resto de grupos a las 48 horas, así como mayor viabilidad y actividad mitocondrial. Esto podría explicarse porque se ha comprobado que las proteínas del SP revierten los daños causados por el shock por frío en la membrana de los espermatozoides de carnero (Barrios *et al.*, 2000), mejorando incluso características de los espermatozoides congelados-descongelados como la motilidad, el estado de capacitación y la habilidad para atravesar el moco cervical *in vitro* (El-Hajj Ghaoui *et al.*, 2007; Bernardini *et al.*, 2011). Es decir, que la privación de SP sí que parece ser beneficiosa durante un protocolo de conservación a medio plazo en forma líquida del semen de carnero, así como una suplementación final con el mismo. En un segundo paso intentamos corroborar esto evaluando el efecto de la eliminación de SP del semen de carnero en las mismas condiciones de almacenamiento (48 horas a 5 °C) utilizando el protocolo de centrifugación diseñado en la Publicación II, tanto a nivel de calidad espermática como de fertilidad tras la AI cervical. Sorprendentemente, no se observaron cambios en la motilidad al retirar el SP en ningún tiempo de evaluación, y la retirada de SP fue perjudicial para la funcionalidad espermática, al aumentar la apoptosis y disminuir la actividad mitocondrial tras 24 y 48 horas a 5 °C. Este efecto negativo sobre la calidad de los espermatozoides de carnero privados de SP también fue señalado por Mata-Campuzano *et al.* (2015). Estos autores describieron una menor PM, tanto a las 3 como a las 24 horas de almacenamiento a 15 °C, en las muestras privadas de SP, sin obtener diferencias en la viabilidad espermática. En cambio, los resultados de nuestro trabajo y los de Mata-Campuzano y colaboradores difieren de los de Paul *et al.* (2018) y Rajabi-Toustani *et al.* (2021), que demostraron que la mayoría de los parámetros de motilidad y cinética espermática, así como la viabilidad, la integridad de membrana y el recuento de espermatozoides no capacitados mejoraban en los grupos sin SP. Este hecho podría explicarse teniendo en cuenta los diferentes métodos utilizados para retirar el SP. Es

posible que nuestro protocolo de eliminación del SP sea menos eficaz que los protocolos basados en una dilución elevada (1:15 y 200×10^6 espermatozoides/mL), seguida o no de una centrifugación a $150 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente (Rajani K. Paul *et al.*, 2018); o en una centrifugación del eyaculado a $720 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente (Rajabi-Toustani *et al.*, 2021). No obstante, ninguno de los métodos utilizados en los artículos mencionados podría aplicarse en condiciones de campo. Debido a la compleja anatomía del cuello uterino de la oveja, la dosis de semen para la AI cervical debe tener un volumen bajo ($< 0,25$ mL) y un número de espermatozoides elevado (400×10^6 espermatozoides) con el fin de evitar un posible reflujo (Cseh *et al.*, 2012). Así, la eliminación del efecto del SP sólo mediante una dilución elevada no sería una opción viable en los programas comerciales de AI debido al elevado volumen y a la baja concentración espermática implicados. Por su parte, la centrifugación a bajas fuerzas centrífugas a temperatura ambiente, precedida o no de las altas diluciones, quedaría descartada por la gran pérdida de espermatozoides que lleva asociada, como ya se discutió en la Publicación I. Con respecto a la suplementación final con SP, observamos nuevamente su efecto positivo. En este caso, tanto el grupo control preservado en presencia de SP como el grupo al que se le había retirado, mostraron una mejor LIN, viabilidad, apoptosis y actividad mitocondrial al recibir una suplementación final a las 48 horas. A las 24 horas, en cambio, el grupo control suplementado presentó la FPM, LIN y funcionalidad mitocondrial más altas, y la apoptosis más baja. Los resultados de fertilidad respaldaron los del análisis *in vitro* de calidad espermática. La suplementación con SP del eyaculado procesado de la forma habitual mejoró la tasa de preñez en las ovejas inseminadas con semen almacenado a 5°C durante 24 horas, alcanzando además niveles similares a los de las seis horas (36,1% vs. 50,0%). Este aumento en la fertilidad tras un protocolo de conservación seminal de 24 horas añadiendo un 30% de SP ya había sido observado anteriormente por López-Pérez y Pérez-Clariget (2012) utilizando un diluyente a base de TRIS y yema de huevo, con la diferencia de que el SP se añadió en el momento de la dilución del semen, al inicio del protocolo de conservación. Por otra parte, Maxwell y colaboradores (1999) registraron porcentajes similares de ovejas

gestantes tras la AI con semen fresco en ausencia o presencia de un 30% de SP en el medio. Igualmente, Belibasaki *et al.* (2005) tampoco detectaron cambios en el porcentaje de ovejas paridas, pero sí un aumento en el número de crías utilizando semen de carnero diluido con un 50% de leche desnatada y un 50% de SP y almacenado 6 horas a 16 °C en la AI intracervical en el pico de la estación reproductiva, lo que indicaría que la suplementación con SP puede influir en cierta medida en la fertilidad de las ovejas o en la capacidad fecundante del semen de carnero.

Por último, la Publicación IV y V se centraron en la optimización de los protocolos de evaluación de la calidad seminal en el carnero, con el fin de poder predecir con mayor exactitud la fertilidad de una muestra seminal. La conservación seminal es una ART esencial, ya que permite el transporte del semen a larga distancia y aumenta el número de hembras que pueden inseminarse por eyaculado, acelerando en última instancia la mejora genética (Brinsko, 2006). Una técnica de conservación seminal óptima debería mantener la capacidad fecundante de los espermatozoides desde la eyaculación hasta su utilización, y esto suele comprobarse mediante análisis laboratoriales de calidad espermática (Salamon and Maxwell, 2000; Dziekońska and Partyka, 2023). En la última década se han desarrollado métodos más sofisticados, altamente cuantitativos, repetibles y sensibles para lograr evaluaciones más precisas con el fin de eliminar aquellos animales infértiles o subfértiles, y seleccionar los eyaculados de alto potencial fecundante para uso en la AI ovina (Rodríguez-Martínez, 2003). Estos análisis más avanzados incluyen la determinación de la motilidad espermática mediante el sistema CASA y una gran variedad de colorantes fluorescentes para su uso en microscopía de fluorescencia y/o citometría de flujo (Gillan *et al.*, 2005; Petrunkina *et al.*, 2007; Martínez-Pastor *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar del uso de estas técnicas de evaluación, nuestro grupo de investigación ha observado que la evaluación de la calidad espermática en el carnero en un momento próximo a la recogida seminal es inexacta, ya que mejora con el tiempo. Tras la recogida seminal, el semen se diluye en diferentes diluyentes en función de la especie, el uso, la temperatura y la duración de conservación requeridos (Gündoğan, 2009; Dziekońska and Partyka, 2023). La elección de un diluyente adecuado es

fundamental para minimizar los daños asociados a la conservación seminal, ya que el diluyente es el responsable de proteger a los espermatozoides del shock osmótico y térmico al mantener un pH y una capacidad tampón adecuados (Rizkallah *et al.*, 2022). Existen resultados contradictorios sobre la eficacia de diferentes diluyentes en la conservación del semen de carnero (Maxwell and Salomon, 1993), aunque los medios a base de TRIS y leche desnatada son los más utilizados (Roostaei-Ali Mehr *et al.*, 2013). Como ya se ha comentado, el INRA 96[®] es el diluyente utilizado para conservar el semen ovino dentro de los programas comerciales de AI en España y en otros países mediterráneos, ya que es el más eficaz para prolongar la vida útil de los espermatozoides refrigerados al reducir la pérdida de lípidos de la membrana plasmática a través del NPPC (Pellicer-Rubio and Combarous, 1998; Bergeron and Manjunath, 2006). Una vez diluido, el semen de carnero se refrigera progresivamente hasta la temperatura de almacenamiento (15 o 5 °C), ya que se sabe desde hace tiempo que la refrigeración del semen de ungulados (especialmente cuando se baja de forma rápida de 30 a 5 °C) induce un estrés letal en los espermatozoides proporcional a la velocidad de enfriamiento y al intervalo de temperatura (Watson, 2000). Aunque este fenómeno, conocido como shock por frío, se manifiesta fundamentalmente justo después de la eyaculación puesto que los espermatozoides se vuelven menos sensibles en las horas siguientes (Pursel *et al.*, 1972), fue descartado en el protocolo de conservación a 15 °C hasta 6 horas llevado a cabo en la Publicación IV, ya que los espermatozoides de carnero mostraron una peor calidad en las muestras sin refrigerar (0 horas). Incluimos además muestras seminales preservadas durante 24 horas a 5 °C como control positivo de daño espermático, basándonos en resultados anteriores de varios autores en esta especie (Albiaty *et al.*, 2016; Falchi *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2020). En este sentido, coincidiendo con Yániz y colaboradores (2008) registramos porcentajes significativamente más bajos de espermatozoides progresivos rápidos y con la membrana plasmática intacta en este tiempo en comparación con las 0 horas. Además, la motilidad en términos de TM y PM mejoró a las 6 horas, sin diferencias con las 3 horas de almacenamiento líquido. En cuanto a la funcionalidad espermática, la viabilidad alcanzó su valor más alto también a las 6 horas, mientras que la apoptosis y la actividad mitocondrial

ya eran óptimas en los espermatozoides conservados a 15 °C durante 3 horas. Es decir, que mientras sólo dos del total de parámetros de motilidad y cinética espermática estudiados (TM y PM) manifestaron una mejora, a nivel de funcionalidad la mejoría se observó en todos los parámetros analizados. Esto podría deberse a que el protocolo de tinción empleado en la evaluación por citometría de flujo implica una dilución elevada de los espermatozoides en un medio isotónico simple a base de una solución salina tamponada con fosfato (PBS). Harrison *et al.* (1982) señalaron que el efecto dilución puede ser un artefacto observacional debido a la tendencia de los espermatozoides vivos a adherirse a la superficie de los tubos en un medio sin proteínas, lo que hace que el muestreo de los espermatozoides libres tienda a seleccionar los muertos. Aunque esta tendencia podría haber afectado a los resultados de todos los tiempos de valoración (0 horas a 30 °C, 3 y 6 horas a 15 °C y 24 horas a 5 °C), Ashworth y colaboradores (1994) demostraron que los espermatozoides de carnero también tienden a morir tras la eliminación del SP y la dilución en un medio salino simple, al desestabilizarse sus membranas plasmáticas debido a una reducción en la concentración de los factores protectores. Esto queda respaldado por el hecho de que la adición de SP a espermatozoides muy diluidos de conejo (Castellini *et al.*, 2000), cerdo (Caballero *et al.*, 2004, 2006), toro (Garner *et al.*, 2001) y carnero (Catt *et al.*, 1997) mejora su viabilidad. Así pues, las altas tasas de dilución de la evaluación por citometría de flujo parecen actuar como una prueba de estrés osmótico que evidencia daños subletales en los espermatozoides de carnero. Además, estos daños subletales parecen ser reversibles, ya que no aparecen tras 3-6 horas de conservación del semen a 15 °C. En una segunda parte pretendimos identificar el factor responsable de la inestabilidad de los espermatozoides de carnero durante las primeras horas de almacenamiento líquido. Para ello, realizamos el mismo protocolo de conservación a 15 °C durante 6 horas en espermatozoides epididimarios de carnero, es decir, en espermatozoides sin contacto previo con el SP y el diluyente, y establecimos cuatro grupos experimentales para testar la influencia de cada factor por separado: 1) espermatozoides epididimarios, 2) espermatozoides epididimarios con SP autólogo, 3) espermatozoides epididimarios con INRA 96® y 4) espermatozoides epididimarios con SP autólogo

e INRA 96® para simular un eyaculado procesado de la forma habitual. A diferencia de lo observado por Paul *et al.* (2018), la suplementación de espermatozoides epididimarios de carnero con SP no mejoró la motilidad ni los parámetros cinéticos. En cambio, el grupo suplementado con SP mostró resultados similares a los del grupo compuesto únicamente por espermatozoides epididimarios, una disminución de la calidad espermática a lo largo del tiempo similar a la sufrida en el primer paso de esta Publicación por el eyaculado procesado de la forma habitual. Además, los espermatozoides de los dos grupos que contenían diluyente presentaron una menor motilidad, parámetros cinéticos y funcionalidad a las 0 horas, que mejoraron significativamente tras 6 horas a 15 °C. La adición del diluyente, sólo o en combinación con el SP, hizo que los espermatozoides epididimarios se comportasen de forma similar a los eyaculados. Así, de acuerdo con los resultados de este segundo experimento, y considerando que el tiempo de adaptación comenzaba cuando se diluían las muestras (0 horas), podríamos afirmar que la adición del diluyente actúa inicialmente como un factor desestabilizante de los espermatozoides de carnero, independientemente de su origen. Como señalaron Herold y colaboradores (2006), la duración del tiempo de adaptación afecta a la intensidad de estabilización de los espermatozoides y a su capacidad de mantener la homeostasis, la presión osmótica y la resistencia al frío. El SP contiene una familia de proteínas denominadas aglutinantes de espermatozoides (BSP), que influyen positivamente en la inducción de la capacitación espermática, un proceso esencial para la fecundación (Manjunath and Thérien, 2002; Lusignan *et al.*, 2007). Sin embargo, las BSP son perjudiciales para los espermatozoides en el contexto de la conservación seminal, ya que eliminan el colesterol y los fosfolípidos de la membrana espermática (Manjunath *et al.*, 2007). Plante *et al.* (2015) demostraron en cerdo, caballo y carnero que las micelas de caseína de la leche, así como la fracción de lipoproteínas de baja densidad (LDL) de la yema de huevo, se unen a las BSP libres, reduciendo la pérdida de colesterol y fosfolípidos de la membrana espermática durante la conservación. Este proceso de unión se caracteriza por ser rápido, específico, saturable y estable incluso después de la congelación y descongelación del semen (Desnoyers and Manjunath, 1992), y

podría haber ocurrido a lo largo del tiempo de adaptación al diluyente en el eyaculado procesado de la forma habitual y en los espermatozoides epididimarios suplementados con SP e INRA 96[®]. En cambio, en nuestro trabajo el grupo compuesto por espermatozoides epididimarios e INRA 96[®] también necesitó de un tiempo de adaptación al diluyente antes de expresar una calidad espermática óptima, lo que confirma que el proceso de estabilización de los espermatozoides de carnero depende en gran medida del diluyente. Por tanto, al igual que sugieren Anzar *et al.* (2011) y Paul *et al.* (2020) para la calidad post-descongelación de espermatozoides de toro y carnero criopreservados en un diluyente a base de yema de huevo, un tiempo de adaptación de 3-6 horas podría estabilizar la membrana de los espermatozoides de carnero al facilitar su recubrimiento con el NPPC en todos los grupos experimentales con diluyente. Esto último, a su vez, podría haber revertido los daños subletales observados en los espermatozoides de carnero cuando se realizó el análisis de la calidad espermática cerca del momento de la recogida seminal, especialmente por citometría de flujo. Estos resultados son interesantes desde un punto de vista práctico, al permitir una mejor organización de los centros de reproducción, y una expresión óptima de la calidad espermática en el momento en que se lleva a cabo la AI cervical de forma rutinaria. No obstante, cuando en la Publicación V llevamos a cabo estos análisis multiparamétricos de calidad espermática en espermatozoides conservados a 15 °C durante 6 horas así como una evaluación ultrasonográfica del complejo testicular de los carneros para intentar explicar las diferencias obtenidas a nivel de fertilidad entre el inicio y el final de la estación reproductiva, obtuvimos resultados similares entre ambos momentos. Fue necesario evaluar el proteoma espermático para identificar 189 proteínas con una expresión significativamente diferente entre ambos puntos de muestreo, que un análisis de enriquecimiento reveló que estaban relacionadas con un menor metabolismo del carbono y del citrato o ácido tricarbóxico (TCA), biosíntesis de aminoácidos y glucólisis/gluconeogénesis al inicio de la época reproductiva. Se sabe que los espermatozoides de mamífero utilizan monosacáridos como principal fuente de energía tanto a través de la glucólisis (respiración anaeróbica) como del ciclo del TCA (respiración aeróbica) (Rodríguez-Gil, 2006). Sin embargo, pueden utilizar una amplia gama de

sustratos para obtener energía, como lactato, piruvato, citrato y glicerol (Jones *et al.*, 1992; Jones, 1997; Medrano *et al.*, 2006). Nuestros resultados lo confirman y revelan que los espermatozoides de carnero tienen un metabolismo energético disminuido al inicio de la estación reproductiva. La presencia de una síntesis de aminoácidos alterada en este momento también requiere atención. Investigaciones recientes han evidenciado la síntesis de glutatión (GSH), un tripéptido constituido por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina, en espermatozoides humanos (Evdokimov *et al.*, 2015) y de caballos (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2019) en respuesta al estrés oxidativo. Una de las consecuencias del almacenamiento líquido del semen es el estrés oxidativo debido a una alteración en el balance de óxido-reducción o rédox debido a una sobreproducción de ROS y a una disminución de la capacidad antioxidante de la muestra (Mata-Campuzano *et al.*, 2014). El GSH es el principal antioxidante encargado de la protección de las células frente al estrés oxidativo (Lu, 2013). Por tanto, una disminución de la síntesis de GSH al inicio de la época reproductiva podría conducir a un aumento del estrés oxidativo, lo que a su vez inhibiría la respiración mitocondrial en este momento (Opuwari and Henkel, 2016; Alahmar, 2019). Esto queda respaldado por los menores niveles de NADH deshidrogenasa y proteína transportadora de acilo mitocondrial (ACP) detectados en la época reproductiva temprana. La NADH deshidrogenasa constituye el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, que transfiere electrones de la NADH a la ubiquinona, proporcionando un gradiente de protones para producir ATP mediante la ATP sintasa. Por otra parte, la ACP se localiza principalmente en la matriz mitocondrial como componente fundamental de la ruta de síntesis de ácidos grasos al presentar intermediarios de la cadena acilo a los sitios catalíticos de las enzimas (Masud *et al.*, 2019). De este modo, esta proteína es imprescindible para la producción de ácidos grasos de cadena larga, que son cruciales para mantener los niveles de fosfolípidos necesarios para la actividad de los complejos II, III y IV (Guler *et al.*, 2008). Además, una pequeña fracción de la ACP se integra en el complejo I de la cadena de transporte de electrones (Cronan *et al.*, 2005). Es decir, que ambas proteínas son necesarias para el buen funcionamiento de la cadena de transporte de electrones y están menos expresadas al inicio de la estación

