



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



MASTER INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA
ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

Nuevos métodos integrados de evaluación de la calidad seminal en vacuno

Tesis de Master
Valencia, Junio 2016

Katherine Sánchez Caycho

Director:
Jesús Yániz Pérez de Albéniz



AGRADECIMIENTOS

Agradecer a mi familia, por su cariño, su apoyo infatigable, en los momentos difíciles que nos toca vivir cuando se esta lejos del hogar, sobre todo por creer siempre en mi, porque ellos son mi mayor inspiración y mi mayor fortaleza cuando tengo nuevos proyectos en la vida.

A la Beca de estudios denominada “Beca Presidente de la República del Perú”, por brindar la oportunidad a jóvenes, de seguir estudios de postgrado en el extranjero, y así poder adquirir la experiencia que será de gran aporte en nuestro desarrollo profesional.

Al MINECO (proyecto AGL2014-52775-P) y a la DGA-FSE (proyecto A40) por financiar la investigación.

A todas esas personas que de algún u otro modo colaboraron en la realización del presente trabajo:

Especialmente, a mi tutor Dr. Jesús Yániz Pérez de Albeniz, del quien he obtenido el apoyo en todo momento para realizar la presente investigación, por su confianza, su paciencia y consejos, los que tomaré de referencia para continuar con futuras investigaciones.

A la Dra. Pilar Santolaria, y la Dra. Esther Sales, porque me brindaron su apoyo y amistad en todo momento.

A la Escuela Politécnica de Huesca (Universidad de Zaragoza) por brindarme todas las facilidades para realizar el trabajo en sus instalaciones, a todos sus trabajadores, por la cordialidad recibida durante mi estancia.

A los docentes y personas involucradas en la organización del Máster, con gran trayectoria científica, a cada uno de ellos por transmitir sus conocimientos de una forma clara, y por los consejos brindados.

A mis compañeros del Máster, por el aliento y el apoyo que fue mutuo en todo momento, por compartir muchas vivencias durante nuestra estancia en España, a quienes echaré mucho de menos.

RESUMEN

El objetivo general del presente estudio fue aplicar un método de análisis fluorescente múltiple desarrollado por el grupo TECNOGAM en el estudio de la motilidad y morfometría de las subpoblaciones espermáticas y en la mejora del test hipo-osmótico. Se realizaron tres estudios utilizando como material animal semen congelado de toros de raza Frisona. En los tres casos el análisis de imagen se realizó con el software libre ImageJ y el análisis estadístico de los datos utilizando el análisis de varianza (ANOVA), seguido por el test de Tukey. En el estudio 1 se determinó el porcentaje de motilidad de las subpoblaciones espermáticas fluorescentes obtenidas tras la tinción múltiple. Los fluorocromos permitieron una rápida determinación de la membrana plasmática e integridad acrosómica en los espermatozoides. La subpoblación con la membrana plasmática intacta y acrosoma intacto presentaron un porcentaje mucho más alto de espermatozoides móviles que aquella con el acrosoma dañado o ausente. Ninguno de los espermatozoides con la membrana dañada presentó motilidad. En el estudio 2, se evaluaron los parámetros morfométricos de la cabeza, núcleo y acrosoma de las subpoblaciones espermáticas y de 3 tratamientos: muestras líquidas inmovilizadas con formol (1) y con shock por calor 65°C – Trumorph® (2), frotis secos, fijados y teñidos con IP/PSA (3). El área de la cabeza, núcleo y acrosoma resultaron menores ($P < 0,05$) en los frotis cuando se comparó con las de los tratamientos en fase líquida. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas en la morfometría de las subpoblaciones espermáticas entre los dos tratamientos de muestras líquidas. En estos tratamientos la subpoblación con acrosoma normal y membrana dañada presentó medidas significativamente mayores ($P < 0,05$) en comparación con la subpoblación con acrosoma normal e integridad de membrana normal. El porcentaje de la cabeza ocupada por el acrosoma en los frotis fue mayor que las líquidas. Por último, en el estudio 3, se comparó el efecto del test hipo-osmótico (HOST), dos tipos de soluciones basadas en citrato y TRIS, y el test de agua (water test, WT) sobre la distribución de las subpoblaciones espermáticas. La osmolaridad final se ajustó a 150 mOsm/kg en todos los casos. El pH se ajustó a 7.0 solo en la solución basada en TRIS. La subpoblaciones se determinaron a los 5 y 40 min de incubación a 37°C. La respuesta al HOST, el estado acrosomal y la integridad de membrana se utilizaron para establecer ocho subpoblaciones. Para los dos periodos de incubación, la subpoblación HOST negativo, acrosoma dañado, membrana dañada fue significativamente mayor en el WT que en las dos soluciones HOST evaluadas ($P < 0.05$). A los 40 min, la subpoblación, HOST positivo, acrosoma intacto, membrana intacta fue menor en el WT que en el HOST cuando se utilizó la solución basada en citrato. El nuevo método de tinción múltiple fluorescente permitió, por vez primera, estudiar en el mismo espermatozoide la

integridad de la membrana plasmática y acrosómica, la funcionalidad y motilidad, diferenciando las subpoblaciones espermáticas. La capacidad de estos nuevos métodos de análisis para predecir la fertilidad del semen se abordará en futuros estudios.

ABSTRACT

The general aim of the present study was to apply a method of fluorescent multiple analysis developed by the group TECNOGAM in the study of the motility and morphometry of the spermatid subpopulations and improving hypo-osmotic test. Three studies were conducted using frozen semen of Friesian bulls as animal model. In three studies the image analysis was conducted with the ImageJ free software, and the statistical analysis of the data using the analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test. In the study 1, the percentage motile spermatozoa in the fluorescent subpopulations was determined. The fluorochromes allowed a rapid determination of the plasma membrane and acrosome integrity of sperm. The subpopulation with intact plasma membrane and acrosome displayed a higher percentage of motile sperm with the damaged membrane were motile. In the study 2, the morphometric parameters of the head, nucleus and acrosome of the sperm subpopulations and of 3 treatments: liquid samples immobilized with formaldehyde (1) and with shock for heat 65°C - Trumorph® (2), dried, fixed smears dyed with IP/PSA (3) were compared. The area of the head, nucleus and acrosome were lower ($P < 0,05$) in smears than it wet mounts treatments. However, no significant differences in the sperm morphometry of the two treatments in the wet mounts were found. The subpopulation with acrosome normal, damaged membrane presented significantly higher measures ($P < 0,05$) compared with the subpopulation with acrosome normal, membrane intact, for both treatments in wet mounts. The percentage of the head occupied by the acrosome in the smears were higher than those of the treatments in wet mounts. Finally, in the study 3, the effect of hypo-osmotic test (HOST), two types of solutions based on citrate and TRIS, and the test water (WT) on the distribution of the sperm subpopulations. The final osmolarity was adjusted to 150 mOsm/kg in all the cases. The pH was adjusted to 7.0 based only on the TRIS solution. The subpopulations were determined at 5 and 40 min from incubation to 37°C. The response to HOST, the state and acrosome membrane integrity were used to establish eight subpopulations. For both periods of incubation, the subpopulation HOST negative, acrosome damaged, damaged membrane was significantly higher in the WT than in both HOST solutions evaluated ($P < 0.05$). At 40 min, the subpopulation, HOST positive, acrosome intact, intact membrane was lower in the WT than in the HOST when citrate-based solution was used. The new method of multiple fluorescent staining allowed, for the first time, to study in the same spermatozoa the integrity of the plasma membrane and acrosome, functionality and motility, obtaining different the sperm subpopulations. The ability of these new methods of analysis to predict sperm fertility will be addressed in future studies.

INDICE

1. Introducción	1
1.1. Situación actual	1
1.2. Producción espermática en bovinos	2
1.3. Obtención de semen bovino	3
1.4. Congelación de semen	4
1.5. Descripción del espermatozoide	6
1.6. Análisis de la calidad seminal o espermiograma	8
2. Objetivos	26
3. Material y métodos	27
3.1. Reactivos	27
3.2. Manipulación de semen	27
3.3. Evaluación de calidad seminal	27
3.3.1. Motilidad espermática	27
3.3.2. Integridad de membrana	28
3.4. Tinción múltiple fluorescente para evaluación de motilidad	28
3.5. Preparación de las muestras para evaluación de morfometría	29
3.5.1. Tratamientos en fase o medio líquido	29
3.5.2. Tratamiento para frotis	30
3.6. Análisis de imágenes para morfometría asistida por ordenador – CASMA	31
3.7. Hypo-osmotic swelling test (HOST) vs. water test (WT)	31
3.8. Diseño experimental	33
3.8.1. Estudio 1: Motilidad de las subpoblaciones espermáticas utilizando el nuevo método fluorescente	33
3.8.2. Estudio 2: Morfometría de las subpoblaciones espermáticas utilizando el nuevo método fluorescente	34
3.8.3. Estudio 3: Valoración de la respuesta a HOST vs. WT utilizando el nuevo método fluorescente	34
3.9. Análisis estadístico	35
4. Resultados	36
4.7. Estudio 1: Motilidad de las subpoblaciones espermáticas utilizando el nuevo método fluorescente	37
4.8. Estudio 2: Morfometría de las subpoblaciones espermáticas utilizando el nuevo método fluorescente	39
4.9. Estudio 3: Valoración de la respuesta a HOST vs. WT	46
5. Discusión	53
6. Conclusiones	59
7. Bibliografía	60

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tinción múltiple y métodos integrados para la evaluación de la calidad seminal aplicadas a diferentes especies.	25
Tabla 2. Media (\pm SEM) para los parámetros cinéticos de la muestra control y muestra después de incubación en presencia de fluorocromos del kit ISAS3 fun® durante 5 minutos a 37°C.	38
Tabla 3. Porcentaje de espermatozoides que presentan motilidad en una determinada subpoblación espermática.	39
Tabla 4. Media (\pm SEM) para los parámetros morfométricos de la cabeza de las subpoblaciones espermáticas para tratamientos en medio líquido (formol y temperatura) y frotis (teñidos con IP/PSA).	41
Tabla 5. Media (\pm SEM) para los parámetros morfométricos del núcleo de las subpoblaciones espermáticas para tratamientos en medio líquido (formol y temperatura) y frotis (teñidos con IP/PSA).	43 - 44
Tabla 6. Media (\pm SEM) para los parámetros morfométricos del acrosoma de las subpoblaciones espermáticas para tratamientos en fase líquida (formol y temperatura) y frotis (teñidos IP/PSA).	45
Tabla 7. Porcentaje medio (\pm SEM) para los patrones de enrollamiento de las colas de los espermatozoides con una respuesta positiva a test hipo-osmótico (HOST) o al test de agua (WT) en toro.	47
Tabla 8. Porcentaje medio (\pm SEM) de la distribución de subpoblaciones espermáticas después del test hipo-osmótico (HOST) y test de agua (WT) a 5 y 40 minutos de incubación a 37°C.	49
Tabla 9. Porcentaje medio (\pm SEM) de parámetros espermáticos después del test hipo-osmótico (HOST) y el test de agua (WT) a 5 y 40 minutos de incubación a 37°C.	50
Tabla 10. Correlaciones entre los porcentajes medios (\pm SEM) de parámetros espermáticos después del test hipo-osmótico (HOST) basado en citrato a 5 y 40 minutos de incubación a 37°C.	51
Tabla 11. Correlaciones entre los porcentajes medios (\pm SEM) de parámetros espermáticos después del test hipo-osmótico (HOST) basado en TRIS a 5 y 40 minutos de incubación a 37°C.	51
Tabla 12. Correlaciones entre los porcentajes medios (\pm SEM) de parámetros espermáticos después del test de agua (WT) a 5 y 40 minutos de incubación a 37°C.	52

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espermatogénesis.	7
Figura 2. Esquema de las partes de un espermatozoide de mamífero.	8
Figura 3. Ilustración del movimiento espermático y los parámetros que los describen.	10
Figura 4. Parámetros morfométricos de espermatozoides evaluados en este estudio.	13
Figura 5. Mecanismo de interacción espermatozoide-ovocito.	20
Figura 6. Sistema CASA (computer-assisted sperm analysis, ISAS [®] , PROISER, Valencia, España).	28
Figura 7. Trumorph [®] System.	30
Figura 8. Microscopio de epifluorescencia (DM 4500B, Leica, Alemania).	33
Figura 9. Patrones de respuesta espermática a tratamientos hiposmótico (HOST) y water test (WT).	35
Figura 10. Evaluación múltiple fluorescente con la presencia de diferentes subpoblaciones en la muestra.	36
Figura 11. Evaluación múltiple fluorescente en la que se aprecia la presencia de diferentes subpoblaciones en la muestra, semejantes a las descritas en la Fig. 10, pero que además incluye espermatozoides con fluorescencia verde intensa.	36
Figura 12. Evaluación múltiple fluorescente en la que se aprecian trayectorias de los espermatozoides móviles (a) y los espermatozoides estáticos (b).	37
Figura 13. Evaluación múltiple fluorescente con la presencia de diferentes subpoblaciones en la muestra para análisis morfométrico.	40
Figura 14. Espermatozoides teñidos con fluorocromos del kit ISAS3fun [®] observados en microscopio de epifluorescencia 400X, distinguiendo 8 subpoblaciones espermáticas.	46

ABREVIATURAS

µl	Microlitro
µm	Micra
A	Área
ADN	Ácido dexosirribonucleico
AI	Integridad acrosómica
ALH	Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza
ANOVA	Análisis de varianza
AO	Naranja de acridina
ASMA	Automatic semen morphometry analysis
AT	Azul de toluidina
ATP	Adenosin-tri-fosfato
BCF	Frecuencia de batido del flagelo
CASA	Computer-Assisted Sperm Analysis
CASMA	Computer-assisted sperm morphometry analysis
CASMA-F	Computer-assisted sperm morphometry-fluorescence
CC-HOS	Coulter counter hypo-osmotic swelling test
CFDA	Diacetato de carboxifluoresceína
CMA3	Cromomicina A3
CTC	Tinción de clortetraciclina
DA	Estado acrosomal dañado
DBD-FISH	Test de detección de la rotura del ADN mediante hibridación fluorescente in situ
DIC	Contraste inter-diferencial
DM	Integridad de membrana dañada
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Eosina
EG	Etilenglicol
EN	Eosina/nigrosina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FITC-PSA	Lectina de Pisum sativum conjugada con isotiocianato de fluoresceína
HN	HOST negativo
HOST	Hypo- osmotic swelling test
HP	HOST positivo
Hz	Hertz
IA	Inseminación artificial
IM	Integridad de membrana plasmática
IMM	Membrana interna de la mitocondria
IP	Yoduro de propidio
ISNT	In situ nick translation

JC-1	5, 5', 6, 6'- tetrachloro- 1, 1', 3, 3' – tetraethylbenzamidazolyl carbocyanine iodide
L	Longitud
LIN	Linearidad
MC540	Merocianina 540
min	Minutos
ml	Mililitro
mOsm/kg	Miliosmoles por kilogramo
NA	Estado acrosomal intacto
NM	Integridad de membrana intacta
ORT	Osmotic resistance test
P	Perímetro
PBS	Buffer fosfato salino
PEG	Polietilenglicol
PE-PNA	Lectina marcada con ficoeritrina.
PNA	Peanut agglutinin
PROH	Propanodiol
PSA	Pisum sativum agglutinin
PVP	Polivinil-pirrolidona
PVS	Espacio perivitelino
ROS	Especies oxígeno reactivos
s	Segundos
SCD	Test de dispersión de la cromatina espermática
SCSA	Ensayo de estructura de la cromatina
SDF	Fragmentación del ADN espermático
SEM	Error estándar de la media
SNARF	Fluorocromo seminaphtharhodafluor.
STR	Rectitud
TB	Trypan–Blue
TUNEL	Terminal dUTP Nick-End Labeling
VAP	Velocidad promedio de la trayectoria
VCL	Velocidad curvilínea
VSL	Velocidad rectilínea
W	Anchura
WOB	Tambaleo o balanceo
WT	Water test o test de agua
ZP	Zona pelúcida

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Situación actual

En las últimas décadas, el sector ganadero ha experimentado un continuo proceso de incorporación de biotecnologías, con el objetivo de mejorar la productividad y la genética. En este sentido, la inseminación artificial (IA) se considera la biotecnología más importante incorporada en sistemas de producción pecuaria, porque implica la utilización de machos probados, que representan una herramienta clave en la obtención de animales con mayor mérito genético. En consecuencia, la IA es la biotecnología reproductiva más utilizada en todo el mundo, con una relación coste-beneficio muy ventajosa.

Diversos factores pueden condicionar el éxito reproductivo tras la IA, que pueden relacionarse con la hembra, las condiciones medioambientales y el manejo de la explotación, aunque el macho sigue teniendo un papel relevante (García-Ispuerto *et al.*, 2007a, b; Yániz *et al.*, 2008a). Por lo tanto la disminución de la fertilidad se considera como un problema multifactorial, no puede ser atribuida solo a una causa (Lucy, 2001). A pesar del desarrollo de técnicas de congelación del semen en vacuno, la calidad de las muestras seminales sigue teniendo un efecto significativo sobre la fertilidad tras la IA. En la actualidad, la falta de métodos fiables que permitan una evaluación *in vitro* de la calidad seminal limita la capacidad para monitorizar los daños de los procesos de congelación-descongelación, y por ende determinar el potencial de fertilidad.

