

# UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

---

Departamento de Ciencia Animal UPV



## Influencia de las características seminales del eyaculado de conejo sobre la calidad espermática post- descongelación

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

**Alumno:** Selena Ferrian

**Director Académico:** D. José Salvador Vicente Antón

**Director Experimental:** Dña. Raquel Lavara García

**Valencia, Diciembre de 2007**

A mi familia por su apoyo. A todos mis amigos más allegados (en particular por aquellos que más contribuyeron a hacerme fácil cualquier momento, Maria y Álvaro). A mi director académico y directora experimental por haber sido tan amables conmigo.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi director académico, José Salvador Vicente Antón, por su ayuda, paciencia y comprensión en cada momento.

Gracias a mi directora experimental, Raquel Lavara García que fue fundamental para mi y para la realización de mi trabajo.

Gracias a todos aquellos que hicieron posible la realización de este trabajo.

# ÍNDICE GENERAL

<b>I. Introducción</b>	1
<b>1.1. Sistemas de valoración de la calidad del semen</b>	2
1.1.1. Aspecto y Ph	3
1.1.2. Volumen y concentración	4
1.1.3. Movilidad	4
1.1.3.1. Movilidad de visu.	5
1.1.3.2. Técnica de análisis de imagen asistido por ordenador: sistema CASA	7
1.1.4. Análisis morfológicos	11
1.1.4.1. Estimación del porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales	12
1.1.4.2. Normalidad acrosómica	15
1.1.5. Evaluación de la integridad de la membrana plasmática	16
1.1.5.1. Tinciones para evaluar el porcentaje de espermatozoides vivos/muertos	17
1.1.5.2. Test de endósmosis (Hypo-osmotic swelling test)	17
1.1.6. Estudio de los procesos de capacitación y reacción acrosómica	19
1.1.7. Estudio de la estructura e integridad de la cromatina (SCSA-Sperm Chromatin Structure Assay)	22
1.1.8. Otros análisis para evaluar la calidad seminal:	
Test de interacción entre gametos	23

<b>1.2. Conservación del semen</b>	24
<b>II. Objetivos</b>	29
<b>III. Material y Métodos</b>	31
<b>3.1. Material animal</b>	32
<b>3.2. Condiciones de alojamiento</b>	32
<b>3.3. Extracción de semen</b>	33
<b>3.4. Metodología de congelación</b>	34
3.4.1. Medio de congelación	34
3.4.2. Técnica de congelación	34
<b>3.5. Metodología de evaluación del semen</b>	35
3.5.1. Motilidad	35
3.5.2. Concentración	36
3.5.3. Análisis morfológicos	36
3.5.4. Integridad de membrana plasmática en el semen descongelado. Porcentaje de viabilidad	37
<b>3.6. Análisis estadísticos</b>	37

<b>IV. Resultados y Discusión</b>	38
<b>4.1. Características de los eyaculados de los machos de la línea R</b>	39
4.1.2. Parámetros cinéticos de los espermatozoides	40
<b>4.2. Características del semen descongelado</b>	42
<b>4.3. Evaluación de la influencia del orden de obtención de los eyaculado sobre de los parámetros seminales pre y post-descongelación</b>	44
<b>4.4. Correlación de los parámetros seminales</b>	45
<b>V. Conclusiones</b>	48
<b>VI. Referencias bibliográficas</b>	50

## **ÍNDICE DE TABLAS**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I. 1. Cuantificación de la movilidad masal en semen puro.</b>	<b>6</b>
<b>Tabla IV. 1. Características de los eyaculados de los machos de la línea R.</b>	<b>40</b>
<b>Tabla IV. 2. Parámetros de los espermatozoides de los eyaculados de los machos de la línea R.</b>	<b>42</b>
<b>Tabla IV. 3. Características del semen descongelado.</b>	<b>43</b>
<b>Tabla IV. 4a. Efecto del orden de obtención de los eyaculados sobre las características seminales.</b>	<b>44</b>
<b>Tabla IV. 4b. Efecto del orden de obtención de los eyaculados sobre las características seminales post-descongelación.</b>	<b>45</b>
<b>Tabla IV. 5. Correlaciones entre parámetros espermáticos del eyaculado y del semen descongelado.</b>	<b>47</b>



# **I. INTRODUCCIÓN**

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1.- Sistemas de valoración de la calidad del semen

La mejora genética de especies de importancia ganadera, así como el control de enfermedades, tienen un gran peso en la producción animal, ya que permiten la creación de explotaciones económicamente competitivas. Dentro de las tecnologías reproductivas que existen en la actualidad, la inseminación artificial ha sido la que quizás más haya contribuido a la mejora de la cabaña ganadera mediante la evaluación y difusión de machos de alto valor genético, y limitando la difusión de enfermedades de transmisión sexual. La inseminación artificial permite aumentar el número de dosis por macho y por lo tanto, el número de hembras inseminadas; es por ello imprescindible evaluar la calidad de las dosis seminales para eliminar aquellos eyaculados que puedan presentar una fertilidad reducida.

La mejor forma de conocer la capacidad fecundante de las dosis seminales (o capacidad de los espermatozoides para fecundar a un óvulo es la realización de pruebas *in vivo*. No obstante, las pruebas *in vivo* tienen un alto coste económico, y requieren una gran cantidad de tiempo para conocer la fertilidad de los eyaculados en la mayoría de las especies. Por ello, se han desarrollado multitud de análisis laboratoriales para evaluar la calidad del semen *in vitro*, y tratar de correlacionar los resultados obtenidos con la fertilidad *in vivo*. No obstante, la fertilidad final no depende sólo del macho, sino también de la hembra, y del número de espermatozoides inseminados (den Daas, 1992), lo que complica enormemente el establecimiento de correlaciones entre la calidad del semen y su fertilidad (Amann y Hammerstedt, 2002). Por otro lado, son varios y complejos los sucesos que conducen a la interacción entre gametos y a la fecundación, y una sola de las pruebas de laboratorio no permite predecir su fertilidad (Verstegen *et al.*, 2002).

Así, la fertilidad de un macho depende de que exista un espermatozoide con un nivel aceptable en todas sus cualidades en el lugar adecuado y en el momento preciso, así como de que el eyaculado contenga un número determinado de estos espermatozoides (Hammerstedt, 1996). La mejor prueba laboratorial sería aquella que evaluase todos los parámetros de calidad al mismo tiempo y en una gran cantidad de espermatozoides, pero en la actualidad, no

existe ningún análisis que lo permita (Muller, 2000). No obstante, existe una batería de pruebas laboratoriales que permiten la estimación de la calidad de cada una de las características de los espermatozoides y que, utilizadas conjuntamente, servirían para estimar ésta adecuadamente.

A continuación, se exponen algunos de los parámetros del semen de conejo analizados de los que se dispone para la estimación de la calidad espermática y los resultados obtenidos por diversos autores en distintas especies.

### 1.1.1.- Aspecto y pH

Los conejos son animales de eyaculación bifásica, presentando una primera porción compuesta por un líquido translúcido, viscoso, con pequeñas gotas de grasa denominado gel o tampón mucoso y otra porción compuesta por el líquido seminal y en su seno los espermatozoides. Este gel es perjudicial porque ejerce un efecto aglutinador sobre los espermatozoides que pierden gran parte de su movilidad y es por esto que es necesario separarlo del semen antes de proceder a la valoración (Alvariño, 1993).

El color del eyaculado es blanquecino y más o menos opaco según la concentración de espermatozoides y la proporción de plasma seminal en el eyaculado. Se puede considerar como color óptimo el blanco nacarado, que puede ser modificado por la presencia de elementos anormales.

Cuando el eyaculado tiene un tono amarillo, indica la presencia de pus u orina. También puede deberse a la presencia de un pigmento llamado riboflavina que es inofensivo, debe distinguirse de la orina por el olor que desprende ésta. Si es de color rojizo, se debe a la sangre fresca procedente de lesiones o heridas en el pene, así como a la administración prolongada de fenitiazina. Si posee elementos sanguíneos degenerados o heces, adquiere un color marrón y si el eyaculado es opaco se puede deber a ciertas degeneraciones testiculares con paso de células gigantes a través del epidídimo o por inflamación de las vesículas seminales.

Un pH comprendido entre 6,8 y 7,3 se considera normal. Valores diferentes a éstos indican mala calidad seminal.

### 1.1.2.- Volumen y concentración

Tanto volumen como concentración son características que varían según el individuo, la edad, el origen genético y las condiciones ambientales.

Normalmente el volumen del eyaculado se lee directamente sobre los tubos graduados de recogida. Puede variar entre 0'1 y 1'4 ml, siendo habitual una promedia próxima a 0'7 ml (Lavara, 1996). Según Battaglini *et al.*, (1992) el volumen varía entre 0'3 hasta 1'2 ml. La concentración expresa el número de espermatozoides por mililitro y también presenta valores muy variables, desde 280 hasta 1050 millones (Battaglini, 1982) o de 125 a 800 millones (Bencheik, 1995). Para machos jóvenes los valores se sitúan dentro del intervalo  $240 \pm 115$  millones /ml (Aragonés, 2002).

El método más utilizado es la numeración directa o recuento sobre una muestra de semen diluida en una cámara cuenta glóbulos de Bürker, Thoma o Neubauer. Aunque también es posible utilizar medidas de absorbancia para estimar la concentración, aunque en estos casos la precisión de la medida depende de la cantidad de unas vesículas muy características del plasma seminal de esta especie (Castellini, 2006).

### 1.1.3.- Movilidad

La movilidad es uno de los parámetros más importantes de la analítica seminal. Hasta hace pocos años el estudio de la movilidad espermática se hacía exclusivamente mediante métodos semi-cuantitativos. Estos métodos evalúan el porcentaje de espermatozoides móviles, así como el tipo de movimiento que presentaba la media de una población espermática. Estas medidas ofrecen una descripción general de la movilidad espermática, pero la exactitud y precisión están limitadas por las condiciones del sistema de medida y por la destreza del observador.

Sin embargo, la aparición de los sistemas informatizados de digitalización de imágenes abrió un nuevo campo en el estudio de la movilidad de los espermatozoides. Estos sistemas, denominados genéricamente CASA (Computer Assisted Motility Analysis), han automatizado y simplificado el proceso.

#### **1.1.3.1.- Movilidad *de visu***

La movilidad se venía analizando visualmente, asignando una valoración en una escala del 1 a 5, en la que se tenía en cuenta la apreciación del porcentaje de espermatozoides en movimiento y su trayectoria dominante. Una evaluación más objetiva podría obtenerse utilizando cámaras específicas para la eliminación del movimiento (cámara Makler). El criterio seguido para la valoración se basa en depositar una gota de semen diluido, por medio de una pipeta Pasteur, sobre un porta atemperado a unos 37°C y, sobre ésta, un cubre transparente. Hay dos tipos de motilidades:

- La **movilidad masal** o total, que hace referencia al movimiento de superficie que refleja la **proporción de espermatozoides** que **presentan algún tipo de movimiento**. Para observarlo se deposita una gota de semen puro y se coloca en un portaobjetos, se examina en un microscopio óptico a 40 aumentos y se valora la velocidad con la que se mueven los remolinos que se forman en la superficie de la gota de semen. Se hace un estimado subjetivo de la movilidad basándose en el vigor de las ondas y su actividad **se cuantifica en grados (de 0 a 5)**, Tabla 1.1), siendo solamente utilizados para inseminación aquellos que presenten una movilidad masal **buena (4)** o muy buena **(5)**.

Tabla 1.1 Cuantificación de la movilidad masal en semen puro

Grado	Clave	Descripción
5	Muy Bueno	Denso, con hondas, moviéndose rápidamente, no pueden observarse espermatozoides individuales, 90% o más de los espermatozoides son activos.
4	Bueno	Movimiento vigoroso, pero las hondas y los remolinos no muy rápidos como para grado 5, alrededor de 70 a 85% de espermatozoides son activos.
3	Regular	Solamente pequeño, bajo movimiento de hondas, espermatozoides individuales pueden ser observados 45 a 65% de células espermáticas activas.
2	Pobre	No se forman hondas, pero algún movimiento de espermatozoides es observado, solo 20 a 40% de los espermatozoides esta, vivos y su motilidad es pobre.
1	Muy pobre	Muy pocos espermatozoides (alrededor del 10%) muestran algún signo de vida, con movimiento estacionario.
0	Muertos	Todos los espermatozoides no se mueven

Fuente: Evans y Maxwell (1987)

- La **movilidad individual**, que hace referencia al porcentaje de **espermatozoides móviles y al movimiento de cada uno**. Para ello se diluye la muestra de semen de conejo entre 1:10 y 1:25, y se observa el tipo de trayectoria que realizan los espermatozoides, siendo el porcentaje de espermatozoides con desplazamiento progresivo y rectilíneo como un buen indicador de la calidad del semen frente a desplazamientos en círculo.

El **semen de buena calidad** debe presentar un **mínimo** del **60%** de espermatozoides **móviles** y de **50% de progresión rectilínea**. Cuando la movilidad masal está por debajo del 50%, hablamos de astenospermia y se observa la inmovilidad total tras la eyaculación se denomina necrospermia (Mocé, 2003).

La estimación de la movilidad *de visu* del semen conservado en estado líquido por períodos de tiempo prolongados, aporta poca información acerca de la capacidad fecundante de los espermatozoides (ya que el descenso en el porcentaje de espermatozoides móviles es menor que el descenso observado en la fertilidad; Vishwanath y Shannon, 1997). Foote (1975) observó en bovinos que la movilidad fue reducida desde 41,5 p.100 previo a la congelación en pajuelas al 28,2 p.100 después de la descongelación y el porcentaje de espermatozoides con acrosomas normales intactos fue también significativamente reducido por el proceso de congelación/ descongelación.

Otro problema adicional para el semen congelado/descongelado es la reducida viabilidad espermática en el tracto reproductivo de la hembra, caracterizado por la menor vida media de los espermatozoides congelados (Maxwell and Watson, 1996).

Por otro lado, en semen fresco de conejos Brun *et al.*, (2002) observaron que la movilidad masal y el número de espermatozoides móviles por dosis de inseminación eran los parámetros que más influían sobre la fertilidad a parto. Hagen *et al.*, (2002) observaron una correlación significativa y positiva ( $r=0,68$ ;  $p<0,05$ ) entre el porcentaje de espermatozoides móviles y la fertilidad (porcentaje de ovocitos fecundados) con bajas dosis de semen diluido en PBS (500.000 espermatozoides/hembra), mientras que no fueron observadas correlaciones significativas entre la fertilidad y la velocidad de los espermatozoides.