reproductiva, coincidiendo con una disminución del metabolismo energético y de la síntesis de aminoácidos como el GSH. Dentro de las proteínas no estructurales disminuidas en este momento encontramos la familia 9B1 de transportadores de solutos (SLC). En la mayoría de las especies de mamíferos los espermatozoides experimentan un aumento de la concentración intracelular de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ y del pH durante su recorrido por el tracto reproductor femenino (Chen *et al.*, 2016). Esto es de gran importancia para la fisiología espermática, ya que es necesario para la posterior activación de los canales CatSper y la entrada de Ca^{2+} , influyendo así en la glucólisis y en la actividad del axonema (Freitas *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2017). Se sabe que son dos los tipos de proteínas transmembrana que están implicados en la regulación del pH intracelular de los espermatozoides: los transportadores de bicarbonato y los de protones (Lu, 2013). Entre estos últimos se encuentran los SLC de la familia 9, comúnmente denominados intercambiadores o antiportadores de Na^+/H^+ (NHE o NHA), implicados en el intercambio de H^+ intracelular por Na^+ extracelular a través de un gradiente de concentración de membrana (Fuster and Alexander, 2014). La familia SLC9 se divide en tres subgrupos diferentes: SLC9A, SLC9B y SLC9C. En concreto, el subgrupo SLC9B está formado por dos isoformas: NHA1 (SLC9B1), que es específica de los testículos, y NHA2 (SLC9B2), que es ubicua (Xiang *et al.*, 2007; Fuster *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2014). La función de NHA1 y NHA2 es bastante desconocida (Yeste *et al.*, 2021), aunque parecen tener propiedades de transporte diferentes. Mientras que NHA2 se comporta como un intercambiador de Na^+/H^+ , NHA1 se considera más bien un cotransportador de H^+/Cl^- (Chintapalli *et al.*, 2015). Cambios en otras dos proteínas confirmaron la disminución de la capacidad de fecundación de los espermatozoides de carnero al inicio de la estación reproductiva. Según estudios realizados en ratones knockout (Cho *et al.*, 1998; Shamsadin *et al.*, 1999; Nishimura *et al.*, 2001, 2004), las desintegrinas y metaloproteinasas (ADAM) están implicadas en la unión del espermatozoide a la zona pelúcida del ovocito en el proceso inicial de adhesión de gametos. Sin embargo, el mecanismo de unión aún no está claro. Varios estudios en ratones han sugerido que el dominio desintegrina de las ADAM se une a las integrinas de la membrana plasmática del ovocito (Yuan *et al.*, 1997; Bigler *et al.*, 2000). Por otra parte,

estudios estructurales revelaron que la región hipervariable en el dominio rico en cisteína serviría como sitio adhesivo (Takeda *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009). En cerdos se observó que la ADAM20 expresada en la región anterior de la membrana plasmática del espermatozoide participaba en la adhesión a un carbohidrato específico de la zona pelúcida (Mori *et al.*, 2012). Dicha función explica nuestros hallazgos, ya que la fertilidad es menor en la época reproductiva temprana, coincidiendo con una menor expresión de esta proteína. La fosfolipasa C (PLC) también desempeña un papel esencial en el proceso de fecundación mediante el metabolismo de los fosfatidilinositol fosfatos (PIP). La PLC hidroliza el fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) para generar dos segundos mensajeros: el diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato (IP₃). El DAG y el IP₃ inician otras vías de señalización mediante la activación de la quinasa C (PKC) y, a su vez, la liberación de Ca²⁺ intracelular (Majerus *et al.*, 1986; Singer *et al.*, 1997; Rhee, 2001). El Ca²⁺ tiene un papel esencial en la ejecución de la capacitación y la reacción acrosómica, que como se ha comentado varias veces son necesarias para la fecundación (Breitbart, 2002), y en la activación del ovocito, un evento fundamental para el inicio del desarrollo embrionario (Nomikos, Kashir, *et al.*, 2017). La importancia de esta proteína específica del espermatozoide ha sido puesta de manifiesto por numerosos estudios clínicos que relacionan directamente defectos o deficiencias en la PLC humana con infertilidad (Kashir, Konstantinidis, Jones, Heindryckx, *et al.*, 2012; Kashir, Konstantinidis, Jones, Lemmon, *et al.*, 2012; Escoffier *et al.*, 2016; Nomikos, Stamatiadis, *et al.*, 2017; Torra-Massana *et al.*, 2019). Así, su menor expresión en los espermatozoides del inicio de la estación reproductiva justifica la menor fertilidad obtenida en este momento. A0A6P7ETW8 codifica para la proteína expresada en testículos, próstata y placenta (TEPP), con función desconocida (Bera *et al.*, 2003). La pro-interleucina-16 (Pro-IL-16) es la molécula precursora de la interleucina-16 (IL-16), una citoquina proinflamatoria considerada originalmente factor quimioatrayente de linfocitos (Center and Cruikshank, 1982). Sin embargo, además de tener un papel regulador en el sistema inmunitario, algunas citoquinas están directamente implicadas en la regulación de la función testicular (Eggert-Kruse *et al.*, 2001). Se ha propuesto que son liberadas por las células germinales, de Leydig y de

Sertoli, epidídimo y próstata (Dousset and Hussenet, 1997), actuando como mediadores locales de las hormonas sexuales y reguladores paracrinos del proceso de espermatogénesis (Takao *et al.*, 1990; Boockfor *et al.*, 1994). Es decir, que una menor cantidad de esta proteína al inicio de la temporada de cría podría influir en el desarrollo de una espermatogénesis exitosa. De hecho, también detectamos cambios en cuatro proteínas estructurales del flagelo de los espermatozoides, un cilio especializado con una estructura con más de 1.000 proteínas responsable de generar la fuerza mecánica necesaria para que los espermatozoides alcancen los ovocitos en el tracto genital femenino (Roy *et al.*, 2004). El flagelo de los espermatozoides se divide en cuatro partes: pieza de unión, media, principal y final. Está compuesto por el axonema en toda su longitud, rodeado de estructuras adicionales conocidas como complejo peri-axonemal, salvo la pieza final, que sólo está recubierta por la membrana plasmática (Kumar and Singh, 2021). Microscópicamente, el axonema es una estructura formada por microtúbulos que consta de nueve dobletes externos de microtúbulos y un par central, unidos por radios radiales (RS) y brazos de dineína. El complejo peri-axonemal se compone de fibras densas externas (ODF), fibrillas satélites, y una vaina mitocondrial (MS) en la pieza central (Takiguchi *et al.*, 2011). Las tecktinas (TEKT) son proteínas constitutivas de los microtúbulos axonemales que parecen estar implicadas en su estabilidad y compleja estructura (Iida *et al.*, 2006). Hasta ahora se han identificado cinco TEKT (TEKT 1-5) en mamíferos (Wolkowicz *et al.*, 2002; Iida *et al.*, 2006; Murayama *et al.*, 2008). La TEKT 5 está asociada mayoritariamente a la cara interna de la MS y podría ser un componente de la pieza intermedia esencial para la estabilidad flagelar y la motilidad de los espermatozoides (Murayama *et al.*, 2008). Los RS son estructuras con forma de T que se anclan a los dobletes externos de microtúbulos a través su tallo (barra vertical de la T) y que interaccionan con las proyecciones del par central mediante la cabeza (barra horizontal de la T) (Curry and Rosenbaum, 1993). En estudios realizados en *Chlamydomonas reinhardtii* la purificación de los RS permitió identificar 23 proteínas (RSP1-RSP23) (Yang *et al.*, 2006). La proteína del radio radial 3 (RSP3) se encuentra entre el tallo y la cabeza del radio y desempeña un papel clave en su unión, actuando como armazón central de los RS y como anclaje al

axonema (Gui *et al.*, 2021). Por ello, las anomalías en esta proteína se caracterizan por múltiples malformaciones en los flagelos, astenoteratospermia e infertilidad masculina (Jeanson *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2020). La proteína armadillo 12 (ARMC12) es una proteína de la membrana mitocondrial externa perteneciente a la familia ARM que se conserva evolutivamente entre especies y es esencial para la formación de la MS (Shimada *et al.*, 2021). Defectos en esta proteína causan anomalías morfológicas en la pieza intermedia de los flagelos espermáticos en humanos (Liu *et al.*, 2022) y ratones (Shimada *et al.*, 2021), dando lugar, como en el caso anterior, a astenoteratospermia e infertilidad. La pieza principal está rodeada por la vaina fibrosa (FS), una estructura citoesquelética única que regula la flexión del flagelo y define la forma de batido del mismo (Ricci and Breed, 2005). La proteína de interacción con la vaina fibrosa 2 (FSIP2) es uno de los principales componentes de la FS (Brown *et al.*, 2003). Se ha descrito que las mutaciones en FSIP2 causan múltiples anomalías morfológicas en los flagelos espermáticos e infertilidad en humanos (Martinez *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019, 2021; Fang *et al.*, 2021; Hou *et al.*, 2022). Además, se ha demostrado que FSIP2 interactúa con la proteína de anclaje a la quinasa A 4 (AKAP4), una enzima fundamental para el metabolismo energético (Rahamim Ben-Navi *et al.*, 2016). En concreto, FSIP2 parece estar implicada en la unión de la quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) a AKAP4, situando a la PKA cerca de sus sustratos enzimáticos (Welch *et al.*, 2010). Así pues, FSIP2 tiene un papel esencial en la motilidad y maduración de los espermatozoides (Eddy *et al.*, 2003; Eddy, 2007), y su menor expresión en la época reproductiva temprana explica la menor capacidad fecundante de estas muestras a pesar de no haber observado diferencias a nivel de motilidad.

De forma global, los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran la necesidad de optimizar los protocolos de manejo, conservación y análisis de calidad seminal en el carnero para diseñar estrategias realmente eficaces en la mejora de la AI ovina. En este sentido, profundizar en el conocimiento del perfil proteómico y metabolómico de los espermatozoides de carnero durante el almacenamiento líquido a medio plazo podría ayudarnos a llevar a cabo acciones más específicas con el fin de mejorar y alargar su vida útil más allá de las 6-8 horas actuales.

Conclusiones

PRIMERA. Los espermatozoides de carnero son muy resistentes a la centrifugación, pudiendo ser sometidos a 1.200 x g durante 10 minutos (en INRA 96® y a 15 °C) con altas tasas de recuperación espermática y sin efectos perjudiciales sobre la calidad y fertilidad en inseminación artificial cervical.

SEGUNDA. Aunque la ausencia de plasma seminal resultó ser beneficiosa en un protocolo de conservación a medio plazo en forma líquida (hasta 48 horas a 5 °C) en un modelo espermático sin contacto previo con esta sustancia (espermatozoides epididimarios), la no constatación de este hecho en muestras seminales eyaculadas sometidas al mismo protocolo de conservación indica la posible ineficiencia del método de retirada de plasma seminal.

TERCERA. Una suplementación con plasma seminal durante un breve período de tiempo (30 minutos) al final de un protocolo de conservación en forma líquida (hasta 24 horas a 5 °C) resulta beneficiosa a nivel de calidad espermática y de fertilidad tras la inseminación artificial cervical.

CUARTA. Una evaluación precisa de la calidad espermática de muestras seminales de carnero sometidas a un protocolo estándar de conservación en forma líquida (6 horas a 15 °C) requiere de un periodo de adaptación al diluyente de entre 3 y 6 horas tras la dilución inicial.

QUINTA. Aunque los análisis clásicos a nivel del complejo testicular de los carneros y de su calidad espermática fueron similares en dos momentos con diferentes tasas de fertilidad tras la inseminación artificial cervical (inicio y final de la época reproductiva), se detectó una menor expresión de proteínas espermáticas relacionadas con el metabolismo energético, las interacciones espermatozoide-ovocito y la estructura del flagelo en el momento de menor fertilidad. Esto podría sugerir que estas proteínas pueden ser utilizadas como marcadores moleculares de la capacidad fecundante de los espermatozoides de carnero.

Conclusions

FIRST. Ram sperm are highly resistant to centrifugation, so they can be subjected to 1,200 x g for 10 minutes (in INRA 96® and at 15 °C) with high sperm recovery rates and without detrimental effects on sperm quality and fertility in cervical artificial insemination.

SECOND. Although seminal plasma absence proved to be beneficial in a medium-term liquid preservation protocol (up to 48 hours at 5 °C) in a sperm model without previous contact with this substance (epididymal sperm), the lack of this finding in ejaculated seminal samples under the same preservation protocol indicates the possible failure of the seminal plasma removal method.

THIRD. A brief seminal plasma supplementation (30 minutes) at the end of a liquid preservation protocol (up to 24 hours at 5 °C) is beneficial in terms of sperm quality and field fertility after cervical artificial insemination.

FOURTH. An accurate sperm quality assessment of ram semen samples stored in liquid form under a standard preservation protocol (6 hours at 15 °C) requires 3 to 6 hours of adaptation to the extender after the initial dilution.

FIFTH. Although classical analyses of testicular complex of rams and sperm quality were similar at two times with different fertility rates after cervical artificial insemination (early and late breeding season), a lower expression of sperm proteins linked to the energy metabolism, sperm-oocyte interactions, and flagellum structure was detected at the time of lower fertility. This could suggest that these proteins can be used as molecular markers of the fertilizing ability of ram sperm.

Bibliografía

- Abaigar, T., Holt, W. V., Harrison, R. A. P. and Del Barrio, G. (1999) "Sperm subpopulations in Boar (*Sus scrofa*) and Gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments", *Biology of Reproduction*, 60(1), pp. 32-41. doi:10.1095/biolreprod60.1.32.
- Ahmad, M., Nasrullah, R. and Ahmad, N. (2015) "Effect of cooling rate and equilibration time on pre-freeze and post-thaw survival of buck sperm", *Cryobiology*, 70(3), pp. 233-238. doi:10.1016/j.cryobiol.2015.03.002.
- Aitken, R. J. and Baker, M. A. (2013) "Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development", *The International Journal of Developmental Biology*, 57(2-3-4), pp. 265-272. doi:10.1387/ijdb.130146ja.
- Aitken, R. J., Clarkson, J. S. and Clarkson, S. J. (1988) "Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques", *Journal of Andrology*, 9(6), pp. 367-376. doi:10.1002/j.1939-4640.1988.tb01067.x.
- Alahmar, A. T. (2019) "Role of oxidative stress in male infertility: An updated review", *Journal of Human Reproductive Sciences*, 12(1), pp. 4-18. doi:10.4103/jhrs.JHRS_150_18.
- Albiaty, N. M., Alobaidi, H. J., Kareem, A. F., Al-Hakim, A. M. and Alnaeb, A. Y. (2016) "Effect of extenders and preservation periods in some semen characteristics of Awassi rams", *World Journal of Pharmaceutical Research*, 5, pp. 234-243.
- Alvarez, J. G., Lasso, J. L., Blasco, L., Nuñez, R. C., Heyner, S., Caballero, P. P. and Storey, B. T. (1993) "Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime", *Human Reproduction*, 8(7), pp. 1087-1092. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a138198.
- Alvarez, M., Anel-Lopez, L., Boixo, J. C., Chamorro, C., Neila-Montero, M., Montes-Garrido, R., de Paz, P. and Anel, L. (2019) "Current challenges in sheep artificial insemination: A particular insight", *Reproduction in Domestic Animals*, 54(Suppl. 4), pp. 32-40. doi:10.1111/rda.13523.
- Alvarez, M., Nicolas, M., Borragán, S., Lopez-Urueña, E., Anel-López, L., Martínez-Pastor, F., Tamayo-Canul, J., Anel, L. and de Paz, P. (2012) "The percentage of spermatozoa lost during the centrifugation of brown bear (*Ursus arctos*) ejaculates is associated with some spermatozoa quality and seminal plasma characteristics", *Animal Reproduction Science*, 135(1-4), pp. 113-121. doi:10.1016/j.anireprosci.2012.09.009.
- Alvarez, M., Tamayo-Canul, J., Anel, E., Boixo, J. C., Mata-Campuzano, M., Martínez-Pastor, F., Anel, L. and de Paz, P. (2012) "Sperm concentration at freezing affects post-thaw quality and fertility of ram semen", *Theriogenology*, 77(6), pp. 1111-1118. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.10.013.
- Amaral, A., Castillo, J., Estanyol, J. M., Balleca, J. L., Ramalho-Santos, J. and Oliva, R. (2013) "Human sperm tail proteome suggests new endogenous metabolic pathways", *Molecular and Cellular Proteomics*, 12(2), pp. 330-342. doi:10.1074/mcp.M112.020552.
- Amaral, A., Paiva, C., Attardo Parrinello, C., Estanyol, J. M., Balleca, J. L., Ramalho-Santos, J. and Oliva, R. (2014) "Identification of proteins involved in human sperm motility using high-throughput differential proteomics", *Journal of Proteome Research*, 13(12), pp. 5670-5684. doi:10.1021/pr500652y.