Los test desarrollados hasta la fecha evidencian una capacidad predictiva limitada, así lo indican las bajas correlaciones observadas entre los resultados obtenidos *in vitro* y la fertilidad en campo, aunque mejora si se combinan varios métodos a la vez (Rodríguez-Martínez, 2003; Gillan *et al.*, 2008; Payan-Carreira *et al.*, 2013), pero normalmente se evalúan diferentes parámetros de forma aislada sobre la muestra, algunos de estos parámetros de calidad están muy correlacionados (Fraser *et al.*, 2001; Yániz *et al.*, 2008b), con lo que el mero hecho de aumentar el número de pruebas analíticas no siempre mejora la capacidad predictiva de un análisis seminal clásico o espermiograma (Brito *et al.*, 2003). El análisis global para cada variable resulta menos informativo que si se centrara en los espermatozoides con posibilidades de éxito, es decir, aquellos que sean normales, móviles y con sus componentes intactos. Surge así la necesidad de desarrollar nuevos métodos de análisis de la calidad seminal más integradores, que permitan evaluar diferentes parámetros simultáneamente en el mismo espermatozoide.

En cuanto a las técnicas de evaluación seminal, han evolucionado mucho recientemente, especialmente con la incorporación de nuevos métodos de tinción fluorescente, los sistemas computarizados de análisis espermático Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) y la citometría de flujo. Los marcadores fluorescentes permiten evaluar, en una población muy amplia, características del espermatozoide como la integridad de membrana plasmática (IM) y acrosomal, la actividad mitocondrial, el estrés oxidativo, la capacitación, la integridad del ácido desoxirribonucleico (ADN) y la apoptosis, entre otros. Por su parte, los sistemas CASA permiten estudiar la motilidad y la morfometría espermática de forma mucho más detallada y objetiva. Todo ello posibilita el análisis del tipo y la extensión del daño espermático de manera mucho más precisa. La citometría de flujo ha representado un gran avance en los estudios de calidad seminal, principalmente porque permite analizar con precisión un elevado número de células en poco tiempo y estudiar varios parámetros a la vez. Sin embargo, las principales limitaciones de esta tecnología es que no permite la evaluación de aspectos tan relevantes como la movilidad espermática o las morfoanomalías, cuyo estudio se realiza por separado. Además, el elevado coste del equipamiento hace que en la práctica su utilización se limite principalmente a la realización estudios científicos. A continuación revisaremos algunos aspectos básicos relacionados con la espermatología en bovinos.

1.2. Producción espermática en bovinos

La formación del semen comienza en la pubertad con la formación de espermatozoides en los túbulos seminíferos, mediado por señales endocrinas. El animal alcanza una edad y peso que caracteriza su pubertad. La edad del toro influye sobre la producción espermática, la cual aumenta de forma paralela al desarrollo testicular a medida que crece el animal. El número de espermatozoides producidos, el volumen y la motilidad por eyaculado, se incrementan desde la pubertad hasta los 3 - 4 años de vida, que es cuando alcanzan su máximo valor, lo que se mantiene hasta los 7- 8 años para luego volver a decaer (Everett y Bean, 1982; López *et al.*, 2007). Cuando se proporciona una alimentación mejorada, estos animales alcanzan la pubertad a una edad más temprana, alcanzando además una adecuada circunferencia escrotal, un buen indicador de la pubertad, un peso y una producción espermática mucho mayores en comparación con los toros que no reciben una buena calidad alimentaria (Rawlings *et al.*, 2008; Harstine *et al.*, 2015).

La temperatura de los testículos (4-5 °C por debajo de la temperatura corporal) es esencial para una adecuada espermatogénesis (Kastelic *et al.*, 1995; Brito *et al.*, 2004). El aumento de la temperatura testicular incrementa el

metabolismo y la demanda de oxígeno pero el flujo sanguíneo en los testículos es limitado. Esta mayor demanda de oxígeno no puede suplirse, resultando en hipoxia, incrementando así las especies oxígeno reactivos (ROS), y disminuyendo la calidad seminal (Setchell, 1998). La temperatura testicular se mantiene dentro de los límites óptimos por mecanismos complejos donde se ven implicados el escroto, cono vascular del testículo, y los testículos (Brito *et al.*, 2004; Kastelic *et al.*, 1996).

El volumen de semen producido por eyaculación en toros varía de 2 a 5 ml en toros jóvenes y de 5 a 15 ml en algunos toros de mayor edad. Una muestra normal debe contener de 1 a 3 billones de espermatozoides por ml (10^9) con más de 60% de los espermatozoides activos mostrando una motilidad vigorosa (Gasque, 2008).

La elucidación de factores que afectan la calidad seminal y producción espermática sería de considerable beneficio para la industria de IA.

1.3. Obtención de semen bovino

La obtención de semen es el primer paso dentro de un programa de congelación, preservación e IA. Esta primera fase es de vital importancia para la obtención de muestras de óptima calidad, así como para la adecuada utilización de los sementales. Existen diferentes métodos de colección de semen, que incluyen la vagina artificial, la electroeyaculación, el masaje transrectal y la recogida post-mortem.

La obtención de semen por medio de vagina artificial es el método comúnmente más empleado en la mayoría de las especies domésticas, permitiendo la recogida de eyaculados limpios y normales. La vagina artificial consiste en un tubo cilíndrico de plástico rígido y resistente recubierto internamente por una camisa de goma que se dobla sobre los extremos del cilindro formando una cámara que se llena con agua caliente (45–46 °C) y aire, con el fin de proveer el estímulo adecuado de temperatura y presión, lográndose así la eyaculación (Morillo *et al.*, 2012). La dificultad principal de este método es el entrenamiento necesario de los machos para que se produzca la monta y la aceptación de la vagina, con la presencia de operadores.

Otro método empleado para la recogida del semen de toros es la electroeyaculación. En este método se emplea un electroeyaculador que no es más que un electrodo conectado a una batería que genera estimulaciones rítmicas provocadas por descargas no mayores a 20 voltios (Rangel, 2007). La técnica consiste en dar pulsos eléctricos muy leves en la próstata y vesículas seminales para que el animal presente erección y eyaculación (Duarte, 2008; Cancino, 2009).

No obstante, la técnica de electroeyaculación presenta algunos inconvenientes entre los que podemos mencionar la contaminación del semen con orina y variabilidad seminal de las muestras obtenidas.

El método de masaje transrectal consiste en aplicar un masaje longitudinal repetitivo hacia adelante y atrás, principalmente sobre la terminación de los canales deferentes, de las vesículas seminales y de la región de la próstata, introduciendo la mano y el antebrazo en el recto del animal. Esto provoca que el semen fluya hacia la uretra pélvica a la vez que otra persona recoge el semen con una probeta de vidrio (Angelino, 2009). Aquellos reproductores que han tenido un adecuado descanso sexual, son dóciles y se manejan con calma, son buenos candidatos para esta técnica. También se recomienda en animales que posean lesiones dolorosas en cuartos posteriores. No requiere tener un equipo costoso y evita el dolor potencial ocasionado por técnicas como la electroeyaculación. Sin embargo, algunas de las desventajas incluyen irritación de la mucosa rectal, falta de protrusión del pene que resulta en muestras contaminadas desde el prepucio, la necesidad de una segunda persona para la colección de la muestra y la dificultad de estimular machos de mal carácter (Pezzone, 2008). Tiene además el inconveniente, de requerir de un operador con gran destreza en palpación por vía rectal del tracto reproductivo de los toros. La libido y la capacidad de apareamiento no son evaluadas con esta técnica, las muestras pueden contaminarse y el volumen y la concentración de semen obtenido son muy variables (Castrillón y Carou, 2007).

La colecta de semen post-mortem consiste en la recolección y criopreservación de espermatozoides de la cola del epidídimo, para propagar y preservar la calidad genética en casos donde la colecta de semen por otros métodos es compleja (Anel *et al.*, 2002), como en el caso de la muerte natural o accidental de especímenes que estén en peligro de extinción. Este material seminal puede ser utilizado en IA o fertilización *in vitro* para conseguir descendientes de alto valor genético (Barrios, 2002). Es fundamental para la supervivencia espermática el manejo del epidídimo y el tiempo transcurrido desde la muerte del animal hasta la congelación de los gametos (Malcotti *et al.*, 2012).

1.4. Congelación del semen

En general el proceso de congelación de semen incluye los siguientes pasos: colecta, evaluación del semen, cálculo del número de pajuelas posibles, dilución del semen al volumen requerido y finalmente el proceso de criopreservación. La criopreservación es una técnica que consiste en mantener el material biológico viable por tiempo indefinido a bajas temperaturas, normalmente a -196°C en

nitrógeno líquido (Ramos, 1996). Estas temperaturas hacen que disminuya el metabolismo celular, provocando un estado de inactividad total en las células espermáticas, del cual solo se recuperan cuando son descongeladas y llevadas a temperatura ambiente (Watson y Morris, 1987). Esta tecnología constituye una alternativa para el establecimiento de bancos genéticos, los cuales ayudan a mantener la biodiversidad y asegurar la conservación física de una especie (Medina-Robles *et al.*, 2006).

Se han desarrollado un gran número de protocolos de congelación seminal debido principalmente a las diferencias observadas entre especies como respuesta a las tasas de congelación y descongelación (Hochi *et al.*, 1996; Peña-Martínez, 2004; Velasco-Santamaría *et al.*, 2006). Esto se debe principalmente a que los resultados dependen de factores tales como el diluyente, el crioprotector usado, el tamaño del envase y la calidad seminal, parámetro altamente variable entre individuos (Landsverk, 2000). El diluyente que se añade para congelación generalmente debe contener sustancias iónicas o no iónicas que mantengan la osmolalidad del medio, una fuente de lipoproteína de alto peso molecular (por ejemplo yema de huevo), una fuente de energía como fructosa o glucosa, y un crioprotector. Existen varios tipos de crioprotectores: los que penetran la membrana como son el 1,2-propanodiol (PROH), el dimetilsulfóxido (DMSO), el etilenglicol (EG) y el glicerol; y los que no penetran la membrana como la sacarosa, glucosa, dextrosa, polivinil-pirrolidona (PVP), dextranso, polietilenglicol (PEG). De estos el más utilizado para la criopreservación de semen bovino es el glicerol.

La supervivencia después de la congelación de muchos tipos de células, incluyendo los espermatozoides, depende en gran medida de la tasa de congelación y descongelación, y especialmente de la temperatura a la cual las células son enfriadas antes de su introducción en nitrógeno líquido, fenómeno conocido como “temperatura intermedia de sumergimiento sub-cero” (Watson *et al.*, 1992; Sukhato *et al.*, 2001). Se ha descrito que uno de los factores críticos para la supervivencia de las células después de la congelación es detener la formación de cristales de hielo intracelular, por medio de una deshidratación adecuada antes de su sumergimiento en nitrógeno líquido (Mazur, 1970; Medina-Robles *et al.*, 2005). Los espermatozoides deben estar vivos para ser fértiles y la motilidad ha sido utilizada para determinar la viabilidad. Sin embargo, la motilidad es un reflejo de la actividad flagelar y no necesariamente garantiza que el espermatozoide sea fértil. La integridad del material genético en la cromatina del espermatozoide también debe ser preservada para lograr un desarrollo embrionario normal tras la fertilización. Los efectos de la crioconservación sobre la función espermática y la fertilidad han sido ampliamente estudiados y descritos, particularmente en bovinos

(Anchordoguy *et al.*, 1987; De Leeuw *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1991; Prathalingam *et al.*, 2006).

La IA con semen congelado ha demostrado ser la tecnología reproductiva que más ha contribuido a acelerar el progreso genético de las diferentes especies ganaderas, especialmente del ganado vacuno de aptitud láctea. Sin embargo, el éxito de esta tecnología depende de que el semen utilizado mantenga su poder fecundante tras su descongelación. Para conseguir dicho objetivo, en todo protocolo de congelación seminal han de controlarse rigurosamente los sucesivos pasos que constituyen el proceso de criopreservación, y de forma especial aquellos que influyen más directamente sobre la estructura y función de las membranas espermáticas, y sobre el metabolismo celular (Hammerstedt *et al.*, 1990).

1.5. Descripción del espermatozoide

La fecundación es un proceso complejo, para ello es necesario el aporte de dos gametos diferentes, denominados óvulo y espermatozoide, el primero corresponde a la hembra y el segundo al macho. Por parte del macho, el éxito de la reproducción, ya sea por monta natural o para ser usado en IA, requiere de la producción de un número adecuado de espermatozoides, los cuales deben haber alcanzado madurez y funcionalidad.

Para que los espermatozoides adquieran la capacidad fecundante deben seguir un proceso de desarrollo celular que recibe el nombre de espermatogénesis, que incluye dos etapas, la espermacitogénesis y la espermiogénesis (Fig. 1). La espermacitogénesis engloba las divisiones celulares, desde las espermatogonias menos diferenciadas y culmina con la producción de espermátidas haploides. En la espermiogénesis las espermátidas se transforman morfológicamente hasta producir espermatozoides, con un núcleo condensado, acrosoma y flagelo. El proceso termina con la espermiación, en el que se produce la liberación de los espermatozoides del compartimento "ad luminal" de la pared del túbulo seminífero a la luz del mismo, los espermatozoides son transportados de los túbulos seminíferos hacia la región de la cola del epidídimo, donde serán almacenados hasta la eyaculación. En este trayecto la organización molecular de su membrana plasmática sufre cambios y/o alteraciones que se relacionan con el proceso de maduración, así como la adquisición de movimiento progresivo lineal o movimiento hiperactivado, que le permitirá transportarse por el aparato genital de la hembra hasta contactar con la zona pelúcida del óvulo e iniciar la reacción acrosomal.

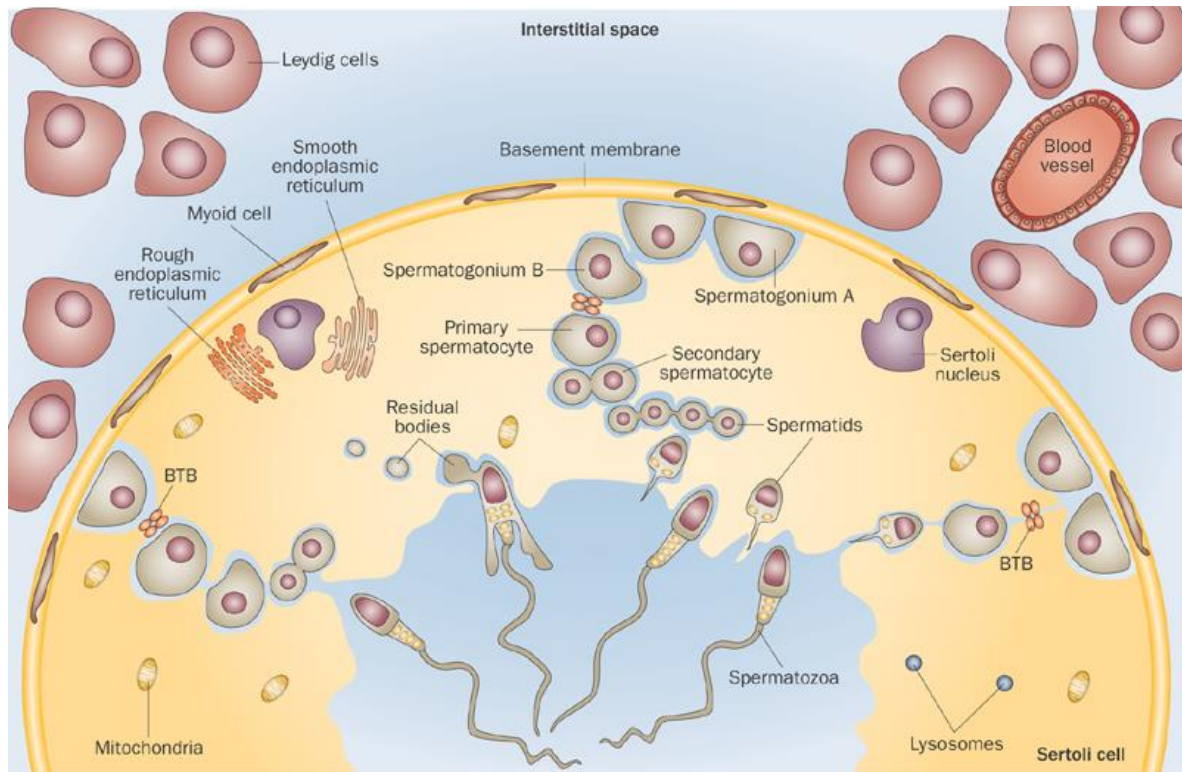


Figura 1. Espermatogénesis (Rato *et al.*, 2012)

Un espermatozoide maduro y funcional, está compuesto por tres regiones principales: la cabeza, la pieza media, y la cola (Fig. 2). La cabeza contiene al núcleo, que se une a proteínas específicas del ADN espermático, llamadas protaminas, que sustituyen a las histonas. Superponiéndose al núcleo está una gran vesícula secretora, el acrosoma, donde podemos distinguir tres regiones claramente diferenciadas: la zona acrosomal con su borde apical, la zona post-acrosomal, y el segmento ecuatorial entre ambas. La cola del espermatozoide (o flagelo) es importante para la motilidad, y se compone de un axonema que contiene una disposición típica de microtúbulos 9+2, se distribuyen de manera que nueve pares de dobletes de microtúbulos periféricos están dispuestos en círculo alrededor del par central. La pieza media del espermatozoide conecta la cabeza y la cola y contiene un número variable de mitocondrias envueltas helicoidalmente alrededor de la porción anterior del flagelo (Ramalho-Santos *et al.*, 2007). El espermatozoide presenta una membrana plasmática con cinco dominios diferentes: acrosoma, segmento ecuatorial, región post-acrosomal, pieza intermedia y cola. Es una estructura heterogénea y dinámica con un papel importante en la fertilidad del macho. Está involucrada en los cambios metabólicos de la célula con el medio extracelular, procesos de capacitación y reacción acrosómica, que requiere que la membrana plasmática se encuentre activa y funcional (Hammerstedt *et al.*, 1990).