#### **1.1.3.2.- Técnica de análisis de imagen asistido por ordenador: Sistema CASA**

El análisis computerizado de la movilidad fue propuesto por primera vez hace 25 años y es usado actualmente en centros de reproducción asistida. El CASA (Fig. 1) establece, de una manera efectiva, **medidas cuantitativas** del **movimiento individual de los espermatozoides**. El sistema de análisis computerizado de semen (CASA, Computer assisted semen analysis) combina una cámara termostáticamente controlada (cámara de Makler en la que se deposita una alícuota de semen y se mantiene la temperatura 37°C durante el examen), un sistema óptico con iluminación de contraste de fases, un detector de imágenes, un conversor digital, un sistema de computación y un monitor de video. Este sistema permite medir el porcentaje de espermatozoides móviles, el porcentaje de espermatozoides con **movilidad progresiva**, la **velocidad de movimiento** y descubrir sus **trayectorias** individualmente. El uso del sistema CASA permite no solo evaluar motilidad espermática sino también **diferenciar subpoblaciones en relación al tipo de movilidad** espermática (e.g. espermatozoides que muestran movimientos lineales o de hiperactividad) (Holt C. *et al.*, 1997, Quintero *et al.*, 2007). Sin embargo, el sistema CASA es costoso y necesita una exacta calibración.



Fig. 1: Componentes de un sistema CASA (Microptic/Barcelona Versión 2002)

Los sistemas automáticos de medición de imágenes se basan en la captura sucesiva de espermatozoides en movimiento provenientes de un microscopio (Fig. 2 y 3).

Estas imágenes se digitalizan identificando las células espermáticas que contienen la primera imagen. Luego se procede al seguimiento de estas células en imágenes sucesivas y al establecimiento de trayectorias definitivas. Las trayectorias se procesan matemáticamente, obteniendo así resultados numéricos precisos. Los parámetros determinados para cada espermatozoide son la velocidad de movimiento sobre la base de varios descriptores, la anchura de la trayectoria que realiza la cabeza del espermatozoide y la frecuencia de los cambios de dirección que efectúa.

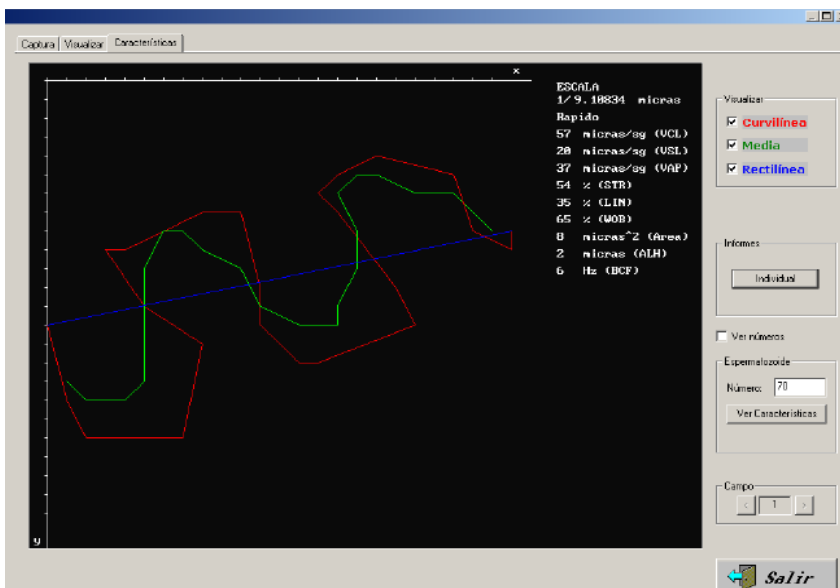
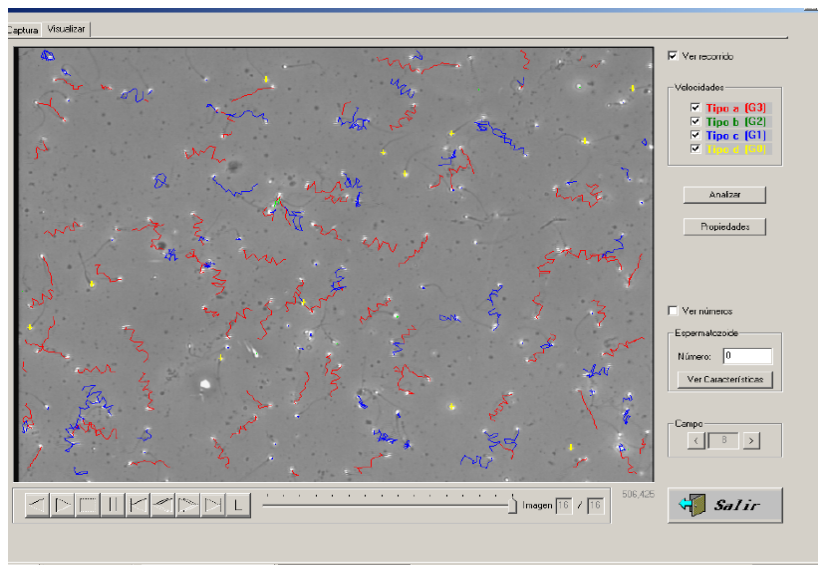


Fig. 2 y 3: Imágenes de captura de espermatozoides en movimiento provenientes de un microscopio.





Estos sistemas se han utilizado para estudiar las características de movilidad que presentan los espermatozoides tras la conservación en estado líquido (en vacuno, Tardif *et al.*, 1997a; en perros Rota *et al.*, 1999), tras ser sometidos a distintos protocolos de congelación (en vacuno, Januskauskas *et al.*, 1999; en caballos Blach *et al.*, 1988) o tras ser incubados en condiciones capacitantes (en vacuno; Iqbal y Hunter, 1995b). Dentro de un mismo eyaculado, coexisten diferentes subpoblaciones de espermatozoides, que se pueden estudiar mediante tinciones o bien mediante los análisis de movilidad. El porcentaje de espermatozoides dentro de cada población es variable entre machos, y podría influir sobre los resultados de supervivencia tras la congelación, sobre los resultados de fertilidad o sobre la respuesta de los espermatozoides a tratamientos de capacitación (Abaigar *et al.*, 1999). En conejo ha sido posible observar correlaciones significativas entre diversos parámetros de movilidad obtenidos mediante estos sistemas y la fertilidad tanto *in vivo* como *in vitro* (Viudes Castro *et al.*, 2005).

No obstante, en los animales de granja es más difícil establecer correlaciones entre los datos de movilidad proporcionados por los sistemas CASA y la fertilidad, ya que por lo general sólo se utilizan para la reproducción aquellos machos que presentan un nivel de fertilidad aceptable (Verstegen *et al.*, 2002), y el número de espermatozoides por dosis se encuentra por encima del valor umbral para alcanzar fertilidades máximas con cada macho, por lo que quedan enmascarados los individuos subfértiles (Amann y Hammerstedt, 2002).

Todavía se desconocen cuáles son las variables de importancia para la predicción de la fertilidad *in vivo*. Sin embargo, parece que la velocidad curvilínea (o VCL, velocidad media

del espermatozoide medida sobre la trayectoria verdadera punto a punto seguida por la célula en  $\mu\text{m}/\text{segundo}$ ), **velocidad lineal (VAP)**, que es la velocidad sobre una trayectoria calculada y recta medida en  $\mu\text{m}/\text{segundo}$ , es una estimación de la trayectoria real) y la **velocidad rectilínea (VSL)**, que es la distancia en línea recta entre el inicio y el final de la trayectoria del espermatozoide, medida en  $\mu\text{m}/\text{segundo}$ ) son los parámetros más correlacionados con la fertilidad. En la Figura 4 se puede observar una representación esquemática de las velocidades medidas por los sistemas CASA.

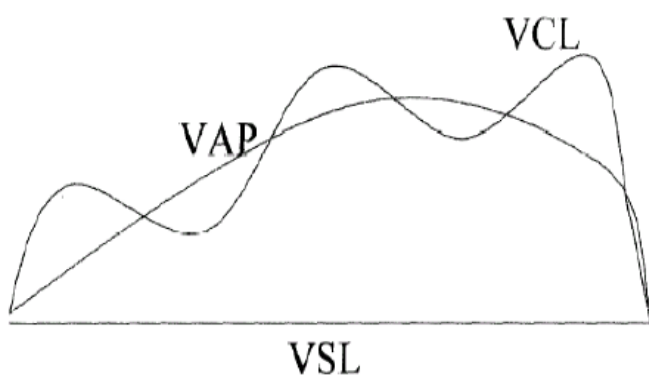


Fig. 4: Representación esquemática de las distintas velocidades medidas por los sistemas CASA (Computer Assisted Semen Analysis). VSL: velocidad rectilínea (straight line velocity); VAP: velocidad lineal (average path velocity); VCL: velocidad curvilínea (curvilinear velocity). Fuente: Verstegen *et al.* (2002).

Otras medidas proporcionadas por estos sistemas y que han sido correlacionadas con la fertilidad o cuyos valores se modifican en función de las condiciones de los medios utilizados son: la **amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH)**, anchura del movimiento lateral de la cabeza del espermatozoide medida en  $\mu\text{m}$ , Figura 5) o la frecuencia de batida (BCF o beat cross frequency, que es el número de veces que la cabeza del espermatozoide cruza la dirección del movimiento, medida en Hz). Por otra parte, **a partir de los valores de velocidad se pueden calcular** varios índices: **índice de linealidad (LIN)**, calculado como  $VSL/VCL$  y expresado en porcentaje) o **índice de rectitud** (calculado como  $VSL/VAP$  y expresado en porcentaje). Los valores de los índices sufren también modificaciones tras someter a los espermatozoides a distintos tratamientos.

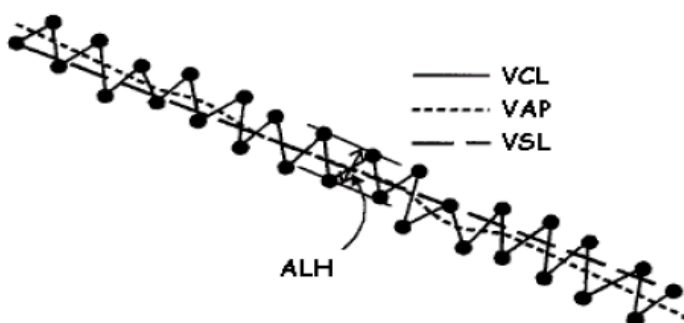


Fig. 5: Determinación de valores cinéticos. VSL: velocidad rectilínea (straight line velocity); VAP: velocidad lineal (average path velocity); VCL: velocidad curvilínea (curvilinear velocity); ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (amplitude of lateral head displacement). Mortimer (2000).

En conejos, se han utilizado estos sistemas para la valoración del semen en varios trabajos, bien para evaluar la calidad del semen tras ser sometido a procesos de capacitación (Young y Bodt, 1994), a conservación (Viudes de Castro *et al.*, 1999), para la evaluación del semen fresco o descongelado de machos alimentados con distintas dietas (Castellini *et al.*, 2001), o sometidos a distintos ritmos reproductivos (Mocé *et al.*, 2000). En algún trabajo, se han estudiado las correlaciones entre los parámetros de movilidad y la fertilidad, observando un coeficiente de correlación significativo ( $r=0,53$ ;  $p<0,01$ ) entre distintas características de movilidad (VCL, ALH, BCF, LIN, VAP y VSL) y la fertilidad (Mocé, 2003).

Recientemente Quintero *et al.*, (2007) utilizaron este sistema para establecer subpoblaciones espermáticas y intentar correlacionar o predecir su fertilidad *in vivo*. Establecieron diferencias en la proporción de subpoblaciones de los eyaculados de diferente procedencia genética y constitución (eyaculados individuales o mezclas) observando que esta estructura de subpoblaciones espermáticas tan sólo permitía establecer un modelo matemático de predicción de la fertilidad con un  $R^2$  en torno 0.16. Otros muchos factores del propio esperma y relacionados con la metodología de preparación de la muestra y su análisis, la hembra, la técnica, el inseminador y la granja pueden enmascarar o contribuir a la baja capacidad de predicción de los parámetros espermáticos de movilidad actuales.

Uno de los principales problemas al evaluar el semen de conejos con los sistemas automáticos de análisis de imagen es la presencia de gran cantidad de partículas en suspensión en el plasma seminal de tamaño similar al de los espermatozoides que interfieren en el análisis.

#### 1.1.4.- Análisis morfológicos

Los espermatozoides, en la mayoría de los mamíferos, presentan una morfología homogénea que se correlaciona con su capacidad fecundante.

En el estudio de la morfología de las células espermáticas, se debe de utilizar un sistema de clasificación adecuado que permita evidenciar el máximo número de anomalías que puedan relacionarse con problemas de fertilidad. Estas anomalías podrían deberse a situaciones tales como: traumatismos e infecciones a nivel gonadal, disfunción en los túmulos seminíferos, alteraciones metabólicas y endocrinas que afecten directamente a la espermatogénesis, a la

espermatogénesis y a la función del epidídimo y con alteraciones en la maduración de los espermatozoides. Por ello, una correcta evaluación del porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y anormales de forma puede ser una información clave en el estudio básico del semen. Recientemente se está analizando la morfología espermática (sobre todo de la cabeza del espermatozoide) mediante sistemas informáticos.

#### **1.1.4.1.- Estimación del porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales de una muestra por valoración visual**

El origen de los espermatozoides anormales se puede encontrar a nivel de los túmulos seminíferos o a nivel de epidídimo y su aparición depende de factores ambientales, genéticos o de una combinación de ambos. Su presencia va acompañada frecuentemente de otros signos de degeneración testicular, como descenso del tamaño y tono testicular, descenso de producción espermática y concentración y empeoramiento de la movilidad (Barth y Oko, 1989).

Para evaluar el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales en un eyaculado, se pueden utilizar tinciones y observar los frotis en microscopios de campo claro, o bien ser evaluados bajo contraste de fases o interferencial en muestras fijadas en glutaraldehído. Se puede utilizar cualquiera de las tinciones empleadas para la evaluación de la viabilidad (en el caso del estudio de morfoanomalías a nivel de la cabeza y de flagelo) o las que se utilizan para el estudio de la integridad de los acrosomas en el caso de las morfoanomalías a nivel de acrosoma. La tinción de Feulgen se emplea para observar defectos a nivel del núcleo de los espermatozoides. Cuando se pretende estudiar la estructura de diferentes partes de los espermatozoides, se utiliza la microscopía electrónica.

La evaluación del espermiograma es interesante, ya que refleja el estado del epitelio seminífero cuando se produjo la espermiogénesis de las células que están siendo observadas, el estado del epidídimo y el funcionamiento de las glándulas accesorias. Barth y Oko (1989) realizaron una revisión sobre todos los tipos de anomalías que han sido descritos, centrándose fundamentalmente en el semen de vacuno. Las anomalías espermáticas se pueden dividir en dos grandes grupos, dependiendo de si la anomalía se encuentra a nivel de la cabeza del espermatozoide o bien a nivel de flagelo.

Dentro de las anomalías descritas a nivel de la cabeza se encuentran la protuberancia acrosómica, espermatozoides con cabezas piriformes y cabezas afiladas, espermatozoides

macrocéfalos o microcéfalos, presencia de vacuolas nucleares, condensación anómala del ADN, cabezas separadas y cabezas sueltas y síndrome de cabezas contorneadas, cresta nuclear y cabeza gigante.