- Amiridis, G. S. and Cseh, S. (2012) "Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants", *Animal Reproduction Science*, 130(3-4), pp. 152-161. doi:10.1016/j.anireprosci.2012.01.009.
- Anel, L., Kaabi, M., Abroug, B., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J. C., De La Fuente, L. F. and De Paz, P. (2005) "Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in Churra ewes: A field assay", *Theriogenology*, 63(4), pp. 1235-1247. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.07.001.
- Anel, L., De Paz, P., Álvarez, M., Chamorro, C. A., Boixo, J. C., Manso, A., González, M., Kaabi, M. and Anel, E. (2003) "Field and *in vitro* assay of three methods for freezing ram semen", *Theriogenology*. Elsevier Inc., 60(7), pp. 1293-1308. doi:10.1016/S0093-691X(03)00140-7.
- Anzar, M., Kroetsch, T. and Boswall, L. (2011) "Cryopreservation of bull semen shipped overnight and its effect on post-thaw sperm motility, plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and normal acrosomes", *Animal Reproduction Science*, 126(1-2), pp. 23-31. doi:10.1016/j.anireprosci.2011.04.018.
- Ashworth, P. J. C., Harrison, R. A. P., Miller, N. G. A., Plummer, J. M. and Watson, P. F. (1994) "Survival of ram spermatozoa at high dilution: Protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma", *Reproduction, Fertility and Development*, 6(2), pp. 173-180. doi:10.1071/RD9940173.
- Aurich, J. E., Kühne, A., Hoppe, H. and Aurich, C. (1996) "Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation", *Theriogenology*, 46(5), pp. 791-797. doi:10.1016/S0093-691X(96)00237-3.
- Barati, F., Ali Papahn, A., Afrough, M. and Barati, M. (2011) "Effects of Tyrode's solution osmolarities and milk on bull sperm storage above zero temperatures", *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 9(1), pp. 25-30.
- Barrier-Battut, I., Bonnet, C., Giraud, A., Dubois, C., Caillaud, M. and Vidament, M. (2013) "Removal of seminal plasma enhances membrane stability on fresh and cooled stallion spermatozoa", *Reproduction in Domestic Animals*, 48(1), pp. 64-71. doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02026.x.
- Barrios, B., Pérez-Pé, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muñio-Blanco, T. and Cebrián-Pérez, J. A. (2000) "Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane", *Biology of Reproduction*, 63(5), pp. 1531-1537. doi:10.1095/biolreprod63.5.1531.
- Barros, C., Berrios, M. and Herrera, E. (1973) "Capacitation *in vitro* of guinea-pig spermatozoa in a saline solution", *Reproduction*, 34(3), pp. 547-549. doi:10.1530/jrf.0.0340547.
- Barros Mothé, G., Scott, C., Sicherle, C. C., de Freitas Guaitolini, C. R., de Paula Freitas Dell'aqua, C., Dantas Malossi, C., Araújo-Júnior, J. P. and de Souza, F. F. (2018) "Sperm sexing with density gradient centrifugation in dogs", *Animal Reproduction Science*, 199, pp. 84-92. doi:10.1016/j.anireprosci.2018.11.003.
- Barroso, G., Taylor, S., Morshedi, M., Manzur, F., Gaviño, F. and Oehninger, S. (2006) "Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations", *Fertility and Sterility*, 85(1), pp. 149-154. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.06.046.
- Bartmer, M. E., Sanguinet, E. de O., Pinzón-Osorio, C. A., Cunha, T. K., Ferreira, H.

- da S., Kohler, L. F., Rodrigues, J. L. and Bertolini, M. (2022) "Sperm cell capacitation status of ram semen after cooling", *Acta Scientiae Veterinariae*, 50(1899), pp. 1-14. doi:10.22456/1679-9216.128811.
- Batellier, F., Vidament, M., Fauquant, J., Duchamp, G., Arnaud, G., Yvon, J. M. and Magistrini, M. (2001) "Advances in cooled semen technology", *Animal Reproduction Science*, 68(3-4), pp. 181-190. doi:10.1016/S0378-4320(01)00155-5.
- Belala, R., Briand-Amirat, L., Vinciguerra, L., Tainturier, D., Kaidi, R., Thorin, C., Michaud, S., Anton, M. and Bencharif, D. (2016) "Effect of equilibration time on the motility and functional integrity of canine spermatozoa frozen in three different extenders", *Research in Veterinary Science*, 106, pp. 66-73. doi:10.1016/j.rvsc.2016.03.010.
- Belibasaki, S., Amiridis, G. S., Lymberopoulos, A., Varsakeli, S. and Kouskoura, T. (2005) "Ram seminal plasma and fertility: Results from an ongoing field study", *Acta Veterinaria Hungarica*, 48(3), pp. 335-341. doi:10.1556/AVET.48.2000.3.10.
- Bera, T. K., Hahn, Y., Lee, B. and Pastan, I. H. (2003) "TEPP, a new gene specifically expressed in testis, prostate, and placenta and well conserved in chordates", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312(4), pp. 1209-1215. doi:10.1016/J.BBRC.2003.11.031.
- Bergeron, A. and Manjunath, P. (2006) "New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk", *Molecular Reproduction and Development*, 73(10), pp. 1338-1344. doi:10.1002/MRD.20565.
- Bernardini, A., Hozbor, F., Sanchez, E., Fornés, M. W., Alberio, R. H. and Cesari, A. (2011) "Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage", *Theriogenology*, 76(3), pp. 436-447. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2011.02.020.
- Bigler, D., Takahashi, Y., Chen, M. S., Almeida, E. A. C., Osbourne, L. and White, J. M. (2000) "Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 2 (fertilin beta) and murine eggs. Role of the alpha(6) integrin subunit", *The Journal of Biological Chemistry*, 275(16), pp. 11576-11584. doi:10.1074/JBC.275.16.11576.
- Boockfor, F. R., Wang, D., Lin, T., Nagpal, M. L. and Spangelo, B. L. (1994) "Interleukin-6 secretion from rat Leydig cells in culture", *Endocrinology*, 134(5), pp. 2150-2155. doi:10.1210/ENDO.134.5.8156916.
- Bravo, J. A., Montanero, J., Calero, R. and Roy, T. J. (2011) "Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams", *Animal Reproduction Science*, 129(1-2), pp. 22-29. doi:10.1016/j.anireprosci.2011.10.005.
- Breitbart, H. (2002) "Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction", *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1-2), pp. 139-144. doi:10.1016/S0303-7207(01)00704-3.
- Brinsko, S. P. (2006) "Insemination doses: How low can we go?", *Theriogenology*, 66, pp. 543-550. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.04.026.
- Broekhuijse, M. L. W. J., Šoštarić, E., Feitsma, H. and Gadella, B. M. (2012) "Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility", *Journal of Animal Science*, 90(3), pp. 779-789. doi:10.2527/jas.2011-4311.
- Brouwers, J. F. H. M. and Gadella, B. M. (2003) "In situ detection and localization of

- lipid peroxidation in individual bovine sperm cells", *Free Radical Biology and Medicine*, 35(11), pp. 1382-1391. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2003.08.010.
- Brown, P. R., Miki, K., Harper, D. B. and Eddy, E. M. (2003) "A-kinase anchoring protein 4 binding proteins in the fibrous sheath of the sperm flagellum", *Biology of Reproduction*, 68(6), pp. 2241-2248. doi:10.1095/BIOLREPROD.102.013466.
- Brun, J. M., Theau-Clément, M. and Bolet, G. (2002) "The relationship between rabbit semen characteristics and reproductive performance after artificial insemination", *Animal Reproduction Science*, 70, pp. 139-149. doi:10.1016/S0378-4320(01)00197-X.
- Caballero, I., Vazquez, J. M., Centurión, F., Rodríguez-Martínez, H., Parrilla, I., Roca, J., Cuello, C. and Martínez, E. A. (2004) "Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa", *Reproduction in Domestic Animals*, 39(5), pp. 370-375. doi:10.1111/J.1439-0531.2004.00530.X.
- Caballero, I., Vázquez, J. M., García, E. M., Roca, J., Martínez, E. A., Calvete, J. J., Sanz, L., Ekwall, H. and Rodríguez-Martínez, H. (2006) "Immunolocalization and possible functional role of PSP-I/PSP-II heterodimer in highly extended boar spermatozoa", *Journal of Andrology*, 27(6), pp. 766-773. doi:10.2164/JANDROL.106.000539.
- Câmara, D. R., Silva, S. V., Almeida, F. C., Nunes, J. F. and Guerra, M. M. P. (2011) "Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen", *Theriogenology*, 76, pp. 342-350. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.02.013.
- Cancel, A. M., Lobdell, D., Mendola, P. and Perreault, S. D. (2000) "Objective evolution of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis", *Human Reproduction*, 15(6), pp. 1322-1328. doi:10.1093/humrep/15.6.1322.
- Carr, D. W. and Acott, T. S. (1984) "Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: I. Studies of a sperm motility quiescence factor 1", *Biology of Reproduction*, 30(4), pp. 913-925. doi:10.1095/biolreprod30.4.913.
- Carvajal, G., Cuello, C., Ruiz, M., Vázquez, J. M., Martínez, E. A. and Roca, J. (2004) "Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival", *Journal of Andrology*, 25(3), pp. 389-396. doi:10.1002/j.1939-4640.2004.tb02805.x.
- Castellini, C., Lattaioli, P., Moroni, M. and Minelli, A. (2000) "Effect of seminal plasma on the characteristics and fertility of rabbit spermatozoa", *Animal Reproduction Science*, 63, pp. 275-282. doi:10.1016/S0378-4320(00)00181-0.
- Catt, S. L., O'Brien, J. K., Maxwell, W. M. C. and Evans, G. (1997) "Assessment of ram and boar spermatozoa during cell-sorting by flow cytometry", *Reproduction in Domestic Animals*, 32, pp. 251-258. doi:10.1111/j.1439-0531.1997.tb01290.x.
- Center, D. M. and Cruikshank, W. (1982) "Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. I. Identification and characterization of chemoattractant activity for lymphocytes from mitogen-stimulated mononuclear cells.", *Journal of Immunology*, 128(6), pp. 2563-2568.
- Chen, S.-R., Chen, M., Deng, S.-L., Hao, X.-X., Wang, X.-X. and Liu, Y.-X. (2016) "Sodium-hydrogen exchanger NHA1 and NHA2 control sperm motility and male fertility", *Cell Death and Disease*, 7. doi:10.1038/cddis.2016.65.
- Chintapalli, V. R., Kato, A., Henderson, L., Hirata, T., Woods, D. J., Overend, G., Davies, S. A., Romero, M. F. and Dow, J. A. T. (2015) "Transport proteins NHA1

- and NHA2 are essential for survival, but have distinct transport modalities", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(37), pp. 11720-11725. doi:10.1073/pnas.1508031112.
- Cho, C., Bunch, D. O. D., Faure, J. E., Goulding, E. H., Eddy, E. M., Primakoff, P. and Myles, D. C. (1998) "Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin B", *Science*, 281(5384), pp. 1857-1859. doi:10.1126/science.281.5384.1857.
- Cochran, J. D., Amann, R. P., Froman, D. P. and Pickett, B. W. (1984) "Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm", *Theriogenology*, 22(1), pp. 25-38. doi:10.1016/0093-691X(84)90470-9.
- Cognié, Y., Baril, G., Poulin, N. and Mermillod, P. (2003) "Current status of embryo technologies in sheep and goat", *Theriogenology*, 59, pp. 171-188. doi:10.1016/S0093-691X(02)01270-0.
- Colás, C., Junquera, C., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J. A. and Muiño-Blanco, T. (2009) "Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock", *Microscopy Research and Technique*, 72, pp. 566-572. doi:10.1002/jemt.20710.
- Cooper, G. W., Overstreet, J. W. and Katz, D. F. (1979) "The motility of rabbit spermatozoa recovered from the female reproductive tract", *Gamete Research*, 2(1), pp. 35-42. doi:10.1002/mrd.1120020105.
- Cronan, J. E., Fearnley, I. M. and Walker, J. E. (2005) "Mammalian mitochondria contain a soluble acyl carrier protein", *FEBS Letters*, 579, pp. 4892-4896. doi:10.1016/J.FEBSLET.2005.07.077.
- Cseh, S., Faigl, V. and Amiridis, G. S. (2012) "Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants", *Animal Reproduction Science*, 130, pp. 187-192. doi:10.1016/j.anireprosci.2012.01.014.
- Cummins, J. M. (1982) "Hyperactivated motility patterns of ram spermatozoa recovered from the oviducts of mated ewes", *Gamete Research*, 6(1), pp. 53-63. doi:10.1002/mrd.1120060107.
- Curry, A. M. and Rosenbaum, J. L. (1993) "Flagellar radial spoke: a model molecular genetic system for studying organelle assembly", *Cell motility and the cytoskeleton*, 24(4), pp. 224-232. doi:10.1002/CM.970240403.
- D'Alessandro, A. G., Martemucci, G., Colonna, M. A. and Bellitti, A. (2001) "Post-thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition", *Theriogenology*, 55, pp. 1159-1170. doi:10.1016/S0093-691X(01)00474-5.
- D'Amours, O., Frenette, G., Bourassa, S., Calvo, É., Blondin, P. and Sullivan, R. (2018) "Proteomic markers of functional sperm population in bovines: Comparison of low- and high-density spermatozoa following cryopreservation", *Journal of Proteome Research*, 17(1), pp. 177-188. doi:10.1021/acs.jproteome.7b00493.
- David, I., Kohnke, P., Lagriffoul, G., Praud, O., Plouarboué, F., Degond, P. and Druart, X. (2015) "Mass sperm motility is associated with fertility in sheep", *Animal Reproduction Science*, 161, pp. 75-81. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.08.006.
- deNicolo, G., Morris, S. T., Kenyon, P. R. and Morel, P. C. H. (2006) "Effect of weaning pre- or post-mating on performance of spring-mated ewes and their lambs in New Zealand", *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 49, pp. 255-260. doi:10.1080/00288233.2006.9513716.

- Desnoyers, L. and Manjunath, P. (1992) "Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid", *Journal of Biological Chemistry*, 267(14), pp. 10149-10155. doi:10.1016/s0021-9258(19)50212-5.
- Dogan, S., Mason, M. C., Govindaraju, A., Belser, L., Kaya, A., Stokes, J., Rowe, D. and Memili, E. (2013) "Interrelationships between apoptosis and fertility in bull sperm", *Journal of Reproduction and Development*, 59(1), pp. 18-26. doi:10.1262/jrd.2012-068.
- Doležalová, M., Stádník, L., Biniová, Z., Ducháček, J. and Stupka, R. (2016) "Equilibration and freezing interactions affecting bull sperm characteristics after thawing", *Czech Journal of Animal Science*, 61(11), pp. 515-525. doi:10.17221/23/2016-cjas.
- Domínguez-Rebolledo, Á., Martínez-Pastor, F., Fernández-Santos, M. R., Del Olmo, E., Bisbal, A., Ros-Santaella, J. L. and Garde, J. J. (2010) "Comparison of the TBARS assay and BODIPY C11 probes for assessing lipid peroxidation in red deer spermatozoa", *Reproduction in Domestic Animals*, 45, pp. e360-e368. doi:10.1111/J.1439-0531.2009.01578.X.
- Dott, H. M., Harrison, R. A. and Foster, G. C. (1979) "The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma", *Reproduction*, 55, pp. 113-124. doi:10.1530/JRF.0.0550113.
- Dousset, B. and Hussenet, F. (1997) "Les cytokines dans le sperme humain. Une nouvelle voie d'approche de la fertilité masculine", *Presse Medicale*, 26(1), pp. 24-29.
- Dziekońska, A. and Partyka, A. (2023) "Current status and advances in semen preservation", *Animals*, 13, pp. 10-13. doi:10.3390/ani13010123.
- Ecot, P., Decuadro-Hansen, G., Delhomme, G. and Vidament, M. (2005) "Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing", *Animal Reproduction Science*, 89, pp. 245-248. doi:10.1016/j.anireprosci.2005.07.004.
- Eddy, E. M. (2007) "The scaffold role of the fibrous sheath", *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 65, pp. 45-62.
- Eddy, E. M., Toshimori, K. and O'Brien, D. A. (2003) "Fibrous sheath of mammalian spermatozoa", *Microscopy Research and Technique*, 61(1), pp. 103-115. doi:10.1002/jemt.10320.
- Eggert-Kruse, W., Boit, R., Rohr, G., Aufenanger, J., Hund, M. and Strowitzki, T. (2001) "Relationship of seminal plasma interleukin (IL)-8 and IL-6 with semen quality", *Human Reproduction*, 16(3), pp. 517-528. doi:10.1093/humrep/16.3.517.
- Eini, F., Kutenaeei, M. A., Shirzeyli, M. H., Dastjerdi, Z. S., Omid, M. and Novin, M. G. (2021) "Normal seminal plasma could preserve human spermatozoa against cryopreservation damages in oligozoospermic patients", *BMC Molecular and Cell Biology*, 22(50), pp. 1-9. doi:10.1186/S12860-021-00390-6/TABLES/2.
- El-Hajj Ghaoui, R., Thomson, P. C., Leahy, T., Evans, G. and Maxwell, W. M. C. (2007) "Autologous whole ram seminal plasma and its vesicle-free fraction improve motility characteristics and membrane status but not *in vivo* fertility of frozen-thawed ram spermatozoa", *Reproduction in Domestic Animals*, 42, pp. 541-549. doi:10.1111/J.1439-0531.2006.00819.X.
- Escoffier, J., Lee, H. C., Yassine, S., Zouari, R., Martinez, G., Karaouzène, T., Coutton, C., Kherraf, Z. E., Halouani, L., Triki, C., Nef, S., Thierry-Mieg, N., Savinov, S.

- N., Fissore, R., Ray, P. F. and Arnoult, C. (2016) "Homozygous mutation of PLCZ1 leads to defective human oocyte activation and infertility that is not rescued by the WW-binding protein PAWP", *Human Molecular Genetics*, 25(5), pp. 878-891. doi:10.1093/HMG/DDV617.
- Evans, G., Maxwell, W. M. C. and Salamon, S. (1987) *Salamon's artificial insemination of sheep and goats*, Butterworths. Sydney. doi:10.1007/bf02361195.
- Evdokimov, V. V., Barinova, K. V., Turovetskii, V. B., Muronetz, V. I. and Schmalhausen, E. V. (2015) "Low concentrations of hydrogen peroxide activate the antioxidant defense system in human sperm cells", *Biochemistry (Moscow)*, 80(9), pp. 1178-1185. doi:10.1134/S0006297915090084.
- Fair, S., Hanrahan, J. P., O'Meara, C. M., Duffy, P., Rizos, D., Wade, M., Donovan, A., Boland, M. P., Lonergan, P. and Evans, A. C. O. (2005) "Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination", *Theriogenology*, 63, pp. 1995-2005. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.09.005.
- Falchi, L., Galleri, G., Zedda, M. T., Pau, S., Bogliolo, L., Ariu, F. and Ledda, S. (2018) "Liquid storage of ram semen for 96 h: Effects on kinematic parameters, membranes and DNA integrity, and ROS production", *Livestock Science*, 207, pp. 1-6. doi:10.1016/j.livsci.2017.11.001.
- Fang, X., Gamallat, Y., Chen, Z., Mai, H., Zhou, P., Sun, C., Li, X., Li, H., Zheng, S., Liao, C., Yang, M., Li, Y., Yang, Z., Ma, C., Han, D., Zuo, L., Xu, W., Hu, H., Sun, L. and Li, N. (2021) "Hypomorphic and hypermorphic mouse models of FSIP2 indicate its dosage-dependent roles in sperm tail and acrosome formation", *The Company of Biologist*, 148(dev199216), pp. 1-14. doi:10.1242/DEV.199216.
- Farrell, P. B., Presicce, G. A., Brockett, C. C. and Foote, R. H. (1998) "Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility", *Theriogenology*, 49, pp. 871-879. doi:10.1016/s0093-691x(98)00036-3.
- Fernandez-Abella, D., Preve, M. O. and Villegas, N. (2003) "Insemination time and dilution rate of cooled and chilled ram semen affects fertility", *Theriogenology*, 60, pp. 21-26. doi:10.1016/S0093-691X(02)01041-5.
- Fernández-Gago, R., Carlos Domínguez, J. and Martínez-Pastor, F. (2010) "Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study", *Theriogenology*, 80, pp. 400-410. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.05.003.
- Ferrer, M. S., Lyle, S. K., Eilts, B. E., Eljarrah, A. H. and Paccamonti, D. L. (2012) "Factors affecting sperm recovery rates and survival after centrifugation of equine semen", *Theriogenology*, 78, pp. 1814-1823. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.07.011.
- Fleming, A. D., Yanagimachi, R. and Yanagimachi, H. (1981) "Spermatozoa of the Atlantic bottlenosed dolphin, *Tursiops truncatus*", *Journal of Reproduction and Fertility*, 63, pp. 509-514. doi:10.1530/jrf.0.0630509.
- Fraser, L. R. (1977) "Motility patterns in mouse spermatozoa before and after capacitation", *Journal of Experimental Zoology*, 202(3), pp. 439-444. doi:10.1002/jez.1402020314.
- Fredricsson, B. and Kinnari, S. (1979) "Vitality and morphology of human spermatozoa studies on the resistance to storage and centrifugation and on the removal of dead spermatozoa", *First International Journal of Andrology*, 11(2), pp. 135-141.

doi:10.1111/j.1439-0272.1979.tb02174.x.