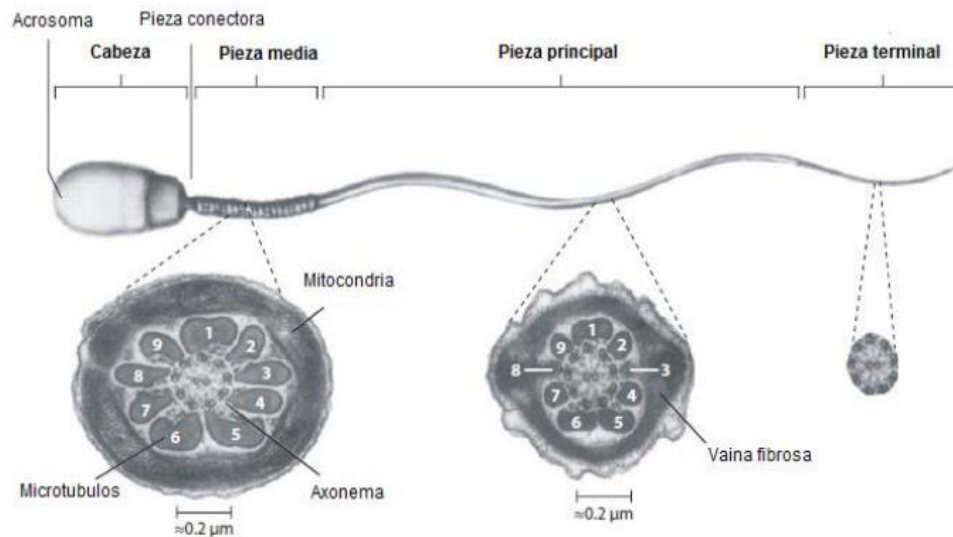


Figura 2. Esquema de las partes de un espermatozoide de mamífero (Modificado de Gaffney *et al.*, 2011).

1.6. Análisis de la calidad seminal o espermiograma

La criopreservación de semen, como se ha visto, es una importante biotecnología reproductiva. Cuando se asocia a la IA, representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad. La criopreservación de semen proporciona una economía para el productor, al reducir los costos de alimentación y transporte de los reproductores, así como los riesgos de transmisión de enfermedades sexualmente transmisibles (Castelo *et al.*, 2008). Sin embargo, las muestras seminales de toros resisten de manera distinta el proceso de congelación-descongelación seminal, por lo que no es extraño encontrar toros destinados a IA con excelentes parámetros de calidad seminal en las muestras frescas y que sean catalogados posteriormente como malos congeladores, obteniendo resultados diferentes de fertilidad a nivel de campo (Madrid-Bury., 2004; Rubio., 2006). Por ello es importante disponer de métodos adecuados de evaluación de la calidad seminal que nos aporten información importante para relacionarlos con los valores de fertilidad en campo.

Los machos y eyaculados destinados a la IA se seleccionan mediante evaluaciones en laboratorio. El espermiograma es una herramienta fundamental en este proceso, por el cual se puede determinar el grado de normalidad del semen antes de destinarlo a la IA y eliminar aquellas muestras potencialmente infértiles o incluso subfértiles. El espermiograma suele incluir la evaluación del volumen,

aspecto, concentración, morfología, y movilidad espermática, así como la presencia de células no espermáticas. Pero estos criterios convencionales tienen una capacidad limitada para predecir la capacidad fecundante del espermatozoide (Graham *et al.*, 1980; Hirano *et al.*, 2001; Farah *et al.*, 2013). Una vez descartados los casos extremos, el espermiograma simple no permite la determinación a priori de la fertilidad potencial que alcanzará el semen analizado (Rodríguez-Martínez, 2003). Debido a ello, los análisis seminales son cada vez más detallados y sofisticados, en un intento de mejorar los pronósticos de fertilidad. A continuación revisaremos algunas de las técnicas utilizadas en la evaluación de calidad seminal en toro, lo que nos permitirá encuadrar los objetivos de nuestro estudio.

Concentración

El principio de la determinación de la concentración espermática está establecido por el recuento de los espermatozoides de una muestra de semen diluido bajo condiciones estandarizadas. Uno de los métodos más aceptados para la evaluación de la concentración espermática de una muestra seminal es la microscopía óptica, empleando el método hemocitométrico, utilizando una cámara de conteo, como por ejemplo las de Neubauer, Burker o Thoma. El método hemocitométrico tiene en cuenta la superficie y la altura de la cámara, y el grado de dilución al que se somete la muestra de semen. Es un método clásico, usado además en otros tipos de células. Para facilitar el conteo celular, las células son inmovilizadas usando una fijación y/o empleando choque osmótico. Se debe tener presente al realizar el conteo que las colas sueltas de los espermatozoides y otros tipos celulares no son considerados. La medida de la concentración también puede realizarse con espectrofotómetros. En este caso la concentración se da por la turbidez de las células en suspensión, una evaluación mucho más rápida que el proporcionado por el método del hemocitómetro (Gamboa y Ramalho Santos, 2005). Un tercer método se basa en la utilización de sistemas computarizados de recuento celular.

Motilidad

Se pueden utilizar diversos métodos para determinar la motilidad espermática. Cuando se cuenta con experiencia, generalmente se realizan estimaciones visuales rápidas, lo que se conoce como análisis subjetivo de la motilidad, observando la intensidad del movimiento. Esta técnica se realiza en un microscopio óptico, preferiblemente con una pletina termostatazada.

En los últimos años han sido introducidos análisis computarizados (Computer Assisted Sperm Analysis - CASA), que permiten determinar la motilidad espermática y progresiva y los parámetros cinéticos de cada espermatozoide, además de la concentración de la muestra (Catena y Cabodevila *et al.*, 1999). Es un método objetivo que nos proporciona una información amplia sobre las propiedades cinemáticas de los eyaculados basados en medidas individuales de los espermatozoides (Fig. 3), además es posible valorar características múltiples de una gran cantidad de muestras con alta repetibilidad (Farrel *et al.*, 1998; Verstenger *et al.*, 2002).

El semen de buena calidad, que ha sido recientemente descongelado, normalmente tiene 40–50% de espermatozoides con motilidad progresiva (Catena y Cabodevila *et al.*, 1999). Existen correlaciones altas entre motilidad espermática y fertilidad (Kjaestad *et al.*, 1993; Bailey *et al.*, 1994; Stalhammar *et al.*, 1994; Januskaukas *et al.*, 2003). Además se han descrito correlaciones significativas entre varios parámetros cinéticos de espermatozoides de toros y la fertilidad *in vivo* (Farrell *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998; Januskauskas *et al.*, 2001, 2003; Cseh *et al.*, 2004).

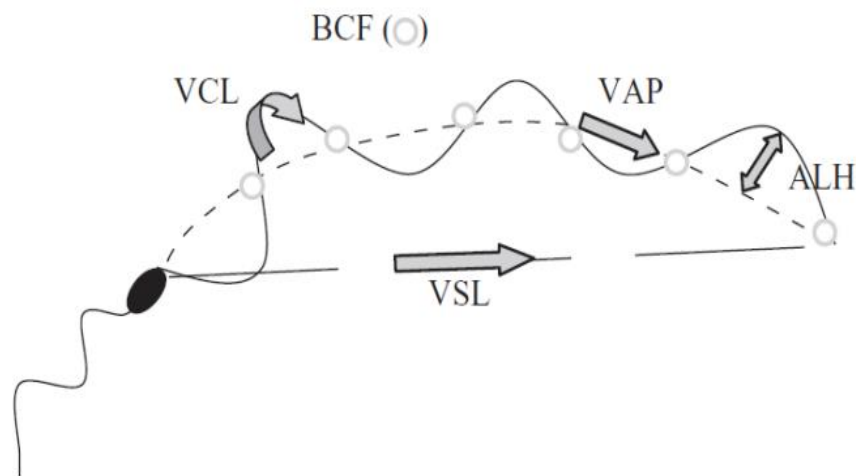


Figura 3. Ilustración del movimiento espermático y los parámetros que lo describen. VCL ($\mu\text{m/s}$), velocidad curvilínea; VSL ($\mu\text{m/s}$), velocidad rectilínea; VAP ($\mu\text{m/s}$), velocidad promedio de la trayectoria; BCF (Hz), frecuencia de batido del flagelo; ALH ($\mu\text{m/s}$), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; LIN Linearidad (%) = $\text{VSL/VCL} \times 100$; STR Rectitud (%) = $\text{VSL/VAP} \times 100$; WOB Tambaleo (%) = $\text{VCL/VAP} \times 100$ (Malo *et al.*, 2005).

Morfología espermática

La disminución de la capacidad fecundante de los espermatozoides criopreservados se ha asociado con un menor porcentaje de motilidad y la mayor presencia de anomalías morfológicas (Watson, 1995; Holt, 2000). Los espermatozoides con cabezas deformes no acceden al ovocito, después de realizarse la IA no atraviesan el tracto reproductor de la hembra y/o no participa en la fecundación (Saacke *et al.*, 1998). Además, pequeñas diferencias geométricas y en la morfología de la cabeza pueden causar grandes diferencias en la hidrodinámica espermática (Dresdner y Katz, 1981). Las cabezas con formas anormales pueden indicar anomalías en la cromatina y por lo tanto incompetencia potencial de una muestra seminal (Saacke, 2008).

Las anomalías se pueden evaluar en muestras fijadas (en glutaraldehído o formol) mediante microscopio con contraste de fases positivo o de contraste interferencial (DIC). También se pueden evaluar en muestras teñidas utilizando microscopio de campo claro (Mocé, 2015). La tinción más utilizada es la monocromática, por ejemplo con nigrosina, llamada también método de contraste. Es un método simple que permite distinguir las regiones principales del espermatozoide (cabeza, cuello/pieza media, cola/pieza principal). El fondo negro contrasta con los espermatozoides incoloros, y la morfología se determina rápidamente utilizando un microscopio óptico ordinario. Se debe tener en cuenta al momento de realizar el frotis, aplicar una fuerza mínima; o de lo contrario las colas de los espermatozoides se pueden romper. Deben registrarse el número de espermatozoides normales y con defectos morfológicos, el tipo de defecto, la región de la célula donde se detecta (cabeza deforme, cola curvada, espermatozoide con dos cabezas, etc.). Existe una clasificación jerárquica de los defectos de los espermatozoides para cada especie, que debe de ser consultado cuando se realiza un análisis, ya que algunos defectos se consideran más limitantes en la función de los espermatozoides que otros.

Se ha encontrado correlación entre la morfología espermática valorada post-descongelado y la fertilidad (Guillan *et al.*, 2008). Por tanto, se ha de tener muy presente que las muestras de semen con un porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales inferior al 70% han de descartarse para la congelación (Barth y Oko, 1989).

Morfometría espermática

La caracterización de las diferentes formas y dimensiones espermáticas y su relación con la fertilidad son actualmente algunos de los puntos claves en el análisis seminal. Se ha implementado un nuevo sistema de análisis computarizado

de la morfometría espermática denominado Automatic semen morphometry analysis (ASMA) o Computer-assisted sperm morphometry analysis (CASMA) como una forma de reducir la subjetividad de la evaluación morfológica espermática y la variabilidad existente (Davis *et al.*, 1992; Kruger *et al.*, 1993; Ball y Mohammed., 1995). Sin embargo, las conclusiones que se obtengan dependen de la técnica de tinción, protocolos empleados y de las muestras seminales.

Las muestras son analizadas mediante un microscopio conectado a una cámara de vídeo y a un ordenador con un software que procesa las imágenes obtenidas, calculando los parámetros métricos de la cabeza espermática, pieza intermedia y acrosoma (Álvarez-Lleó, 2003). Los parámetros a cuantificar pueden hacer referencia al tamaño de la cabeza (área, perímetro, longitud y anchura) y a la forma de la cabeza, además de obtener la proporción de acrosoma que incluye la cabeza del espermatozoide (Fig. 4). Incluso, el sistema de análisis ofrece información inherente a la inserción de la pieza intermedia en el núcleo, midiendo la distancia y el ángulo de la inserción (Soler, 2000). Este sistema también podría clasificar los espermatozoides en categorías morfológicas (normales/anormales) y proporcionar información sobre defectos de la cabeza, acrosoma y pieza intermedia.

Los protocolos de procesamiento de las muestras utilizados en análisis de morfometría espermática convencionales involucran varios pasos, incluyendo la extensión y secado, fijación y tinción, que matan todos los espermatozoides y pueden alterar las estructuras celulares, potencialmente afectando resultados morfométricos (Yániz *et al.*, 2015). Hay pocos estudios que evalúen el impacto del procesamiento de la muestra de resultados morfométricos. Generalmente se asume que el secado y fijación provoca una disminución de las dimensiones del espermatozoide en una magnitud que podría estar próxima al 30 % para el área de la cabeza (Katz *et al.*, 1986), mientras la disminución del tamaño nuclear podría ser mucho menor (entre el 0% y el 9 % dependiendo de la especie) (Yániz *et al.*, 2012; Vicente-Fiel *et al.*, 2013). También en estructuras celulares como el acrosoma la extensión y secado de las muestras provoca su alteración (Lybaert *et al.*, 2009).

En los últimos años, varios autores han propuesto alternativas para el estudio de morfometría espermática de muestras de semen en preparaciones húmedas. Estos incluyen el uso de la microscopía de fluorescencia (CASMA-F; Yániz *et al.*, 2012; Vicente Fiel *et al.*, 2013; Yániz *et al.*, 2015) y los métodos de contraste de fases (Ball y Mohammed, 1995; Marco-Jimenez *et al.*, 2006; Marco-Jimenez *et al.*, 2010; Lavara *et al.*, 2013). La utilización de estos métodos permite la evaluación directa de morfometría cabeza de espermatozoides en montajes húmedos. Esto minimiza la posibilidad de que las dimensiones de la cabeza del espermatozoide

pueden verse influenciadas por artefactos procesales, aunque normalmente se deben fijar las muestras (Yániz *et al.*, 2015). Sin embargo, la captura de imagen usando esta técnica es más difícil, ya que los espermatozoides pueden estar flotando en diferentes planos. Para resolver este inconveniente, se ha introducido una nueva técnica (Trumorph®, Proiser I+D, Paterna, España). El Trumorph® combina un corto choque térmico con una ligera presión para que las células permanezcan inmóviles y distribuidas en un plano focal (Soler *et al.*, 2014, 2016). Sin embargo, este método necesita una validación para verificar que el choque térmico no altera la estructura celular.

A pesar de avances, los métodos disponibles actualmente no permiten la identificación separada y el estudio morfométrico de los espermatozoides vivos y muertos y sus componentes en artiodáctilos. Para superar esta limitación, en esta tesis utilizaremos el método de tinción múltiple desarrollado por el grupo de investigación TECNOGAM.

Diferentes estudios utilizando CASMA han demostrado asociaciones entre las dimensiones de la cabeza del espermatozoide y la fertilidad en toros (Sailer *et al.*, 1996; Ostermeier *et al.*, 2001), aunque se necesitan estudios más amplios.

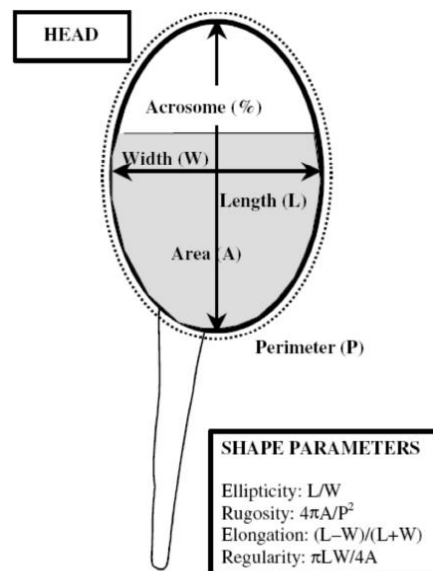


Figura 4. Parámetros morfométricos de espermatozoides evaluados en este estudio (Modificado de Soler *et al.*, 2003)

Integridad de la membrana plasmática y acrosómica

La integridad de membrana plasmática y acrosomal reflejan la viabilidad espermática. El proceso de criopreservación puede afectar estas membranas ocasionando daños como hinchamiento y disrupción de las mismas, cambios en la fluidez, alteración del flujo Ca^{2+} y cambios en la actividad enzimática que pueden inducir una capacitación espermática anticipada, viéndose afectada la fertilidad (Tartaglione y Ritta, 2004). Por lo tanto, resulta importante evaluar la integridad estructural y funcional de ambas, más aún si se sabe que el daño criogénico sobre la cabeza y el flagelo espermático pueden ocurrir independientemente uno del otro, y la presencia de la membrana flagelar intacta, no indica necesariamente integridad de la membrana acrosomal (Zhu y Liu, 2000).