Entre las anomalías englobadas a nivel del flagelo, se pueden diferenciar los defectos en la pieza media (colas flexionadas o en látigo, colas en ovillo, aplasia segmental de la vaina mitocondrial, 14 las pseudogotas, defecto de sacacorchos o cuello en espiral y piezas medias curvadas), y defectos asociados con el flagelo (colas abaxiales y accesorias, el defecto de cola en muñón, las gotas citoplasmáticas y los espermatozoides teratógenos). Porcentajes de hasta un 15-20% para anomalías de núcleo, hasta un 25% para anomalías del acrosoma o el flagelo y un 75% mínimo de normalidad acrosómica han sido propuestos como niveles tolerables de morfoanomalías, (Mocé 2003).

La presencia de un elevado porcentaje de espermatozoides con cualquiera de estos tipos de anomalías cursa con un descenso en la fertilidad del macho tanto *in vivo* como *in vitro*.

Recientemente se ha estudiado el efecto de la presencia de alguna de estas anomalías en eyaculados de toros sobre la fertilidad *in vitro*, y se ha observado:

- los espermatozoides con protuberancia acrosómica son incapaces de unirse a la zona pelúcida y fusionarse con el oolema (Thundathil *et al.*, 2000 y 2001b).
- los espermatozoides con cabezas piriformes presentan problemas para unirse al ovocito y el porcentaje de ovocitos fecundados es menor que en el caso de los toros con espermatozoides normales (Thundathil *et al.*, 1999c).
- los eyaculados con un elevado porcentaje de vacuolas nucleares presentan bajos niveles de fertilidad *in vivo* debido al aumento en el porcentaje de mortalidad embrionaria temprana (Miller *et al.*, 1982), e *in vitro* se han observado problemas de unión a zona pelúcida (Pilip y col., 1996).
- Los espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales presentan problemas de adherencia a zona pelúcida, fecundación y desarrollo embrionario (Amann *et al.*, 2000; Thundathil *et al.*, 2001a).

Para hacer los cálculos del porcentaje de formas anormales en los eyaculados, se han propuesto diferentes clasificaciones que han sido recogidas por Barth y Oko (1989). Una de ellas divide las anomalías en función del lugar donde se originan en:

- Primarias: engloban aquellas anomalías que se producen durante la espermiogénesis y están causadas por procesos patológicos del epitelio seminífero. Su presencia indicaría que la fertilidad del macho alrededor del tiempo de valoración podría ser cuestionable.
- Secundarias: son aquellas que se producen una vez que los espermatozoides han abandonado los testículos. Dentro de ellas se englobarían las cabezas sueltas, gotas proximales y distales, colas en látigo y acrosomas sueltos. Este tipo de anomalías indicarían que el daño se ha producido por función anormal del epidídimo o por manejo inadecuado en el laboratorio. Son tan importantes en la fertilidad como las primarias, sin embargo, el pronóstico de recuperación es mejor que en el caso de las anomalías primarias.

Otras clasificaciones se basan en la severidad del defecto, incluyendo dentro de las anomalías primarias aquellas que imposibilitan la fecundación y secundarias las que suceden tras la espermatogénesis y la maduración epididimaria y se corresponderían con los espermatozoides dañados o degenerados. Para establecer los niveles tolerables de morfoanomalías, Barth y Oko (1989) propusieron:

- El porcentaje de espermatozoides con anomalías del núcleo, que permiten la interacción y la penetración de los óvulos pero que producirán fallos en la fecundación o en el desarrollo embrionario, deberían ser menores del 15 ó 20%.
- Las anomalías del acrosoma o del flagelo que no interfieren con la capacidad de que los espermatozoides normales fecunden a los ovocitos, podrían ser toleradas a niveles de hasta el 25%.
- Al menos, el 75% de los espermatozoides debería presentar morfología normal.
- Amann *et al.*, (2000) propusieron que el porcentaje de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales debería ser menor del 30% para que la fertilidad no disminuya.

Con respecto al pronóstico de recuperación, hay que tener en cuenta aquellas anomalías que tienen un origen genético, ya que estarán presentes de forma permanente en los eyaculados. El porcentaje de espermatozoides anormales no sólo afecta a la fertilidad de los eyaculados como ya se ha expuesto anteriormente, sino que en especies polítopas, el tamaño de camada también se reduce. En porcino, Xu *et al.*, (1998) observaron que el porcentaje de espermatozoides normales de los eyaculados podría tener una gran importancia ( $r^2=0,59$ ) en el tamaño de camada cuando la dosis de espermatozoides inseminada se reducía a 2000 millones, en eyaculados con más del 25% de espermatozoides con morfología anormal. Gadea *et al.*, (1998) observaron diferencias significativas entre el porcentaje de morfoanomalías en un grupo de verracos de baja fertilidad (43% morfoanomalías, 10% de hembras gestantes y 8,3 nacidos totales) respecto a los grupos de media (23% morfoanomalías, 57% de hembras gestantes y 9,1 nacidos totales) o alta fertilidad (11% morfoanomalías, 90% de hembras gestantes y 9,4 nacidos totales). Recientemente, Lavara *et al.*, (2005) observaron en conejo una correlación negativa y significativa (-0,5) entre el porcentaje de anomalías y la fertilidad del semen.

#### 1.1.4.2.- Normalidad acrosómica

El semen siempre va a contener un porcentaje de espermatozoides con alguna morfoanomalía, si bien ésta no puede correlacionarse con una bajada de fertilidad hasta que estos niveles superen un 20-30%. Dentro de dichas alteraciones cabría distinguir las que afectan al acrosoma y aquellas que afectan al resto del espermatozoide.

El acrosoma juega un papel fundamental en la fecundación y esta importancia hace que convenga realizar una valoración específica del mismo. En un espermatozoide que tenga el acrosoma en perfectas condiciones se pueden distinguir tres regiones claramente diferenciadas en la cabeza: la zona acrosomal, con un borde apical, la zona postacrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas. Esta valoración puede realizarse con un microscopio óptico convencional, mediante la tinción previa de los distintos compartimentos celulares, pero como este proceso requiere varias horas, es mucho más práctico realizar el análisis a través de microscopía de contraste de fases, mediante la simple fijación de la muestra con glutaraldehído al 2%.

Los daños en el acrosoma provocan que se liberen las enzimas (acrosina y hialuronidasa)

que alberga en su interior, **impidiendo la fecundación**, de forma que si el porcentaje de estas alteraciones es elevado, puede provocar un **descenso de la fertilidad**. Estas enzimas liberadas pueden detectarse por lo que constituyen otro indicador, como se expondrá posteriormente, del estado de la estructura espermática. Las muestras seminales con alta proporción de acrosomas alterados o ausentes suelen tener una fertilidad baja.

Para determinar el estado de los acrosomas, se puede emplear microscopía de fluorescencia mediante las tinciones con lecitinas de guisante o cacahuete marcadas con fluoresceína que se unen específicamente a la glicoproteínas (el acrosoma es una región rica en estas proteínas), mediante microscopios equipados con contraste de fases (Pursel y Johnson, 1974) o con contraste interferencial (Saacke y Marshall, 1968) o pueden utilizarse tinciones. Entre éstas tenemos la tinción de eosina/verde rápido, Giemsa y la de eosina/nigrosina, las dobles y triples tinciones, basadas en la combinación del azul tripán con otros colorantes y tinciones comerciales como el Spermac ®.

#### **1.1.5.- Evaluación de la integridad de la membrana plasmática**

La integridad de la membrana plasmática es muy importante **para el metabolismo espermático**, ya que es necesario que se produzcan cambios en sus propiedades (durante la capacitación, reacción acrosómica y unión del espermatozoide a la superficie del óvulo) para que se unan los gametos masculino y femenino (Jeyendran *et al.*, 1984).

La integridad de la membrana plasmática es fundamental en el **proceso de fecundación** por lo que el estudio de su funcionamiento puede ser un indicador útil de la capacidad fecundante de los espermatozoides.

Para el estudio de la integridad de la membrana plasmática se pueden emplear o bien **tinciones**, o bien el **test de endósmosis**.

##### **1.1.5.1.- Tinciones para evaluar el porcentaje de espermatozoides vivos/muertos**

Uno de los análisis más utilizados para la evaluación de la calidad del semen es el estudio del porcentaje de espermatozoides viables. En algunos trabajos se ha observado que el porcentaje



de espermatozoides móviles no siempre se corresponde con el porcentaje de espermatozoides viables, habiendo tras la conservación un mayor porcentaje de espermatozoides viables que móviles, por ejemplo en ganado porcino (Jonson *et al.*, 1996). En algún trabajo se ha observado incluso una correlación positiva entre el porcentaje de espermatozoides vivos y la fertilidad *in vivo* (en toros,  $r = 0,58$ ;  $p < 0,05$ ; Januskauskas *et al.*, 2001).

Por lo general, las tinciones que estiman el porcentaje de células viables se basan en la capacidad de la membrana plasmática de los espermatozoides de evitar la entrada de colorantes en el caso de que no esté dañada, por lo que son indicadores de la integridad estructural de la membrana plasmática. Como en el caso de la evaluación de los acrosomas, se han descrito tinciones para la evaluación de las muestras en microscopios de campo claro (la más utilizada es la de eosina-nigrosina descrita por Hancock, 1951), o en microscopios de fluorescencia (una de las más utilizadas en la actualidad es la combinación de SYBR-14 y yoduro de propidio-PI, descrita por Garner y col., 1994).

#### 1.1.5.2.- Test de endósmosis (HOST- Hypo-Osmotic Swelling Test)

Mediante este test, es posible evaluar la funcionalidad de la membrana plasmática a nivel del flagelo.

Con las tinciones se evalúa si la membrana está intacta o bien dañada, pero no si funciona correctamente. El test de endósmosis se basa en la capacidad que tienen las membranas de permitir el transporte de moléculas selectivamente. Cuando los espermatozoides son expuestos a soluciones hipoosmóticas, éstos tratan de establecer un equilibrio entre las condiciones intracelulares y extracelulares, por lo que penetra agua para tratar de reestablecer el equilibrio.

Esta entrada de agua produce un incremento del volumen del espermatozoide y la membrana plasmática se hincha. La membrana del flagelo es especialmente susceptible a las condiciones hipoosmóticas, y es visible el ensortijamiento de la cola bajo microscopio. Así, si la membrana funciona correctamente, bajo condiciones hipoosmóticas los espermatozoides sufren un ensortijamiento del flagelo. Por lo tanto, el test de endósmosis evalúa si una membrana intacta estructuralmente funciona correctamente.

Este análisis ha sido empleado en multitud de especies, desde que Jeyendran *et al.*, (1984) lo desarrollaron para estudiar el comportamiento del semen fresco de humana, y se ha mostrado como un buen indicador de viabilidad espermática a través del análisis de la integridad funcional de la membrana, Mocé (2003).

Por lo general, se emplean soluciones de citrato sódico y fructosa, de diferente osmolaridad dependiendo de la especie de que se trate, debido a las diferencias en la resistencia al estrés osmótico entre especies. En algunos de los trabajos, se ha comparado la respuesta de los espermatozoides al ser sometidos al test de endósmosis con los resultados obtenidos al realizar tinciones.

Siempre se obtiene un mayor porcentaje de espermatozoides vivos (que no se tiñen con los colorantes, es decir, que no tienen dañada la membrana), que de espermatozoides que reaccionan al test de endósmosis (en humana, Jeyendran *et al.*, 1984; en vacuno, Correa y Zavos, 1994; en porcino, Vázquez *et al.*, 1997), debido a que puede haber espermatozoides cuyas membranas sean capaces de evitar la penetración de colorante, pero que no sean capaces de soportar el estrés osmótico.

Algunos autores han observado una correlación positiva entre el porcentaje de espermatozoides que responden al test de endósmosis y la fertilidad. En el caso del semen congelado de ganado vacuno, Revell y Mrode (1994) observaron un alto coeficiente de correlación ( $r=0,6-0,79$ ) entre el porcentaje de espermatozoides con actividad residual tras el test de endósmosis y la fertilidad, y Correa *et al.*, (1997) observaron una correlación positiva entre el porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva y la fertilidad in vivo ( $r=0,57$ ;  $p=0,01$ ). Neild *et al.*, (2000) observaron en caballos de baja fertilidad una respuesta al test de endósmosis menor del 40% y además, el test de endósmosis mostró una tendencia a correlacionarse con el número de servicios/gestación. En el caso del ganado porcino, Pérez-Llano *et al.*, (2001) observaron una correlación positiva entre la fertilidad del semen fresco y la respuesta de endósmosis de los espermatozoides tras su incubación en una solución de 75 mOsm durante 5 minutos ( $r = 0,43$ ;  $p<0,01$ ).

Cuando se utiliza este análisis, se estudia la integridad de la membrana del flagelo, pero no se obtiene información acerca de la integridad de la membrana de la cabeza. Chan *et al.*, (1992), modificaron el test de endósmosis para el semen de humana, añadiendo a la solución

hipoosmótica un colorante (eosina) denominando a este análisis test de viabilidad hipoosmótica.

Tras la evaluación del porcentaje de espermatozoides vivos del semen fresco (que no captaban el colorante) al ser sometidos al test de endósmosis observaron una correlación muy alta ( $r = 0,7$ ;  $p < 0,05$ ) con la calidad del semen post-descongelación, que no fue observada con el test de endósmosis solo. Este test de endósmosis modificado podría ser utilizado para la selección de eyaculados previo a la congelación.

En el caso de los conejos, este análisis no ha sido muy utilizado y en ninguno de los trabajos se establecieron correlaciones entre los resultados del test y la fertilidad *in vivo*. Castellini *et al.*, (2000) lo emplearon para evaluar el efecto del consumo de diferentes piensos sobre la calidad seminal.

Pese a que algunos autores han observado una correlación positiva entre los resultados obtenidos con este análisis y la fertilidad, esto no ha sido siempre corroborado, pero es un análisis sencillo que se suele utilizar conjuntamente con otros test.

#### **1.1.6.- Estudio de los procesos de capacitación y reacción acrosómica**

El proceso de capacitación representa los primeros estadios del proceso de desestabilización que sufren los espermatozoides previamente al contacto con los óvulos. Es un paso necesario para que se produzca la fecundación, y está relacionado con la eliminación de proteínas extracelulares y de colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide, produciéndose la redistribución de proteínas estructurales y el calcio (Rodríguez-Martínez, 1999).

En varias especies, se ha observado que los espermatozoides que han sido sometidos a procesos de congelación o de conservación presentan un estado similar al de la capacitación pero sus acrosomas no necesariamente aparecen reaccionados (en toros, Januskauskas *et al.*, 1999; en ovino Gillan *et al.*, 1997). Los cambios producidos en las membranas tras la crioconservación pueden conducir a la disminución de la fertilidad de los espermatozoides, ya que probablemente éstos sufran una exocitosis prematura y no participen en el proceso de la fecundación (para una revisión ver Bailey *et al.*, 2000).

Durante el proceso de capacitación y reacción acrosómica se produce un aumento en los niveles intracitoplasmáticos de calcio y durante el proceso de crioconservación se producen

alteraciones en la membrana plasmática de los espermatozoides que favorecen la entrada de calcio al interior del citoplasma (Collin *et al.*, 2000). Por lo tanto, la evaluación de los niveles de calcio intracelulares (para lo que se utiliza el colorante fluorescente indo-1) en espermatozoides que han sido congelados-descongelados, podría aportar información acerca del estado de capacitación y de la capacidad fecundante de la muestra. En semen congelado de vacuno se ha observado que la fertilidad *in vivo* es menor cuando los espermatozoides presentan niveles internos de  $\text{Ca}^{2+}$  mayores que los del semen fresco o cuando el calcio penetra rápidamente a través de sus membranas ( $r^2 = -0,911$ ;  $p < 0,01$ ; Bailey *et al.*, 1994). Por otra parte, se ha observado que el semen de toros fértiles presenta niveles de calcio intracitoplasmáticos menores que el semen de toros de baja fertilidad (Collin *et al.*, 2000).