- Freitas, M. J., Vijayaraghavan, S. and Fardilha, M. (2017) "Signaling mechanisms in mammalian sperm motility", *Biology of Reproduction*, 96(1), pp. 2-12. doi:10.1095/biolreprod.116.144337.
- Fuster, D. G. and Alexander, R. T. (2014) "Traditional and emerging roles for the SLC9 Na⁺/H⁺ exchangers", *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 466(1), pp. 61-76. doi:10.1007/s00424-013-1408-8.
- Fuster, D. G., Zhang, J., Shi, M., Bobulescu, I. A., Andersson, S. and Moe, O. W. (2008) "Characterization of the sodium/hydrogen exchanger NHA2", *Journal of the American Society of Nephrology*, 19, pp. 1547-1556. doi:10.1681/ASN.2007111245.
- Gadea, J. (2005) "Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility", *Theriogenology*, 63, pp. 431-444. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.09.023.
- Gadea, J., Sellés, E. and Marco, M. (2004) "The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions", *Reproduction in Domestic Animals*, 39(5), pp. 303-308. doi:10.1111/j.1439-0531.2004.00513.x.
- Gadella, B. M. (2008) "Sperm membrane physiology and relevance for fertilization", *Animal Reproduction Science*, 107(3-4), pp. 229-236. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.05.006.
- Gaitskell-Phillips, G., Martín-Cano, F. E., Ortiz-Rodríguez, J. M., Silva-Rodríguez, A., Gil, M. C., Ortega-Ferrusola, C. and Penã, F. J. (2021) "Differences in the proteome of stallion spermatozoa explain stallion-to-stallion variability in sperm quality post-thaw†", *Biology of Reproduction*, 104(5), pp. 1097-1113. doi:10.1093/biolre/iaob003.
- García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Ramón, M., del Olmo, E., Montoro, V., Dominguez-Rebolledo, A. E., Bisbal, A., Jiménez-Rabadán, P., Pérez-Guzmán, M. D. and Soler, A. J. (2010) "Analysis of selected sperm by density gradient centrifugation might aid in the estimation of *in vivo* fertility of thawed ram spermatozoa", *Theriogenology*, 74, pp. 979-988. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.04.027.
- Garcia, J. C., Dominguez, J. C., Pena, F. J., Alegre, B., Gonzalez, R., Castro, M. J., Habing, G. G. and Kirkwood, R. N. (2010) "Thawing boar semen in the presence of seminal plasma: Effects on sperm quality and fertility", *Animal Reproduction Science*, 119(1-2), pp. 160-165. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.11.001.
- Garcia, M. A. and Graham, E. F. (1987) "Effects of low-molecular-weight fractions (LMWF) from milk, egg yolk, and seminal plasma on freezability of bovine spermatozoa", *Cryobiology*, 24(5), pp. 429-436. doi:10.1016/0011-2240(87)90046-0.
- Garner, D. L., Thomas, C. A., Gravance, C. G., Marshall, C. E., DeJarnette, J. M. and Allen, C. H. (2001) "Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm", *Theriogenology*, 56, pp. 31-40. doi:10.1016/S0093-691X(01)00540-4.
- Gibb, Z., Lambourne, S. R., Quadrelli, J., Smith, N. D. and Aitken, R. J. (2015) "L-carnitine and pyruvate are prosurvival factors during the storage of stallion spermatozoa at room temperature", *Biology of Reproduction*, 93(4). doi:10.1095/biolreprod.115.131326.
- Gil, J., Lundeheim, N., Söderquist, L. and Rodríguez-Martínez, H. (2003) "Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters

- in ram semen", *Theriogenology*, 59, pp. 1241-1255. doi:10.1016/S0093-691X(02)01177-9.
- Gil, J., Söderquist, L. and Rodriguez-Martinez, H. (2000) "Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen", *Theriogenology*, 54, pp. 93-108. doi:10.1016/S0093-691X(00)00328-9.
- Gil, M. C., Ferrusola, C. O., Anel-López, L., Ortiz-Rodríguez, J. M., Alvarez, M., de Paz, P., Anel, L. and Peña, F. J. (2018) "A simple flow cytometry protocol to determine simultaneously live, dead and apoptotic stallion spermatozoa in fresh and frozen thawed samples", *Animal Reproduction Science*, 189, pp. 69-76. doi:10.1016/j.anireprosci.2017.12.009.
- Gillan, L., Evans, G. and Maxwell, W. M. C. (2005) "Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential", *Theriogenology*, 63, pp. 445-457. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.09.024.
- Gillan, L., Maxwell, W. M. C. and Evans, G. (2004) "Preservation and evaluation of semen for artificial insemination", *Reproduction, Fertility and Development*, 16(4), pp. 447-454. doi:10.1071/RD04034.
- Gomes-Alves, S., Alvarez, M., Nicolas, M., Martínez-Rodríguez, C., Borragán, S., Chamorro, C. A., Anel, L. and De Paz, P. (2014) "Salvaging urospermic ejaculates from brown bear (*Ursus arctos*)", *Animal Reproduction Science*, 150(3-4), pp. 148-157. doi:10.1016/j.anireprosci.2014.09.007.
- Graham, J. K. (1994) "Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process", *Theriogenology*, 41, pp. 1151-1162. doi:10.1016/S0093-691X(05)80037-8.
- Griffin, R. A., Swegen, A., Baker, M., Aitken, R. J., Skerrett-Byrne, D. A., Rodriguez, A. S., Martín-Cano, F. E., Nixon, B., Peña, F. J., Delehede, M., Sergeant, N. and Gibb, Z. (2020) "Mass spectrometry reveals distinct proteomic profiles in high- and low-quality stallion spermatozoa", *Reproduction*, 160(5), pp. 695-707. doi:10.1530/REP-20-0284.
- Gui, M., Ma, M., Sze-Tu, E., Wang, X., Koh, F., Zhong, E. D., Berger, B., Davis, J. H., Dutcher, S. K., Zhang, R. and Brown, A. (2021) "Structures of radial spokes and associated complexes important for ciliary motility", *Nature Structural and Molecular Biology*, 28(1), pp. 29-37. doi:10.1038/S41594-020-00530-0.
- Guler, J. L., Kriegova, E., Smith, T. K., Lukeš, J. and Englund, P. T. (2008) "Mitochondrial fatty acid synthesis is required for normal mitochondrial morphology and function in *Trypanosoma brucei*", *Molecular Microbiology*, 67(5), pp. 1125-1142. doi:10.1111/J.1365-2958.2008.06112.X.
- Gündoğan, M. (2009) "Short term preservation of ram semen with different extenders", *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(3), pp. 429-435. doi:10.9775/kvfd.2009.033-a.
- Gundogan, M., Yeni, D., Avdatek, F. and Fidan, A. F. (2010) "Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage", *Animal Reproduction Science*, 122(3-4), pp. 200-207. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2010.08.012.
- Halbert, G. W., Dobson, H., Walton, J. S. and Buckrell, B. C. (1990) "The structure of the cervical canal of the ewe", *Theriogenology*, 33, pp. 977-992. doi:10.1016/0093-691X(90)90060-7.

- Harrison, R. A. P., Dott, H. M. and Foster, G. C. (1982) "Bovine serum albumin, sperm motility, and the "dilution effect"", *Journal of Experimental Zoology*, 222(1), pp. 81-88. doi:10.1002/jez.1402220111.
- Harrison, R. A. P. and Gadella, B. M. (2005) "Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation", *Theriogenology*, 63, pp. 342-351. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.09.016.
- He, Y., Wang, K., Zhao, X., Zhang, Y., Ma, Y. and Hu, J. (2016) "Differential proteome association study of freeze-thaw damage in ram sperm", *Cryobiology*, 72, pp. 60-68. doi:10.1016/j.cryobiol.2015.11.003.
- Henkel, R. R. and Schill, W. B. (2003) "Sperm preparation for ART", *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(108), pp. 1-22. doi:10.1186/1477-7827-1-108.
- Henning, H., Petrunkina, A. M., Harrison, R. A. P. and Waberski, D. (2014) "Cluster analysis reveals a binary effect of storage on boar sperm motility function", *Reproduction, Fertility and Development*, 26(5), pp. 623-632. doi:10.1071/RD13113.
- Herold, F. C., de Haas, K., Colenbrander, B. and Gerber, D. (2006) "Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl™ or AndroMed®", *Theriogenology*, 66, pp. 1123-1130. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.03.007.
- Hill, J. R., Thompson, J. A. and Perkins, N. R. (1998) "Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28,447 merino ewes under commercial conditions: A survey", *Theriogenology*, 49, pp. 697-709. doi:10.1016/s0093-691x(98)00019-3.
- Hirai, M., Boersma, A., Hoeflich, A., Wolf, E., Föll, Jü., Aumüller, R. and Braun, J. (2001) "Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): Relation to fertility and seminal plasma growth factors", *Journal of Andrology*, 22(1), pp. 104-110. doi:10.1002/j.1939-4640.2001.tb02159.x.
- Hitit, M., Özbek, M., Ayaz-Guner, S., Guner, H., Oztug, M., Bodu, M., Kirbas, M., Bulbul, B., Bucak, M. N., Ataman, M. B., Memili, E. and Kaya, A. (2021) "Proteomic fertility markers in ram sperm", *Animal Reproduction Science*, 235(106882), pp. 1-16. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2021.106882.
- Höfner, L., Luther, A.-M. and Waberski, D. (2020) "The role of seminal plasma in the liquid storage of spermatozoa", *Animal Reproduction Science*, 220(106290), pp. 1-8. doi:10.1016/j.anireprosci.2020.106290.
- Holt, C., Holt, W. V. and Moore, H. D. M. (1996) "Choice of operating conditions to minimize sperm subpopulation sampling bias in the assessment of boar semen by computer-assisted semen analysis", *Journal of Andrology*, 17(5), pp. 587-596. doi:10.1002/j.1939-4640.1996.tb01837.x.
- Holt, C., Holt, W. V., Moore, H. D. M., Reed, H. C. B. and Curnock, R. M. (1997) "Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: Results of two fertility trials", *Journal of Andrology*, 18(3), pp. 312-323. doi:10.1002/j.1939-4640.1997.tb01925.x.
- Holt, W. V. (1995) "Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility", *Reproduction in Domestic Animals*, 31(1), pp. 17-24. doi:10.1111/j.1439-0531.1995.tb00001.x.
- Holt, W. V., Medrano, A., Thurston, L. M. and Watson, P. F. (2005) "The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: Insights

- from the cryomicroscope", *Theriogenology*, 63, pp. 370-382. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.09.018.
- Hoogewijs, M., Rijsselaere, T., De Vlieghe, S., Vanhaesebrouck, E., De Schauwer, C., Govaere, J., Thys, M., Hoflack, G., Van Soom, A. and de Kruif, A. (2010) "Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation", *Theriogenology*, 74, pp. 118-126. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.01.022.
- Hou, M., Xi, Q., Zhu, L., Jia, W., Liu, Z., Wang, C., Zhou, X., Zhang, D., Xing, C., Peng, X., Luo, Y., Jin, L., Li, Z. and Zhang, X. (2022) "Novel compound heterozygous mutation in FSIP2 causes multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF) and male infertility", *Reproductive Sciences*, 29(9), pp. 2697-2702. doi:10.1007/s43032-022-00965-4.
- Hunter, R. H. F. (1981) "Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation", *Journal of Reproduction and Fertility*, 63(1), pp. 109-117. doi:10.1530/jrf.0.0630109.
- Huo, L. J., Ma, X. H. and Yang, Z. M. (2002) "Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage", *Theriogenology*, 58, pp. 1349-1360. doi:10.1016/S0093-691X(02)00953-6.
- Iida, H., Honda, Y., Matsuyama, T., Shibata, Y. and Inai, T. (2006) "Tektin 4 is located on outer dense fibers, not associated with axonemal tubulins of flagella in rodent spermatozoa", *Molecular Reproduction and Development*, 73(7), pp. 929-936. doi:10.1002/MRD.20486.
- Januskauskas, A., Johannisson, A. and Rodriguez-Martinez, H. (2003) "Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility", *Theriogenology*, 60, pp. 743-758. doi:10.1016/S0093-691X(03)00050-5.
- Jeanson, L., Copin, B., Papon, J. F., Dastot-Le Moal, F., Duquesnoy, P., Montantin, G., Cadranet, J., Corvol, H., Coste, A., Désir, J., Souayah, A., Kott, E., Collot, N., Tissier, S., Louis, B., Tamalet, A., De Blic, J., Clement, A., Escudier, E., Amselem, S. and Legendre, M. (2015) "RSPH3 mutations cause primary ciliary dyskinesia with central-complex defects and a near absence of radial spokes", *American Journal of Human Genetics*, 97(1), pp. 153-162. doi:10.1016/J.AJHG.2015.05.004.
- Jodar, M., Attardo-Parrinello, C., Soler-Ventura, A., Barrachina, F., Delgado-Dueñas, D., Cívico, S., Calafell, J. M., Ballescà, J. L. and Oliva, R. (2020) "Sperm proteomic changes associated with early embryo quality after ICSI", *Reproductive BioMedicine Online*, 40(5), pp. 698-708. doi:10.1016/j.rbmo.2020.01.004.
- Jones, A. R. (1997) "Metabolism of lactate by mature boar spermatozoa", *Reproduction, Fertility, and Development*, 9(2), pp. 227-232. doi:10.1071/R96102.
- Jones, A. R., Chantrill, L. A. and Cokinakis, A. (1992) "Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa", *Reproduction*, 94(1), pp. 129-134. doi:10.1530/JRF.0.0940129.
- Juyena, N. S. and Stelletta, C. (2012) "Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa", *Journal of Andrology*, 33(4), pp. 536-551. doi:10.2164/jandrol.110.012583.
- Kameni, S. L., Meutchieye, F. and Ngoula, F. (2021) "Liquid storage of ram semen: Associated damages and improvement", *Open Journal of Animal Sciences*, 11, pp.

473-500. doi:10.4236/ojas.2021.113033.

- Kashir, J., Konstantinidis, M., Jones, C., Heindryckx, B., De Sutter, P., Parrington, J., Wells, D. and Coward, K. (2012) "Characterization of two heterozygous mutations of the oocyte activation factor phospholipase C zeta (PLC ζ) from an infertile man by use of minisequencing of individual sperm and expression in somatic cells", *Fertility and sterility*, 98(2), pp. 423-431. doi:10.1016/J.FERTNSTERT.2012.05.002.
- Kashir, J., Konstantinidis, M., Jones, C., Lemmon, B., Chang Lee, H., Hamer, R., Heindryckx, B., Deane, C. M., De Sutter, P., Fissore, R. A., Parrington, J., Wells, D. and Coward, K. (2012) "A maternally inherited autosomal point mutation in human phospholipase C zeta (PLC ζ) leads to male infertility", *Human Reproduction*, 27(1), pp. 222-231. doi:10.1093/HUMREP/DER384.
- Kasimanickam, R., Kasimanickam, V., Thatcher, C. D., Nebel, R. L. and Cassell, B. G. (2007) "Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls", *Theriogenology*, 67, pp. 1004-1012. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.11.013.
- Kasimanickam, R., Kasimanickam, V., Tibary, A. and Pelzer, K. (2011) "Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4°C", *Small Ruminant Research*, 99, pp. 208-213. doi:10.1016/j.smallrumres.2011.03.057.
- Katkov, I. I. and Mazur, P. (1998) "Influence of centrifugation regimes on motility, yield, and cell associations of mouse spermatozoa", *Journal of Andrology*, 19(2), pp. 232-241. doi:10.1002/j.1939-4640.1998.tb01993.x.
- Katkov, I. I. and Mazur, P. (1999) "Factors affecting yield and survival of cells when suspensions are subjected to centrifugation: Influence of centrifugal acceleration, time of centrifugation, and length of the suspension column in quasi-homogeneous centrifugal fields", *Cell Biochemistry and Biophysics*, 31(3), pp. 231-245. doi:10.1007/BF02738241.
- Kay, V. J. and Robertson, L. (1998) "Hyperactivated motility of human spermatozoa: A review of physiological function and application in assisted reproduction", *Human Reproduction Update*, pp. 776-786. doi:10.1093/humupd/4.6.776.
- Kershaw, C. M., Khalid, M., McGowan, M. R., Ingram, K., Leethongdee, S., Wax, G. and Scaramuzzi, R. J. (2005) "The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen", *Theriogenology*, 64, pp. 1225-1235. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.02.017.
- Killian, G. J., Chapman, D. A. and Rogowski, L. A. (1993) "Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma", *Biology of Reproduction*, 49(6), pp. 1202-1207. doi:10.1095/biolreprod49.6.1202.
- Knights, M., Baptiste, Q. S., Dixon, A. B., Pate, J. L., Marsh, D. J., Inskip, E. K. and Lewis, P. E. (2003) "Effects of dosage of FSH, vehicle and time of treatment on ovulation rate and prolificacy in ewes during the anestrous season", *Small Ruminant Research*, 50, pp. 1-9. doi:10.1016/S0921-4488(03)00111-1.
- Knop, K., Hoffmann, N., Rath, D. and Sieme, H. (2005) "Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability", *Animal Reproduction Science*, 89(1-4), pp. 294-297.
- Kukovics, S., Gyoker, E., Nemeth, T. and Gergatz, E. (2011) "Artificial insemination of sheep - Possibilities, realities and techniques at the farm level", in *Artificial Insemination in Farm Animals*. Rijeka. doi:10.5772/16642.