Las tinciones vitales espermáticas tales como Eosina/Nigrosina (EN) y Trypan-Blue (TB) han sido utilizados durante décadas para evaluar la integridad de la membrana plasmática (Mayer *et al.*, 1951; Hackett y Macpherson., 1965). También se han desarrollado tinciones vitales fluorescentes con el mismo fin. Estos fluorocromos pueden dividirse en dos grupos: permeables (tiñen las células vivas) y no permeables (tiñen las células muertas) (Juonala *et al.*, 1999). La emisión de la fluorescencia con la tinción de células vivas, depende de las bombas iónicas funcionales presentes solo en células viables, por tanto son indicadores de la integridad de la membrana espermática (Love *et al.*, 2003). El yoduro de propidio (IP) es una tinción rojo fluorescente específico del ADN, no penetra en el plasmalema intacto y puede ser combinado con tinciones fluorescentes que sirven como marcadores de aquellos espermatozoides intactos. La mayoría de ellos exhiben una fluorescencia verde brillante en la cabeza, como el diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) (Garner *et al.*, 1986; Harrison *et al.*, 1990), el SYBR-14 (Garner *et al.*, 1994), o la naranja de acridina (Yániz *et al.*, 2013c), permitiendo el registro del porcentaje de espermatozoides viables. Este tipo de sondas pueden ser combinadas y utilizadas en el citómetro de flujo. La combinación de diferentes patrones permiten estimar diferentes grados de viabilidad espermática (Silva y Gadella., 2006). La integridad de la membrana espermática también ha sido evaluada con el uso de Merocianina 540 (MC540), una sonda que muestra una alta afinidad por la membrana inestable. Permite la evaluación de las alteraciones en la organización y arquitectura de los lípidos de la membrana plasmática, lo cual puede generarse debido a los cambios de temperatura a los que son sometidas las células espermáticas. Usando esta sonda bajo microscopio de fluorescencia se han identificado dos poblaciones espermáticas: los espermatozoides fluorescentes indican que presentan las membranas inestables (positivos para MC540) y los espermatozoides no fluorescentes con membranas estables (Ramalho-Santos *et al.*, 2007).

Guillan *et al.* (2008) en muestras de semen post-descongelado correlacionaron viabilidad y fertilidad en toro. En el pasado, al hablar de integridad de las membranas espermáticas (plasmática y acrosomal) se hacía énfasis solo en la valoración de la integridad estructural de las mismas, mediante tinciones supravitales (pruebas de vitalidad), o contabilizando el número de acrosomas alterados en una muestra seminal dada. Es conocido que aun cuando algunas técnicas de evaluación morfológica informan sobre el daño que sufre la membrana plasmática y acrosomal, estos resultados no siempre están correlacionados con la fertilidad del semen (Rubio, 2006), a menos que el daño que presenten los espermatozoides sea muy importante (Rodríguez-Martínez, 2000). Un aspecto muy relevante al inferir sobre la integridad es evaluar la capacidad funcional del espermatozoide, con el fin de determinar la integridad funcional de la membrana plasmática y acrosomal y que constituye una información importante en la evaluación de la fertilidad del macho (Vera, 2001; Quintero-Moreno *et al.*, 2007; Rubio-Guillén *et al.*, 2007).

La funcionalidad de la membrana plasmática es un parámetro importante que se determina por medio del test hipo-osmótico conocido como HOST (Hypo-osmotic swelling test) (Jeyendran *et al.*, 1984; Kumi-Diaka, 1993; Correa *et al.*, 1997a, b). Es una herramienta importante de evaluación de la calidad seminal, complementaria para predecir la capacidad de fertilización del semen (Bacinoglu *et al.*, 2008), aunque normalmente se debe combinar con otras técnicas para mejorar la capacidad predictiva de la fertilidad.

El HOST se basa en los estudios de Drevius y Eriksson, quienes demostraron la capacidad de los espermatozoides de toro, conejo y humano para captar agua en un medio hipo-osmótico, lo que se manifiesta por el enrollamiento del flagelo (Drevius y Eriksson, 1966). Dichos cambios fueron confirmados por otros autores, que lo relacionaron con la capacidad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide humano, observando una alta correlación entre la capacidad de hinchamiento del espermatozoide en un medio hipo-osmótico y su capacidad de penetración en el ovocito de hámster desnudo (Mahi y Yanagimachi, 1973; Jeyendran *et al.*, 1984). El HOST se adaptó después a otras especies como la bovina (Correa y Zavos, 1994; Revell y Mrode, 1994; Brito *et al.*, 2003), ovina (García, 1992), entre otras, demostrando que presenta una mayor relación con la fertilidad que otros métodos *in vitro* (Revell y Mrode, 1994; Brito *et al.*, 2003; Payan-Carreira *et al.*, 2013).

Dado que no existe un único protocolo para realizar el HOST, se han usado en muchos estudios diferentes soluciones con diferentes presiones osmóticas, con

una temperatura de incubación generalmente de 37°C, pero en ocasiones menor (Check *et al.*, 1989; Correa *et al.*, 1997a, b), y un tiempo de incubación variable. En relación a la solución hipoosmótica, 150 mOsm/kg es la osmolalidad más utilizada para realizar la técnica con semen fresco (Revell y Mrode, 1994), y 100 mOsm/kg para el semen congelado/descongelado (Correa y Zavos, 1994; Revell y Mrode, 1994). En cuanto a los tiempos de incubación empleados en soluciones hipoosmóticas, en estudios anteriores se reportan: 5 minutos (Correa *et al.*, 1997a), 15 minutos (Franco *et al.*, 2011), 20 minutos (Tartaglione y Ritta, 2004), 30 minutos (Mocé y Graham, 2008), pero principalmente 60 minutos (Revell y Mrode, 1994; Bacinoglu *et al.*, 2008; Vera-Munoz *et al.*, 2009). La evaluación se realiza subjetivamente y sobre un número reducido de espermatozoides, determinando el total de espermatozoides con colas enrolladas. Estos muestran diferentes grados de turgencia en un esfuerzo por mantener el equilibrio entre los líquidos de su compartimiento interno y el medio extracelular, aunque en el estudio de Revell y Mrode (1994) solamente consideraron como espermatozoides viables aquellos que tras la incubación en medio hipo-osmótico presentaban colas enrolladas y actividad residual, encontrando una relación altamente significativa con la fertilidad. La determinación de esta actividad residual tras el HOST es subjetiva y lenta, y en otros ensayos se ha observado que se relaciona con la IM estudiada mediante fluorocromos, cuya determinación se puede automatizar (Yániz *et al.*, 2008b; Yániz *et al.*, 2013b, c), como se realizó en un trabajo de Webb *et al.* (2008), quienes emplearon un contador celular electrónico, que mide la resistencia eléctrica del espermatozoide al pasarlo a través de un capilar coulter counter hypo-osmotic swelling test (CC-HOS), aunque su utilización está poco extendida. A pesar de sus virtudes, el HOST no permite determinar la proporción de espermatozoides con la membrana intacta que no responden a las condiciones hipo-osmóticas, ni los espermatozoides con colas enrolladas pero con la membrana dañada.

Lomeo y Giambersio (1991), describieron un nuevo test para valorar la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide utilizando agua destilada en vez de la solución hipo-osmótica, que llamaron 'Test de agua'. Este test es más sencillo y rápido que el HOST, con una buena correlación con los análisis rutinarios de semen y tinción de Eosina-amarilla (Ey).

A pesar de los estudios realizados, aún existe un gran desconocimiento sobre los mecanismos moleculares específicos que el espermatozoide utiliza para reaccionar frente a un medio hipo-osmótico.

La reactividad de la membrana acrosomal representa un requisito absoluto para la fecundación y sólo los espermatozoides que puedan realizar la reacción acrosómica de manera sincronizada con la fase de penetración en el ovocito,

tienen la capacidad de atravesar la zona pelúcida y, como consecuencia, fusionarse con el ovocito para la formación del embrión (Januskauskas *et al.*, 2000).

El test de resistencia osmótica (osmotic resistance test, ORT) se desarrolló a partir de los trabajos de Schilling *et al.* (1986), en la especie porcina. Permite evaluar la sensibilidad de la membrana acrosomal a cambios bruscos en la osmolaridad, evaluando su integridad, lo que puede tener función predictiva sobre la capacidad fecundante (Schilling *et al.*, 1986), y sobre la capacidad de soportar el proceso de criopreservación en una determinada muestra seminal (Schilling y Vengust, 1985; Rubio-Guillén *et al.*, 2007). Al realizar esta prueba se evalúan dos grupos de muestras sometidas a dos diferentes condiciones, una en hipo-osmosis y otra en condiciones iso-osmóticas que sirve como grupo control al test (Correa y Zavos, 1994), los resultados se representan en forma porcentual, indicando la resistencia acrosomal al medio hipo-osmótico (%ORT) (Pérez-Llano *et al.*, 1998; Gil *et al.*, 2000).

Porcentajes altos de acrosomas alterados, hacen presumir que el acrosoma es una de las estructuras más afectadas luego de la criopreservación (Hammerstedt *et al.*, 1990), no permitiendo conseguir una tasa de fertilidad esperada o idónea. Por el contrario, este tipo de respuesta suele relacionarse con una fertilidad baja, encontrando correlaciones altas y positivas con la tasa de fertilidad *in vivo* al evaluarse la integridad de la membrana acrosomal tras la incubación en un medio hipo-osmótico (Aisen *et al.*, 2002). Como se ha mencionado, el daño criogénico sobre la cabeza y el flagelo espermático pueden ocurrir independientemente uno del otro (Zhu y Liu, 2000).

Función mitocondrial

El interés de esta evaluación deriva de la importancia de las mitocondrias en la producción de adenosin-tri-fosfato (ATP), producido por fosforilación oxidativa, necesario para la motilidad, fecundación (Evenson *et al.*, 1982; O'Connell *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2011) y la preservación de la funcionalidad de las membranas plasmática y mitocondrial (O'Connell *et al.*, 2002). El daño de la membrana mitocondrial puede ser un acontecimiento inicial que potencia la muerte celular (Henry *et al.*, 1993).

La función mitocondrial en los espermatozoides puede ser evaluada usando tinción vital fluorescente, como la Rodamina 123. Este fluorocromo penetra en las mitocondrias con actividad respiratoria y se acumula en su interior, analizado con citómetro de flujo, la luz del láser sobre los espermatozoides teñidos con Rodamina

123 emiten una intensa fluorescencia verde en la pieza intermedia de los espermatozoides, identificándose mitocondrias activas. La rodamina 123 es una tinción dependiente del potencial de membrana, cuando colapsa el gradiente de protones, la producción aeróbica de ATP falla, por lo tanto las mitocondrias aparecen sin teñir (Ericsson *et al.*, 1993; Garner *et al.*, 1997; Partyka *et al.*, 2012). La rodamina 123 permite cuantificar la población de espermatozoides con mitocondrias activas, pero no permite diferenciar el grado de actividad respiratoria de las células. Para tal fin se suele emplear la tinción catiónica lipofílica JC-1 (5, 5', 6, 6'- tetrachloro- 1, 1', 3, 3' – tetraethylbenzamidazolyl carbocyanine iodide) que emite diferentes colores de fluorescencia de acuerdo al potencial de membrana interna de la mitocondria (IMM), es decir permite diferenciar entre espermatozoides con baja y alta actividad respiratoria. El JC-1 se acumula en el interior de las mitocondrias, si la actividad respiratoria es elevada forma agregados intramitocondriales que emiten fluorescencia naranja, y si la actividad respiratoria es baja, el JC-1 no llega a formar agregados y emite fluorescencia verde (Thomas *et al.*, 1998; Garner y Cheryl., 1999). La relación de fluorescencia de naranja a verde del JC-1 depende solo del potencial de membrana, la pieza media del espermatozoide revela fluorescencia roja, naranja o verde (Silva y Gadella., 2006), independientemente del tamaño de la mitocondria, forma o densidad. Diferentes patrones de marcaje pueden correlacionarse con parámetros tales como la motilidad espermática (Gravance *et al.*, 2000; Garner *et al.*, 2001).

El desarrollo y uso de nuevas tinciones como las sondas Mitotracker (Poot *et al.*, 1996) para evaluar la funcionalidad mitocondrial, han sido correlacionadas con el potencial de la mitocondria (Sousa *et al.*, 2011). Las tinciones con Mitotracker son específicas para el marcaje de mitocondrias. Existen distintos tipos de Mitotracker, Mitotracker Green, se une fácilmente en la mitocondria con un alto potencial mitocondrial (mitocondrias activas), y la pieza intermedia del espermatozoide presenta fluorescencia verde, mientras que si las mitocondrias no están funcionales permanece sin fluorescencia (Sutovsky *et al.*, 1999). Mitotracker Deep Red, fue recientemente sugerido por Hallap *et al.* (2005) para evaluar la actividad mitocondrial en el espermatozoide.

Reacción acrosómica y capacitación

La reacción acrosómica es un proceso especializado de fusión de la membrana citoplasmática con la membrana acrosomal externa en la zona apical de la cabeza espermática originando la liberación de las enzimas almacenadas en esta vesícula y la exposición de la membrana acrosomal interna (Fig. 5), necesarios para que el espermatozoide pueda penetrar la zona pelúcida, además

de la expresión de moléculas que actúan como receptores para que pueda ingresar al oocito y ocurra la fusión entre gametos (Myles, 1993; Snell y White, 1996).

La reacción acrosómica puede ser determinada por varias técnicas, entre ellas el azul de Coomassie (Cross *et al.*, 1986), aunque comúnmente es valorada con lectinas conjugadas fluorescentes (PNA-Peanut agglutinin- y PSA-Pisum sativum agglutinin). Se puede detectar en espermatozoides vivos: la ausencia de fluorescencia es un indicativo de un acrosoma intacto, y la fluorescencia es un indicativo de la ruptura del acrosoma o de la reacción acrosómica. Esta técnica es comúnmente utilizada en el citómetro de flujo (Graham, 2001; Gillian *et al.*, 2005) o por microscopía de fluorescencia (Gadella y Harrison, 2002). Cuando la tinción acrosómica se lleva a cabo en espermatozoides fijados y permeabilizados, todos los acrosomas fluorescentes son considerados como intactos, mientras que los acrosomas con baja o solo con una banda de tinción fluorescente, muestran señales irregulares de acrosomas rotos o reaccionados (Cheng *et al.*, 1996; Gamboa y Ramalho Santos, 2005; Partyka *et al.*, 2012). Con esta técnica es posible mostrar el grado de reacción acrosómica de los espermatozoides que se unirán a la zona pelúcida en un momento dado (Fazeli *et al.*, 1997).

Hay otros tests fluorescentes para evaluar el acrosoma, como la tinción de clortetraciclina (CTC), en la que la fluorescencia es activada cuando se une a iones de Ca^{2+} libres. Cuando se combina con otras tinciones fluorescentes, tales como Hoechst 33258, se diferencian subpoblaciones espermáticas. En la actualidad, la tinción CTC es un test de rutina en algunas especies para evaluar la ocurrencia de la capacitación y reacción acrosómica. También ha sido adaptado para citometría de flujo (Payan-Carreira *et al.*, 2011).

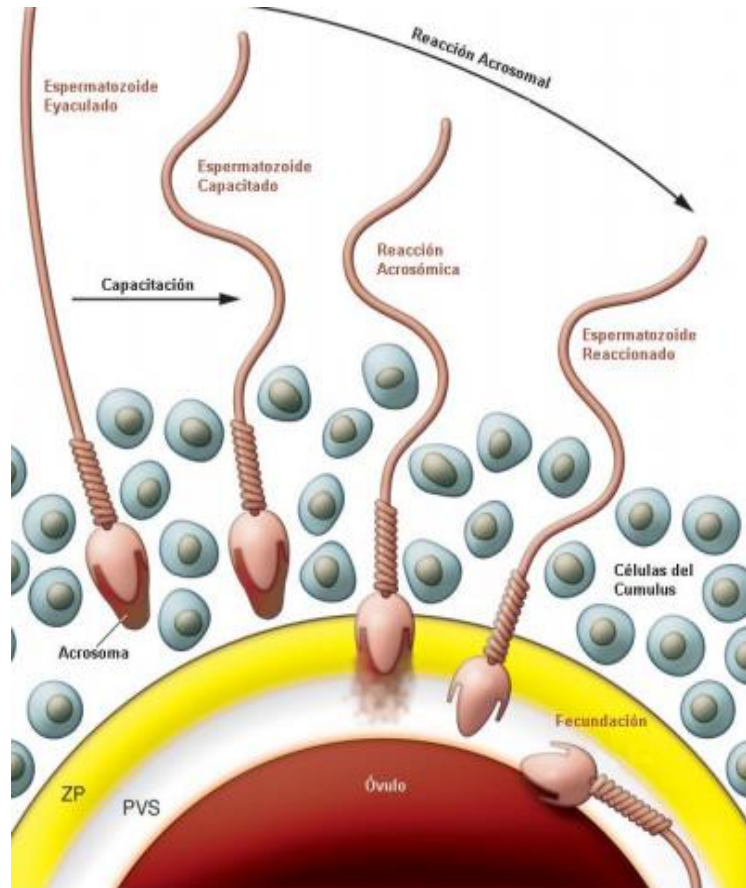


Figura 5. Mecanismo de interacción espermatozoide-ovocito. PVS: Espacio perivitelino. ZP: Zona pelúcida (Modificado de Ikawa *et al.*, 2010).