Con las tinciones utilizadas para la evaluación de los acrosomas, se detectan aquellos espermatozoides cuyo acrosoma está intacto o bien reaccionado, pero no se diferencian entre estadios de capacitación. Para evaluarlo se puede utilizar el antibiótico clortetraciclina (CTC), que se une a los iones de calcio asociados a las proteínas de la cara interna de la membrana de la región cefálica de los espermatozoides, permitiendo así la visualización de la localización de los iones de calcio y su cambio, asociados al proceso de capacitación (Fraser *et al.*, 1995) y es evaluado bajo microscopios equipados con fluorescencia.

En algunos trabajos, se han encontrado correlaciones significativas entre el porcentaje de espermatozoides vivos no capacitados (evaluado mediante la tinción con clortetraciclina) del semen congelado y la fertilidad en ganado vacuno ( $r = 0,4-0,5$ ;  $p = 0,03$ ; Thundathil *et al.*, 1999a y b) y entre los espermatozoides que presentan el patrón de reacción acrosómica evaluado mediante esta tinción y la fertilidad (en vacuno; Collin *et al.*, 2000). También es posible determinar cambios en la fluidez de la membrana plasmática, que se producen durante el proceso de capacitación mediante el uso de colorantes fluorescentes, entre ellos la merocianina (Graham, 2001).

Además de ser útiles para detectar cambios en los espermatozoides tras distintos tratamientos, el estudio de los procesos de capacitación y reacción acrosómica sirve para estudiar la funcionalidad de los espermatozoides, y como marcadores de defectos en su membrana que pueden afectar a la fertilidad de los machos (Ax y Lenz, 1987). Se han observado correlaciones significativas entre la respuesta de los espermatozoides al tratamiento con sustancias capacitantes (glicosaminoglicanos) y la fertilidad *in vivo* en ganado vacuno. Los eyaculados de toros de alta fertilidad presentan mayor respuesta al tratamiento con glicosaminoglicanos y mayor afinidad por la heparina que los de baja fertilidad (Ax *et al.*,

1985), y esta respuesta se correlaciona con la fertilidad in vivo ( $r =$  entre 0,81 y 0,87;  $p < 0,01$ ; Ax y Lenz, 1987; Lenz *et al.*, 1988; Whitfield y Parkinson, 1992). Además, se ha observado que la presencia de una proteína ligando de heparina de 30 kDa en la membrana de los espermatozoides (FAA-fertility associated antigen), está asociada a los toros de alta fertilidad (Bellin *et al.*, 1998), presentando los toros FAA+ un 9% más de fertilidad que los toros que no presentan esta proteína en la membrana (FAA-).

Graham y Foote (1987a), observaron que los espermatozoides frescos de toros de alta fertilidad necesitaban ser expuestos a concentraciones de liposomas (PC12 o dilauril fosfatidil colina) menores para penetrar el número máximo de ovocitos de hamster que los de baja fertilidad, observándose el comportamiento contrario en el semen congelado (Graham y Foote, 1987b). El mismo comportamiento fue observado por Wilhelm *et al.*, (1996) para el semen congelado de caballos de alta y baja fertilidad. Probablemente, en el caso del semen fresco, la membrana de los espermatozoides de toros de fertilidad elevada reaccione más rápidamente al tratamiento con PC12 que la de los animales de fertilidad reducida (por diferencias en la composición de sus membranas), de forma que al ser tratados con altas dosis de fosfolípidos sufrirían reacciones acrosómicas rápidas que provocarían el envejecimiento de los espermatozoides, impidiendo su interacción con los óvulos. Sin embargo, en el caso del semen congelado, los espermatozoides de toros subfértiles sufrirían más daños en la membrana tras la crioconservación, siendo más sencillo desestabilizar sus membranas por lo que reaccionarían antes a menores dosis de liposomas. Se ha observado una correlación entre la fertilidad in vivo y la concentración de liposomas necesaria para maximizar el porcentaje de ovocitos de hamster penetrados por el semen congelado ( $r = 0,92$ ,  $p = 0,05$  y  $r = 0,86$  observados por Graham y Foote, 1987b y Truelson *et al.*, 1992, respectivamente), pero esta correlación no fue confirmada en estudios posteriores cuando se utilizaron machos con un rango de fertilidad más estrecho (Truelson *et al.*, 1996). Al parecer, la respuesta del semen congelado de toros al tratamiento con PC12 está muy relacionada con la fertilidad ( $r^2 = 0,97$ ;  $p = 0,04$ ; Davis y Foote, 1987). No obstante, cuando se utiliza semen congelado y se seleccionan los espermatozoides móviles (mediante swim-up o gradientes de Percoll), se observan diferencias en la afinidad y en la respuesta de los espermatozoides de diferentes machos al tratamiento con heparina pero no correlaciones con la fertilidad (Merkiens *et al.*, 2000; Januskauskas y col., 2000), observándose en este caso correlaciones significativas entre la longevidad de los espermatozoides tras el tratamiento con heparina y la fertilidad in vivo ( $r = 0,49$ ;  $p < 0,05$ ; Januskauskas *et al.*, 2000).

Los espermatozoides de animales fértiles presentan mayor respuesta al ser tratados con sustancias capacitantes (en cerdos, Harrison *et al.*, 1996; en caballos, Varner *et al.*, 2000).

### **1.1.7.- Estudio de la estructura e integridad de la cromatina (SCSA Sperm Chromatin Structure Assay)**

En varios trabajos se ha observado que la compactación anormal de la cromatina, y la susceptibilidad de ésta a la desnaturalización se asocian a problemas en la espermatogénesis e incremento en el porcentaje de espermatozoides anormales y conducen a problemas en la fecundación, provocando problemas de infertilidad (Ballachey *et al.*, 1987). Para evaluar la estructura de la cromatina se pueden emplear tinciones (Feulgen, anilina azul o cromomicina A3- CMA3), y la integridad de la cromatina puede ser evaluada, entre otras técnicas (para una revisión, ver Evenson *et al.*, 2002), mediante la tinción con naranja de acridina tras tratamiento ácido o con calor de los espermatozoides para provocar la desnaturalización del ADN.

Mediante este análisis, es posible detectar diferencias entre individuos, incluso cuando se trabaja con machos de fertilidad muy similar (Bochenek *et al.*, 2001). Además, con él se estudia un aspecto no evaluado por ningún otro análisis, ya que es posible detectar individuos subfértiles que presenten espermiograma normal, porque las anomalías en la compactación de la cromatina se relacionan más con problemas en el desarrollo del embrión producido que con problemas en la capacidad de interacción con los óvulos (Córdova *et al.*, 2002).

Se han observado correlaciones negativas entre la susceptibilidad del ADN a la desnaturalización y la fertilidad (en toros  $r =$  entre  $-0,41$  y  $-0,68$ ;  $p < 0,01$ ; según Ballachey *et al.*; 1987; Sailer *et al.*, 1996; Januskauska *et al.*, 2001; Bochenek *et al.*, 2001). En cerdos y caballos, se ha observado que los machos de baja fertilidad son los que presentan la cromatina más heterogénea (Evenson *et al.*, 1994; Love y Kenney, 1998), y en conejos, la descondensación nuclear afecta negativamente al tamaño de camada (Courstens *et al.*, 1994).

Tras el proceso de congelación-descongelación, la condensación nuclear aumenta (en porcino y humana; Hamamah *et al.*, 1990), y además, la susceptibilidad del ADN a la desnaturalización se incrementa (en verracos; Córdova *et al.*, 2002), probablemente debido a la generación de radicales libres de oxígeno (ROS) que provocan tanto la supercondensación del ADN como la inducción de roturas en el ADN (que se relacionan con el incremento en la

susceptibilidad del ADN a la desnaturalización). La supercondensación puede conducir a fallos en la descondensación del núcleo del espermatozoide tras la fecundación, retrasando la formación del pronúcleo masculino, y las primeras divisiones, y como consecuencia provocar mortalidad embrionaria temprana o retraso en el desarrollo embrionario (Hamamah *et al.*, 1990).

### **1.1.8.- Otros análisis para evaluar la calidad seminal: Test de interacción entre gametos**

Cuando se utilizan métodos de contrastación seminal convencionales, las correlaciones obtenidas con la fertilidad *in vivo* suelen ser bajas, debido a que el fenómeno de la fecundación es muy complejo, y en él intervienen multitud de factores que dependen tanto del macho como de la hembra, así como de factores ambientales (Garde López-Brea, 1994). Como ha sido expuesto a lo largo de toda la introducción, en los análisis sólo se evalúa alguno de los factores que intervienen en momentos puntuales en la fecundación, lo que dificulta el establecimiento de correlaciones con la fertilidad *in vivo*.

Para estudiar varios de los pasos que acontecen durante la fecundación, se han desarrollado en multitud de especies sistemas de interacción entre gametos *in vitro* que permitan determinar cuál es la capacidad fecundante de los espermatozoides. Dentro de ellos se pueden distinguir dos tipos de sistemas:

- heterólogos: cuando semen y ovocitos no pertenecen a la misma especie.

Se utilizan, por lo general, ovocitos de hamster dorado libres de zona pelúcida, y son de gran utilidad para la evaluación del semen de especies en las que es difícil conseguir ovocitos homólogos o en las que los sistemas de maduración de ovocitos *in vitro* no estén suficientemente desarrollados. Diversos autores han conseguido establecer correlaciones entre los resultados obtenidos en este test y la fertilidad del semen *in vivo* en varias especies (Mocé, 2003).

- homólogos: semen y ovocitos pertenecen a la misma especie. Debido a que los sistemas de maduración de ovocitos presentan todavía problemas, algunos autores han estudiado la posibilidad de utilizar ovocitos inmaduros para estos tests. Martínez *et al.*, (1993) observaron resultados similares al utilizar ovocitos maduros o inmaduros de ganado porcino. Al igual que

los test heterólogos, son diversos los autores que han logrado establecer correlaciones entre los resultados del test y la fertilidad *in vivo*.

En conejo, uno de los primeros estudio para evaluar la calidad del semen congelado *in vitro* ha sido realizado por Mocé *et al.*, (2002), obteniendo como resultado una correlación significativa entre el tratamiento del semen (fresco, tratado con heparina o congelado), la resistencia a la incubación del semen y su fertilidad *in vivo*. Probablemente, mejorando la resistencia a la incubación del semen congelado se podría predecir su fertilidad *in vivo*, pero para ello son necesarios nuevos estudios.

## 1.2.- Conservación del semen

Desde el punto de vista de difusión genética, las ventajas que presenta la inseminación artificial con respecto a la monta natural aumentan cuando se dispone de diluyentes y protocolos adecuados para la conservación de los espermatozoides, ya que su capacidad fecundante disminuye cuando el semen es conservado por períodos de tiempo más o menos prolongados a temperaturas por encima de los 0°C. El deterioro en la calidad del semen conservado depende de la temperatura y diluyente de conservación, así como de la especie y se debe a la formación de radicales libres de oxígeno que dañan tanto las membranas espermáticas como el ADN mitocondrial y nuclear (para una revisión, ver Vishwanath y Shannon, 1997).

Tras la descongelación del semen, se consigue mantener un porcentaje bastante elevado de espermatozoides móviles, sin embargo, la capacidad fecundante de estos es menor que la del semen fresco, y en la actualidad, el uso masivo de semen congelado en explotaciones comerciales solamente es rentable en ganado vacuno. Varios factores son responsables de los bajos niveles de fertilidad obtenidos con el semen congelado (Salamon y Maxwell, 2000, Watson, 2000):

- daño de los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación: se pueden producir daños a nivel ultra estructural (de membranas plasmática y acrosomal, acrosoma, mitocondrias o axonema) o bien daños bioquímicos (pérdida de contenidos vitales, bien enzimáticos o alteraciones en el contenido de distintos productos, así como desnaturalización



del ADN). Estos conducen a la alteración funcional de los espermatozoides provocando el descenso de su supervivencia *in vivo* y la disminución de su capacidad fecundante.

- **Transporte inadecuado** y **escasa viabilidad** de los espermatozoides en el tracto genital de la hembra, lo que provoca una disminución de la capacidad fecundante del semen.

Tras el proceso de crioconservación, tanto el transporte espermático como las interacciones entre los espermatozoides y las células epiteliales del oviducto se alteran (en ovino, Gillan *et al.*, 2000). Varios autores han observado que tras la inseminación con semen congelado, se produce una reducción en el número de espermatozoides accesorios en los embriones recuperados. En conejos, Murdoch y O'Shea (1973) observaron menos espermatozoides accesorios en embriones de hembras que habían sido inseminadas con semen congelado que cuando se empleó semen fresco (2,0 y 0,69 espermatozoides accesorios tras la inseminación con 30 millones de semen fresco y congelado, respectivamente) además de que tras la inseminación con semen fresco, se observaron espermatozoides móviles en la proximidad de los óvulos.

- **Alteraciones en las membranas espermáticas**, que acortan la vida de los espermatozoides, haciéndolos subfértiles. Diversos autores han observado que los espermatozoides congelados se encuentran en un estado similar al de la capacitación (para una revisión ver Bailey *et al.*, 2000).

- **Mortalidad embrionaria**. Algunos espermatozoides pueden fecundar a los óvulos, pero dan lugar a embriones no viables. Se ha observado que los espermatozoides descongelados fecundan antes a los óvulos *in vitro* e *in vivo*, y se producen antes las divisiones, lo que podría inducir mortalidad embrionaria.

La **resistencia** de los **espermatozoides a la crioconservación es variable entre especies**, debido a las diferencias (fisiológicas y bioquímicas) existentes en los espermatozoides lo que explica, junto con las **diferencias anatómicas** y en el **transporte espermático del tracto reproductor de las hembras**, las diferencias **de fertilidad entre especies** tras la inseminación con semen congelado (Holt, 2000). Dentro de la misma especie, se han observado diferencias en la resistencia a la congelación **entre razas**. Nakagata y Takeshima (1993) observaron diferencias en la resistencia a la congelación-descongelación entre líneas de ratón, y en porcino, Johnson *et al.*, (1981) observaron diferencias en la fertilidad *in vivo* entre el semen congelado de dos

razas (58,6 vs 40,9% de fertilidad con semen congelado de Dutch Landrace y de Dutch Large White, respectivamente), y Thurston *et al.*, (2002) observaron mayor calidad post-descongelación cuando el semen pertenecía a machos de raza Landrace que si era de razas Large White y Duroc. Las diferencias en la resistencia a la crioconservación **entre individuos de la misma raza** han sido constatadas en distintas especies (Curry, 2000) y recientemente ha sido observado en verracos que la variación en la calidad seminal post-descongelación entre machos **puede tener una base genética**, y se han identificado dieciséis marcadores moleculares candidatos ligados a genes que podrían controlar la congelabilidad del semen (Thurston *et al.*, 2002).