- Kumar, N. and Singh, A. K. (2021) "The anatomy, movement, and functions of human sperm tail: An evolving mystery", *Biology of Reproduction*, 104(3), pp. 508-520. doi:10.1093/BIOLRE/IOAA213.
- Kwon, W.-S., Oh, S.-A., Kim, Y.-J., Rahman, M. S., Park, Y.-J. and Pang, M.-G. (2015) "Proteomic approaches for profiling negative fertility markers in inferior boar spermatozoa", *Scientific Reports*, 5(13821), pp. 1-10. doi:10.1038/srep13821.
- Kwon, W.-S., Rahman, M. S., Lee, J.-S., Yoon, S.-J., Park, Y.-J. and Pang, M.-G. (2015) "Discovery of predictive biomarkers for litter size in boar spermatozoa", *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(5), pp. 1230-1240. doi:10.1074/mcp.M114.045369.
- Lambert, H. (1981) "Temperature dependence of capacitation in bat sperm monitored by zona-free hamster ova", *Gamete Research*, 4(6), pp. 525-533. doi:10.1002/mrd.1120040606.
- De Lazari, F. L., Sontag, E. R., Schneider, A., Araripe Moura, A. A., Vasconcelos, F. R., Nagano, C. S., Dalberto, P. F., Bizarro, C. V., Mattos, R. C., Mascarenhas Jobim, M. I. and Bustamante-Filho, I. C. (2020) "Proteomic identification of boar seminal plasma proteins related to sperm resistance to cooling at 17 °C", *Theriogenology*, 147, pp. 135-145. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.11.023.
- Leahy, T. and de Graaf, S. P. (2012) "Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing", *Reproduction in Domestic Animals*, 47(Suppl. 4), pp. 207-213. doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02077.x.
- Leahy, T., Marti, J. I., Evans, G. and Maxwell, W. M. C. (2009) "Seminal plasma proteins protect flow-sorted ram spermatozoa from freeze-thaw damage", *Reproduction, Fertility and Development*, 21(4), pp. 571-578. doi:10.1071/RD08238.
- Leahy, T., Marti, J. I., Evans, G. and Maxwell, W. M. C. (2010) "Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen-thawed ram spermatozoa", *Animal Reproduction Science*. Elsevier, 119(1-2), pp. 147-153. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.12.010.
- Ledesma, A., Fernández-Alegre, E., Cano, A., Hozbor, F., Martínez-Pastor, F. and Cesari, A. (2016) "Seminal plasma proteins interacting with sperm surface revert capacitation indicators in frozen-thawed ram sperm", *Animal Reproduction Science*, 173, pp. 35-41. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2016.08.007.
- Leite, T. G., do Vale Filho, V. R., de Arruda, R. P., de Andrade, A. F. C., Emerick, L. L., Zaffalon, F. G., Martins, J. A. M. and Andrade, V. J. de (2010) "Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry", *Animal Reproduction Science*, 120(1-4), pp. 31-38. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.04.005.
- Len, J. A., Jenkins, J. A., Eilts, B. E., Paccamonti, D. L., Lyle, S. K. and Hosgood, G. (2010) "Immediate and delayed (after cooling) effects of centrifugation on equine sperm", *Theriogenology*, 73, pp. 225-231. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.09.003.
- Lin, W. W., Lamb, D. J., Wheeler, T. M., Lipshultz, L. I. and Kim, E. D. (1997) "In situ end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis", *Fertility and Sterility*, 68(6), pp. 1065-1069. doi:10.1016/S0015-0282(97)00372-5.
- Liu, H., Shim, A. H. R. and He, X. (2009) "Structural characterization of the ectodomain of a disintegrin and metalloproteinase-22 (ADAM22), a neural adhesion receptor

- instead of metalloproteinase. Insights on adam function", *Journal of Biological Chemistry*, 284(42), pp. 29077-29085. doi:10.1074/jbc.M109.014258.
- Liu, M., Sun, Y., Li, Y., Sun, J., Yang, Y. and Shen, Y. (2021) "Novel mutations in FSIP2 lead to multiple morphological abnormalities of the sperm flagella and poor ICSI prognosis", *Gene*, 781(145536), pp. 1-6. doi:10.1016/J.GENE.2021.145536.
- Liu, W., Wei, X., Liu, X., Chen, G., Zhang, X., Liang, X., Isachenko, V., Sha, Y., Wang, Y., To cite, G., Med Genet Epub, al J., Hospital, Z. and Vladimir Isachenko, A. (2022) "Biallelic mutations in ARMC12 cause asthenozoospermia and multiple midpiece defects in humans and mice", *Journal of Medical Genetics*, 0, pp. 1-9. doi:10.1136/JMEDGENET-2021-108137.
- Liu, W., Wu, H., Wang, L., Yang, X., Liu, C., He, X., Li, W., Wang, J., Chen, Y., Wang, H., Gao, Y., Tang, S., Yang, S., Jin, L., Zhang, F. and Cao, Y. (2019) "Homozygous loss-of-function mutations in FSIP2 cause male infertility with asthenoteratospermia", *Journal of Genetics and Genomics*, 46(1), pp. 53-56. doi:10.1016/J.JGG.2018.09.006.
- Long, J. A. (2020) "The "omics" revolution: Use of genomic, transcriptomic, proteomic and metabolomic tools to predict male reproductive traits that impact fertility in livestock and poultry", *Animal Reproduction Science*, 220(106354), pp. 1-13. doi:10.1016/j.anireprosci.2020.106354.
- López-Pérez, A. and Pérez-Clariget, R. (2012) "Ram seminal plasma improves pregnancy rates in ewes cervically inseminated with ram semen stored at 5 °C for 24 hours", *Theriogenology*, 77, pp. 395-399. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2011.08.013.
- López-Sáez, A., Ortiz, N., Gallego, L. and Garde, J. J. (2000) "Liquid storage (5°C) of ram semen in different diluents", *Archives of Andrology*, 44(2), pp. 155-164. doi:10.1080/014850100262335.
- Love, C. C. (2011) "Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions", *Theriogenology*, 76, pp. 547-557. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.03.007.
- Lu, S. C. (2013) "Glutathione synthesis", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5), pp. 3143-3153. doi:10.1016/J.BBAGEN.2012.09.008.
- Luna, C., Colás, C., Casao, A., Serrano, E., Domingo, J., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J. A. and Muiño-Blanco, T. (2015) "Ram seminal plasma proteins contribute to sperm capacitation and modulate sperm-zona pellucida interaction", *Theriogenology*, 83, pp. 670-678. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2014.10.030.
- Lusignan, M. F., Bergeron, A., Crête, M. H., Lazure, C. and Manjunath, P. (2007) "Induction of epididymal boar sperm capacitation by pB1 and BSP-A1/-A2 proteins, members of the BSP protein family", *Biology of Reproduction*, 76(3), pp. 424-432. doi:10.1095/BIOLREPROD.106.055624.
- Lv, C., Wu, G., Hong, Q. and Quan, G. (2019) "Spermatozoa cryopreservation: State of art and future in small ruminants", *Biopreservation and Biobanking*, 17(2), pp. 171-182. doi:10.1089/bio.2018.0113.
- Lybaert, P., Danguy, A., Leleux, F., Meuris, S. and Lebrun, P. (2009) "Improved methodology for the detection and quantification of the acrosome reaction in mouse spermatozoa", *Histology and Hstopathology*, 24(8), pp. 999-1007.
- Machado, G. M., Carvalho, J. O., Filho, E. S., Caixeta, E. S., Franco, M. M., Rumpf, R. and Dode, M. A. N. (2009) "Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos",

- Theriogenology*, 71, pp. 1289-1297. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.01.002.
- Mack, S. R. and Zaneveld, L. J. D. (1987) "Acrosomal enzymes and ultrastructure of unfrozen and cryotreated human spermatozoa", *Gamete Research*, 18(4), pp. 375-383. doi:10.1002/mrd.1120180411.
- Macleod, I. C. and Irvine, D. S. (1995) "Andrology: The predictive value of computer-assisted semen analysis in the context of a donor insemination programme", *Human Reproduction*, 10(3), pp. 580-586. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a135993.
- Mahi, C. A. and Yanagimachi, R. (1976) "Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*", *Journal of Experimental Zoology*, 196(2), pp. 189-195. doi:10.1002/jez.1401960206.
- Majerus, P. W., Connolly, T. M., Deckmyn, H., Ross, T. S., Bross, T. E., Ishii, H., Bansal, V. S. and Wilson, D. B. (1986) "The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules", *Science*, 234(4783), pp. 1519-1526. doi:10.1126/SCIENCE.3024320.
- Manjunath, P. (2012) "New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components", *Animal Reproduction*, 9(4), pp. 809-815.
- Manjunath, P., Bergeron, A., Lefebvre, J. and Fan, J. (2007) "Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation", *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 65, pp. 217-228.
- Manjunath, P. and Thérien, I. (2002) "Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation", *Journal of Reproductive Immunology*, 53(1-2), pp. 109-119. doi:10.1016/S0165-0378(01)00098-5.
- Mann, T. (1964) *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract*. London.
- MAPA (2023a) *Caracterización del sector ovino y caprino de carne en España*.
- MAPA (2023b) *Caracterización del sector ovino y caprino de leche en España*.
- Marchetti, C., Jouy, N., Leroy-Martin, B., Defossez, A., Formstecher, P. and Marchetti, P. (2004) "Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility", *Human Reproduction*, 19(10), pp. 2267-2276. doi:10.1093/HUMREP/DEH416.
- Martí, E., Pérez-Pé, R., Colás, C., Muiño-Blanco, T. and Cebrián-Pérez, J. A. (2008) "Study of apoptosis-related markers in ram spermatozoa", *Animal Reproduction Science*, 106(1-2), pp. 113-132. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2007.04.009.
- Martí, E., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T. and Cebrián-Pérez, J. A. (2006) "Comparative study of four different sperm washing methods using apoptotic markers in ram spermatozoa", *Journal of Andrology*, 27(6), pp. 746-753. doi:10.2164/jandrol.106.000109.
- Martín-Cano, F. E., Gaitskell-Phillips, G., Ortiz-Rodríguez, J. M., Silva-Rodríguez, A., Román, Á., Rojo-Domínguez, P., Alonso-Rodríguez, E., Tapia, J. A., Gil, M. C., Ortega-Ferrusola, C. and Peña, F. J. (2020) "Proteomic profiling of stallion spermatozoa suggests changes in sperm metabolism and compromised redox regulation after cryopreservation", *Journal of Proteomics*, 221(103765), pp. 1-14. doi:10.1016/j.jprot.2020.103765.
- Martín-Hidalgo, D., Macías-García, B., García-Marín, L. J., Bragado, M. J. and

- González-Fernández, L. (2020) "Boar spermatozoa proteomic profile varies in sperm collected during the summer and winter", *Animal Reproduction Science*, 219(106513), pp. 1-10. doi:10.1016/j.anireprosci.2020.106513.
- Martínez-Pastor, F., Anel, L., Guerra, C., Álvarez, M., Soler, A. J., Garde, J. J., Chamorro, C. and de Paz, P. (2006) "Seminal plasma improves cryopreservation of Iberian red deer epididymal sperm", *Theriogenology*, 66, pp. 1847-1856. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.04.036.
- Martínez-Pastor, F., Díaz-Corujó, A. R., Anel, E., Herraéz, P., Anel, L. and De Paz, P. (2005) "Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm", *Theriogenology*, 64, pp. 958-974. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.01.003.
- Martínez-Pastor, F., García-Macias, V., Álvarez, M., Herraéz, P., Anel, L. and de Paz, P. (2005) "Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process", *Biology of Reproduction*, 72(2), pp. 316-327. doi:10.1095/biolreprod.104.032730.
- Martínez-Pastor, F., Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Anel, L. and de Paz, P. (2010) "Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry", *Reproduction in Domestic Animals*, 45(Suppl. 2), pp. 67-78. doi:10.1111/j.1439-0531.2010.01622.x.
- Martínez-Pastor, F., Del Rocío Fernández-Santos, M., Domínguez-Rebolledo, Á., Estesó, M. and Garde, J. (2009) "DNA status on thawed semen from fighting bull: A comparison between the SCD and the SCSA tests", *Reproduction in Domestic Animals*, 44(3), pp. 424-431. doi:10.1111/J.1439-0531.2008.01098.X.
- Martínez-Pastor, F., Tizado, E. J., Garde, J. J., Anel, L. and de Paz, P. (2011) "Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis", *Theriogenology*, 75, pp. 783-795. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.11.034.
- Martínez, G., Kherraf, Z. E., Zouari, R., Mustapha, S. F. Ben, Saut, A., Pernet-Gallay, K., Bertrand, A., Bidart, M., Hograindeur, J. P., Amiri-Yekta, A., Kharouf, M., Karaouzène, T., Thierry-Mieg, N., Dacheux-Deschamps, D., Satre, V., Bonhivers, M., Touré, A., Arnoult, C., Ray, P. F. and Coutton, C. (2018) "Whole-exome sequencing identifies mutations in FSIP2 as a recurrent cause of multiple morphological abnormalities of the sperm flagella", *Human Reproduction*, 33(10), pp. 1973-1984. doi:10.1093/HUMREP/DEY264.
- Martins, A. D., Bernardino, R. L., Neuhaus-Oliveira, A., Sousa, M., Sá, R., Alves, M. G. and Oliveira, P. F. (2014) "Physiology of Na⁺/H⁺ exchangers in the male reproductive tract: Relevance for male fertility", *Biology of Reproduction*, 91(1), pp. 11-12. doi:10.1095/biolreprod.114.118331.
- Masoudi, R., Zare Shahneh, A., Towhidi, A., Kohram, H., Akbarisharif, A. and Sharafi, M. (2017) "Fertility response of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen-thawed semen", *Cryobiology*, 74, pp. 77-80. doi:10.1016/j.cryobiol.2016.11.012.
- Masud, A. J., Kastaniotis, A. J., Rahman, M. T., Autio, K. J. and Hiltunen, J. K. (2019) "Mitochondrial acyl carrier protein (ACP) at the interface of metabolic state sensing and mitochondrial function", *BBA - Molecular Cell Research*, 1866(118540), pp. 1-14. doi:10.1016/J.BBAMCR.2019.118540.
- Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Tamayo-Canul, J., López-Urueña, E., de Paz, P., Anel, L., Martínez-Pastor, F. and Álvarez, M. (2014) "Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: Effect of temperature,

- extender and storage time", *Animal Reproduction Science*, 151(3-4), pp. 137-147. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2014.10.006.
- Mata-Campuzano, M., Soleilhavoup, C., Tsikis, G., Martinez-Pastor, F., de Graaf, S. P. and Druart, X. (2015) "Motility of liquid stored ram spermatozoa is altered by dilution rate independent of seminal plasma concentration", *Animal Reproduction Science*, 162, pp. 31-36. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2015.09.004.
- Matás, C., Decuadro, G., Martínez-Miró, S. and Gadea, J. (2007) "Evaluation of a cushioned method for centrifugation and processing for freezing boar semen", *Theriogenology*, 67, pp. 1087-1091. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.11.010.
- Maxwell, W. M. C., Evans, G., Mortimer, S. T., Gillan, L., Gellatly, E. S. and McPhie, C. A. (1999) "Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma", *Reproduction, Fertility and Development*, 11(2), pp. 123-126. doi:10.1071/rd99046.
- Maxwell, W. M. C. and Johnson, L. A. (1997) "Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation", *Theriogenology*, 48, pp. 209-219. doi:10.1016/S0093-691X(97)84068-X.
- Maxwell, W. M. C. and Salomon, S. (1993) "Liquid storage of ram semen: A review", *Reproduction, Fertility and Development*, 5(6), pp. 613-638. doi:10.1071/RD9930613.
- Maxwell, W., Welch, G. and Johnson, L. (1996) "Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma", *Reproduction, Fertility and Development*, 8(8), pp. 1165-1178. doi:10.1071/RD9961165.
- Medrano, A., Fernández-Novell, J. M., Ramió, L., Alvarez, J., Goldberg, E., Rivera, M. M., Guinovart, J. J., Rigau, T. and Rodríguez-Gil, J. E. (2006) "Utilization of citrate and lactate through a lactate dehydrogenase and ATP-regulated pathway in boar spermatozoa", *Molecular Reproduction and Development*, 73(3), pp. 369-378. doi:10.1002/MRD.20414.
- Melean, M., Ibanescu, I., Pieper, L., Goebel, H., Leiding, C. and Bollwein, H. (2022) "Impact of a prolonged equilibration period prior to freezing on sperm quality and fertility of AI bulls.", *Animal Reproduction Science*, 247, p. 107133. doi:10.1016/j.anireprosci.2022.107133.
- Moore, A. I., Squires, E. L. and Graham, J. K. (2005) "Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa", *Theriogenology*, 63, pp. 2372-2381. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.05.032.
- Mori, E., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S., Mori, T. and Takasaki, S. (2012) "Purification of N-acetyllactosamine-binding activity from the porcine sperm membrane: Possible involvement of an ADAM complex in the carbohydrate-binding activity of sperm", *Journal of Reproduction and Development*, 58(1), pp. 117-125. doi:10.1262/jrd.11-108N.
- Mortimer, D. (1991) "Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of *in-vitro* fertilization", *Human Reproduction*, 6(2), pp. 173-176. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a137300.
- Mortimer, D. (1994) "Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity", *Reproduction, Fertility and Development*, 6(1), pp. 25-31. doi:10.1071/RD9940025.
- Mortimer, S. (1997) "A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals", *Human Reproduction Update*, 3(5), pp. 403-439.

doi:10.1093/humupd/3.5.403.