Fragmentación del ADN espermático (SDF)

En 1966 se identificó por primera vez en toros con baja fertilidad que los espermatozoides presentaban un complejo ADN-proteínas anormales utilizando la reacción de Feulgen (Gledhill, 1966). La coloración intensa de la cabeza del espermatozoide se asoció a una alta densidad de ADN por una fuerte compactación de la cromatina y por tanto, una menor sensibilidad a la hidrólisis. Estos estudios fueron cobrando mayor interés cuando se comenzó a asociar problemas de infertilidad inespecífica con alteraciones de la estructura del núcleo del espermatozoide (Evenson, 1983). Las roturas en el ADN celular, pueden conducir a la inestabilidad genómica y las células podrían sufrir apoptosis o envejecimiento, con el fin de prevenir la acumulación potencial de mutaciones tumorogénicas. Si esta respuesta a los daños en el ADN falla, esas mutaciones aparecerán (Wang *et al.*, 2012), condicionando la estabilidad de los cromosomas en las siguientes divisiones celulares, pudiendo ser transmitidas en el momento de la

fecundación y provocando una pérdida de funcionalidad celular, incompatible con la formación del embrión y el desarrollo fetal (Evenson *et al.*, 2002; Silva y Gadela, 2006).

El estudio de este parámetro se puede realizar mediante el empleo de diferentes técnicas que permiten detectar la presencia de lesiones en el ADN: naranja de acridina (AO), es un fluorocromo que distingue entre roturas simples y dobles de los ácidos nucleicos (Tejada *et al.*, 1984; Khalifa *et al.*, 2008); azul de toluidina (AT), señala la persistencia de las histonas (Mello, 1982; Belletti y Mello, 2004; Nava-Trujillo *et al.*, 2013); cromomicina A3 (CMA3), señala la deficiencia de protaminas (Bianchi *et al.*, 1993). Las técnicas más innovadoras se basan en dos estrategias diferentes para estudiar la fragmentación del ADN espermático. La primera de ellas incluye las metodologías que implican el marcaje de roturas de cadena sencilla y de cadena doble de la molécula de ADN *in situ*, que se registran de forma natural o fortuita. Se utilizan procesos enzimáticos para la incorporación *in situ* de nucleótidos modificados sobre los espermatozoides fijados en un portaobjetos (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007). En este grupo se incluyen: Terminal dUTP Nick-End Labeling (TUNEL), por marcado del extremo libre utilizando una transferasa terminal (Sun *et al.*, 1997; Lopes *et al.*, 1998; Anzar *et al.*, 2002; Fatehi *et al.*, 2005; Mota y Ramalho-Santos, 2006; Waterhouse *et al.*, 2006; Varum *et al.*, 2007), *in situ* nick translation (ISNT), por marcado del extremo terminal 3-OH utilizando una ADN polimerasa (Gorczyca *et al.*, 1993). La segunda estrategia incluye aquellas técnicas que miden la capacidad de la cromatina y en particular del ADN para desnaturalizarse frente a determinados tratamientos (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007). En este grupo se incluyen: Test de dispersión de la cromatina espermática (SCD) (Fernández *et al.*, 2003, 2007), ensayo de cometa (Singh *et al.*, 1988; Aravindan *et al.*, 1997; Slowinska *et al.*, 2008; Enciso *et al.*, 2009, 2011), ensayo de estructura de la cromatina (SCSA) (Evenson *et al.*, 1980; Ballachey *et al.*, 1987), test de detección de la rotura del ADN mediante hibridación fluorescente *in situ* (DBD-FISH) (Fernández *et al.*, 2000, 2002).

La técnica SCD se utiliza por la simpleza en su ejecución en varias especies, entre ellas la bovina (Gosálvez *et al.*, 2007, 2011; Martínez-Pastor *et al.*, 2009), ya que no requiere un equipo complejo ni personal especializado en la interpretación de los resultados, pueden ser interpretados mediante microscopía de fluorescencia o de campo claro, valorando el tamaño de los halos de dispersión de la cromatina. Los resultados obtenidos del test SCD, muestran una correlación positiva con otras metodologías, tales como el SCSA o el TUNEL (Fernández *et al.*, 2005; Chohan *et al.*, 2006).

Se han correlacionado las alteraciones de la cromatina con la infertilidad en la especie bovina (Ballachey *et al.*, 1987; Karabinus *et al.*, 1990). Existen estudios

que demuestran que valores por debajo de un 15-20% de fragmentación del ADN espermático no experimentarían disminuciones apreciables en la fertilidad en bovino y porcino (Rybar *et al.*, 2004). Acevedo *et al.*, (2002) informaron que la vulnerabilidad del ADN espermático a la desnaturalización se asoció positivamente con la ocurrencia de cabezas espermáticas deformes, lo que sugiere que la ocurrencia de cabezas deformes puede indicar la presencia de anomalías en la cromatina espermática y una posible incapacidad para lograr el éxito en la fecundación.

Estrés oxidativo

El metabolismo espermático en condiciones aeróbicas origina moléculas reactive oxygen species (ROS) o reactivos químicos intermedios de corta duración que generan oxidación en lípidos, proteínas y glúcidos (Storey, 1997; Garrido *et al.*, 2004; Sanocka y Kurpisz, 2004; Kasimanickan *et al.*, 2007; Agarwal *et al.*, 2008; Agarwal *et al.*, 2009). La excesiva producción de ROS daña la membrana espermática, reduce la motilidad por disminución del potencial de membrana, induce irreparables daños en el ADN y está estrechamente asociado con la apoptosis (Kim *et al.*, 2010; Natali y Turek., 2011). Los espermatozoides son susceptibles a la oxidación de su membrana plasmática debido a la presencia de ácidos grasos poliinsaturados (Aitken *et al.*, 2007). El plasma seminal posee varios antioxidantes naturales que protegen a los espermatozoides contra el estrés oxidativo, el cual se eliminan cuando el semen es diluido o sometido a procesos de preservación. Dentro de los espermatozoides, la mitocondria y la membrana plasmática son las estructuras más sensibles al ROS (Agarwal *et al.*, 2008).

Hay estudios en los que se menciona que los ROS son producidos por los espermatozoides muertos y por la congelación (Parks y Graham, 1992) o una reducción en la temperatura del semen que da lugar a alteraciones en la membrana espermática con la posterior liberación al medio de enzimas activas. La acumulación de productos metabólicos tóxicos y las enzimas activas que se liberan, tales como las contenidas en el acrosoma, es mayor en los medios con espermatozoides desintegrados. Esto puede aumentar la degradación de espermatozoides intactos en una forma exponencial (López-Fernández *et al.*, 2008). Un importante efecto secundario del estrés oxidativo es la apoptosis (Kim *et al.*, 2010). La apoptosis (muerte celular programada) se ha afirmado que se produce como un resultado del daño por la criopreservación en células de mamíferos (Baust, 2002). Este fenómeno fue estudiado en semen de toro por su relación con la fertilidad (Anzar *et al.*, 2002).

Para evaluar la apoptosis espermática se usa frecuentemente la Anexina V, una proteína dependiente de Ca^{2+} que se une y reacciona con la fosfatidilserina, que se transloca a la cara externa de la membrana plasmática en espermatozoides que inician la apoptosis. La Anexina V puede ser conjugada a fluorocromos tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC) en análisis por citometría de flujo. Si una tinción vital es usada, tales como IP, la combinación permite distinguir entre tres subpoblaciones: viable (Anexina-FITC-IP-negativo), apoptosis temprana (Anexina-FITC-positivo y IP-negativo) y apoptosis tardía (Anexina-FITC-IP-positivo) (Ramalho-Santos *et al.*, 2007; Agarwal *et al.*, 2009)

La integridad de la membrana plasmática y la motilidad progresiva presentan una correlación negativa con la peroxidación lipídica espermática, y la peroxidación lipídica está negativamente correlacionada con la fertilidad del toro (Kasimanickam *et al.*, 2007; Aitken, 2007).

Evaluación multi-paramétrica

La combinación de sondas fluorescentes ha permitido obtener determinaciones multi-paramétricas de la calidad del espermatozoide, normalmente analizadas mediante citometría de flujo. Así, se han preparado conjugados fluorescentes para evaluar simultáneamente la integridad de la membrana y acrosoma (IP/FITC-PSA o FITC-PNA) (Peña *et al.*, 1999; Nagy *et al.*, 2003). A esta combinación se le ha añadido en ocasiones un tercer fluorocromo, por ejemplo el SYBR-14 (Nagy *et al.*, 2003) o el Carboxy SNARF-1 (Peña *et al.*, 1999), para mejorar la eficacia en la detección de los espermatozoides vivos, que de lo contrario podrían confundirse en el citómetro de flujo con partículas de yema de huevo del diluyente o con restos celulares. Otras combinaciones, además de la integridad de la membrana plasmática y acrosomal, permiten también analizar la actividad mitocondrial añadiendo fluorocromos específicos; para ello, se han combinado los fluorocromos IP/FITC-PSA/JC-1 (De Andrade *et al.*, 2007) o IP/Bis-benzamida/Mitotracker Green-MF/SBTI (Bussalleu *et al.*, 2005). A pesar de conseguir determinaciones multi-paramétricas, muchos de estos tratamientos provocan alteraciones en el espermatozoide, tales como la pérdida de movilidad.

De entre los diferentes métodos, los mejores resultados fueron obtenidos de la combinación de diferentes fluorocromos específicos para cada parte del espermatozoide (Juonala *et al.*, 1999; Langlois *et al.*, 2005). Diferencias en el potencial de membrana, contenido de proteínas específicas y permeabilidad macromolecular de los compartimientos hace posible analizar la integridad de estos en un espermatozoide. La integridad de la membrana plasmática de la cabeza y el estado del acrosoma pueden ser evaluados usando tinciones específicas, y la

integridad de la membrana de la cola mediante HOST (Tabla 1) (Amann y Graham, 1993; Garner, 1997; Jeyendran *et al.*, 1984; Lindahl y Drevious, 1964).

El citómetro de flujo proporciona la posibilidad de evaluar características múltiples de gran cantidad de células espermáticas vivas durante un relativo periodo corto de tiempo (Hammerstedt, 1996). El citómetro de flujo solo detecta fluorescencia cuando se tiñen las células espermáticas con sondas fluorescentes. Por lo tanto, la citometría de flujo actualmente se utiliza para una evaluación rápida, precisa y reproducible. Este enfoque automatizado mejora también la repetibilidad del ensayo porque un número mucho mayor de células pueden ser analizadas en relación a los espermatozoides analizados usando el método por microscopia, pero algunas características espermáticas que son considerados importantes para un examen seminal completo no pueden ser evaluados por citometría de flujo, tales como la motilidad espermática.

Tabla 1. Tinción múltiple y métodos integrados para la evaluación de la calidad seminal aplicados a diferentes especies:

ESPECIE	MÉTODO APLICADO	PARÁMETROS EVALUADOS	FUENTE
Bovino, Ovino, Porcino	. HOST/TB-Giemsa	. Viabilidad/IM	Nagy <i>et al.</i> , 1999
Equino	. HOST/E	. Viabilidad/IM	Mansour, 2009
Humano	. HOST/E	. Viabilidad/IM	Cincik <i>et al.</i> , 2007
Humano	. HOST/TUNEL . HOST/Tinción CMA3 . HOST/Tinción Papanicolau . HOST/Anexina V FITC	. IM/Fragmentación del ADN . IM/Deficiencia de protaminas . IM/Morfología de cabezas anormales . IM/Apoptosis	Bassiri <i>et al.</i> , 2012
Porcino	. HOST/Microscopía de contraste de fases	. IM/Acrosoma	Pérez-Llano <i>et al.</i> , 2003
Porcino	. Bis-benzamida-IP/ Trypsin inhibitor from Soybean (SBTI) conjugado con fluorocromo Alexa Fluor® 488/Mitrotracker® Green FM	. Núcleo/Acrosoma/Mitocondria	Bussalleu <i>et al.</i> , 2005
Porcino	. HOST/Microscopía de contraste de fases	. IM/Acrosoma	Pérez-Llano <i>et al.</i> , 2006
Ovino	. HOST/E	. Viabilidad/IM	Gundogan <i>et al.</i> , 2010
Bovino	. SYBR-14/PE-PNA/IP	. Viabilidad-IM/Acrosoma	Nagy <i>et al.</i> , 2003
Canino	. Carboxy-SNARF-I (SNARF)/IP/FITC-PSA	. IM/Acrosoma	Peña <i>et al.</i> , 1999
Porcino	. IP/FITC-PSA/JC-1	. IM/Acrosoma/Funcionalidad mitocondrial	De Andrade <i>et al.</i> , 2007

- HOST: Hypo-osmotic swelling test. TB: Trypan-Blue. TUNEL: Ensayo Terminal dUTP Nick-End Labeling. E: Eosina. CMA3: Naranja de acridina y cromomicina A3. IP: Yoduro de propidio. PE-PNA: Lectina marcada con ficoeritrina. SNARF: Fluorocromo seminaphtharhodafuor. FITC-PSA: Lectina de *Pisum sativum* conjugada con isotiocianato de fluoresceína. JC-1: Fluorocromo 5,5', 6,6' tetrachloro-1,1',3,3'tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine Iodide. IM: integridad de membrana.

2. OBJETIVOS

Antes de incorporarme al laboratorio, el grupo TECNOGAM había desarrollado un nuevo método avanzado de análisis de la calidad seminal en rumiantes que posibilita la evaluación simultánea de diversos parámetros con relevancia funcional, tales como la motilidad, las morfoanomalías, la integridad de la membrana plasmática y acrosomal del espermatozoide. El nuevo método se basa en la utilización de la microscopía de fluorescencia múltiple y análisis de imagen y permite clasificar cada espermatozoide en las diversas subpoblaciones presentes en la muestra. Por ello nos planteamos como objetivo general de esta tesis aplicar este método para estudiar la motilidad y morfometría de estas subpoblaciones y en la mejora del test hipo-osmótico en toro. Para la consecución de este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos utilizando este nuevo método integrado de análisis de calidad seminal:

Objetivo 1: Describir la subpoblaciones de espermatozoides presentes en muestras de semen de toro, sus características de motilidad y su relación con otros parámetros de calidad seminal.

Objetivo 2: Estudiar detalladamente la morfometría de los componentes de la cabeza de espermatozoides vivos y muertos presentes en muestras de semen de toro.

Objetivo 3: Comparar el efecto del test hipo-osmótico (hypo-osmotic swelling test, HOST) y el test de agua (water test, WT) en la distribución de las subpoblaciones espermáticas de semen de toro.

En resumen, la consecución de los objetivos permitirá desarrollar nuevos métodos integrados de análisis de la calidad seminal que potencialmente mejorarán la capacidad predictiva de la fertilidad de los machos/eyaculados. Además, los nuevos métodos aportarán información de gran valor sobre aspectos funcionales del espermatozoide y el efecto de diferentes tratamientos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Reactivos

A menos que se indique lo contrario, todos los productos químicos utilizados se obtuvieron de Sigma-Chemical Company (Alcobendas, Madrid, España) y los diluyentes se prepararon con agua Mili-Q (Milipore Ibérica S.A., Barcelona, España).

3.2. Manipulación de semen

Para poner a punto el nuevo método integrado se utilizaron pajuelas congeladas de semen de 20 toros comerciales. Para su obtención, el semen se recogió mediante vagina artificial de machos adultos de la raza Frisona, se diluyó hasta 20×10^6 espermatozoides/ml con un diluyente comercial (Bioxcell™, IMV Technologies, Humeo, Huesca, España), se refrigeró, se envasó en pajuelas y se congeló en nitrógeno líquido siguiendo las instrucciones del fabricante. El semen se mantuvo congelado en nitrógeno líquido hasta su análisis. Se descongeló cada pajuela durante 30-60 s en un baño maría a 37°C, se vació en un tubo eppendorf de 1,5 ml previamente atemperado a 37°C, y se mezcló cuidadosamente.

3.3. Evaluación de la calidad seminal

3.3.1. Motilidad espermática

Para evaluar la motilidad espermática de cada muestra se utilizó un sistema CASA comercial (computer-assisted sperm analysis, ISAS®, PROISER, Valencia, España), como se describe en Yániz *et al.*, 2013a (Fig. 6). Las alícuotas de 5 μ l se colocaron en una cámara Makler precalentada, y se evaluaron por el sistema CASA con un objetivo 10X de contraste de fases negativo. Se realizaron 10 capturas de diferentes campos y se anotaron los siguientes resultados: espermatozoides móviles, progresivos, lentos, medios y rápidos. Como criterio mínimo de aceptación se consideró una motilidad mínima del 60%. Se obtuvieron los siguientes parámetros: % de espermatozoides móviles (MS, %), % móviles progresivos (PS, %), velocidad según la trayectoria real (VCL, μ m/s), velocidad según la trayectoria media (VAP, μ m/s), velocidad según la trayectoria rectilínea (VSL, μ m/s), índice de linealidad de la trayectoria (LIN, VSL/VCL), índice de rectitud (STR, VSL/VAP), índice de oscilación (WOB, VAP/VCL), amplitud del movimiento lateral de la cabeza (ALH, μ m), y frecuencia de batido flagelar (BCF, Hz).