Como ya se ha indicado, los resultados de fertilidad obtenidos tras la inseminación con semen congelado, sólo son comparables a los observados con semen fresco en el ganado vacuno, de forma que la inseminación con semen congelado sólo está extendida en esta especie. Sin embargo, es necesario aumentar la concentración de espermatozoides cuando se insemina con semen congelado de ganado vacuno, debido precisamente a los daños sufridos por los espermatozoides durante la congelación-descongelación (Vishwanath y Shannon, 2000). En otras especies se han desarrollado técnicas de inseminación con las que se alcanzan niveles de fertilidad muy elevados tras el uso de semen congelado, pero suelen presentar el inconveniente del encarecimiento de la inseminación. Así, en el ganado ovino y caprino los resultados de fertilidad tras inseminaciones cervicales con semen congelado son bajos, mejorando notablemente si las inseminaciones son transcervicales y más aún si el semen es depositado dentro del útero por medio de laparoscopia (en ovino, Salamon y Maxwell, 2000, en caprino, Leboeuf *et al.*, 2000). También se están desarrollando catéteres que permitan realizar inseminaciones transcervicales en ovino, ya que de este modo mejora la fertilidad (Wulster- Radcliffe y Lewis, 2002).

En los équidos, se están desarrollando actualmente nuevos diluyentes tanto para aumentar el tiempo de conservación en estado líquido como para congelar el semen. Como en todas las especies, los resultados que se obtienen tras la inseminación con semen congelado son peores que los obtenidos con semen fresco, no obstante, hay animales con los que se obtienen altos niveles de fertilidad, mientras que con otros, los niveles de fertilidad obtenidos son muy bajos (Graham, 1996).

En especies polítopas, deben alcanzarse niveles adecuados de fertilidad y prolificidad para que la inseminación con semen congelado sea competitiva en explotaciones comerciales. En el

caso del ganado porcino, es posible obtener buenos niveles de fertilidad con semen conservado durante 2 ó 3 días (79% de fertilidad y 10,6 nacidos), mientras que con el semen congelado en pellets o pajuelas de varios tamaños, los resultados publicados han sido alrededor de 55% de fertilidad y entre 7,4 y 10,4 nacidos (dependiendo del sistema de envasado elegido, Johnson *et al.*, 2000). Por ello, el semen congelado en porcino se utiliza de momento para la exportación de material genético de los animales seleccionados, mientras que el semen conservado se utiliza para la producción de los animales que serán destinados a matadero. Recientemente, han sido publicados datos de inseminaciones realizadas con semen congelado de porcino envasado en FlatPack, obteniéndose resultados de fertilidad y prolificidad similares a los del semen fresco o la monta natural (72,3% fertilidad y 11,3 nacidos totales, Eriksson *et al.*, 2002), y resultados tras la inseminación intrauterina profunda (deep intrauterine insemination-DUI) con semen congelado observándose fertilidad y prolificidad elevada (70% vs 84% de fertilidad y 9,3 vs 9,9 nacidos para el semen congelado y fresco, respectivamente; Roca *et al.*, 2003), lo que podría potenciar el uso del semen congelado en esta especie.

En el caso de los conejos, la inseminación artificial con semen congelado se restringe a trabajos experimentales, y no se utiliza para la inseminación en explotaciones comerciales. Han sido varios los protocolos y diluyentes descritos para la congelación del semen de conejos, pero las pruebas de fertilidad *in vivo* se han realizado sobre un escaso número de hembras en la mayoría de las ocasiones, y actualmente, con ninguno de ellos se han obtenido resultados que permitan su utilización en granjas comerciales con suficientes garantías de éxito.

En los últimos estudios realizados con semen congelado de conejo podemos diferenciar en el proceso de **congelación** una serie de fases, un **descenso lento** desde **25°C hasta 5°C** con una duración habitual de **1 ó 2 horas** (según autores esta fase va desde los 45 minutos hasta las 4 horas; Vicente, 2001, Mocé, 2003) en las que en muchos caso **se añade** la solución con el **crioprotector** y los espermatozoides adquieren resistencia posiblemente durante un proceso de estabilización de membranas, y en la mayor parte de los casos, una segunda fase de **congelación rápida en vapor de nitrógeno (-120°C)** previa a la **inmersión en nitrógeno líquido (-196°C)**. Es característico de la congelación del semen de conejo, la utilización de **dimetilsulfóxido o acetamidas** como crioprotector frente al uso habitual en otras especies de glicerol. La solución base crioprotectora se compone de un tampón orgánico TRIS ajustado a

pH 6,8-7,0 con ácido cítrico, y suplementado con glucosa o fructosa. A ésta se le añade, en ocasiones yema de huevo (Courtens, *et al.*, 1994) o sacarosa (Viudes de Castro y Vicente, 1996), acetamidas (Chen y Foote, 1994) o dimetilsulfóxido (Vicente y Viudes de Castro, 1996, Mocé *et al.*, 2002).

Viudes de Castro *et al.* (2005) estudiaron diferentes parámetros de los espermatozoides y la capacidad del semen congelado para fertilizar *in vitro* e *in vivo* los ovocitos maduros, como prueba para predecir *in vivo* la fertilidad y la prolificidad. Aunque no se observaron diferencias estadísticas entre los protocolos de congelación en los parámetros seminales [MOT: 40 y 35%, VCL: 35 y 46  $\mu\text{m/s}$ , ALH: 1,7 y 2,4  $\mu\text{m}$ , para el semen congelado a  $-30^{\circ}\text{C}$  y LNV, respectivamente], se observaron diferencias significativas en la capacidad de la fertilización *in vivo* e *in vitro*. El semen congelado a  $-30^{\circ}\text{C}$  mostró la más alta capacidad de fertilización *in vitro* (26,7% frente a 6,2 y 8,7% para el semen congelado a  $-30^{\circ}\text{C}$ , en el semen fresco y LNV, respectivamente) y la más baja tasa de fertilidad *in vivo* (21,7% versus 64,2% y 70,6% para el semen congelado a  $-30^{\circ}\text{C}$ , en el semen fresco y LNV, respectivamente). En fin el semen congelado a  $-30^{\circ}\text{C}$  pareció ser más capacitado.

Mocé *et al.* (2003) estudiaron el efecto de diferentes protocolos de congelación y descongelación después de la inseminación artificial con semen de tres diferentes líneas de conejo (dos líneas maternas seleccionadas por el tamaño de camada al destete, las líneas A, y V, y una línea seleccionada por el índice de crecimiento, Línea R). Los mejores resultados (tasa de fertilidad y prolificidad) para todas las líneas de conejo se obtuvieron después de la congelación en nitrógeno líquido y vapor de descongelación a  $50^{\circ}\text{C}$ , siendo más pronunciado en la línea seleccionada para el crecimiento (línea R).

## **II. OBJETIVOS**

## **II. OBJETIVOS**

El trabajo se enmarca dentro de los estudios de heredabilidad de los parámetros seminales en el eyaculado y post-descongelación que se llevan a cabo sobre machos seleccionados de la línea R.

El objetivo de la actual tesis de master es realizar un estudio preliminar sobre las relaciones entre parámetros seminales del eyaculado y parámetros espermáticos post-descongelación.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

## III. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1.- Material animal

Los machos utilizados en este trabajo pertenecen a la línea R, seleccionada por el Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia.

La **línea rosa R** es una línea genética de conejos seleccionada en la Universidad Politécnica de Valencia desde 1991 **para el carácter velocidad de crecimiento** durante el **periodo de cebo** (desde los 28 días hasta los 63 días de edad).

En este experimento se utilizaron los eyaculados de **82 machos de 6 a 8 meses** de edad. Los machos empleados para la recogida del semen estaban alojados en el **centro de Inseminación Artificial de Aras de los Olmos** y desde el inicio de su actividad reproductiva a los 5 meses son estimulados 2 veces por semana para la extracción de eyaculados. **Los datos utilizados** en este experimento **corresponden a los eyaculados recuperados desde Noviembre de 2006 a Abril de 2007.**

### 3.2.- Condiciones de alojamiento

Este centro consta de dos naves, dedicadas una de ellas a centro de inseminación y la segunda a centro de multiplicación. Los machos empleados para la recogida del semen estaban alojados en el centro de Inseminación Artificial de Aras de los Olmos. Los datos utilizados en este experimento corresponden a los eyaculados recuperados desde Noviembre de 2006 a Abril de 2007.

Esta granja consta de dos naves, dedicadas una de ellas a centro de inseminación y la segunda a centro de multiplicación. Los machos de la línea R se encuentran alojados en la nave del centro de inseminación está dotada de un sistema de ventilación forzada (cooling) que renueva el aire, permitiendo la eliminación de gases nocivos. Las paredes son de bloques de arcillas expandida, el techo es de chapa ondulada verde de acero galvanizado y está aislado interiormente con placas de poliuretano expandido, recubiertas por una lámina de aluminio en su cara interna, garantizando así un adecuado aislamiento térmico.



Todos los animales utilizados en el experimento fueron alojados en jaulas individuales de 0,5 m x 0,6 m de base y 0,3 m de altura y alimentados con una dieta comercial (en comedero tipo tolva) y agua *ad limitum* (con bebederos automáticos de chupete). El fotoperíodo empleado fue de 16 horas luz/día.

### 3.3.- Extracción de semen

Los métodos de recogida deben garantizar la cantidad de los eyaculados, no entrañar peligro para el animal y permitir la obtención de volúmenes seminales semejantes a los de monta natural, evitando tanto la contaminación como el shock térmico. En el momento de la extracción se lleva una hembra a la jaula del macho. Se **úbica** a la **hembra en posición de servicio**, cuando el macho intenta el salto, **se coloca la vagina artificial** por **debajo del vientre de la coneja** de manera tal que el pene del reproductor se introduzca en la vagina artificial.

La vagina artificial consta de:

- **Cuerpo semi-rígido** (parte fundamental) de fibra de vidrio.
- Revestimiento interno o camisa. En esta experiencia se utilizaron **preservativos**.
- **Colector de eyaculado**.

El cuerpo es un cilindro de material rígido o semi-rígido con dos aberturas terminales. En una de ellas se sitúa un tubo colector mientras que la otra permite la entrada del pene del animal y la eyaculación. Normalmente este cilindro dispone de un **orificio que permite la introducción de agua caliente o aire**.

La camisa es un cilindro de látex o goma elástica más largo que el cuerpo, de forma que, una vez introducida en él, se puedan revestir los bordes. Para ello el preservativo fue cortado por su extremo anterior. De este modo se forma una cavidad estanca entre el cuerpo y la camisa destinada a contener agua caliente que proporcionará la temperatura adecuada, siendo la temperatura **50°C óptima para estimular la eyaculación sin provocar efectos adversos** sobre los espermatozoides y vertiendo el eyaculado al interior del tubo graduado. Si es menor, el macho rechazará la monta, mientras que si está por encima de la temperatura, podemos dañar el pene del animal, a la vez que provocamos un shock térmico a los espermatozoides, los cuales no sobrevivirán por mucho tiempo. La presión del líquido es otro factor importante que determinará el éxito de la recogida, ya que simula la presión que la vulva y la vagina de la hembra ejercen sobre el pene.

A cada uno de los machos se intento recoger dos eyaculados con un lapso de tiempo de 30 minutos entre ellos. El orden del eyaculado utilizado en el experimento fue registrado.

### 3.4.- Metodología de congelación

Todos los eyaculados de color blanco fueron congelados, la congelación se realizó con independencia de sus características.

#### 3.4.1.- Medio de congelación

El medio de congelación consta de un diluyente de semen de conejo cuya composición es 0,25 M de Tris[hidroximetil]-aminometano, 88mM de ácido cítrico, y 47mM de D-Glucosa (diluyente 1), al que se adicionaron los crioprotectores dimetilsulfóxido y sacarosa a una concentración de 3,5M y 0,1M respectivamente.

#### 3.4.2.- Técnica de congelación

El medio de congelación y el eyaculado se mezclaron a partes iguales (1:1) a temperatura ambiente (en torno a 18-20°C), la concentración final de los crioprotectores fue por tanto: 1,75M de dimetilsulfóxido y 0,05M de sacarosa.

Consta de dos etapas: la primera etapa fue de 45 minutos de duración en un frigorífico a 5 °C y la segunda de 10 minutos, suspendidas horizontalmente sobre vapor de nitrógeno líquido (-120°C) a 5 cm del nitrógeno líquido, antes de sumergir las pajuelas de 0,25ml en nitrógeno líquido (-196°C).

Para la descongelación del semen se sumergieron las pajuelas durante 10-15 segundos en un baño de agua caliente, atemperado a 40°C.

### 3.5.- Metodología de evaluación del semen

El eyaculado de cada macho fue inmediatamente procesado guardando dos **alícuotas de 25µl** para su análisis de movilidad, concentración y morfológico. El resto del eyaculado fue congelado según el procedimiento detallado anteriormente.

#### 3.5.1.- Movilidad

Movilidad y parámetros cinéticos del eyaculado y del semen post-descongelación: se valoró la **movilidad individual**, tomando una **alícuota de 10µl** de la **muestra diluida** (25µl de eyaculado + 475µl del diluyente 1 suplementado con 1g/L de BSA, o 50µl de semen descongelado + 450µl del mismo diluyente) y depositándola en una **cámara Mackler** situada sobre la platina termostada a 37°C de un microscopio (NiKon E-400). Seguidamente, cada muestra fue **valorada** por medio del programa de análisis de imágenes **CASA** (VIMAS, Microptics España). De cada muestra se capturaron, al menos, 4 secuencias de 16 imágenes que tras su análisis permitió obtener los siguientes parámetros utilizados en este trabajo:

- Porcentaje de movilidad

- Parámetros de velocidad:

VCL: Velocidad Curvilínea (Curvilinear Velocity). Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo (µ/s).

VSL: Velocidad Rectilínea. Distancia recorrida por el espermatozoide en línea recta entre el inicio y el final de la trayectoria.

VAP: Velocidad Media (Average Path Velocity). Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de la trayectoria media (µ/s).

- Parámetros de progresión:

LIN: Índice de linealidad (Lineality). Relación porcentual entre la Velocidad Rectilínea VSL y la velocidad curvilínea VCL (%).  $LIN = (VSL / VCL) * 100$

STR: Índice de Rectitud (Straightness). Relación porcentual entre la Velocidad Rectilínea VSL y la velocidad Lineal VAP (%).  $STR = (VSL / VAP) * 100$

WOB: Índice de Oscilación (Wobbel). Relación porcentual entre la Velocidad Lineal VAP y la Velocidad Rectilínea VSL (%).  $WOB = (VAP / VSL) * 100$

▪ Parámetros de angularidad:

ALH: Amplitud media de desplazamiento lateral (Lateral Head displacement). Desplazamiento que efectúan las cabezas en su trayectoria curvilínea de un lado al otro de la trayectoria media o lineal, ( $\mu\text{m}$ ).  $ALH = (\sum^{n-1} (alh * 2)) / (n-2)$

### **3.5.2.- Concentración**

La muestra para evaluación de la concentración y morfológica fue fijada añadiendo 25 $\mu\text{l}$  o 50 $\mu\text{l}$  (eyaculado o semen descongelado) a 475 $\mu\text{l}$  de una solución de tampón fosfato (PBS) con glutaraldehído al 1%. Tras agitar la muestra fijada con glutaraldehído se tomó una gota mediante una pipeta Pasteur y se depositó en la cámara cuenta glóbulos Thoma, realizando el recuento de espermatozoides en las 40 cuadrículas resultantes de la suma de los cuadros de las dos diagonales de la cámara.