- Ben moula, A. and El Amiri, B. (2022) "Factors influencing seminal plasma composition and its relevance to succeed sperm technology in sheep: An updated review", *Small Ruminant Research*, 215(106759), pp. 1-10. doi:10.1016/j.smallrumres.2022.106759.
- Muhammad Aslam, M. K., Sharma, V. K., Pandey, S., Kumaresan, A., Srinivasan, A., Datta, T. K., Mohanty, T. K. and Yadav, S. (2018) "Identification of biomarker candidates for fertility in spermatozoa of crossbred bulls through comparative proteomics", *Theriogenology*, 119, pp. 43-51. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.06.021.
- Muñoz-Blanco, T., Pérez-Pé, R. and Cebrián-Pérez, J. A. (2008) "Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress", *Reproduction in Domestic Animals*, 43(Suppl. 4), pp. 18-31. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01228.x.
- Murayama, E., Yamamoto, E., Kaneko, T., Shibata, Y., Inai, T. and Iida, H. (2008) "Tektin5, a new Tektin family member, is a component of the middle piece of flagella in rat spermatozoa", *Molecular Reproduction and Development*, 75(4), pp. 650-658. doi:10.1002/MRD.20804.
- Murphy, E. M., Eivers, B., O'Meara, C. M., Lonergan, P. and Fair, S. (2018) "Effect of increasing equilibration time of diluted bull semen up to 72 h prior to freezing on sperm quality parameters and calving rate following artificial insemination", *Theriogenology*, 108, pp. 217-222. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.11.034.
- Naing, W. S., Haron, W. A., Goriman, M. A. K., Yusoff, R., Bakar, M. Z. A., Sarsaifi, K., Bakar, M. M., Thein, M., Kyaw, T. and San, M. M. (2011) "Effect of seminal plasma removal, washing solutions, and centrifugation regimes on boer goat semen cryopreservation", *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 34(2), pp. 271-279.
- Naitana, S. and Ledda, S. (2020) "Reproductive technologies in sheep", in *Reproductive Technologies in Animals*. Academic Press, pp. 31-54. doi:10.1016/b978-0-12-817107-3.00003-5.
- Naqvi, S. M. K., Joshi, A., Bag, S., Pareek, S. R. and Mittal, J. P. (1998) "Cervical penetration and transcervical AI of tropical sheep (Malpura) at natural oestrus using frozen-thawed semen", *Small Ruminant Research*, 29(3), pp. 329-333. doi:10.1016/S0921-4488(97)00141-7.
- Natali, I. (2011) "Sperm preparation techniques for artificial insemination - Comparison of sperm washing, swim up, and density gradient centrifugation methods", in *Artificial Insemination in Farm Animals*. InTech, pp. 115-122. doi:10.5772/17026.
- Nicolas, M., Alvarez, M., Borragán, S., Martínez-Pastor, F., Chamorro, C. A., Alvarez-Rodríguez, M., de Paz, P. and Anel, L. (2012) "Evaluation of the qualitative and quantitative effectiveness of three media of centrifugation (Maxifreeze, Cushion Fluid Equine, and PureSperm 100) in preparation of fresh or frozen-thawed brown bear spermatozoa", *Theriogenology*, 77, pp. 1119-1128. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2011.10.016.
- Nicolas, M., Alvarez, M., Gomes-Alves, S., Mata-Campuzano, M., Borragán, S., Martínez-Pastor, F., de Paz, P. and Anel, L. (2011) "Effects on brown bear (*Ursus arctos*) spermatozoa freezability of different extender and dilution ratios used for pre-freezing centrifugation", *European Journal of Wildlife Research*, 57(2), pp. 259-266. doi:10.1007/s10344-010-0420-y.

- Nishimura, H., Cho, C., Branciforte, D. R., Myles, D. G. and Primakoff, P. (2001) "Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin B", *Developmental Biology*, 233(1), pp. 204-213. doi:10.1006/dbio.2001.0166.
- Nishimura, H., Kim, E., Nakanishi, T. and Baba, T. (2004) "Possible function of the ADAM1a/ADAM2 fertilin complex in the appearance of ADAM3 on the sperm surface", *Journal of Biological Chemistry*, 279(33), pp. 34957-34962. doi:10.1074/jbc.M314249200.
- Nomikos, M., Kashir, J. and Lai, F. A. (2017) "The role and mechanism of action of sperm PLC-zeta in mammalian fertilisation", *Biochemical Journal*, 474(21), pp. 3659-3673. doi:10.1042/BCJ20160521.
- Nomikos, M., Stamatiadis, P., Sanders, J. R., Beck, K., Calver, B. L., Buntwal, L., Lofty, M., Sideratou, Z., Swann, K. and Lai, F. A. (2017) "Male infertility-linked point mutation reveals a vital binding role for the C2 domain of sperm PLC ζ ", *Biochemical Journal*, 474(6), pp. 1003-1016. doi:10.1042/BCJ20161057.
- O'Hara, L., Hanrahan, J. P. P., Richardson, L., Donovan, A., Fair, S., Evans, A. C. O. C. O. O. and Lonergan, P. (2010) "Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm", *Theriogenology*, 73, pp. 541-549. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2009.10.009.
- Okano, T., Murase, T., Asano, M. and Tsubota, T. (2004) "Effects of final dilution rate, sperm concentration and times for cooling and glycerol equilibration on post-thaw characteristics of canine spermatozoa", *Journal of Veterinary Medical Science*, 66(11), pp. 1359-1364. doi:10.1292/jvms.66.1359.
- Ollero, M., Perez-Pe, R., Gargallo, I., Morlanes, S., Osada, J., Muino-Blanco, T. and Cebrian-Perez, J. A. (2000) "Separation of ram spermatozoa bearing X and Y chromosome by centrifugal countercurrent distribution in an aqueous two-phase system", *Journal of Andrology*, 21(6), pp. 921-928. doi:10.1002/j.1939-4640.2000.tb03423.x.
- Opuwari, C. S. and Henkel, R. R. (2016) "An update on oxidative damage to spermatozoa and oocytes", *BioMed Research International*, 2016(9540142), pp. 1-11. doi:10.1155/2016/9540142.
- Ortega-Ferrusola, C., Macías García, B., Gallardo-Bolaños, J. M., González-Fernández, L., Rodríguez-Martínez, H., Tapia, J. A. and Peña, F. J. (2009) "Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa", *Animal Reproduction Science*, 114(4), pp. 393-403. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.10.005.
- Ortega-Ferrusola, C., Martín Muñoz, P., Ortiz-Rodríguez, J. M., Anel-López, L., Balao da Silva, C., Álvarez, M., de Paz, P., Tapia, J. A., Anel, L., Silva-Rodríguez, A., Aitken, R. J., Gil, M. C., Gibb, Z. and Peña, F. J. (2019) "Depletion of thiols leads to redox deregulation, production of 4-hydroxynonenal and sperm senescence: a possible role for GSH regulation in spermatozoa", *Biology of Reproduction*, 100(4), pp. 1090-1107. doi:10.1093/biolre/i0y241.
- Ortega-Ferrusola, C., Sotillo-Galán, Y., Varela-Fernández, E., Gallardo-Bolaños, J. M., Muriel, A., González-Fernández, L., Tapia, J. A. and Peña, F. J. (2008) "Detection of "apoptosis-like" changes during the cryopreservation process in equine sperm", *Journal of Andrology*, 29(2), pp. 213-221. doi:10.2164/jandrol.107.003640.
- Padilla, A. W. and Foote, R. H. (1991) "Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa.", *Journal of Animal Science*, 69(8), pp. 3308-3313. doi:10.2527/1991.6983308x.

- Palacín, I., Yániz, J. L., Fantova, E., Blasco, M. E., Quintín-Casorrán, F. J., Sevilla-Mur, E. and Santolaria, P. (2012) "Factors affecting fertility after cervical insemination with cooled semen in meat sheep", *Animal Reproduction Science*, 132, pp. 139-144. doi:10.1016/j.anireprosci.2012.05.005.
- Palomo, M. J., García, W. and Tabarez, A. (2017) "Effect of seminal plasma and butylated hydroxytoluene (BHT) concentration on ram sperm freezability", *Small Ruminant Research*, 153, pp. 66-70. doi:10.1016/j.smallrumres.2017.05.010.
- Parrilla, I., Perez-Patiño, C., Li, J., Barranco, I., Padilla, L., Rodriguez-Martinez, H., Martinez, E. A. and Roca, J. (2019) "Boar semen proteomics and sperm preservation", *Theriogenology*, 137, pp. 23-29. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.05.033.
- Passarelli, M. da S., Pinoti Pavaneli, A. P., Mouro Ravagnani, G., Pasini Martins, M., Pedrosa, A. C., Maria Massami Kitamura Martins, S., Rocha, N. R. de A., Bittar Rigo, V. H., Yasui, G., Yeste, M. and de Andrade, A. F. C. (2020) "Effects of different equilibration times at 5 °C on boar sperm cryotolerance", *Animal Reproduction Science*, 219(106547), pp. 1-9. doi:10.1016/j.anireprosci.2020.106547.
- Paul, R. K., Balaganur, K., Bahire, S. V., Kumar, D. and Singh, R. (2018) "Supplementation of cauda epididymal plasma improves sperm characteristics following liquid preservation of ram semen at 3-5°C", *Reproduction, Fertility and Development*, 30(11), pp. 1389-1401. doi:10.1071/RD18063.
- Paul, Rajani K., Balaganur, K., Kumar, D. and Naqvi, S. M. K. (2018) "Modulation of seminal plasma content in extended semen improves the quality attributes of ram spermatozoa following liquid preservation at 3-5°C", *Reproduction in Domestic Animals*, 53(5), pp. 1200-1210. doi:10.1111/rda.13227.
- Paul, R. K., Balaganur, K., Kumar, D. and Singh, R. (2020) "Pre-freezing equilibration for 22 h improves post-thaw sperm functions in cryopreserved ram semen by reducing cholesterol efflux", *Cryobiology*, 96, pp. 76-84. doi:10.1016/j.cryobiol.2020.07.013.
- Paulenz, H., Söderquist, L., Pérez-Pé, R. and Andersen Berg, K. (2002) "Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen", *Theriogenology*, 57, pp. 823-836. doi:10.1016/S0093-691X(01)00683-5.
- Pavaneli, A. P. P., Passarelli, M. da S., de Freitas, F. V., Ravagnani, G. M., Torres, M. A., Martins, S. M. M. K., Yeste, M. and de Andrade, A. F. C. (2019) "Removal of seminal plasma prior to liquid storage of boar spermatozoa: A practice that can improve their fertilizing ability", *Theriogenology*, 125, pp. 79-86. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2018.10.020.
- Peddinti, D., Nanduri, B., Kaya, A., Feugang, J. M., Burgess, S. C. and Memili, E. (2008) "Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility", *BMC Systems Biology*, 2(19), pp. 1-14. doi:10.1186/1752-0509-2-19.
- Pellicer-Rubio, M. T. and Combarrous, Y. (1998) "Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60", *Journal of Reproduction and Fertility*, 112(1), pp. 95-105. doi:10.1530/JRF.0.1120095.
- Peña, F. J., Ortega Ferrusola, C. and Martín Muñoz, P. (2016) "New flow cytometry approaches in equine andrology", *Theriogenology*, 86, pp. 366-372. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2016.04.050.

- Peña, F. J., Saravia, F., Johannisson, A., Wallgren, M. and Rodríguez-Martínez, H. (2007) "Detection of early changes in sperm membrane integrity pre-freezing can estimate post-thaw quality of boar spermatozoa", *Animal Reproduction Science*, 97(1-2), pp. 74-83. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2005.12.014.
- Peña, F., Rodríguez Martínez, H., Tapia, J., Ortega-Ferrusola, C., González Fernández, L. and Macías García, B. (2009) "Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: A review", *Reproduction in Domestic Animals*, 44(2), pp. 345-349. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01211.x.
- Pereira, R., Sá, R., Barros, A. and Sousa, M. (2017) "Major regulatory mechanisms involved in sperm motility", *Asian Journal of Andrology*, 19, pp. 5-14. doi:10.4103/1008-682X.167716.
- Perez-Patiño, C., Barranco, I., Li, J., Padilla, L., Martínez, E. A., Rodríguez-Martínez, H., Roca, J. and Parrilla, I. (2019) "Cryopreservation differentially alters the proteome of epididymal and ejaculated pig spermatozoa", *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1791), pp. 1-19. doi:10.3390/ijms20071791.
- Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J. A. and Muíño-Blanco, T. (2001) "Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa", *Theriogenology*, 56, pp. 425-434. doi:10.1016/S0093-691X(01)00574-X.
- Petrunkina, A. M., Waberski, D., Günzel-Apel, A. R. and Töpfer-Petersen, E. (2007) "Determinants of sperm quality and fertility in domestic species", *Reproduction*, 134(1), pp. 3-17. doi:10.1530/REP-07-0046.
- Pickett, B. W., Sullivan, J. J., Byers, W. W., Pace, M. M. and Remmenga, E. E. (1975) "Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa", *Fertility and Sterility*, 26(2), pp. 167-174. doi:10.1016/S0015-0282(16)40938-6.
- Pini, Taylor, Leahy, T. and de Graaf, S. P. (2018) "Sublethal sperm freezing damage: Manifestations and solutions", *Theriogenology*, 118, pp. 172-181. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.06.006.
- Pini, T., Rickard, J. P., Leahy, T., Crossett, B., Druart, X. and de Graaf, S. P. (2018) "Cryopreservation and egg yolk medium alter the proteome of ram spermatozoa", *Journal of Proteomics*, 181, pp. 73-82.
- Plante, G., Lusignan, M. F., Lafleur, M. and Manjunath, P. (2015) "Interaction of milk proteins and Binder of Sperm (BSP) proteins from boar, stallion and ram semen", *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(92), pp. 1-13. doi:10.1186/s12958-015-0093-1.
- Plaza Davila, M., Martín Muñoz, P., Tapia, J. A., Ortega Ferrusola, C., Balao da Silva C, C. and Peña, F. J. (2015) "Inhibition of mitochondrial complex I leads to decreased motility and membrane integrity related to increased hydrogen peroxide and reduced ATP production, while the inhibition of glycolysis has less impact on sperm motility", *PLoS ONE*, 10(9), pp. 1-21. doi:10.1371/journal.pone.0138777.
- Potts, R. J., Notarianni, L. J. and Jefferies, T. M. (2000) "Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation", *Mutation Research*, 447(2), pp. 249-256. doi:10.1016/S0027-5107(99)00215-8.
- Promthep, K., Satitmanwiwat, S., Kitiyanant, N., Tantiwattanakul, P., Jirajaroenrat, K., Sitthigripong, R. and Singhapol, C. (2016) "Practical use of Percoll density gradient centrifugation on sperm sex determination in commercial dairy farm in

- Thailand", *Indian Journal of Animal Research*, 50, pp. 310-313. doi:10.18805/ijar.8427.
- Purdy, P. H. (2006) "The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5 °C prior to cryopreservation", *Animal Reproduction Science*, 93(1-2), pp. 114-123. doi:10.1016/j.anireprosci.2005.07.002.
- Purdy, P. H., Mocé, E., Stobart, R., Murdoch, W. J., Moss, G. E., Larson, B., Ramsey, S., Graham, J. K. and Blackburn, H. D. (2010) "The fertility of ram sperm held for 24 h at 5 °C prior to cryopreservation", *Animal Reproduction Science*, 118(2-4), pp. 231-235. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.06.014.
- Pursel, V. G., Johnson, L. A. and Rampacek, G. B. (1972) "Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock.", *Journal of Animal Science*, 34(2), pp. 278-283. doi:10.2527/jas1972.342278x.
- Quan, G. B., Wu, G. Q., Wang, Y. J., Li, D. J., Ma, Y. and Hong, Q. H. (2016) "Effects of the Tris, Tes, or skim milk based extender on in vitro parameters of ram spermatozoa during liquid storage", *Small Ruminant Research*, 134, pp. 14-21. doi:10.1016/j.smallrumres.2015.11.008.
- Quintero-Moreno, A., Miró, J., Teresa Rigau, A. and Rodríguez-Gil, J. E. (2003) "Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates", *Theriogenology*, 59, pp. 1973-1990. doi:10.1016/S0093-691X(02)01297-9.
- Rahamim Ben-Navi, L., Almog, T., Yao, Z., Seger, R. and Naor, Z. (2016) "A-Kinase Anchoring Protein 4 (AKAP4) is an ERK1/2 substrate and a switch molecule between cAMP/PKA and PKC/ERK1/2 in human spermatozoa", *Scientific Reports*, 6(37922), pp. 1-13. doi:10.1038/srep37922.
- Rajabi-Toustani, R., Mehr, M. R. A. and Motamedi-Mojdehi, R. (2021) "Reduction of seminal plasma concentration can decrease detrimental effects of seminal plasma on chilled ram spermatozoa", *Animal Reproduction*, 18(1), pp. 1-12. doi:10.1590/1984-3143-AR2020-0211.
- Ramón, M., Pérez-Guzmán, M. D., Jiménez-Rabadán, P., Estesó, M. C., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Anel-López, L., Soler, A. J., Fernández-Santos, M. R. and Garde, J. J. (2013) "Sperm cell population dynamics in ram semen during the cryopreservation process", *PLoS ONE*. Edited by S. Schlatt, 8(3), pp. 1-8. doi:10.1371/journal.pone.0059189.
- Ramón, M., Soler, A. J., Ortiz, J. A., García-Alvarez, O., Maroto-Morales, A., Roldan, E. R. S. and Garde, J. J. (2013) "Sperm population structure and male fertility: An intraspecific study of sperm design and velocity in Red Deer", *Biology of Reproduction*, 89(5), pp. 1-7. doi:10.1095/biolreprod.113.112110.
- Rhee, S. G. (2001) "Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C", *Annual Review of Biochemistry*, 70, pp. 281-312. doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.281.
- Ribeiro, S. C., Sartorius, G., Pletscher, F., De Geyter, M., Zhang, H. and De Geyter, C. (2013) "Isolation of spermatozoa with low levels of fragmented DNA with the use of flow cytometry and sorting", *Fertility and Sterility*, 100(3), pp. 686-694. doi:10.1016/J.FERTNSTERT.2013.05.030.
- Ricci, M. and Breed, W. G. (2005) "Morphogenesis of the fibrous sheath in the marsupial spermatozoon", *Journal of Anatomy*, 207(2), pp. 155-164. doi:10.1111/J.1469-7580.2005.00437.X.
- Rickard, J. P. P., Leahy, T., Soleilhavoup, C., Tsikis, G., Labas, V., Harichaux, G.,

- Lynch, G. W. W., Druart, X. and de Graaf, S. P. P. (2015) "The identification of proteomic markers of sperm freezing resilience in ram seminal plasma", *Journal of Proteomics*, 126, pp. 303-311. doi:10.1016/j.jprot.2015.05.017.
- Rickard, J. P., Pini, T., Soleilhavoup, C., Cognie, J., Bathgate, R., Lynch, G. W., Evans, G., Maxwell, W. M. C., Druart, X. and De Graaf, S. P. (2014) "Seminal plasma aids the survival and cervical transit of epididymal ram spermatozoa", *Reproduction*, 148(5), pp. 469-478. doi:10.1530/REP-14-0285.
- Rigau, T., Farré, M., Ballester, J., Mogas, T., Pea, A. and Rodríguez-Gil, J. E. (2001) "Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates", *Theriogenology*, 56, pp. 801-815. doi:10.1016/S0093-691X(01)00609-4.
- Rigby, S. L., Brinsko, S. P., Cochran, M., Blanchard, T. L., Love, C. C. and Varner, D. D. (2001) "Advances in cooled semen technologies: Seminal plasma and semen extender", *Animal Reproduction Science*, 68(3-4), pp. 171-180. doi:10.1016/S0378-4320(01)00154-3.
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D. and de Kruif, A. (2002) "Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa", *Theriogenology*, 57, pp. 1669-1681. doi:10.1016/S0093-691X(02)00663-5.
- Ritar, A. J. and Salamon, S. (1982) "Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat", *Australian Journal of Biological Sciences*, 35(3), pp. 305-312. doi:10.1071/BI9820305.
- Rizkallah, N., Chambers, C. G., de Graaf, S. P. and Rickard, J. P. (2022) "Factors affecting the survival of ram spermatozoa during liquid storage and options for improvement", *Animals*, 12(244), pp. 1-18. doi:10.3390/ani12030244.
- Robertson, S. A. (2005) "Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract", *Cell and Tissue Research*, 322(1), pp. 43-52. doi:10.1007/s00441-005-1127-3.
- Robertson, S. A. (2007) "Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: Lessons from rodents and pigs", *Journal of Animal Science*, 85(Suppl. 13), pp. 36-44. doi:10.2527/JAS.2006-578.
- Rodríguez-Gil, J. E. (2006) "Mammalian sperm energy resources management and survival during conservation in refrigeration", *Reproduction in Domestic Animals*, 41(Suppl. 2), pp. 11-20. doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00765.x.
- Rodríguez-Martínez, H. (2003) "Laboratory semen assessment and prediction of fertility: Still utopia?", *Reproduction in Domestic Animals*, 38(4), pp. 312-318. doi:10.1046/j.1439-0531.2003.00436.x.
- Roostaee-Ali Mehr, M., Chambary, B. and Ghavi Hossein-Zadeh, N. (2013) "Effect of different diluents and storage time on field fertility of cooled ram semen after vaginal insemination", *Small Ruminant Research*, 115(1-3), pp. 82-85. doi:10.1016/j.smallrumres.2013.09.004.
- Rota, A., Magelli, C., Panzani, D. and Camillo, F. (2008) "Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiatina donkey spermatozoa", *Theriogenology*, 69, pp. 176-185. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.09.003.
- Rothschild, L. (1948) "The activity of ram spermatozoa", *Journal of Experimental Biology*, 25(3), pp. 219-226.