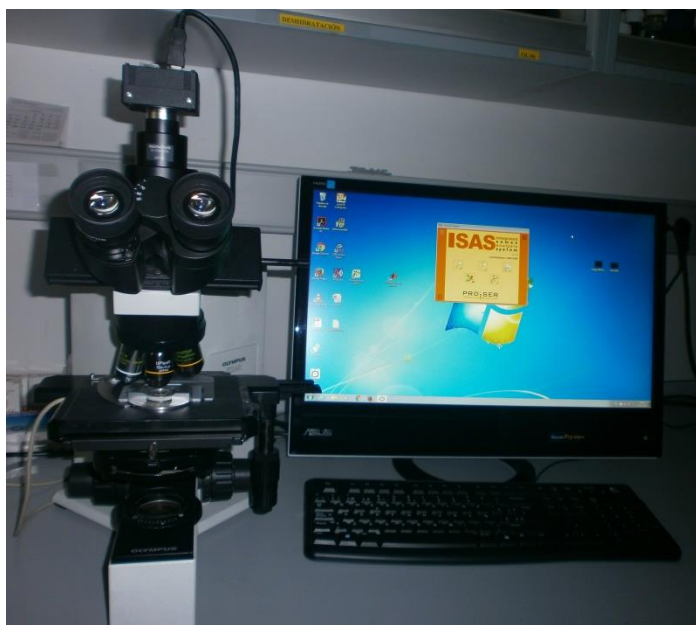


Figura 6. Sistema CASA (computer-assisted sperm analysis, ISAS®, PROISER, Valencia, España), microscopio óptico conectado a una cámara controlado en el ordenador por un software de análisis de imágenes.

3.3.2. Integridad de membrana

La viabilidad espermática (integridad de membrana) se evaluó como se describe en Yániz *et al.*, 2013c. Una alícuota de la muestra seminal (20 μ l) se transfirió a un tubo eppendorf y se tiñó con IP (2 μ l) y AO (0.4 μ l) utilizando el kit DUOVITAL (Halotech, Madrid, Spain). Para inmovilizar a los espermatozoides se agregó 1 μ l de formol al 3.8%, se colocaron los cubreobjetos de 22mmx22 mm y se observaron en microscopio de epifluorescencia (Leica DM4500B, Wetzlar, Alemania) a 10X, las capturas se realizaron con la cámara Jenoptik ProgRes CF CCD (Jenoptik AG, Jena, Germany), conectada a un ordenador y controlada por el programa ProgRes® CapturePro 2.8.8 (Fig. 8). Se examinaron 200 células por muestra como mínimo, determinando la proporción de espermatozoides viables (fluorescencia verde) y no viables (fluorescencia roja).

3.4. Tinción múltiple fluorescente para evaluación de motilidad

En un tubo eppendorf se colocaron 40 μ l de semen, se añadieron 3,2 μ l de la combinación fluorocromos del kit ISAS3fun®, incubándolo durante 5 minutos a 37°C. En ensayos previos a este se determinó las concentraciones y el periodo de incubación óptimo, aquel que, sin provocar descensos de movilidad, permitan una buena tinción fluorescente y la posibilidad de discriminar diferentes subpoblaciones en la muestra. Después de la incubación se colocaron en un porta

atemperado dos gotas de 5 μ l de la muestra y se cubrieron con cubre-objetos de 22mmx22mm. Se capturaron secuencias de imágenes para el análisis de las diferentes variables: motilidad y distribución en las diferentes subpoblaciones en función de la integridad de membrana plasmática y acrosomal y la funcionalidad espermática.

Las secuencias de imágenes digitales de los espermatozoides con marcaje fluorescente se obtuvieron utilizando un equipamiento consistente en un microscopio de fluorescencia (DM4500B, Leica, Alemania) provisto de las adecuadas combinaciones de filtros, un objetivo 40X, y se fotografiaron por una cámara digital Jenoptik ProgRes CF CCD (Jenoptik AG, Jena, Alemania). Esta cámara fue controlada de manera remota con un ordenador provisto del programa JENOPTIK PROGRES CAPTURE PRO (Fig. 8). A partir de las secuencias de imágenes obtenidas (secuencia de vídeo), y para cada muestra se analizó la motilidad con el programa ImageJ (versión 1.44h, disponibles en línea en <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>), en las diferentes subpoblaciones espermáticas encontradas en la muestra.

3.5. Preparación de las muestras para evaluación de morfometría

Se prepararon 3 tratamientos diferentes: 2 en fresco (usando Kit fluorocromos ISAS3fun® tal como se describe en el apartado 3.4) y 1 en frotis (IP/PSA).

3.5.1. Tratamientos en fresco (muestras líquidas)

Tratamiento fresco 1: Inmovilizados con temperatura 65°C – Tinción fluorocromos kit ISAS3fun®

Después de incubar a 37°C durante 5 minutos (apartado 3.4). Se depositó 1 gota de 2 μ l en dos láminas portaobjetos diferentes, se cubrieron con laminillas 22mmx22mm, se utilizó la técnica del Trumorph® System (Proiser R+D, S.L., Paterna, Spain, Soler y Blasco, 2013) para observación y análisis de la morfología espermática, se colocaron las láminas dentro del Trumorph® System con el que se ejerció una presión constante de 6 kp distribuidos uniformemente sobre la superficie del cubreobjeto a una temperatura de 65°C durante ~10 s, shock usado para inmovilizar a los espermatozoides (Fig. 7). En estas condiciones el espacio entre la lámina porta y cubreobjeto fue de ~6 μ m, lo que permitió que los espermatozoides fueran expuestos de manera paralela con el cubreobjetos. Se utilizan diferentes tiempos y temperaturas de acuerdo a la especie (Soler *et al.*, 2015). Las muestras fueron observadas en microscopio de epifluorescencia.



Figura 7. Trumorph® System.

Tratamiento fresco 2: Inmovilizados con formol al 3,8% - Tinción kit fluorocromos ISAS3fun®

A la muestra restante se le añadió 0.5 μ l de formol al 3,8%. Se depositaron 2 gotas de 2 μ l en una lámina portaobjeto, se cubrieron con laminillas 22 mmx22 mm, se ejerció presión sobre ellas y se observó en microscopio de epifluorescencia.

3.5.2. Tratamiento para frotis

Se prepararon 2 frotis de cada pajuela. En un portaobjetos se extendió una gota de 5 μ l de semen dejando secar como mínimo 24 horas en oscuridad.

Tratamiento frotis 1: Fijado con etanol al 96% - Tinción IP/PSA

Una vez secos los dos frotis se sumergieron en un recipiente que contenía etanol (96%) durante 15 minutos, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar. Se preparó una solución que contenía 1 μ l de IP y 5 μ l de PSA diluidos en 95 μ l PBS (buffer fosfato salino), siguiendo el protocolo descrito por Yániz *et al.*, 2014. Una vez secos los frotis, se incorporó una gota de 10 μ l de la solución preparada en cada extremo del frotis, se colocó las laminillas cubreobjetos 22 mm x 22 mm e incubó en oscuridad por 10 minutos. Se retiraron las laminillas, se lavaron repetidamente con agua destilada (meter y sacar constantemente del recipiente con agua destilada ~40 veces). Se dejó secar en oscuridad a temperatura ambiente.

3.6. Análisis de imágenes para morfometría asistida por ordenador - Computer-assisted sperm morphometry analysis (CASMA)

Para las determinaciones de la morfometría espermática se utilizó el protocolo descrito en trabajos previos (Yániz *et al.*, 2012; Vicente-Fiel *et al.*, 2013; Yániz *et al.*, 2014) basado en la utilización de microscopía fluorescente y análisis de imágenes (CASMA-F). Se registraron las imágenes digitales de las cabezas, núcleos y acrosoma de los espermatozoides marcados con fluorescencia utilizando un microscopio de epifluorescencia (DM4500 B, Leica, Wetzlar, Alemania) con un objetivo apocromático 63X, equipados con los conjuntos de filtros apropiados. Se fotografiaron con una cámara Canon EOS 400D digital. La cámara fue controlada por ordenador utilizando un software DSLR Remote Pro (Breeze Systems) (Fig. 8). La morfometría de los espermatozoides obtenidos por microscopía de epifluorescencia puede ser alterado mediante la modificación de la intensidad de fluorescencia, por lo que la intensidad se ajustó, cuando fue necesario, modificando el tiempo de exposición de la cámara o la intensidad de la lámpara, a 17% del estándar de fluorescencia. Y en el monitor se ajustó el brillo equivalente para las diferentes capturas fotográficas.

Las imágenes fueron procesadas mediante el software Image J libre (versión 1.44h, disponibles en línea en <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>), con un plug-in creado para este fin. Se ajustó el Tresholding para cada imagen a analizar. Se midieron para la suma del núcleo y acrosoma (cabeza completa) y el núcleo para el área (A, en μ^2), perímetro (P, en μ), longitud (L, en μ), y anchura (W, en μ). También se midió el área acrosomal (en μ^2) y perímetro del mismo (en μ); y cuatro parámetros derivados de ellos: elipticidad (L/W), rugosidad ($4\pi A/P^2$), elongación ((L-W)/(L+W)), y regularidad ($\pi LW/4A$). Se consideraron para el análisis aquellos espermatozoides que no presentan anomalías y que no se superponen, para las diferentes subpoblaciones espermáticas. Al menos 200 espermatozoides por cada tratamiento fueron capturados y analizados.

3.7. Test hipo-osmótico (Hypo-osmotic swelling test - HOST)

Para el test de endósmosis o test hipo-osmótico (HOST) se seguirá el método descrito por (Jeyendran *et al.*, 1984), adaptado a la especie bovina.

En los ensayos se usaron dos tipos de soluciones hipo-osmóticas; una basada en citrato (Revell y Mrode, 1994; Brito *et al.*, 2003), otra basada en TRIS y el water test.

Antes de comenzar los ensayos se simplificó el método HOST, ajustando la osmolaridad. Para ello se siguió el protocolo ya descrito en otras especies:

porcino (Perez-Lano *et al.*, 2001; Perez-Llano *et al.*, 2003) y perro (Pinto y Kozink, 2008). En todos los casos la osmolaridad quedó ajustada a 150 mOsm/kg. El pH se ajustó a 7.0 solo en la solución basada en TRIS. En estudios preliminares a este se observó y se ajustó la concentración indicada para los fluorocromos en cada caso que permita determinar la integridad de membrana plasmática y acrosomal.

Se separaron 3 alícuotas de la muestra se diluyeron y añadieron los fluorocromos del Kit ISAS3fun® en tubos eppendorf de 1.5 ml, de la siguiente manera:

- 10 µl de semen en 100 µl de una solución hipo-osmótica basada en citrato + fluorocromos Kit ISAS3fun® (5.5 µl fluorocromo rojo, 2.75 µl fluorocromo azul, 0.55 µl fluorocromo verde).
- 10 µl de semen en 100 µl de una solución hipo-osmótica basada en TRIS + fluorocromos Kit ISAS3fun® (5.5 µl fluorocromo rojo, 2.75 µl fluorocromo azul, 0.55 µl fluorocromo verde).
- 25 µl de semen en 100 µl en agua destilada (Milli-Q®) + fluorocromos Kit ISAS3fun® (6.25 µl fluorocromo rojo, 3.13 µl fluorocromo azul y 0.63 µl fluorocromo verde).

Cada alícuota se incubó durante 5 y 40 minutos en oscuridad a 37°C. Después de la incubación se fijaron las muestras con 1µl de formol al 3,8%, se colocaron dos gotas de 5 µl de la muestra en un porta-objetos, se cubrieron con laminillas cubre-objetos 22 mm×22 mm y después de cada tiempo de incubación; se analizó calidad y capacidad de tinción, y la posibilidad de discriminar diferentes subpoblaciones espermáticas en la muestra. Se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia y contraste de fases (DM4500B, Leica, Alemania) con el objetivo 40X, y se capturaron secuencias de imágenes con una cámara digital Canon EOS 400D. Esta cámara se controló de manera remota con un ordenador provisto del programa DSLR Remote Pro software (Breeze Systems) (Fig. 8), se analizaron para integridad y funcionalidad de la membrana plasmática y acrosomal con un conteo mínimo de 200 espermatozoides/muestra.



Figura 8. Microscopio de epifluorescencia (DM4500B, Leica, Alemania) con pletina termostatzada, cámaras digitales adaptadas Jenoptik ProgRes CF CCD (Jenoptik AG, Jena, Alemania) y Canon EOS 400D, con objetivos y filtros adecuados para evaluación de integridad de membrana, motilidad, morfometría, y HOST con tinción múltiple, controlados por un ordenador con software para cada fin.

3.8. Diseño experimental

Fue necesario realizar una batería amplia de pruebas laboratoriales con las que contrastar. Ello permitió, además, determinar la relación existente entre los nuevos métodos y los diferentes parámetros de calidad estudiados de manera independiente. El trabajo se dividió en tres estudios:

3.8.1. Estudio 1. Motilidad de las subpoblaciones espermáticas utilizando el nuevo método fluorescente

Para ello se procesaron 10 pajuelas de semen criopreservadas de toros de raza Frisona. Se determinaron las subpoblaciones que presentaban movilidad y aquellas inmóviles, según la tinción que adquirieron con los fluorocromos del kit ISAS3fun®, en el acrosoma, y el núcleo, estos fueron observados y las secuencias de imágenes (vídeos) de las muestras teñidas se capturaron con el filtro triple BGR del microscopio de epifluorescencia (DM4500B, Leica, Alemania) a 400X. Posteriormente se analizaron los vídeos tal como se describe en el apartado 3.4.

3.8.2. Estudio 2. Morfometría de las subpoblaciones espermáticas utilizando el nuevo método fluorescente

Para el ensayo se utilizaron 10 pajuelas de semen criopreservadas de toros de raza Frisona. En el caso de las muestras en fresco teñidas con el kit ISAS3fun® las imágenes se capturaron con el filtro BGR (triple) y la misma imagen con los filtros A (azul), I3 (verde), N21 (rojo) del microscopio de fluorescencia, en los frotis teñidos con IP/PSA se utilizó el filtro I2 y N21.

En las muestras en fresco teñidas con el kit ISAS3fun® se comparó la morfometría de cabeza, núcleo y acrosoma de las diferentes subpoblaciones espermáticas, asimismo el efecto que tuvo sobre estos el formol y la temperatura, empleados para inmovilizar a los espermatozoides. En las muestras de los frotis se comparó la morfometría de los espermatozoides del tratamiento teñido con IP/PSA con la morfometría de las muestras en fresco usando el kit ISAS3fun®.

3.8.3. Estudio 3. Valoración de la respuesta a HOST vs. WT utilizando el nuevo método fluorescente

Para este ensayo se utilizaron 20 pajuelas de semen criopreservadas de toros de raza Frisona. Se tiñeron con los fluorocromos del kit ISAS3fun® como se describe en el apartado 3.7.

Se evaluó la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática y acrosomal de los espermatozoides que forman las subpoblaciones, y el efecto que ejerce sobre la distribución de estas subpoblaciones espermáticas el uso de soluciones hipo-osmóticas y el WT.

Durante el desarrollo de los experimentos se observaron diferencias aparentes en los patrones HOST entre tratamientos hipotónicos, y se decidió cuantificar este aspecto en diez toros adicionales. Los espermatozoides con una respuesta positiva se clasificaron según los patrones HOST definidos por Rota *et al.*, 2000), con leves modificaciones, en los siguientes tipos dependiendo de la facilidad para identificar el enrollamiento de los flagelos: cola muy enrollada fácilmente identificable (patrón A); enrollamiento distal de la cola menos evidente (patrón B); y cola acortada y engrosada (patrón C) (Fig. 9).

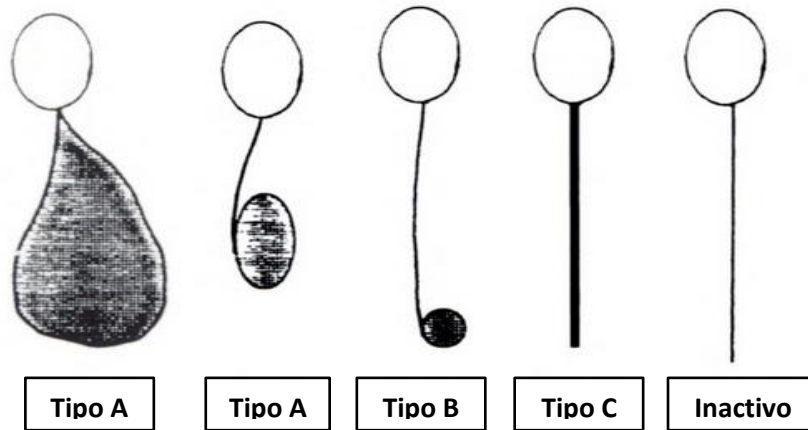


Figura 9. Patrones de respuesta espermática a tratamientos hipo-osmóticos (HOST) y water test (WT). Tipo A: cola muy enrollada fácilmente identificable, tipo B: enrollamiento distal de la cola menos evidente, tipo C: cola acortada y engrosada. (Modificado de Rota *et al.*, 2000)

3.9. Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS, versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Las distribuciones de normalidad y homogeneidad de la varianza para cada grupo se verificaron utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov y prueba de Levene, respectivamente. Si los datos presentan una distribución normal, las diferencias entre los resultados de los diferentes tratamientos se examinaron utilizando el análisis de varianza (ANOVA), utilizando modelos lineales generalizados. Si el valor de F resulta significativo, se utilizará el test de Tukey para las comparaciones múltiples a posteriori. En el caso de que la distribución no sea normal, se utilizará la prueba de Kruskal-Wallis, seguida del test de Mann-Whitney para las comparaciones múltiples a posteriori. El nivel de significación estadística se fijó en $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

En los estudios previos de desarrollo de la técnica, el grupo TECNOGAM en el que me he incorporado, había desarrollado una combinación de los fluorocromos que permite determinar la integridad de la membrana plasmática y acrosómica, morfometría y motilidad espermáticas, tal y como se muestra en las Figuras 10 a 12.