### **3.5.3.- Análisis morfológicos**

La evaluación de las anomalías morfológicas y de la normalidad acrosómica sobre el eyaculado y sobre el semen descongelado se realizaron sobre la muestra fijada en la solución fosfato con glutaraldehído al 1%, depositando una alícuota en un portaobjetos y tras cubrir fueron observados en un microscopio con óptica de contraste de fases a 500X, respectivamente. La dinámica seguida fue la observación de un mínimo de 100 espermatozoides usando las fórmulas siguientes para el cálculo del porcentaje tanto de anomalías morfológicas en el eyaculado y como de acrosomas normales en el eyaculado y en el semen descongelado:

$$\text{Porcentaje de morfoanomalías} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de espermatozoides anormales} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de espermatozoides contados}}$$

Normalidad acrósomica =  $\frac{\text{n}^\circ \text{ de espermatozoides con acrosomas normales} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de espermatozoides sin anomalías morfológicas}}$

#### **3.5.4.- Integridad de membrana plasmática en el semen descongelado. Porcentaje de viabilidad**

Se utiliza una solución de 475µl de diluyente 1 suplementado con 1g/L de BSA y 10µl de una solución comercial para valoración de espermatozoides de SYBR-green (Invitrogen) + 1µg yoduro de propidio (Invitrogen) a la que se adicionó 25µl de semen descongelado. Tras 5' de incubación a temperatura ambiente. Se fija con 500µl de solución de glutaraldehído al 1%.

#### **3.6.- Análisis estadísticos**

Los parámetros seminales y sus correlaciones fueron analizados mediante el programa de análisis descriptivo del paquete estadístico Statgraphics 5.1. Se realizó un análisis de varianza para estudiar el efecto del orden de eyaculado sobre los parámetros espermáticos pre y post-congelación, incluyendo como factores fijos el orden de eyaculado (1 y 2) y el macho. Los parámetros mas correlacionados entre las características del eyaculado y las del semen descongelado fueron incluidos en la opción de selección de ecuaciones de regresión del mismo paquete estadístico.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1.- Características de los eyaculados de los machos de la línea R.

Las tablas 4.1 y 4.2 recogen los parámetros estadísticos que describen tanto las características de los eyaculados como las características cinéticas de los espermatozoides. La mayor parte de las características seminales analizadas presentaron coeficientes de variación elevados, de un 25 % a un 90%, tan sólo en el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos (NAR), en la Velocidad Curvilínea (VCL), en el índices de rectitud (STR) y oscilación (WOB) se observaron coeficientes de variación moderados (de un 10 % a un 19%).

En el presente trabajo el volumen medio de los eyaculados fue de 0,66ml. Volumen similar a los recogidos por Lavara *et al.*, (2000) o inferior (1,2ml) al registrado por Mocé *et al.*, (2000) para macho adultos de esta línea seleccionada.

La concentración media del eyaculado fue de  $190 \times 10^6$  espermatozoides/ml (tabla 4.1), inferior a la obtenida por Mocé *et al.*, (2000) con  $239 \times 10^6$  espermatozoides/ml y a la observada por Quintero *et al.*, (2007) con  $395 \times 10^6$  espermatozoides/ml. La concentración espermática de esta línea genética fue también inferior a las observadas en otras líneas genéticas como las V y H de la UPV ( $340$  y  $380 \times 10^6$  espermatozoides/ml, respectivamente, Vicente *et al.*, 2000) o a las líneas A1077 y A2066 del INRA ( $574$  y  $394 \times 10^6$  espermatozoides/ml, respectivamente, Bencheik, 1995). No obstante tanto la edad, las condiciones ambientales y nutricionales ejercen un importante efecto sobre estas características, por ello las diferencias observadas entre diferentes experimentos en una misma línea o entre líneas deben ser consideradas con precaución.

El porcentaje de espermatozoides anormales fue relativamente bajo. La media para este experimento se situó en un 15% (Tabla 4.1), similar a los valores obtenidos en otros estudios para esta línea, 5-11% Pascual *et al.*, (2004), 11% García *et al.*, (2004), 12% Viudes y Castro *et al.* (2004), 20% (Guirado, 2004). Mayores fueron los resultados, 24%, obtenidos por Quintero *et al.*, (2007).

El porcentaje de normalidad acrosómica fue de 86,9% mayor al obtenido por Mocé *et al.*, (2003) con un 39% y inferior a los obtenidos por Viudes de Castro *et al.*, (2005) en torno al 87%. Resultados en otras líneas o estirpes sitúan el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal en un 84% para los machos híbridos Neocelandés Blanco (Castellini *et al.*, 2004).

La movilidad media fue relativamente baja, un 58,9% (tabla 4.1.), mayor a la observada por Mocé *et al.*, (2003) con un 43% para machos de ésta línea genética y a la obtenida por Viudes de Castro *et al.*, (2005) con un 55%. La motilidad media observada por Lavara *et al.* (2005) y Quintero *et al.*, (2007) fue mayor, en torno o superior al 70%. A diferencia de otros experimentos, en este trabajo se utilizaron todos los eyaculados obtenidos, así en el trabajo de Lavara *et al.* (2005) y Quintero *et al.* (2007) los eyaculados fueron utilizados en una experiencia de inseminación por lo que se seleccionan los eyaculados de acuerdo con unos criterios mínimos de calidad espermática, por ejemplo más de un 70% de movilidad.

Tabla 4.1: Características de los eyaculados de los machos de la línea R.

Parámetro	Nº de casos	Media	Error estándar	Mínimo	Máximo	Coef. variación
<b>Vol</b>	298	0,66	0,02	0,1	2,5	51,40
<b>Conc</b>	298	190,41	9,79	0	1150,0	89,33
<b>ABN</b>	298	15,06	0,69	1,51	84,50	78,84
<b>NAR</b>	298	86,85	0,93	4,17	100	18,56
<b>Mot</b>	298	58,87	1,55	0	100	45,46

Vol: volumen (ml); Conc: concentración (mill/ml); ABN: porcentaje de espermatozoides anormales (%); NAR: normalidad acrosómica (%); Mot: movilidad total (%).

#### 4.1.2.- Parámetros cinéticos de los espermatozoides

Los parámetros cinéticos analizados fueron poco relacionados, en términos generales, a los registrados en anteriores estudios para esta línea (Lavara *et al.*, 2005, Mocé *et al.* 2000, Quintero *et al.*, 2007 y Viudes de Castro *et al.*, 2005).



#### Parámetros de velocidad:

- VCL (Velocidad Curvilínea): en el presente estudio 84,93  $\mu\text{m/s}$  (Tabla 4.2) resulta ser mayor al mismo observado por Lavara *et al.*, (2005), con 54,8  $\mu\text{m/s}$  y por Viudes de Castro *et al.*, (2005) con 78  $\mu\text{m/s}$ .
- VSL (Velocidad Rectilínea): en el presente estudio 47,61  $\mu\text{m/s}$  (Tabla 4.2) fue mayor al de Lavara *et al.*, (2005), con 26,1  $\mu\text{m/s}$  y al obtenido por Viudes de Castro *et al.*, (2005), 42,9  $\mu\text{m/s}$ .
- VAP (Velocidad Media) fue de 56,61  $\mu\text{m/s}$  (Tabla 4.2) mayor de los resultados obtenidos en los estudios citados: Lavara *et al.*, (2005), Viudes de Castro *et al.*, (2005), respectivamente 36  $\mu\text{m/s}$  y 49  $\mu\text{m/s}$ . Mientras que fue menor del observado por Quintero *et al.*, (2007) con un 77,28  $\mu\text{m/s}$ .

#### Parámetros de progresión:

- LIN (Índice de linealidad). Los valores para este parámetro en el presente estudio fueron relativamente similares a los observados por Lavara *et al.*, (2005) y Viudes de Castro *et al.*, (2005), 58,2 % (Tabla 4.2) frente a 53,4 % y 55 % respectivamente, mientras que Quintero *et al.*, (2007) registró un valor de 76,84 %.
- WOB (Índice de Oscilación) fue de 67,81 % (Tabla 4.2) similar al valor de Lavara *et al.*, (2005), 66,9 %. Mucho mayores fue el Índice de Oscilación observado por Viudes de Castro *et al.*, (2005), con 116,6 %.
- STR (Índice de Rectitud) fue de 81,27 % (Tabla 4.2) mayor al resultado obtenido por Lavara *et al.*, (2005), 72,5% y menor al de Viudes de Castro *et al.*, (2005), que registró un 87,55%.

#### Parámetros de angularidad:

- ALH (Amplitud media de desplazamiento lateral) fue similar al registrado en los anteriores estudios (Viudes de Castro *et al.*, 2005 y Quintero *et al.*, 2007), y mayor al obtenido por Lavara *et al.*, (2005), 3,09  $\mu\text{m}$  (Tabla 4.2) frente a 2,05  $\mu\text{m}$ .

Tabla 4.2: Parámetros de los espermatozoides de los eyaculados de los machos de la línea R.

Parámetro	Nº de casos	Media	Error estándar	Mínimo	Máximo	Coef. variación
<b>VCL</b>	278	84,93	1,12	32,69	184,45	22,04
<b>VSL</b>	278	47,61	0,90	13,62	133,37	31,56
<b>VAP</b>	278	56,61	0,90	19,36	152,78	26,44
<b>LIN</b>	278	58,20	0,92	18,38	96,28	26,48
<b>STR</b>	278	81,27	0,61	44,29	98,97	12,60
<b>WOB</b>	278	67,81	0,79	7,25	97,28	19,51
<b>ALH</b>	278	3,09	0,06	0,95	6,46	31,74

VCL: Velocidad curvilínea ( $\mu\text{s}^{-1}$ ); VSL: Velocidad rectilínea ( $\mu\text{s}^{-1}$ ); VAP: Velocidad lineal ( $\mu\text{s}^{-1}$ ); LIN: Índice de linealidad (%). Calculado como  $\text{VSL}/\text{VCL}$ ; STR: Índice de rectitud (%). Calculado como  $\text{VSL}/\text{VAP}$ ; WOB: Índice de oscilación (%); ALH: Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza ( $\mu\text{m}$ ).

Cabe resaltar que todos los coeficientes de variación han sido elevados para todos los parámetros, por lo que la variabilidad también será alta.

#### 4.2.- Características del semen descongelado

El efecto de descongelación descrito por otros autores en otras especies y que justifica los problemas que posteriormente se observan en la capacidad fecundante de los espermatozoides descongelados, no puede ser fundamentado exclusivamente en base a los parámetros cinéticos sino que además deben ser tenidos en cuenta los daños en las membranas que afectan al acrosoma, y a la integridad de la membrana plasmática.

En el presente estudio podemos observar que los parámetros cinéticos, la normalidad acrosómica y la motilidad del semen de conejo resultan gravemente afectados por los procesos de criopreservación.

Tabla 4.3: Características del semen descongelado

Parámetro	Nº de casos	Media	Error estándar	Mínimo	Máximo	Coef. variación
<b>D_SYBR</b>	299	40,87	0,77	2,11	58,48	41,49
<b>D_NAR</b>	298	23,28	1,08	0,0	88,5	80,03
<b>D_Mot</b>	298	9,36	0,72	0,0	55,0	133,66
<b>D_VCL</b>	215	61,37	1,73	11,14	198,76	41,40
<b>D_VSL</b>	215	26,41	0,82	1,71	58,48	45,42
<b>D_VAP</b>	215	27,23	0,77	2,11	58,48	41,49
<b>D_LIN</b>	215	34,98	0,91	5,07	74,26	38,21
<b>D_STR</b>	215	53,13	1,04	8,75	100,0	28,78
<b>D_WOB</b>	215	74,08	1,18	29,90	100,0	23,34
<b>D_ALH</b>	215	4,69	0,23	0,48	45,91	71,48

Parámetros medidos en semen descongelado:

D\_SYBR: Viabilidad (%); D\_NAR: normalidad acrosómica (%); D\_Mot: movilidad total (%); D\_VCL: Velocidad curvilínea ( $\mu\text{s}^{-1}$ ); D\_VSL: Velocidad rectilínea ( $\mu\text{s}^{-1}$ ); D\_VAP: Velocidad lineal ( $\mu\text{s}^{-1}$ ); D\_LIN: Índice de linealidad (%). Calculado como  $\text{VSL}/\text{VCL}$ ; D\_STR: Índice de rectitud (%). Calculado como  $\text{VSL}/\text{VAP}$ ; D\_WOB: Índice de oscilación (%); D\_ALH: Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza ( $\mu\text{m}$ ).

Atendiendo a los datos de viabilidad (integridad de la membrana plasmática) en torno al 40% de los espermatozoides post-descongelación son viables, sin embargo tan sólo el 23% tienen el acrosoma intacto morfológicamente y el 9% de ellos se desplazan, con una velocidad inferior al semen no congelado (VCL  $61,37\mu\text{s}^{-1}$ , tabla 4.3) y trayectorias de acuerdo con el índice de linealidad más circulares y con mayor desplazamiento de sus cabezas (LIN: 34,98, ALH: 4,69, tabla 4.3). Estos datos contrastan con los observados por Mocé (2003) y Viudes de Castro *et al.* (2005) para semen descongelado de esta línea de machos, en el que la movilidad y integridad de la acrosoma son superiores a los de este experimento (Mot 54%, NAR 64% y Mot 35%, NAR 33% respectivamente) La baja movilidad y integridad acrosómica observada en este experimento probablemente se debe a la no selección de los eyaculados antes de su congelación. Viudes *et al.* (2005) demostró que a los daños visibles ocasionados al semen congelado de conejo, bajo porcentaje de movilidad, elevados daños en acrosoma (100-NAR) y espermatozoides con desplazamientos laterales de la cabeza (ALH) mayores, además debe considerarse una temprana capacitación y seguida de apoptosis.

#### 4.3.- Evaluación de la influencia del orden de obtención de los eyaculado sobre de los parámetros seminales pre y post-descongelación

Se realizó un análisis de la varianza para estudiar el efecto de orden de eyaculado (primero o segundo) sobre las características de los eyaculados y sobre los parámetros espermáticos pre y post-descongelación, el análisis se incluyó el efecto fijo el factor macho.

Las tablas correspondientes al análisis son las siguientes:

Tabla 4.4a- Efecto del orden de obtención de los eyaculado sobre las características seminales.