- Roy, A., Yan, W., Burns, K. H. and Matzuk, M. M. (2004) "Tektin3 encodes an evolutionarily conserved putative testicular microtubules-related protein expressed preferentially in male germ cells", *Molecular Reproduction and Development*, 67(3), pp. 295-302. doi:10.1002/MRD.20025.
- Said, T., Agarwal, A., Grunewald, S., Rasch, M., Baumann, T., Kriegel, C., Li, L., Glander, H.-J., Thomas Jr., A. J. and Paasch, U. (2006) "Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: An *in vitro* model", *Biology of Reproduction*, 74(3), pp. 530-537. doi:10.1095/biolreprod.105.046607.
- Salamon, S. and Maxwell, W. M. . (1995) "Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement", *Animal Reproduction Science*. Elsevier, 38(1-2), pp. 1-36. doi:10.1016/0378-4320(94)01328-J.
- Salamon, S. and Maxwell, W. M. . M. C. (2000) "Storage of ram semen", *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), pp. 77-111. doi:10.1016/S0378-4320(00)00155-X.
- Samper, J. C. and Plough, T. (2010) "Techniques for the insemination of low doses of stallion sperm", *Reproduction in Domestic Animals*, 45(Suppl. 2), pp. 35-39. doi:10.1111/J.1439-0531.2010.01632.X.
- Sánchez-Partida, L. G., Windsor, D. P., Eppleston, J., Setchell, B. P. and Maxwell, W. M. C. (1999) "Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen", *Journal of Andrology*, 20(2), pp. 280-288. doi:10.1002/j.1939-4640.1999.tb02519.x.
- Santiago-Moreno, J., Esteso, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Delgadillo, J. A. and López-Sebastián, A. (2017) "Seminal plasma removal by density-gradient centrifugation is superior for goat sperm preservation compared with classical sperm washing", *Animal Reproduction Science*, 181, pp. 141-150. doi:10.1016/j.anireprosci.2017.04.002.
- Santiago-Moreno, J., Esteso, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Rodríguez, E. and López-Sebastián, A. (2014) "Sperm selection by Capripure® density-gradient centrifugation versus the dextran swim-up procedure in wild mountain ruminants", *Animal Reproduction Science*, 149(3-4), pp. 178-186. doi:10.1016/j.anireprosci.2014.07.003.
- Santolaria, P., Palacin, I. and Yaniz, J. (2011) "Management factors affecting fertility in sheep", in *Artificial Insemination in Farm Animals*. InTech, pp. 167-190. doi:10.5772/18013.
- Schäfer, J., Waberski, D., Jung, M. and Schulze, M. (2017) "Impact of holding and equilibration time on post-thaw quality of shipped boar semen", *Animal Reproduction Science*, 187, pp. 109-115. doi:10.1016/j.anireprosci.2017.10.014.
- Sexton, T. J. (1973) "Effect of centrifugation and repeated washing on the fertilizing capacity of fowl spermatozoa", *Journal of Reproduction and Fertility*, 32(1), pp. 101-104. doi:10.1530/jrf.0.0320101.
- Shamsadin, R., Adham, I. M., Nayernia, K., Heinlein, U. A. O., Oberwinkler, H. and Engel, W. (1999) "Male mice deficient for germ-cell cyritestin are infertile", *Biology of Reproduction*, 61(6), pp. 1445-1451. doi:10.1095/biolreprod61.6.1445.
- Shekarriz, M., DeWire, D. M., Thomas, A. J. and Agarwal, A. (1995) "A method of human semen centrifugation to minimize the latrogenic sperm injuries caused by

- reactive oxygen species", *European Urology*, 28(1), pp. 31-35. doi:10.1159/000475016.
- Shi, L., Jin, T., Hu, Y., Ma, Z., Niu, H. and Ren, Y. (2020) "Effects of reduced glutathione on ram sperm parameters, antioxidant status, mitochondrial activity and the abundance of hexose transporters during liquid storage at 5 °C", *Small Ruminant Research*, 189(106139), pp. 1-8. doi:10.1016/j.smallrumres.2020.106139.
- Shimada, K., Park, S., Miyata, H., Yu, Z., Morohoshi, A., Oura, S., Matzuk, M. M. and Ikawa, M. (2021) "ARMC12 regulates spatiotemporal mitochondrial dynamics during spermiogenesis and is required for male fertility", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(6), pp. 1-12. doi:10.1073/PNAS.2018355118/VIDEO-2.
- Sieme, H., Martinsson, G., Rauterberg, H., Walter, K., Aurich, C., Petzoldt, R. and Klug, E. (2003) "Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen", *Reproduction in Domestic Animals*, 38(2), pp. 134-140. doi:10.1046/J.1439-0531.2003.00416.X.
- Singer, W. D., Brown, H. A. and Sternweis, P. C. (1997) "Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D", *Annual Review of Biochemistry*, 66, pp. 475-509. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.475.
- Sinha Hikim, A. P., Wang, C., Lue, Y., Johnson, L., Wang, X.-H. and Swerdloff, R. S. (1998) "Spontaneous germ cell apoptosis in humans: Evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death", *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(1), pp. 152-156. doi:10.1210/jcem.83.1.4485.
- Skindersoe, M. E. and Kjaerulff, S. (2014) "Comparison of three thiol probes for determination of apoptosis-related changes in cellular redox status", *Cytometry Part A*, 85A(2), pp. 179-187. doi:10.1002/CYTO.A.22410.
- Söderquist, L., Lundeheim, N. and Nilsson, B. (1999) "Assessment of fertility after using different procedures to thaw ram spermatozoa frozen in mini straws", *Reproduction in Domestic Animals*, 34(2), pp. 61-66. doi:10.1111/j.1439-0531.1999.tb01384.x.
- Sousa, A. P., Amaral, A., Baptista, M., Tavares, R., Campo, P. C., Peregrín, P. C., Freitas, A., Paiva, A., Almeida-Santos, T. and Ramalho-Santos, J. (2011) "Not all sperm are equal: Functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential", *PLoS ONE*, 6(3), pp. 1-11. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0018112.
- Swelum, A. A., Saadeldin, I. M., Bahadi, M., Afifi, M., Al-Mutary, M. and Alowaimer, A. N. (2018) "The effect of heterologous seminal plasma from ram, buck or camel on the freezability of ram semen", *Veterinarni Medicina*, 63(11), pp. 500-512. doi:10.17221/52/2018-VETMED.
- Takao, T., Mitchell, W. M., Tracey, D. E., de Souza, E. B. and de Souza, E. B. (1990) "Identification of interleukin-1 receptors in mouse testis", *Endocrinology*, 127(1), pp. 251-258. doi:10.1210/ENDO-127-1-251.
- Takeda, S., Igarashi, T., Mori, H. and Araki, S. (2006) "Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold", *The EMBO Journal*, 25(11), pp. 2388-2396. doi:10.1038/sj.emboj.7601131.
- Takiguchi, H., Murayama, E., Kaneko, T., Kurio, H., Toshimori, K. and Iida, H. (2011)

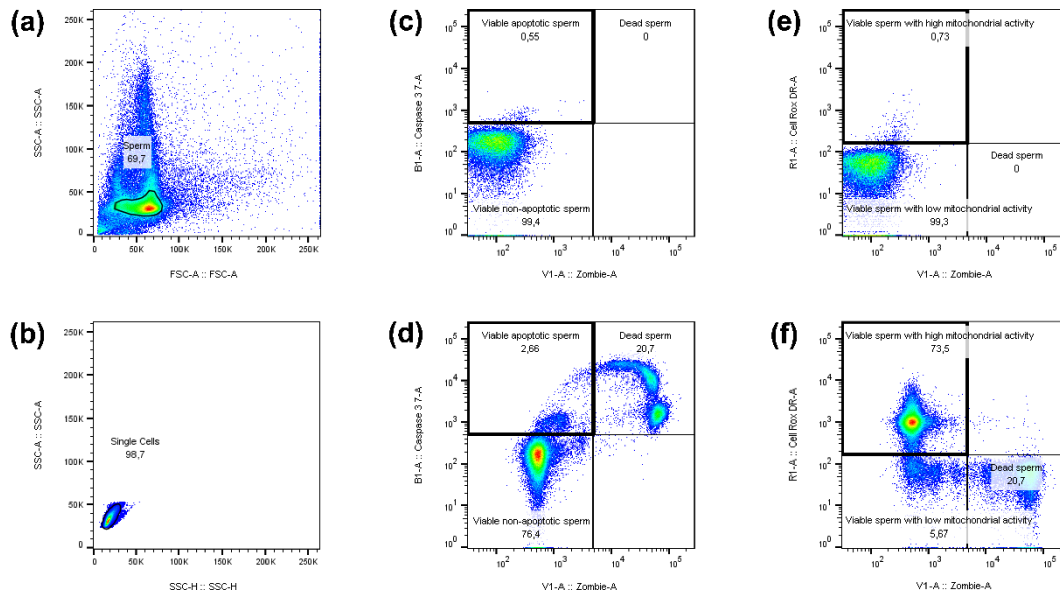
- "Characterization and subcellular localization of Tektin 3 in rat spermatozoa", *Molecular Reproduction and Development*, 78(8), pp. 611-620. doi:10.1002/MRD.21352.
- Tapia, J., Macias-Garcia, B., Miro-Moran, A., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G., Peña, F. and Aparicio, I. (2012) "The membrane of the mammalian spermatozoa: much more than an inert envelope", *Reproduction in Domestic Animals*, 47(Suppl. 3), pp. 65-75. doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02046.x.
- Tardif, S., Laforest, J. P., Cormier, N. and Bailey, J. L. (1999) "The importance of porcine sperm parameters on fertility *in vivo*", *Theriogenology*, 52, pp. 447-459. doi:10.1016/S0093-691X(99)00142-9.
- Thurston, L. M., Watson, P. F., Mileham, A. J. and Holt, W. V. (2001) "Morphologically distinct sperm subpopulations defined by fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation", *Journal of Andrology*, 22(3), pp. 382-394. doi:10.1002/j.1939-4640.2001.tb02194.x.
- Tibary, A. and Manar, S. (2018) "Cryo-preservation of sperm and embryos in small ruminants", *Revue Marocaine Des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 6, pp. 195-210.
- van Tilburg, M. F., Salles, M. G. F., Silva, M. M., Moreira, R. A., Moreno, F. B., Monteiro-Moreira, A. C. O., Martins, J. A. M., Cândido, M. J. D., Araújo, A. A. and Moura, A. A. A. (2014) "Semen variables and sperm membrane protein profile of Saanen bucks (*Capra hircus*) in dry and rainy seasons of the northeastern Brazil (3°S)", *International Journal of Biometeorology*, 59(5), pp. 561-573. doi:10.1007/s00484-014-0869-6.
- Torra-Massana, M., Cornet-Bartolomé, D., Barragán, M., Durban, M., Ferrer-Vaquer, A., Zambelli, F., Rodriguez, A., Oliva, R. and Vassena, R. (2019) "Novel phospholipase C zeta 1 mutations associated with fertilization failures after ICSI", *Human Reproduction*, 34(8), pp. 1494-1504. doi:10.1093/humrep/dez094.
- Tsakmakidis, I. A. (2010) "Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques", *Small Ruminant Research*, 92(1-3), pp. 126-130. doi:10.1016/j.smallrumres.2010.04.017.
- Twigg, J., Irvine, D. S., Houston, P., Fulton, N., Michael, L. and Aitken, R. J. (1998) "Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma.", *Molecular Human Reproduction*, 4(5), pp. 439-445. doi:10.1093/MOLEHR/4.5.439.
- Ungerfeld, R. and Rubianes, E. (2002) "Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes", *Small Ruminant Research*, 46(1), pp. 63-66. doi:10.1016/S0921-4488(02)00105-0.
- Vadnais, M. L. and Althouse, G. C. (2011) "Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm", *Theriogenology*, 76, pp. 1508-1516. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2011.06.021.
- Valcarce, D. G. and Robles, V. (2016) "Effect of captivity and cryopreservation on ROS production in *Solea senegalensis* spermatozoa", *Reproduction*, 152(5), pp. 439-446. doi:10.1530/REP-16-0270.
- Vasan, S. S. (2011) "Semen analysis and sperm function tests: How much to test", *Indian Journal of Urology*, 27(1), pp. 41-48. doi:10.4103/0970-1591.78424.
- Vidament, M., Ecot, P., Noue, P., Bourgeois, C., Magistrini, M. and Palmer, E. (2000)

- "Centrifugation and addition of glycerol at 22 °C instead of 4 °C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa", *Theriogenology*, 54, pp. 907-919. doi:10.1016/S0093-691X(00)00401-5.
- Vishwanath, R. and Shannon, P. (2000) "Storage of bovine semen in liquid and frozen state", *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), pp. 23-53. doi:10.1016/S0378-4320(00)00153-6.
- Vozaf, J., Makarevich, A. V., Balazi, A., Vasicek, J., Svoradova, A., Olexikova, L. and Chrenek, P. (2021) "Cryopreservation of ram semen: Manual versus programmable freezing and different lengths of equilibration", *Animal Science Journal*, 92(e13670), pp. 1-9. doi:10.1111/asj.13670.
- Wang, X., Zhang, Y., Sun, H. L., Wang, L. T., Li, X. F., Wang, F., Wang, Y. L. and Li, Q. C. (2021) "Factors affecting artificial insemination pregnancy outcome", *International Journal of General Medicine*, 14, pp. 3961-3969. doi:10.2147/IJGM.S312766.
- Watson, P. F. (2000) "The causes of reduced fertility with cryopreserved semen", *Animal Reproduction Science*, 60-61, pp. 481-492. doi:10.1016/S0378-4320(00)00099-3.
- Welch, E. J., Jones, B. W. and Scott, J. D. (2010) "Networking with AKAPs: Context-dependent regulation of anchored enzymes", *Molecular Interventions*, 10(2), pp. 86-97. doi:10.1124/MI.10.2.6.
- Wolkowicz, M. J., Naaby-Hansen, S., Gamble, A. R., Reddi, P. P., Flickinger, C. J. and Herr, J. C. (2002) "Tektin B1 demonstrates flagellar localization in human sperm", *Biology of Reproduction*, 66(1), pp. 241-250. doi:10.1095/BIOLREPROD66.1.241.
- Wongtawan, T., Saravia, F., Wallgren, M., Caballero, I. and Rodríguez-Martínez, H. (2006) "Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses", *Theriogenology*, 65, pp. 773-787. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.07.003.
- Wrench, N., Pinto, C. R. F., Klinefelter, G. R., Dix, D. J., Flowers, W. L. and Farin, C. E. (2010) "Effect of season on fresh and cryopreserved stallion semen", *Animal Reproduction Science*, 119(3-4), pp. 219-227. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.02.007.
- Wu, H., Wang, J., Cheng, H., Gao, Y., Liu, W., Zhang, Z., Jiang, H., Li, W., Zhu, F., Lv, M., Liu, C., Tan, Q., Zhang, X., Wang, C., Ni, X., Chen, Y., Song, B., Zhou, P., Wei, Z., Zhang, F., He, X. and Cao, Y. (2020) "Patients with severe asthenoteratospermia carrying SPAG6 or RSPH3 mutations have a positive pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection", *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(4), pp. 829-840. doi:10.1007/s10815-020-01721-w.
- Xiang, M., Feng, M., Muend, S. and Rao, R. (2007) "A human Na⁺/H⁺ antiporter sharing evolutionary origins with bacterial NhaA may be a candidate gene for essential hypertension", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(47), pp. 18677-18681. doi:10.1073/PNAS.0707120104.
- Yanagimachi, R. (1970) "The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation", *Reproduction*, 23(1), pp. 193-196. doi:10.1530/jrf.0.0230193.
- Yanagimachi, R. (1972) "Fertilization of guinea pig eggs in vitro", *The Anatomical Record*, 174(1), pp. 9-19. doi:10.1002/ar.1091740103.
- Yang, P., Diener, D. R., Yang, C., Kohno, T., Pazour, G. J., Dienes, J. M., Agrin, N. S.,

- King, S. M., Sale, W. S., Kamiya, R., Rosenbaum, J. L. and Witman, G. B. (2006) "Radial spoke proteins of *Chlamydomonas* flagella", *Journal of Cell Science*, 119(6), pp. 1165-1174. doi:10.1242/jcs.02811.
- Yániz, J. L., Palacín, I., Vicente-Fiel, S., Sánchez-Nadal, J. A. and Santolaria, P. (2015) "Sperm population structure in high and low field fertility rams", *Animal Reproduction Science*, 156, pp. 128-134. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.03.012.
- Yániz, J. L., Santolaria, P., Marco-Aguado, M. A. and López-Gatius, F. (2008) "Use of image analysis to assess the plasma membrane integrity of ram spermatozoa in different diluents", *Theriogenology*, 70, pp. 192-198. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.03.002.
- Yeste, M., Recuero, S., Maside, C., Salas-Huetos, A., Bonet, S. and Pinart, E. (2021) "Blocking NHE channels reduces the ability of *in vitro* capacitated mammalian sperm to respond to progesterone stimulus", *International Journal of Molecular Sciences*, 22, p. 12646. doi:10.3390/ijms222312646.
- Yi, Y. J., Cheon, Y. M. and Park, C. S. (2002) "Effect of N-acetyl-d-glucosamine, and glycerol concentration and equilibration time on acrosome morphology and motility of frozen-thawed boar sperm", *Animal Reproduction Science*, 69(1-2), pp. 91-97. doi:10.1016/S0378-4320(01)00175-0.
- Yuan, R., Primakoff, P. and Myles, D. G. (1997) "A role for the disintegrin domain of cyritestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion", *The Journal of Cell Biology*, 137(1), pp. 105-112. doi:10.1083/JCB.137.1.105.
- Zini, A., Finelli, A., Phang, D. and Jarvi, K. (2000) "Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity", *Urology*, 56(6), pp. 1081-1084. doi:10.1016/S0090-4295(00)00770-6.