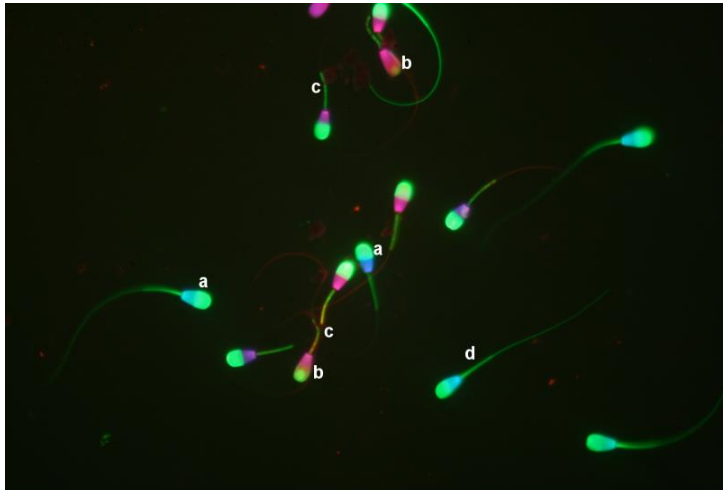


Figura 10. Evaluación múltiple fluorescente con la presencia de diferentes subpoblaciones en la muestra: membrana intacta (azules), acrosoma intacto (a); membrana dañada (rojos), acrosoma dañado (b); membrana dañada (rojos), acrosoma intacto (c); membrana intacta (azules), acrosoma dañado (d).

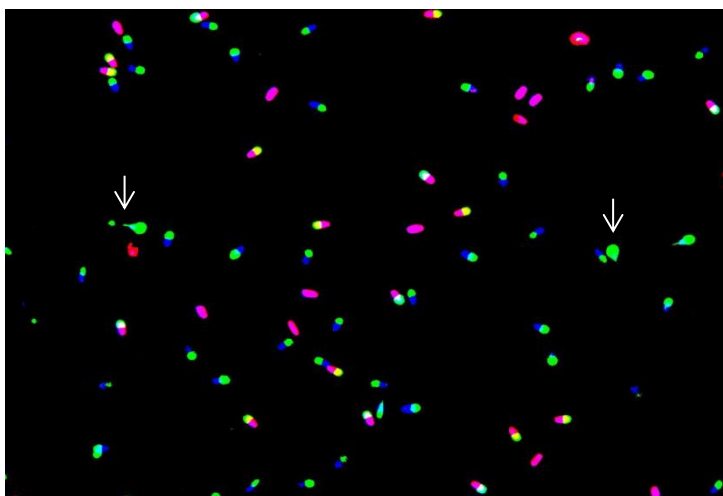


Figura 11. Evaluación múltiple fluorescente en la que se aprecia la presencia de diferentes subpoblaciones en la muestra semejantes a las descritas en la Fig. 10, pero que además incluye espermatozoides con fluorescencia verde intensa (flechas). Los filtros y contrastes de la imagen han sido modificados mediante el programa ImageJ para una mejor discriminación de los subtipos celulares.

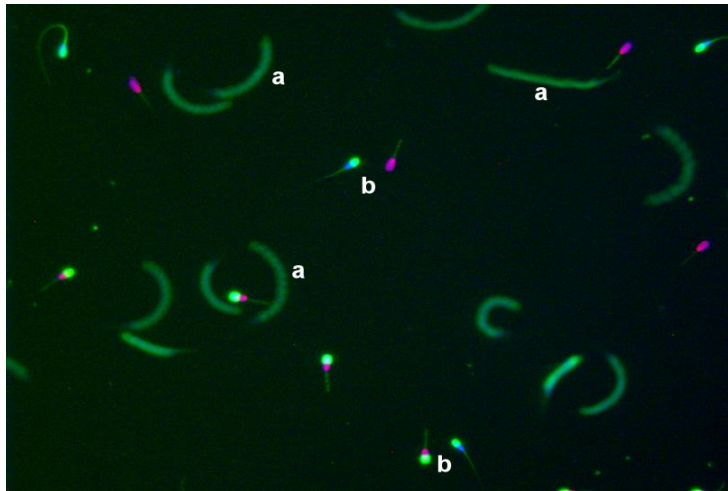


Figura 12. Evaluación múltiple fluorescente en la que se aprecian las trayectorias de los espermatozoides móviles (a) y los espermatozoides estáticos (b). El análisis de imagen permite obtener las diferentes subpoblaciones de espermatozoides en función de su movilidad, integridad de la membrana plasmática y del acrosoma, además de analizar su movilidad.

4.1. Estudio 1. Motilidad de las subpoblaciones espermáticas utilizando el nuevo método fluorescente

En primer lugar se estudió el efecto de la adición de la combinación fluorescente del kit ISAS3fun® e incubación durante 5 minutos a 37°C sobre los parámetros de motilidad de la muestra estudiados mediante CASA. Los resultados se muestran en la Tabla 2. El tratamiento provocó una disminución media de un 17% en motilidad total (Tabla 2). El resto de los parámetros cinéticos no presentaron diferencias significativas entre las muestras tratadas y las del grupo control (Tabla 2).

Tabla 2. Media (\pm SEM) para los parámetros cinéticos de la muestra control y muestra después de incubación en presencia de fluorocromos del kit ISAS3fun® durante 5 minutos a 37 °C.

PARÁMETROS CINÉTICOS	CONTROL	DESPUÉS DE INCUBACIÓN 5 MIN
VCL ($\mu\text{m/s}$)	60.33 \pm 3.69	56.30 \pm 3.66
VSL ($\mu\text{m/s}$)	32.48 \pm 1.90	29.34 \pm 2.17
VAP ($\mu\text{m/s}$)	41.37 \pm 2.25	37.43 \pm 2.66
LIN (%)	52.64 \pm 2.11	50.70 \pm 2.20
STR (%)	72.69 \pm 1.42	72.65 \pm 1.63
WOB (%)	68.54 \pm 1.72	66.00 \pm 1.69
ALH (μm)	2.35 \pm 0.13	2.29 \pm 0.13
BCF (Hz)	6.98 \pm 0.27	6.85 \pm 0.31
MS (%)	75.58 \pm 4.11 ^a	58.47 \pm 6.48 ^b
PS (%)	58.54 \pm 5.60	42.51 \pm 5.87

VCL: velocidad curvilínea, VSL: velocidad rectilínea, VAP: velocidad media, LIN: índice de linealidad, STR: índice de rectitud, WOB: índice de oscilación, ALH: amplitud del movimiento lateral de la cabeza, BCF: frecuencia de batido flagelar. ^{a-b}: Denota diferencia entre las columnas $P < 0,05$.

Las diferentes subpoblaciones presentaron marcadas diferencias en la proporción de espermatozoides móviles (Tabla 3). Como era de esperar, ninguno de los espermatozoides con la membrana dañada presentó movimiento. Entre los espermatozoides con la membrana plasmática intacta, la subpoblación con el acrosoma intacto presentó un porcentaje mucho más alto de espermatozoides móviles que aquella con el acrosoma dañado o ausente. También se detectó en esta última subpoblación una aparente menor velocidad de los espermatozoides, si bien este último parámetro deberá evaluarse adecuadamente en futuros trabajos. Por último la subpoblación de espermatozoides con fluorescencia verde intensa presentó un patrón de motilidad diferenciado, en el sentido de que presentaron una menor proporción de espermatozoides móviles en relación a los de fluorescencia menor, y que una proporción de los mismos mostraron una velocidad aparentemente incrementada. Estos resultados preliminares deberán completarse con un estudio mediante CASA de los parámetros cinéticos de las

diferentes subpoblaciones. Este estudio requiere el desarrollo de software específico, ya que los programas CASA comerciales no permiten la identificación de las subpoblaciones y el estudio de sus trayectorias. El grupo TECNOGAM está desarrollando este software, pero su incorporación en este trabajo no ha sido posible en esta fase.

Tabla 3. Porcentaje de espermatozoides que presentan motilidad en una determinada subpoblación espermática.

SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS	MOTILIDAD (%)
NANM	83.231
DANM	56.842
NANM - GREEN	59.091
NADM	0.000
DADM	0.000

NANM: acrosoma normal o intacto e integridad de membrana normal; DANM: acrosoma dañado e integridad de membrana normal; NANM–GREEN: acrosoma normal o intacto e integridad de membrana normal + fluorescencia verde intenso; NADM: acrosoma normal y membrana dañada; DADM: acrosoma y membrana dañados.

4.2. Estudio 2: Morfometría de las subpoblaciones espermáticas utilizando el nuevo método fluorescente

La utilización de la combinación fluorescente del kit ISAS3fun® permitió la diferenciación, captura y análisis morfométrico de la cabeza y sus componentes en la mayoría de los espermatozoides con una gran precisión . El método permitió analizar independientemente la morfometría de espermatozoides con membrana plasmática y acrosoma intactos o dañados, diferenciando cuatro subpoblaciones, como se describen en la Figura 13.

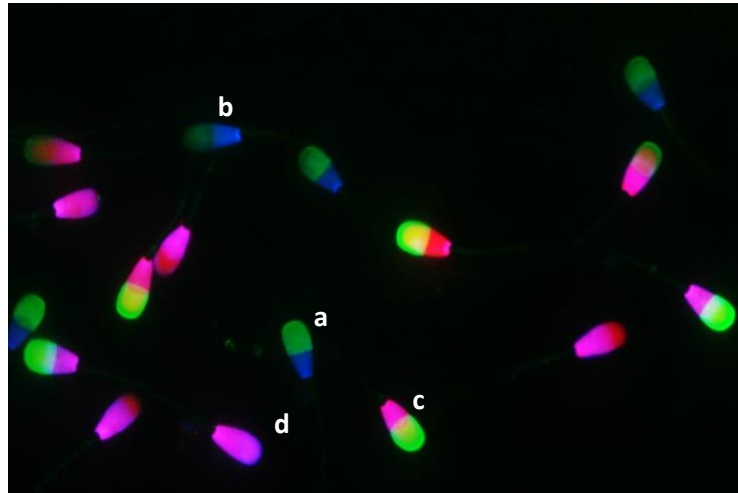


Figura 13. Evaluación múltiple fluorescente con la presencia de diferentes subpoblaciones en la muestra para análisis morfométrico: membrana intacta (azules), acrosoma intacto (a); membrana intacta (azules), acrosoma dañado (b); membrana dañada (rojos), acrosoma intacto (c); membrana dañada (azules), acrosoma dañado (d).

Queremos insistir que se trata de un estudio preliminar, por lo que será necesario ampliar la población de estudio para obtener resultados más concluyentes. Se estudió el efecto del tratamiento de inmovilización de los espermatozoides en muestras líquidas (formol vs choque térmico) y el efecto de la extensión y secado de las muestras (IP/PSA) sobre los parámetros morfométricos referidos a la cabeza de los espermatozoides de las subpoblaciones (Tabla 4). Las medidas para el área de la cabeza de los espermatozoides analizados en los tratamientos en medio líquido no presentaron diferencias significativas intra y entre subpoblaciones espermáticas. Sin embargo se observó una clara diferencia significativa ($P < 0,05$) cuando se compararon con la morfometría de los frotis teñidos con IP/PSA, que resultaron menores para el área. Sin embargo, la anchura y regularidad de la cabeza del espermatozoide fueron mayores ($P < 0,05$) en los frotis teñidos con IP/PSA que en las muestras líquidas, independientemente de su integridad de membrana en este último caso o del tratamiento.

Tabla 4. Media (\pm SEM) para los parámetros morfométricos de la cabeza de las subpoblaciones espermáticas para tratamientos en fresco (formol y temperatura) y frotis (teñidos con IP/PSA).

PARÁMETRO MORFOMÉTRICO	TRATAMIENTO	NAMN vs. Frotis	NADM vs. Frotis
Area (μ^2)	Formol	40.86 \pm 0.324 ^c	40.72 \pm 0.278 ^c
	Temperatura	40.30 \pm 0.277 ^{cd}	40.95 \pm 0.390 ^c
	IP/PSA	39.30 \pm 0.333 ^d	39.30 \pm 0.333 ^d
Perímetro (μ)	Formol	27.08 \pm 0.152 ^c	26.75 \pm 0.092 ^c
	Temperatura	26.42 \pm 0.095 ^{a,d}	26.75 \pm 0.130 ^{b,c}
	IP/PSA	27.31 \pm 0.123 ^c	27.31 \pm 0.123 ^d
Longitud (μ)	Formol	9.98 \pm 0.039	9.97 \pm 0.035
	Temperatura	9.89 \pm 0.038	9.99 \pm 0.052
	IP/PSA	9.80 \pm 0.060	9.80 \pm 0.060
Anchura (μ)	Formol	5.33 \pm 0.029 ^c	5.29 \pm 0.024 ^c
	Temperatura	5.30 \pm 0.025 ^c	5.34 \pm 0.032 ^c
	IP/PSA	5.47 \pm 0.022 ^d	5.47 \pm 0.022 ^d
Elipticidad	Formol	1.88 \pm 0.007 ^c	1.89 \pm 0.007 ^c
	Temperatura	1.87 \pm 0.008 ^c	1.88 \pm 0.011 ^c
	IP/PSA	1.80 \pm 0.011 ^d	1.80 \pm 0.011 ^d
Rugosidad	Formol	0.70 \pm 0.003 ^{a,c}	0.71 \pm 0.002 ^{b,c}
	Temperatura	0.72 \pm 0.002 ^d	0.72 \pm 0.003 ^c
	IP/PSA	0.66 \pm 0.003 ^e	0.66 \pm 0.003 ^d
Elongación	Formol	0.30 \pm 0.002 ^c	0.31 \pm 0.002 ^c
	Temperatura	0.30 \pm 0.002 ^c	0.30 \pm 0.003 ^c
	IP/PSA	0.28 \pm 0.003 ^d	0.28 \pm 0.003 ^d
Regularidad	Formol	1.02 \pm 0.002 ^c	1.02 \pm 0.002 ^c
	Temperatura	1.02 \pm 0.002 ^c	1.02 \pm 0.002 ^c
	IP/PSA	1.08 \pm 0.003 ^d	1.08 \pm 0.003 ^d

NANM: acrosoma normal o intacto e integridad de membrana normal; NADM: acrosoma normal y membrana dañada. Frotis (IP/PSA): Frotis teñidos con Yoduro de propidio/Pisum sativum agglutinin. ^{a-b}: Denota diferencia entre las subpoblaciones para los tratamientos en un determinado carácter morfométrico P<0,05. ^{c-e}: Denota diferencia entre tratamientos para cada una de las subpoblaciones en un determinado carácter morfométrico.

Los resultados morfométricos del núcleo de los espermatozoides de las subpoblaciones espermáticas se muestran en la Tabla 5. Las medidas del área, perímetro, longitud y anchura fueron menores en los frotis teñidos con IP/PSA que en las muestras líquidas, con diferencia significativa ($P < 0,05$) para el área. Entre tratamientos en fase líquida para el área del núcleo, no se encontraron diferencias significativas en las subpoblaciones.

Tabla 5. Media (\pm SEM) para los parámetros morfométricos del núcleo de las subpoblaciones espermáticas para tratamientos en fresco (formol y temperatura) y frotis (teñidos con IP/PSA).

PARÁMETRO MORFOMÉTRICO	TRATAMIENTO	NANM vs. Frotis	DANM vs. Frotis	NADM vs. Frotis	DADM vs. Frotis
Area (μ^2)	Formol	36.50 \pm 0.290 ^c	36.61 \pm 0.341 ^c	36.26 \pm 0.246 ^c	36.53 \pm 0.179 ^c
	Temperatura	37.25 \pm 0.224 ^c	37.12 \pm 0.392 ^c	36.79 \pm 0.372 ^c	37.14 \pm 0.190 ^c
	IP/PSA	34.98 \pm 0.205 ^d	34.98 \pm 0.205 ^d	34.98 \pm 0.205 ^d	34.98 \pm 0.205 ^d
Perimetro (μ)	Formol	25.20 \pm 0.101 ^c	25.28 \pm 0.108	25.07 \pm 0.082	25.14 \pm 0.059 ^c
	Temperatura	25.28 \pm 0.079 ^c	25.13 \pm 0.129	25.09 \pm 0.131	25.27 \pm 0.062 ^c
	IP/PSA	24.78 \pm 0.091 ^d	24.78 \pm 0.091	24.78 \pm 0.091	24.78 \pm 0.091 ^d
Longitud (μ)	Formol	9.40 \pm 0.036 ^{a,cd}	9.52 \pm 0.048 ^{b,c}	9.42 \pm 0.033 ^{ab}	9.51 \pm 0.023 ^{ab,c}
	Temperatura	9.44 \pm 0.030 ^c	9.42 \pm 0.056 ^{cd}	9.45 \pm 0.050	9.56 \pm 0.024 ^c
	IP/PSA	9.32 \pm 0.031 ^d	9.32 \pm 0.031 ^d	9.32 \pm 0.031	9.32 \pm 0.031 ^d
Anchura (μ)	Formol	4.90 \pm 0.024 ^c	4.85 \pm 0.031 ^c	4.86 \pm 0.023 ^c	4.86 \pm 0.015 ^c
	Temperatura	4.97 \pm 0.020 ^d	4.96 \pm 0.034 ^d	4.89 \pm 0.032 ^c	4.91 \pm 0.016 ^c
	IP/PSA	4.77 \pm 0.018 ^e	4.77 \pm 0.018 ^c	4.77 \pm 0.018 ^d	4.77 \pm 0.018 ^d
Elipticidad	Formol	1.92 \pm 0.007 ^{a,c}	1.97 \pm 0.013 ^{b,c}	1.94 \pm 0.008 ^{ab}	1.96 \pm 0.005 ^b
	Temperatura	1.90 \pm 0.008 ^{a,c}	1.90 \pm 0.013 ^{a,d}	1.94 \pm 0.012 ^{ab}	1.95 \pm 0.005 ^b
	IP/PSA	1.96 \pm 0.007 ^d	1.96 \pm 0.007 ^c	1.96 \pm 0.007	1.96 \pm 0.007
Rugosidad	Formol	0.72 \pm 0.002 ^c	0.72 \pm 0.003 ^c	0.72 \pm 0.002 ^c	0.72 \pm 0.001 ^c

	Temperatura	0.73±0.002 ^{ab,d}	0.74±0.003 ^{a,d}	0.73±0.003 ^{ab,d}	0.73±0.001 ^{b,c}
	IP/PSA	0.72±0.002 ^c	0.72±0.002 ^c	0.72±0.002 ^c	0.72±0.002 ^d
Elongación	Formol	0.31±0.002 ^{a,c}	0.33±0.003 ^{b,c}	0.32±0.002 ^{ab}	0.32±0.001 ^b
	Temperatura	0.31±0.002 ^{a,c}	0.31±0.003 ^{a,d}	0.32±0.003 ^{ab}	0.32±0.001 ^b
	IP/PSA	0.32±0.002 ^d	0.32±0.002 ^c	0.32±0.002	0.32±0.002
Regularidad	Formol	0.989±0.001 ^{a,c}	0.991±0.002 ^{ab,c}	0.992±0.001 ^{ab,c}	0.995±0.001 ^{b,c}
	Temperatura	0.990±0.001 ^{ab,c}	0.991±0.002 ^{ab,c}	0.988±0.002 ^{a,c}	0.994±0.001 ^{b,c}
	IP/PSA	1.000±0.001 ^d	1.000±0.001 ^d	1.000±0.001 ^d	1.000±0.001 ^d

NANM: acrosoma normal o intacto e integridad de membrana normal; DANM: acrosoma dañado e integridad de membrana normal; NADM: acrosoma normal y membrana dañada; DADM: acrosoma dañado e integridad de membrana dañada. Frotis (IP/PSA): Frotis teñidos con Yoduro de propidio/Pisum sativum agglutinin. ^{a-b}: Denota diferencia entre las subpoblaciones para los tratamientos en un determinado carácter morfométrico P<0,05. ^{c-e}: Denota diferencia entre tratamientos para cada una de las subpoblaciones en un determinado carácter morfométrico.