Característica	Vol	Conc	Producción	ABN	NAR	Mot
<i>Eyaculado 1</i> (152)	0,71 0,027 <sup>a</sup>	164 13,3 <sup>b</sup>	113 9,9	17,0 0,07 <sup>a</sup>	84,9 1,03	58,4 2,09
<i>Eyaculado 2</i> (146)	0,59 0,029 <sup>b</sup>	210 14,0 <sup>a</sup>	113 10,4	14,0 0,07 <sup>b</sup>	86,9 1,06	58,2 2,20
Parámetro	VCL	VAP	VSL	LIN	STR	ALH
<i>Eyaculado 1</i> (144)	85,3 1,56	52,9 1,24	46,2 1,25	56,8 1,28	81,8 0,85	3,2 0,08
<i>Eyaculado 2</i> (134)	84,5 1,62	58,4 1,29	49,2 1,29	59,7 1,33	81,0 0,89	3,0 0,08

() n° de casos, valores con diferente superíndice difieren estadísticamente P<0,05.

Vol: volumen (ml); Conc: concentración (mill/ml); ABN: porcentaje de espermatozoides anormales (%); NAR: normalidad acrosómica (%); Mot: movilidad total (%); VCL: Velocidad curvilínea ( $\mu$ s-1); VSL: Velocidad rectilínea ( $\mu$ s-1); VAP: Velocidad lineal ( $\mu$ s-1); LIN: Índice de linealidad (%). Calculado como VSL/VCL; STR: Índice de rectitud (%). Calculado como VSL/VAP; WOB: Índice de oscilación (%); ALH: Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza ( $\mu$ m).

Las tablas 4.4a y 4.4b nos indican que hay diferencias significativas solo para los parámetros de volumen y concentración seminal, mientras que para las restantes de las características seminales no hay diferencias entre primer y segundo eyaculado. Sin embargo Bencheikh, (1993) además de encontrar diferencias en la concentración y el volumen del semen en fresco, también observa cambios en la movilidad entre los dos eyaculados. En particular el segundo eyaculado presenta valores mejores para los parámetros de movilidad masal, movilidad individual y concentración (7,6% frente a 6,8%; 3,6% frente a 3,3% y 525mill/ml frente a 349mill/ml respectivamente).

El macho siempre es significativo en la evaluación de todos los parámetros seminales.

Tabla 4.4b.- Efecto del orden de obtención de los eyaculado sobre las características seminales post-descongelación.

Parámetros	N°	Viabilidad	NAR	Mot			
<i>Eyaculado 1</i>	152	39,8 2,20	22,8 1,51	9,5 1,01			
<i>Eyaculado 2</i>	146	42,0 2,25	23,8 1,54	9,2 1,04			
Parámetros		VCL	VAP	VSL	LIN	STR	ALH
<i>Eyaculado 1</i>	103	62,4 2,51	28,6 1,11	27,3 1,18	36,2 1,32	53,4 1,51	4,8 0,33
<i>Eyaculado 2</i>	112	60,4 2,40	26,0 1,07	25,6 1,13	33,9 1,26	52,9 1,45	4,6 0,32

N°: n° de casos; Viabilidad (%); NAR: normalidad acrosómica (%); Mot: movilidad total (%);

#### 4.4.- Correlación de los parámetros seminales

Se estudiaron las relaciones entre las variables pre y post-congelación, a continuación se comentan aquellas que siendo significativas estadísticamente relacionan variables del eyaculado como por ejemplo porcentaje de espermatozoides anormales, integridad del acrosoma o movilidad del eyaculado con movilidad post-descongelación. U otras que relacionan variables morfológicas con cinéticas. No obstante, los coeficientes de correlación obtenidos son, en general, bajos (tabla 4.5).

- **ABN-Mot\_D:** El porcentaje de espermatozoides anormales en semen fresco presenta una relación poco significativa con la movilidad en semen descongelado, ( $r = -0,154$ ,  $p < 0,01$ ), este valor ( $r$ ) nos indica que las dos variables están negativamente relacionadas, eso significa que con altos porcentajes de espermatozoides anormales en semen fresco la movilidad seminal se verá seriamente afectada en el semen descongelado.

- **Mot-Mot\_D:** Resulta interesante observar como la movilidad en semen fresco y la en semen descongelado están estrechamente correlacionadas ( $r = 0,376$ ,  $p < 0,001$ ) entre sí como era de esperar. El signo positivo nos informa sobre el tipo de relación entre las variables. Con alto

valores de movilidad en semen fresco tendremos altos valores de movilidad en semen descongelado, siempre considerando que la motilidad viene afectada por los procesos de criopreservación.

▪ **NAR-Mot\_D:** Movilidad en semen descongelado y integridad del acrosoma en semen fresco están correlacionado, según los resultados obtenidos, de forma positiva ( $r = 0,247$ ,  $p < 0,001$ ).

Eso nos indica que con altos valores de espermatozoides con acrosoma normal en semen fresco, también tendremos altos valores la movilidad seminal post-descongelación.

▪ **D\_NAR-LIN:** La presente correlación obtenida nos informa que el índice de linealidad en semen en fresco resulta estar positivamente relacionado con la normalidad acrosómica post-descongelación ( $r = 0,167$ ,  $p < 0,01$ ).

Considerando la movilidad post-descongelación y la integridad acrosómica como criterios de calidad espermática, es posible intentar establecer ecuaciones de regresión a partir de las variables más correlacionadas del eyaculado con la finalidad de congelar eyaculados de modo eficiente. Así, es posible obtener la siguiente ecuación de regresión para la movilidad post-descongelación:

$$\text{Mot}_D = -3,044 + 0,022 \text{ Conc} + 0,14 \text{ Mot}$$

Concentración y movilidad del eyaculado explican tan sólo un 22% de la variabilidad total del parámetro movilidad post-descongelación. La inclusión de otros parámetros en la ecuación tan sólo reduce la variabilidad 1%. En el caso de la integridad acrosómica, no es posible obtener ecuaciones de predicción con  $R^2$  superiores a 0,10.

Es necesario por tanto contemplar otras características del esperma distintas de las observadas en este trabajo para mejorar la capacidad de seleccionar eyaculados para la congelación.

Tabla 4.5- Correlaciones entre parámetros espermáticos del eyaculado y del semen descongelado

ABN-Conc -0,214 ***	Conc-D_SYBR -0,140 *	<b>Mot-Mot_D</b> <b>0,376</b> ***	<b>Mot_D-NAR</b> <b>0,247</b> ***	<b>D_NAR-LIN</b> <b>0,167</b> **	D_ALH-NAR 0,137 *	D_LIN-Mot 0,174 *
ABN-Mot -0,254 ***	Conc-Mot 0,259 ***	Mot-NAR 0,398 ***	Mot_D-Prod 0,256 ***	D_NAR-VCL -0,128 *		D_LIN-NAR 0,186 **
<b>ABN-Mot_D</b> <b>-0,154</b> **	Conc-Mot_D 0,372 ***	Mot-Prod 0,232 ***		D_NAR-WOB 0,166 **		D_LIN-Prod -0,167 *
ABN-NAR -0,322 ***	Conc-NAR 0,310 ***	Mot-VSL 0,176 **				
ABN-Prod -0,199 ***	Conc-Prod 0,771 ***	Mot-WOB 0,232 ***				
	Conc-Vol -0,117 *					

Probabilidad: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Conc: concentración (mill/ml) ; Prod: Producción; ABN: porcentaje de espermatozoides anormales; NAR: normalidad acrosómica; Mot: movilidad total; VCL: Velocidad curvilínea; VAP: Velocidad lineal; LIN: Índice de linealidad; WOB: Índice de oscilación; ALH: Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza. Parámetros medidos en semen descongelado: D\_SYBR: Viabilidad (%); D\_NAR: normalidad acrosómica (%); D\_Mot: movilidad total (%); D\_LIN: Índice de linealidad (%); D\_ALH: Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza ( $\mu\text{m}$ ).

Variable-Variable Coef.Variación Probabilidad
---

## **V. CONCLUSIONES**



## V. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se analizan y relacionan los distintos parámetros de evaluación de la calidad seminal pre y post-descongelación. Con el presente estudio se evidencia que los parámetros seminales son seriamente perturbado por el proceso de criopreservación.

No se ha observado una respuesta diferencial entre el semen congelado proveniente del primer o del segundo eyaculado.

Se ha observado que la motilidad post-descongelación está correlacionada con la integridad del acrosoma y la producción seminal.

Se ha observado que la integridad acrosómica post-descongelación se correlaciona con el índice de linealidad, con la velocidad curvilínea y el índice de oscilación.

Por último la mejor ecuación de predicción de un parámetro espermático post-descongelación se ha obtenido para la movilidad a partir de la movilidad del eyaculado y de su concentración.

## **VI. BIBLIOGRAFÍA**

## VI. BIBLIOGRAFÍA

### A

Abaigar, T., Holt, W.V., Harrison, R.A.P., 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. *Biol. Reprod.*, 60: 32-41.

Alvariño, J.M.R., 1993. Inseminación artificial. Control de la reproducción en el conejo, 5:65-88, Ed. Mundi-Prensa. Madrid.

Amann, R.P., Hammerstedt, R.H. 2002. Detection of differences in fertility. *J. Androl.*, 23: 317-325.

Amann, R.P., Seidel, G.E., Mortimer, R.G. 2000. Fertilizing potential in vitro of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. *Theriogenology*, 54: 1499-1515.

Aragonés, A., 2002. Evaluación de la respuesta endosómica del semen de conejo. Trabajo fin de carrera. UPV.

Ax, R.L., Dickson, K., Lenz, R.W. 1985. Induction of acrosome reactions by chondroitin sulfates in vitro corresponds to nonreturn rates of dairy bulls. *J. Dairy Sci.*, 68: 387-390.

Ax, R.L., Lenz, R.W. 1987. Glycosaminoglycans as probes to monitor differences in fertility of bulls. *J. Dairy Sci.*, 70: 1477-1486.

## **B**

Bailey, J.L., Bilodeau, J.F., Cormier, N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.*, 21: 1-7.

Bailey, J.L., Robertson, L., Buhr, M.M. 1994. Relationships among in vivo fertility, computeranalysed motility and in vitro Ca<sup>2+</sup> flux in bovine spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci.*, 74: 53-58.

Ballachey, B.E., Hohenboken, W.D., Evenson, D.P. 1987. Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. *Biol. Reprod.*, 36: 915-925.

Barth, A.D., Oko, R.J. 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press.

Battaglini, M., Castellini, C., Lattaioli, P., 1992. Variability of the main characteristics of rabbit semen. *J. APP. RABBIT RES.*, 15: 436-446.

Battaglini, M., 1982, L'insémination artificielle chez la lapine. *CUNICULTURE* 13 (15): 230-234, 13 (6) : 280-283.

Bellin, M.E., Oyarzo, J.N., Hawkins, H.E., Zhang, Smith, R.G., Forrest, D.W., Sprott, L.R., Ax, R.L. 1998. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. *J. Anim. Sci.*, 76: 2032-2039.

Bencheik, N., 1995. Effect de la fréquence de collecte de la semence sur les caractéristiques du sperme et des spermatozoides récoltés chez la lapin. *ANN ZOOTECH.*, 44 : 263- 279.

Bencheik, N., 1993. Production de sperme et fertilité du mâle *Oryctolagus cuniculus* . Effets de la fréquence de récolte et du type génétique. Thèse Doctorat Institut Nacional. Polytechnique de Toulouse, 142 p.

Blach, E.L., Amann, R.P., Bowen, R.A., Frantz, D. 1988. Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: plasma membrane integrity and motion characteristics. *Theriogenology*, 31: 283-298.

Bochenek, M., Smorag, Z., Pilch, J. 2001. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. *Theriogenology*, 56: 557-567.

Brun, J.M., Theau-Clément, M., Bolet, G. 2002. The relationship between rabbit semen characteristics and reproductive performance after artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 70: 139-149.

## C

Castellini, C., Flavia Pizzi, Michèle Theau-Clément and Paolo Lattaioli. 2006. Effect of different number of frozen spermatozoa inseminated on the reproductive performance of rabbit does. *Theriogenology*, Volume 66, Issue 9.

Castellini, C., Dal Bosco, A., Cardinali, R., 2004. Effect of dietary alpha-linolenic acid on the semen characteristics of rabbit bucks. 8th World rabbit congress, Mexico; 245-250.

Castellini, C., Lattaioli, P., Dal Bosco, A., Ligouri, L. 2001. Effet de l'addition des vitamines C et E sur les paramètres de la semence de lapin fraîche et après congélation. 9èmes Journ. Rech. Cunicole Paris, 151-154.

Castellini, C., Lattaioli, P., Moroni, M., Minelli, A. 2000. Effect of seminal plasma on the characteristics and fertility of rabbit spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 63: 275-282.

Chan, P.J., Tredway, D.R., Pang, S.C., Corselli, J., Su, B.C. 1992. Assessment of sperm for cryopreservation using the hypoosmotic viability test. *Fertil. Steril.*, 58: 841-844.

Chen, Y., Foote, R.H. 1994. Survival of rabbit spermatozoa frozen and thawed at different rates with and without seeding. *Anim. Reprod. Sci.*, 35: 131-143.

Collin, S., Sirard, M.A., Dufour, M., Bailey, J.L. 2000. Sperm calcium levels and chlortetracycline fluorescence patterns are related to the in vivo fertility of cryopreserved bovine semen. *J. Androl.*, 21: 938-943.

Córdova, A., Pérez-Gutiérrez, J.F., Lleó, B., García-Artiga, C., Alvarez, A., Drobchak, V., Martín-Rillo, S. 2002. In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. *Theriogenology*, 57: 2119-2128.

Correa, J.R., Pace, M.M., Zavos, P.M. 1997. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology*, 48: 721-731.

Correa, J.R., Zavos, P.M. 1994. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*, 42: 351-360.

Courtens, J.L., Bolet, G., Theau-Clément, M. 1994. Effect of acrosome defects and sperm chromatin decondensation on fertility and litter size in the rabbit. Preliminary electronmicroscopic study. *Reprod. Nutr. Dev.*, 34: 427-437.

Curry, M.R. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*, 5: 46-52.

## **D**

Davis, A.P., Foote, R.H. 1987. Relationship of sire fertility to acrosome-reacted and motile spermatozoa after treatment with liposomes. *J. Dairy Sci.*, 70: 850-857.

Den Daas, N. 1992. Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim. Reprod. Sci.*, 28: 87-94.

## **E**

Eriksson, B.M., Petersson, H., Rodríguez-Martínez, H. 2002. Field fertility with exported boar semen frozen in the new FlatPack container. *Theriogenology*, 58: 1065-1079.

Evenson, D.P., Larson, K.L., Jost, L.K. 2002. Sperm Chromatin Structure Assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.*, 23: 25-43.

Evenson, D.P., Thompson, L., Jost, L. 1994. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology*, 41: 637-651.

## **F**

Fraser, L.R., Abeydeera, L.R., Niwa, K. 1995. Ca<sup>2+</sup> regulating mechanisms that modulate bull spermatozoa capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol. Reprod. Dev.*, 40: 233-241.

Foote, R. H., 1975. Semen quality from the bull to the freezer: An assessment. *Theriogenology*, Volume 3, Issue 6

## G

Gadea, J. 2001. La evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos mediante la fecundación in vitro. *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.*, 16: 63-77.

Gadea, J., Matás, C., Lucas, X. 1998. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. *Anim. Reprod. Sci.*, 56: 95-108.