Anexos

Anexo de la Publicación I



Additional file 1. Representative cytograms of the assays reported in the present study. **(a)** Dot plot showing the region gated corresponds to sperm. **(b)** Events gated in **(a)** are now plotted against SSC-H and SSC-A for select single cells, and this region was further used to set the remaining populations of interest. **(c)** Unstained control for viability and apoptosis. **(d)** Representative dot plot confronting Zombie Violet™ (X axis) versus CellEvent™ Caspase-3/7 Green fluorescence (Y axis), which evidences three subpopulations: (1) viable non-apoptotic sperm negative for Zombie Violet™ and CellEvent™ Caspase-3/7 Green, (2) viable apoptotic sperm negative for Zombie Violet™ and positive for CellEvent™ Caspase-3/7 Green (subpopulation of interest), and (3) dead sperm positive for Zombie Violet™ and CellEvent™ Caspase-3/7 Green. **(e)** Unstained control for viability and mitochondrial functionality. **(f)** Representative cytogram showing relation between Zombie Violet™ (X axis) and CellROX™ Deep Red (Y axis) which allowed us to detect three subpopulations: (1) viable sperm with low mitochondrial activity negative for Zombie Violet™ and CellROX™ Deep Red, (2) viable sperm with high mitochondrial activity negative for Zombie Violet™ and positive for CellROX™ Deep Red (subpopulation of interest), and (3) dead sperm positive for Zombie Violet™ and CellROX™ Deep Red.

Otras Contribuciones Científicas

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha participado en los siguientes artículos científicos que no componen los resultados incluidos en la presente memoria:

- Mercedes Alvarez, Luis Anel-Lopez, Juan Carlos Boixo, César Chamorro, Marta Neila-Montero, Rafael Montes-Garrido, Paulino de Paz y Luis Anel. (2019). *Current challenges in sheep artificial insemination: A particular insight. Reproduction in Domestic Animals*, 54 (Suppl. 4), 32-40.
<https://doi.org/10.1111/rda.13523>
- Marta F. Riesco, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Rafael Montes-Garrido, Mercedes Alvarez, Paulino de Paz y Luis Anel. (2020). *ProAKAP4 as a novel molecular marker of sperm quality in ram: An integrative study in fresh, cooled and cryopreserved sperm. Biomolecules*, 10, 1046.
<https://doi.org/10.3390/biom10071046>
- Marta F. Riesco, Mercedes Alvarez, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Rafael Montes-Garrido, Juan Carlos Boixo, Paulino de Paz y Luis Anel. (2021). *Multiparametric study of antioxidant effect on ram sperm cryopreservation - From field trials to research bench. Animals*, 11, 283.
<https://doi.org/10.3390/ani11020283>
- Luis Anel-Lopez, Marta F. Riesco, Rafael Montes-Garrido, Marta Neila-Montero, Juan Carlos Boixo, César Chamorro, Cristina Ortega-Ferrusola, Ana Carvajal, Jose R. Altonaga, Paulino de Paz, Mercedes Alvarez y Luis Anel. (2021). *Comparing the effect of different antibiotics in frozen-thawed ram sperm: Is it possible to avoid their addition? Frontiers in Veterinary Science*, 8:656937.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.656937>

- Mohamed A. A. Hassan, Ramy K. A. Sayed, Mohammed Abdelsabour-Khalad, Enas A. Abd-Elhafez, Luis Anel-Lopez, Marta F. Riesco, Cristina Ortega-Ferrusola, Rafael Montes-Garrido, Marta Neila-Montero, Luis Anel y Mercedes Alvarez. (2022). *Morphological and ultrasonographic characterization of the three zones of suprastesticular region of testicular artery in Assaf rams. Scientific Reports*, 12:8334.

<https://doi.org/10.1038/s41598-022-12243-z>

- Cristina Palacin-Martinez, Mercedes Alvarez, Rafael Montes-Garrido, Marta Neila-Montero, Luis Anel-Lopez, Paulino de Paz, Luis Anel y Marta F. Riesco. (2022). *Frequency of semen collection affects ram sperm cryoresistance. Animals*, 12, 1492.

<https://doi.org/10.3390/ani12121492>

- Rafael Montes-Garrido, Marta F. Riesco, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Juan Carlos Boixo, Paulino de Paz, Cristina Ortega-Ferrusola, Mohamed A. A. Hassan, Luis Anel y Mercedes Alvarez. (2022). *Application of ultrasound technique to evaluate the testicular function and its correlation to the sperm quality after different collection frequency in rams. Frontiers in Veterinary Science*, 9:1035036.

<https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1035036>

- Rafael-Montes Garrido, Luis Anel-Lopez, Marta F. Riesco, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Cristina Soriano-Úbeda, Juan Carlos Boixo, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez. (2023). *Does size matter? Testicular volume and its predictive ability of sperm production in rams. Animals*, 13, 3204.

<https://doi.org/10.3390/ani13203204>

- Aderson M. Viana Neto, Denise D. Guerreiro, Jorge A. M. Martins, Fabio R. Vasconcelos, Révila B. F. Melo, Ana Luiza M. C. S. Velho, Marta Neila-Montero, Rafael Montes-Garrido, Celso S. Nagano, Airton A. Araújo y Arlindo A. Moura. (2024). *Sperm traits and seminal plasma proteome of locally adapted hairy rams subjected to intermittent scrotal insulation. Animal Reproduction Science*, 263:107439.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2024.107439>

- Cristina Palacin-Martinez, Luis Anel-Lopez, Mercedes Alvarez, Marta Neila-Montero, Rafael Montes-Garrido, Cristina Soriano-Úbeda, Paulino de Paz, Luis Anel y Marta F. Riesco. (2024). *The characterization of CellROX™ probes could be a crucial factor in ram sperm quality assessment. Frontiers in Veterinary Science*, 11:1342808.

<https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1342808>

Además, se han presentado las siguientes Comunicaciones a Congresos:

23th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. San Petersburgo, Rusia. Septiembre de 2019.

Póster. *Recovering sperm motility after thawing in Gaur (Bos gaurus) epididymal sperm.* Marta Neila-Montero, Mercedes Alvarez, Rafael Montes-Garrido, Santiago Borragán, Patricia Manrique, Fernando J. Peña, Luis Anel, Paulino de Paz y Luis Anel-Lopez.

Póster. *A preliminary study to calculate ram testicular volume using caliber and different formulas.* Rafael Montes-Garrido, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Juan Carlos Boixo, Cristina Ortega-Ferrusola, Cesar Chamorro, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez.

15º Congreso Internacional de la Asociación Española de Reproducción Animal. Toledo, España. Noviembre de 2019.

Póster. *Centrifugal forces effect in physiological status of ram sperm.* Marta Neila-Montero, Mercedes Alvarez, Rafael Montes-Garrido, Juan Carlos Boixo, Fernando J. Peña, Luis Anel, Paulino de Paz y Luis Anel-Lopez.

Póster. *Relationship between the testicular volume and the Pulse Doppler of the testicular artery according to the rams age.* Rafael Montes-Garrido, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Juan Carlos Boixo, Cristina Ortega-Ferrusola, Cesar Chamorro, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez.

24th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. Tesalónica, Grecia. Octubre de 2021.

Póster. *Establishment of a fast-refrigeration protocol to improve pelletization degree avoiding damage induction in ram sperm centrifugation.* Marta Neila-Montero, Mercedes Alvarez, Luis Anel-Lopez, Rafael Montes-Garrido, Juan Carlos Boixo, Paulino de Paz, Luis Anel y Marta F. Riesco.

Póster. *Establishment of innovative biomarkers to optimize cooling and cryopreservation protocols in ram sperm.* Marta F. Riesco, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Rafael Montes-Garrido, Mercedes Alvarez, Juan Carlos Boixo, Paulino de Paz, Luis Anel y Luis Anel-Lopez.

Póster. *Preliminary characterization of morphometry and Doppler parameters in the post-surgical monitoring of laparoscopic vasectomy in ram.* Rafael Montes-Garrido, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Juan Carlos Boixo, Cristina Ortega-Ferrusola, Cesar Chamorro, Marta F. Riesco, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez.

19th International Congress on Animal Reproduction. Bolonia, Italia. Junio de 2022.

Póster. *High dilution rates modify the movement pattern of ram sperm.* Marta Neila-Montero, Mercedes Alvarez, Rafael Montes-Garrido, Juan Carlos Boixo, Luis Anel, Paulino de Paz, Luis Anel-Lopez y Marta F. Riesco.

Póster. *The characterization of ROS localization could be a crucial factor in ram sperm quality determination.* Cristina Palacin-Martinez, Marta Neila-Montero, Rafael Montes-Garrido, Luis Anel-Lopez, Mercedes Alvarez, Juan Carlos Boixo, Luis Anel y Marta F. Riesco.

Póster. *Preliminary characterization of morphometry and Doppler parameters in the post-surgical monitoring of vasectomy in ram.* Rafael Montes-Garrido, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Juan Carlos Boixo, Cristina Ortega-Ferrusola, Cesar Chamorro, Marta F. Riesco, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez.

16^o Congreso Internacional de la Asociación Española de Reproducción Animal. León, España. Octubre de 2022.

Póster. *Sperm collection frequency modifies ram sperm morphology.* Marta Neila-Montero, Marta F. Riesco, Cristina Palacin-Martinez, Rafael Montes-Garrido, Paulino de Paz, Luis Anel, Mercedes Alvarez y Luis Anel-Lopez.

Póster. *Determination of reproductive status in brown bear (Ursus arctos) using vaginal cytology.* Victoria Zavala, Santiago Borragán, Patricia Manrique, Rafael Montes-Garrido, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Marta F. Riesco, Luis Anel y Mercedes Alvarez.

Póster. *Does double prostaglandin f2a injection improve the fertility of ewes artificially inseminated by laparoscopic route?* Mercedes Alvarez, Rafael Montes-Garrido, Marta F. Riesco, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Juan Carlos Boixo, César Chamorro, Paulino de Paz, Luis Anel y Luis Anel-Lopez.

Póster. *Does fixation influences ram sperm morphology evaluation results?* Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Ángela Fernandez-Gonzalez, Marta F. Riesco, Cristina Palacin-Martinez, Rafael Montes-Garrido, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez.

Póster. *Equilibration time of 24 hours not modify post-thawed apoptosis and mitochondrial activity of bull sperm.* Tomás Mantecon, Ana Sierra, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Rafael Montes-Garrido, Luis Anel-Lopez, Marta F. Riesco, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez.

Póster. *Frequency of sperm collection could be a feasible strategy to improve ram sperm cryoresistence.* Cristina Palacin-Martinez, Mercedes Alvarez, Rafael Montes-Garrido, Marta Neila-Montero, Luis Anel-Lopez, Paulino de Paz, Luis Anel y Marta F. Riesco.

Póster. *Preliminary study of fetuses number diagnosis in Assaf ewes under field conditions.* Rafael Montes-Garrido, Luis Anel-Lopez, Marta F. Riesco, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Juan Carlos Boixo, María Giovanna González, Cristina Ortega-Ferrusola, Cesar Chamorro, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez.

10th International Sheep Veterinary Congress. Sevilla, España. Marzo de 2023.

Comunicación oral. *Lambing-mating interval as a crucial factor to improve the fertility of meat sheep.* Rafael Montes-Garrido, Marta Neila-Montero, Luis Anel-Lopez, Marta F. Riesco, Cristina Palacin-Martinez, Juan Carlos Boixo, Cesar Chamorro, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez.

Artículo de divulgación. *Avances en la evaluación andrológica de los sementales ovinos.* *Tierras Ovino-Caprino*, 40, 80-84. Rafael Montes-Garrido, Marta Neila-Montero, Luis Anel-Lopez, Cristina Palacin-Martinez, Luis Anel y Mercedes Alvarez.

1st European Symposium on Animal Reproduction. Nantes, Francia. Septiembre de 2023.

Póster. *Liquid preservation withstand of ram sperm varies within the breeding season.* Marta Neila-Montero, Marta F. Riesco, Mercedes Alvarez, Rafael Montes-Garrido, Cristina Palacin-Martinez, Paulino de Paz, Luis Anel y Luis Anel-Lopez.

Póster. *Fluozin-3 as a new marker of sperm capacitation status in ram.* Cristina Palacin-Martinez, Mercedes Alvarez, Marta Neila-Montero, Rafael Montes-Garrido, Luis Anel-Lopez, Paulino de Paz, Luis Anel y Marta F. Riesco.

Póster. *Preliminary study of breeding soundness evaluation in peripubertal ram lambs.* Rafael Montes-Garrido, Marta F. Riesco, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Juan Carlos Boixo, Cristina Ortega-Ferrusola, César Chamorro, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez.

I Jornada de Jóvenes Investigadores de la Asociación Española de Reproducción Animal. Toledo, España. Diciembre de 2023.

Comunicación oral. *Is it possible to perform a delayed sperm quality analysis in brown bear (*Ursus arctos*) using fixable fluorescent dyes?* Marta Neila-Montero, Mercedes Alvarez, Rafael Montes-Garrido, Cristina Palacin-Martinez, Santiago Borragán, Patricia Manrique, Cristina Soriano-Úbeda, Marta F. Riesco, Paulino de Paz, Luis Anel-Lopez y Luis Anel.

Comunicación oral. *Differences in testicular volume and sperm production between treated and untreated male brown bears (*Ursus arctos*) using Vaccinzel® as immunocontraceptive.* Victoria Zavala, Santiago Borragán, Patricia Manrique, Rafael Montes-Garrido, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Cristina Soriano-Úbeda, Luis Anel y Mercedes Alvarez.

Comunicación oral. *Preliminary study on the prediction of testicular volume and sperm production of Assaf rams using Machine Learning.* Rafael Montes-Garrido, Pablo A. S. Fonseca, Marta F. Riesco, Luis Anel-Lopez, Marta Neila-Montero, Cristina Palacin-Martinez, Juan Carlos Boixo, Cristina Soriano-Úbeda, Paulino de Paz, Luis Anel y Mercedes Alvarez.

Comunicación oral. *Protein transmembrane 95 as a novel biomarker of oocyte-sperm union in ram sperm.* Cristina Palacin-Martinez, Cristina Soriano-Úbeda, Rafael Montes-Garrido, Marta Neila-Montero, Mercedes Alvarez, Luis Anel-Lopez, Paulino de Paz, Luis Anel y Marta F. Riesco.

Listado de Abreviaturas

ACP: proteína transportadora de acilo mitocondrial
ADAM: desintegrinas y metaloproteinasas
AI: inseminación artificial
AKAP4: proteína de anclaje a la quinasa A 4
ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza
AMP: adenosín monofosfato
ARM: proteínas armadillo
ARMC12: proteína armadillo 12
ART: técnicas de reproducción asistida
ATP: adenosín trifosfato

BCF: frecuencia de batido del flagelo
BSP: proteínas aglutinantes de espermatozoides

Ca²⁺: calcio
CASA: sistema computerizado de análisis seminal
Cl⁻: cloro
CO₂: dióxido de carbono

DAG: diacilglicerol
DNA: ácido desoxirribonucleico

FPM: motilidad progresiva rápida
FS: vaina fibrosa
FSIP2: proteína de interacción con la vaina fibrosa 2

GSH: glutatión

H⁺: hidrógeno
HCO₃⁻: bicarbonato

IL-16: interleucina-16
IP3: inositol trifosfato

Listado de Abreviaturas

K⁺: potasio

LDL: lipoproteínas de baja densidad

LIN: linealidad

MPM: motilidad progresiva media

MS: vaina mitocondrial

Na⁺: sodio

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

NHA: antiportadores de Na⁺/H⁺

NHE: intercambiadores de Na⁺/H⁺

NPPC: fosfocaseinato nativo

ODF: fibras densas externas

PBS: solución salina tamponada con fosfato

PIP: fosfatidilinositol fosfatos

PIP2: fosfatidilinositol bifosfato

PKA: quinasa dependiente de AMP cíclico

PKC: quinasa C

PLC: fosfolipasa C

PM: motilidad progresiva

Pro-IL-16: pro-interleucina-16

ROS: especies reactivas de oxígeno

RS: radios radiales

RSP3: proteína del radio radial 3

SLC: transportador de solutos

SP: plasma seminal

STR: rectitud

TCA: ácido tricarbóxico

TEKT: tektinas

TEPP: proteína expresada en testículos, próstata y placenta

TM: motilidad total

UE: Unión Europea

VAP: velocidad de trayectoria

VCL: velocidad curvilínea

WOB: oscilación