García, M., Piles, M., Sanchez, J., Rafel, O., Ramon, J., 2004. Heterosis, direct and maternal genetic effect on semen quality traits of rabbits. 8th World Rabbit Congress, Mexico. 57-62.

Garde López-Brea, J.J. 1994. Evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides mediante tests heterólogos de FIV. 7th International Meeting on Animal Reproduction, Murcia: 87-92.

Garner, D.L., Johnson, L.A., Yue, S.T., Roth, B.L., Haugland, R.P. 1994. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J. Androl.*, 15 (6): 620-629.

Gillan, L., Evans, G., Maxwell, W.M.C. 1997. Capacitation status and fertility of fresh and frozenthawed ram spermatozoa. *Reprod. Fert. Dev.*, 9: 481-487.

Gillan, L., Evans, G., Maxwell, W.M.C. 2000. The interaction of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa with oviductal epithelial cells in vitro. *Reprod. Fert. Dev.*, 12: 237-244.

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: 1151-1162.

Graham, J.K. 1996. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 12: 131-147.



Graham, J.K. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim. Reprod. Sci.*, 68: 239-247.

Graham, J.K., Foote, R.H. 1987a. Dilauroylphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and in vitro penetration of zona-free hamster eggs by bull sperm: I. A fertility assay for fresh semen. *Gamete Res.*, 16: 133-145.

Graham, J.K., Foote, R.H. 1987b. Dilauroylphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and in vitro penetration of zona-free hamster eggs by bull sperm: II. A fertility assay for frozen-thawed semen. *Gamete Res.*, 16: 147-158.

Guirado, S., 2004. Estudio de parámetros seminales en dos líneas seleccionadas de conejo. Proyecto final de carrera., UPV.

## **H**

Hagen, D.R., Gilkey, A.L., Foote, R.H. 2002. Spermatozoal velocity and motility and its relationship to fertility in the rabbit inseminated with low sperm numbers. *World Rabbit Science*, 10: 135-140.

Hamamah, S., Royère, D., Nicolle, J.C., Paquignon, M., Lansac, J. 1990. Effects of freezingthawing on the spermatozoon nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. *Reprod. Nutr. Dev.*, 30: 59-64.

Hammerstedt, R.H. 1996. Evaluation of sperm quality: identification of the subfertile male and courses of action. *Anim. Reprod. Sci.*, 42: 77-87.

Hancock, J.L. 1951. A staining technique for the study of temperature shock in semen. *Nature*, 167: 323.

Harrison, R.A.P., Asworth, P.J.C., Miller, N.G.A. 1996. Assessment of sperm function under fertilizing conditions. *Reprod. Fertil. Dev.*, 8: 25-30.

Holt, C., Holt, W.V., Moore, H.D., Reed, H.C., Curnock, R.M. 1997. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J. Androl.*, 18: 312-323.

## **I**

Iqbal, N., Hunter, A.G. 1995b. Effect of various capacitation systems on bovine sperm motion characteristics, acrosome integrity, and induction of hyperactivation. *J. Dairy Sci.*, 78: 91-102.

## **J**

Januskauskas, A., Gil, J., Söderquist, L., Haard, M.G.M., Haard, M.Ch., Johannisson, A., Rodríguez-Martínez, H. 1999. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination. *Theriogenology*, 52: 641-658.

Januskauskas, A., Gil, J., Söderquist, L., Rodríguez-Martínez, H. 2000. Relationship between sperm response to glycosaminoglycans in vitro and non-return rates of Swedish dairy AI bulls. *Reprod. Dom. Anim.*, 35: 207-212.

Januskauskas, A., Johannisson, A., Rodríguez-Martínez, H. 2001. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology*, 55: 947-961.

Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Pérez Peláez, M., Crabo, B.G., Zaneveld, L.J.D. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.*, 70: 219-228.

Johnson, L.A., Aalbers, J.G., Willems, C.M., Sybesma, W. 1981. Use of spermatozoa for artificial insemination. I. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms. *J. Anim. Sci.*, 52: 1130-1136.

Johnson, L.A., Maxwell, W.M.C., Dobrinsky, J.R., Welch, G.R. 1996. Staining sperm for viability assessment. *Reprod. Fertil. Devel.*, 8: 37-47.

Johnson, L.A., Weitze, K.F., Fiser, P., Maxwell, W.M.C. 2000. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 143-172.

## **L**

Lavara, R., Mocé, E., Lavara, F., Viudes de Castro, M.P., Vicente, J.S., 2005. Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits?. *Theriogenology*, Ed. Prensa.

Lavara, R., Mocé, E., Andreu, E., Pascual, J.j., Cervera, C., Viudes de Castro, M.P., Vicente, J.S., 2000. Effects of environmental temperature and vitamin supplements on seminal parameters from a rabbit line selected by high growth rate. 7th World Rabbit Congress, Valencia, A: 167-171.

Lavara, R., 1996. "Inseminación artificial en cunicultura: Efecto de la disminución de la Concentración de Espermatozoides en las Dosis de Inseminación". Trabajo fin de carrera. UPV.

Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 113-141.

Lenz, R.W., Martin, J.L., Bellin, M.E., Ax, R.L. 1988. Predicting fertility of dairy bulls by inducing acrosome reactions in sperm with chondroitin sulfates. *J. Dairy Sci.*, 71: 1073-1077.

Love, C.C., Kenney, R.M. 1998. The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology*, 50: 955-972.

## **M**

Martínez, E., Vázquez, J.M., Matás, C, Roca, J., Coy, P., Gadea, J. 1993. Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Theriogenology*, 40: 547-557.

Maxwell, C., W. M., S. L. Catt and G. Evans. 1996. Dose of fresh and frozen-thawed spermatozoa for in vitro fertilization of sheep oocytes. *Theriogenology*, Volume 45, Issue 1.

Merkiers, K., Larsson, B., Kjellén, L., Zhang, B.R., Buhr, M.M., Rodríguez-Martínez, H. 2000. Relationship between heparin binding to spermatozoa and the fertility of dairy bulls. *Theriogenology*, 54: 1249-1258.

Miller, D.M., Hrudka, F., Cates, W.F., Mapletoft, R.J. 1982. Infertility in a bull with a nuclear sperm defect: a case report. *Theriogenology*, 17: 611-621.

Mocé, E., 2003. Estudio de diversos factores que afectan a la capacidad fecundante del semen de conejos congelado en un medio con DMSO y sacarosa. Tesis doctoral. UPV.

Mocé, E., Vicente, J.S., Lavara, R., 2002. Effect of donor strain and maturation stage of rabbit oocytes on results of penetration test of rabbit semen. *World rabbit Science*, vol 10 (2), 53/62.

Mocé, E., Lavara, R., Lavara, F., Vicente, J.S. 2000. Effect of reproductive rhythm on seminal parameters from a rabbit line with high growth rate. 7th World Rabbit Congress, Valencia, Vol. A: 197-201.

Mortimer, S.T. 2000. CASA-Practical aspects. *J. Androl.*, 21: 515-524.

Muller, C.H. 2000. Rationale, interpretation, validation, and uses of sperm function tests. *J. Androl.*, 21: 10-30.

Murdoch, B.E., O'Shea, T. 1973. Effect of storage of rabbit spermatozoa at  $-79^{\circ}\text{C}$  on their subsequent transport and fertility in the rabbit doe. *Aust. J. Biol. Sci.* 26: 645-651.

## **N**

Nakagata, N., Takeshima, T. 1993. Cryopreservation of mouse spermatozoa from inbred and F1 hybrid strains. *Exp. Anim.*, 42: 317-320.

Neild, D.M., Chaves, M.G., Flores, M., Miragaya, M.H., González, E., Agüero, A. 2000. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia*, 32: 351-355.

## **P**

Pascual, J.J., Garcia, C., martinez, E., Mocé, E., Vicente, J.S., 2004. Rearing management of rabbit males selected by high growth rate: the effect of diet and season on semen characteristics. *Reprod. In dom. Anim.*, 44: 49-63.

Pérez-Llano, B., Lorenzo, J.L., Yenes, P., Trejo, A., García-Casado, P. 2001. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology*, 56: 387-398.

Pilip, R., Del Campo, M.R., Barth, A.D., Mapletoft, R.J. 1996. In vitro fertilizing characteristics of bovine spermatozoa with multiple nuclear vacuoles: a case study. *Theriogenology*, 46: 1-12.

Pursel V.G., Johnson, L.A. 1974. Gluteraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosomal evaluation. *Theriogenology*, 1: 63-68.

## **Q**

A Quintero-Moreno, T Rigau and JE Rodríguez-Gil, 2007. Multivariate Cluster Analysis Regression Procedures as Tools to Identify Motile Sperm Subpopulations in Rabbit Semen and to Predict Semen Fertility and Litter Size. *Reprod Dom Anim* 42, 312–319.

## **R**

Revell, S.G., Mrode, R.A. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 36: 77-86.

Roca, J., Carvajal, G., Lucas, X., Vázquez, J.M., Martínez, E.A. 2003. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, (in press).

Rodríguez-Martínez, H. 1999. Nuevas técnicas de evaluación de la fertilidad en el macho. II Congreso Ibérico de Reproducción Animal, Lugo, 302-316.

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

## **S**

Saacke, R.G., Dalton, J.C., Nadir, S., Nebel, R.L., Bame, J.H. 2000. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61:663-677.

Saacke, R.G., Marshall, C.E. 1968. Observation on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 16: 511-514.

Sailer, B.L., Jost, L.K., Evenson, D.P. 1996. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry*, 24: 167-173

Salamon, S., Maxwell, W.M.C. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 77-111.

Samper, J.C., Behnke, E.J., Byers, A.P., Hunter, A.G., Crabo, B.G. 1989. In vitro capacitation of stallion spermatozoa in calcium-free Tyrode's medium and penetration of zona-free hamster eggs. *Theriogenology*, 31: 875-884.

## **T**

Tardif, A.L., Farrell, P.B., Trouern-Trend, V., Foote, R.H. 1997a. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. *J. Dairy Sci.*, 80: 1606-1612.

Thundathil, J., Gil, J., Januskauskas, A., Larsson, B., Soderquist, L., Mapletoft, R.J., Rodríguez-Martínez, H. 1999a. Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed bull semen and fertility with artificial insemination. *Int. J. Androl.*, 22: 366-373.

Thundathil, J., Gil, J., Januskauskas, A., Larsson, B., Soderquist, L., Mapletoft, R.J., Rodríguez-Martínez, H. 1999b. Premature capacitation and fertility of frozen-thawed bull semen used in artificial insemination. *Theriogenology*, 51: 351 Abstr.

Thundathil, J., Meyer, R., Palasz, A.T., Barth, A.D., Mapletoft, R.J. 2000. Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production. *Theriogenology*, 54: 921-934.

Thundathil, J., Palasz, A.T., Barth, A.D., Mapletoft, R.J. 2001a. The use of in vitro fertilization techniques to investigate the fertilizing ability of bovine sperm with proximal cytoplasmic droplets. *Anim. Reprod. Sci.*, 65: 181-192.

Thundathil, J., Palasz, A.T., Mapletoft, R.J., Barth, A.D. 1999c. An investigation of the fertilizing characteristics of pyriform-shaped bovine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 57: 35-50.

Thundathil, J., Palomino, J., Barth, A., Mapletoft, R., Barros, C. 2001b. Fertilizing characteristics of bovine sperm with flattened or indented acrosomes. *Anim. Reprod. Sci.*, 67: 231-243.

Thurston, L.M., Siggins, K., Mileham, A.J., Watson, P.F., Holt, W.V. 2002. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biol. Reprod.*, 66: 545-554.

Truelson, S.L., Graham, J.K., Mortimer, R.G., Field, T.G. 1996. In vitro penetration into bovine oocytes and zona-free hamster oocytes by bull spermatozoa treated with liposomes. *J. Dairy Sci.*, 79: 991-999.



Truelson, S.L., Graham, J.K., Mortimer, R.G., Field, T.G., Phillips, J.J. 1992. The in vitro penetration of lipid treated bull sperm into bovine and zona-free hamster eggs. Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science, Fort Collins, CO, 78-81.

## V

Varner, D.D, Blanchard, T.L., Brinsko, S.P., Love, C.C., Taylor, T.S., Johnson, L. 2000. Techniques for evaluating selected reproductive disorders in stallions. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61: 493-509.

Vázquez, J.M., Martínez, E., A., Martínez, P., García-Artiga, C., Roca, J. 1997. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology*, 47: 913-922.

Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57: 149-179.

Vicente, J.S., Viudes de Castro, M.P. 1996. A sucrose-DMSO extender for freezing rabbit semen. *Reprod. Nutr. Dev.*, 36: 485-492.

Vicente, J.S., Viudes de Castro, M.P., Lavara, R., Lavara, F. 2000. Effect of male line on prolificacy from does inseminated with low sperm doses. 7th World Rabbit Congress, Valencia, Vol. A: 273-277.

Vicente, J.S., 2001. Crioconservacion de gametos y embriones. Laboratorio de biotecnología de la reproducción. Dep. de Ciencia Animal. UPV.

Vishwanath, R., Shannon, P. 1997. Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. *Reprod. Fertil. Dev.*, 9: 321-331.

Vishwanath, R., Shannon, P. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen stage. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 23-53.

Viudes de Castro, E., Mocé , J.S, Vicente, F, Marco Jimenez and R Lavara, 2005. In vitro Evaluation of in vivo Fertilizing Ability of Frozen Rabbit Semen. *Reprod Dom Anim* 40, 136–140

Viudes de Castro, M.P., M.p., Jiménez, F.M., Vicente, J.S., Navarro, E., Lavara, R., Mocé. E.; 2004. Sperm kinetic parameters and differences in seminal plasma composition among two rabbit lines. *Reprod. in dom anim.* 39:266.

Viudes de Castro, M.P., Vicente, J.S. 1996. A simple method for freezing rabbit semen with successful results on fertility and prolificity. *Anim. Reprod. Sci.*, 44: 195-201.

Viudes de Castro, M.P., Vicente, J.S., Lavara, R. 1999. Effet du nombre de spermatozoïdes sur la fertilité de la semence conservée 24 heures chez le lapin. *Ann. Zootech.*, 48: 407-412.

.

## **W**

Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61: 481-492.

Whitfield, C.H., Parkinson, T.J. 1992. Relationship between fertility of bovine semen and in vitro induction of acrosome reactions by heparin. *Theriogenology*, 38: 11-20.

Wilhelm, K.M, Graham, J.K., Squires, E.L. 1996. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zonafree hamster oocyte penetration. *Theriogenology*, 46: 559-578.

Wulster-Radcliffe, M.C., Lewis, G.S. 2002. Development of a new transcervical artificial insemination method for sheep: effects of a new transcervical insemination catheter and traversing the cervix on semen quality and fertility. *Theriogenology*, 58: 1361-1371.

## **X**

Xu, X., Pommier, S., Arbov, T., Hutchings, B., Sotto, W., Foxcroft, G.R. 1998. In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. *J. Anim.Sci.* 76: 3079-3089.

## **Y**

Young, R.J., Bodt, B.A. 1994. Development of computer-directed methods for the identification of hyperactivated motion using motion patterns developed by rabbit sperm during incubation under capacitation conditions. *J. Androl.*, 15: 362-377.