Por último, en la Tabla 6 se muestran las medidas morfométricas del acrosoma de las subpoblaciones espermáticas por tratamientos. La subpoblación con acrosoma normal y membrana dañada presentó medidas significativamente mayores ($P<0,05$) en comparación con la subpoblación con acrosoma normal e integridad de membrana normal, para ambos tratamientos en fase líquida. Las medidas del área del acrosoma fueron menores en los frotis que en los frescos y esta diferencia fué significativa ($P<0,05$) para la subpoblación acrosoma normal y membrana dañada. Para el área del acrosoma no se encontraron diferencias significativas entre los dos tratamientos en fase líquida en las subpoblaciones. El porcentaje de la cabeza ocupado por el acrosoma en los frotis fue mayor que los que se obtuvieron de las muestras de los tratamientos en fase líquida.

Tabla 6. Media (\pm SEM) para los parámetros morfométricos del acrosoma de las subpoblaciones espermáticas para tratamientos en fresco (formol y temperatura) y frotis (teñidos con IP/PSA).

PARÁMETRO MORFOMÉTRICO	TRATAMIENTO	NAMN vs. Frotis	NADM vs. Frotis
Área (μ^2)	Formol	25.13 \pm 0.168 ^a	26.30 \pm 0.179 ^{b,c}
	Temperatura	24.85 \pm 0.196 ^a	26.61 \pm 0.271 ^{b,c}
	IP/PSA	24.76 \pm 0.259	24.76 \pm 0.259 ^d
Perímetro (μ)	Formol	20.09 \pm 0.101 ^c	20.37 \pm 0.100 ^c
	Temperatura	19.55 \pm 0.086 ^{a,d}	20.38 \pm 0.105 ^{b,c}
	IP/PSA	22.07 \pm 0.123 ^e	22.07 \pm 0.123 ^d
Porcentaje de acrosoma	Formol	61.91 \pm 0.422 ^{a,c}	64.88 \pm 0.472 ^b
	Temperatura	62.12 \pm 0.663 ^{a,cd}	65.32 \pm 0.674 ^b
	IP/PSA	66.22 \pm 1.590 ^d	66.50 \pm 1.669

NANM: acrosoma normal o intacto e integridad de membrana normal; NADM: acrosoma normal y membrana dañada. Frotis (IP/PSA): Frotis teñidos con Yoduro de propidio/Pisum sativum agglutinin. ^{a-b}: Denota diferencia entre las subpoblaciones para los tratamientos en un determinado carácter morfométrico $P<0,05$. ^{c-e}: Denota diferencia entre tratamientos para cada una de las subpoblaciones en un determinado carácter morfométrico.

4.3. Estudio 3: Valoración de la respuesta a HOST vs. WT

Como se ha descrito anteriormente, en este experimento se realizaron cuatro tratamientos para cada muestra: control, dos soluciones HOST (basadas en citrato y TRIS) y water test (WT). En todos los casos, los espermatozoides se tiñeron con fluorocromos del kit ISAS3fun®, que permite diferenciar las subpoblaciones espermáticas.

Los fluorocromos permitieron una fácil determinación de la membrana plasmática y de la integridad del acrosoma de los espermatozoides. La combinación de la fluorescencia con el contraste de fases hizo posible la obtención de las 8 subpoblaciones que se describen en la Figura 14.

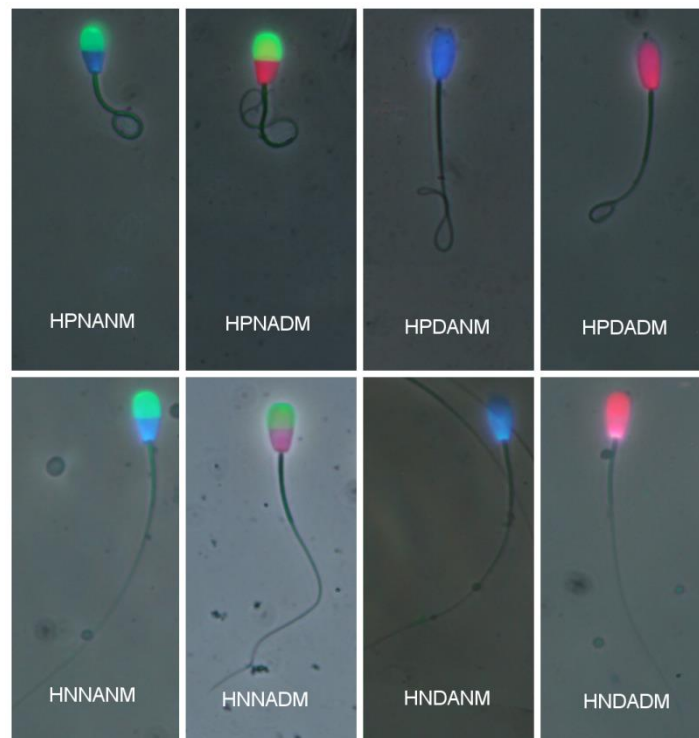


Figura 14. Espermatozoides teñidos con fluorocromos del kit ISAS3fun® observados en microscopio de epifluorescencia 400X, distinguiendo 8 subpoblaciones espermáticas con respecto a respuesta a HOST (positivo HP – negativo HN), estado acrosomal (normal o intacto NA – dañado DA), integridad de membrana (intacta NM – dañada DM): HPNANM, HNNANM, HPNADM, HNNADM, HPDANM, HNDANM, HPDADM, HNDADM

La Tabla 7 muestra la respuesta de los espermatozoides a los diferentes tratamientos, hipo-osmóticos: HOST basado en soluciones de citrato y TRIS y el test de agua (WT). Asimismo se definen tres patrones de respuesta espermática a estas condiciones: el Tipo A (corresponden a aquellos fácilmente identificables con cola enrollada en espiral), Tipo B (con un área enrollada en la punta de la cola) y Tipo C (con la cola doblada y engrosada).

El estudio de los patrones de respuesta reveló que al someter a los espermatozoides al WT estos reaccionaron con un enrollamiento de cola mayor que en las soluciones HOST, predominando el patrón tipo A (Tabla 7), por lo que la evaluación de este parámetro es más rápida y fácil cuando se realiza de forma independiente. Conviene destacar que las evaluaciones de respuesta a los diferentes test se realizaron de forma rigurosa, ya que la identificación de los patrones del B y C no es tan clara como los del tipo A. Una evaluación rápida o inadecuada podría haber generado que este tipo de respuesta se infravalorase.

Tabla 7. Porcentaje medio (\pm SEM) para los patrones de enrollamiento de las colas de los espermatozoides con una respuesta positiva a test hipo-osmótico (HOST) o al test de agua (WT) en toro.

Tratamiento	Tipo A	Tipo B	Tipo C
HOST-citrato	20.60 \pm 7.86 ^{a,c}	30.02 \pm 3.74 ^{ab,c}	49.38 \pm 10.25 ^{b,c}
HOST-TRIS	11.36 \pm 5.61 ^{a,c}	37.29 \pm 5.52 ^{b,c}	51.35 \pm 9.34 ^{b,c}
Water Test	68.71 \pm 3.81 ^{a,d}	14.95 \pm 3.05 ^{b,d}	16.34 \pm 4.17 ^{b,d}

HOST-citrato y HOST-TRIS: HOST basadas en soluciones de citrato y TRIS, respectivamente. Tipos de enrollamiento espermático A-C corresponden a aquellos fácilmente identificables con cola enrollada en espiral (A), con un área enrollada en la punta de la cola (B), y con la cola doblada y engrosada (C). ^{a-b}: Denota diferencia entre las columnas P<0,05. ^{c-d}: Denota diferencia entre las filas P<0,05.

En la Tabla 8, se muestran las ocho subpoblaciones espermáticas identificadas al teñir las muestras de semen con los fluorocromos del kit ISAS3fun con la siguiente nomenclatura:

- Respuesta a HOST (positivo HP - negativo HN)
- Estado acrosomal (normal o intacto NA - dañado DA)
- Integridad membrana (intacta NM – dañada DM).

Resultando las siguientes subpoblaciones: HPNANM, HNANNM, HPDANM, HNDANM, HPNADM, HNNADM, HPDADM, HNDADM.

Se estudió la distribución de las subpoblaciones descritas al someter las muestras a HOST y WT, después de incubar a dos periodos de tiempo 5 minutos y 40 minutos a 37°C Aunque la respuesta de enrollamiento de colas fue semejante en los dos tratamientos HOST y en el WT, el estudio de las subpoblaciones de espermatozoides reveló que, en los dos periodos de incubación, la subpoblación HOST negativo, acrosoma dañado, membrana dañada, HNDADM, fueron mayores para el WT que en las dos soluciones HOST evaluadas (Tabla 8). A los 5 y 40 minutos, la subpoblación, HOST positivo, acrosoma intacto, membrana intacta, HPNANM, fue significativamente menor en el WT, que en el HOST basado en citrato y TRIS ($P < 0,05$). El tiempo de incubación no tuvo efecto sobre la distribución de las subpoblaciones de espermatozoides dentro de los tratamientos.

Tabla 8. Porcentaje medio (\pm SEM) de la distribución de subpoblaciones espermáticas después del test hipo-osmótico (HOST) y test de agua (WT) a 5 y 40 minutos de incubación a 37°C.

	HOST-citrate	HOST-TRIS	Water Test
<u>5 MIN</u>			
HPNANM	24.80 \pm 2.85 ^a	25.40 \pm 2.87 ^a	14.60 \pm 2.01 ^b
HNANNM	0.32 \pm 0.19	0.63 \pm 0.31	0.15 \pm 0.15
HPDANM	2.50 \pm 1.29	0.32 \pm 0.19	0.87 \pm 0.66
HNDANM	2.22 \pm 1.77	1.46 \pm 0.92	0.31 \pm 0.31
HPNADM	5.32 \pm 1.04	4.67 \pm 1.04	6.51 \pm 1.71
HNNADM	18.52 \pm 3.02	20.56 \pm 3.42	24.01 \pm 3.52 ^c
HPDADM	9.58 \pm 1.87	9.24 \pm 1.60	12.43 \pm 2.46
HNDADM	36.74 \pm 2.79	37.72 \pm 3.40	41.31 \pm 2.88
<u>40 MIN</u>			
HPNANM	25.58 \pm 2.91 ^a	22.03 \pm 2.52 ^a	12.91 \pm 2.52 ^b
HNNANM	0.07 \pm 0.51	0.14 \pm 0.10	0.00 \pm 0.00
HPDANM	1.91 \pm 1.28	0.41 \pm 0.27	1.33 \pm 0.40
HNDANM	0.53 \pm 0.38	0.28 \pm 0.28	0.00 \pm 0.00
HPNADM	4.92 \pm 0.84	4.53 \pm 1.08	7.59 \pm 1.34
HNNADM	16.62 \pm 2.43	20.39 \pm 3.42	14.22 \pm 2.38 ^d
HPDADM	9.73 \pm 1.46	9.72 \pm 1.51	15.14 \pm 2.50
HNDADM	39.16 \pm 2.59 ^a	42.48 \pm 2.46 ^{ab}	48.80 \pm 2.58 ^b

HOST-citrato y HOST-TRIS: HOST basadas en soluciones de citrato y TRIS, respectivamente. Respuesta a HOST (positivo HP - negativo HN), estado acrosomal (normal o intacto NA - dañado DA), integridad membrana (intacto NM – dañado DM). ^{a-b}: Denota diferencias entre tratamientos en un determinado tiempo de incubación P < 0.05. ^{c-d}: Denota diferencias dentro de los tratamientos en los diferentes periodos de incubación P < 0.05.

En la Tabla 9 se han separado los diferentes parámetros de calidad espermática (respuesta positiva a HOST o WT: HP; integridad de la membrana plasmática: IM; integridad acrosómica: AI) sin considerar subpoblaciones. En general se observó que el WT provocó una mayor alteración en la membrana plasmática que el HOST y un mayor daño acrosómico cuando la incubación se prolongó durante 40 minutos.

Tabla 9. Porcentaje medio (\pm SEM) de parámetros espermáticos después del test hipo-osmótico (HOST) y el test de agua (WT) a 5 y 40 minutos de incubación a 37°C.

	HOST - citrato	HOST-TRIS	WT
<u>5 MIN</u>			
HP	42.20 \pm 2.73	39.63 \pm 2.98	34.41 \pm 3.15
AI	48.96 \pm 4.08	51.26 \pm 4.20	45.28 \pm 4.25
IM	29.84 \pm 3.21 ^a	27.81 \pm 3.35 ^a	15.93 \pm 2.22 ^b
<u>40 MIN</u>			
HP	42.15 \pm 2.74	36.71 \pm 2.48	36.98 \pm 2.92
AI	47.20 \pm 3.35 ^a	47.10 \pm 3.03 ^a	34.72 \pm 3.35 ^b
IM	28.09 \pm 2.86 ^a	22.87 \pm 2.61 ^{ab}	14.24 \pm 2.63 ^b

HP: Respuesta positiva a HOST o WT. AI: Integridad acrosómica. IM: Integridad de membrana plasmática. HOST-citrato y HOST-TRIS: HOST basadas en soluciones de citrato y TRIS, respectivamente. ^{a-b}: Denota diferencias entre los tratamientos para diferentes periodos de incubación a P < 0.05.

Por último, en las tablas 10 a 12 se muestran las correlaciones entre diferentes parámetros de calidad seminal para los diferentes tratamientos y tiempos de incubación. Para las soluciones HOST se encontraron correlaciones significativas ente la integridad de membrana plasmática y el resultado de HOST. También se observaron correlaciones en los resultados obtenidos para cada parámetro en los dos tiempos de incubación. En el WT, en cambio, solamente se describieron correlaciones dentro de cada parámetro para diferentes tiempos de incubación, pero no entre los diferentes parámetros. Esto se asocia con el hecho de que este tratamiento provocó una respuesta normal de enrollamiento de colas pero un mayor daño de la membrana plasmática que los tratamientos HOST.

Tabla 10. Correlaciones entre los porcentajes medios (\pm SEM) de parámetros espermáticos después del test hipo-osmótico (HOST) basado en citrato a 5 y 40 minutos de incubación a 37°C.

HOST-citrato							
		<u>5 MIN</u>			<u>40 MIN</u>		
		HP	AI	IM	HP	AI	IM
<u>5 MIN</u>	HP	1					
	AI	0.114	1				
	IM	0.391	0.174	1			
<u>40 MIN</u>	HP	0.549*	0.101	0.520*	1		
	AI	0.201	0.836**	0.249	0.332	1	
	IM	0.595**	0.409	0.880**	0.805**	0.423	1

HP: Respuesta positiva a HOST o WT. AI: Integridad acrosómica. IM: Integridad de membrana plasmática. HOST-citrato: HOST basado en solución de Citrato. * P < 0,05 (bilateral). ** P < 0,01 (bilateral).

Tabla 11. Correlaciones entre los porcentajes medios (\pm SEM) de parámetros espermáticos después del test hipo-osmótico (HOST) basado en TRIS a 5 y 40 minutos de incubación a 37°C.

HOST-TRIS							
		<u>5 MIN</u>			<u>40 MIN</u>		
		HP	AI	IM	HP	AI	IM
<u>5 MIN</u>	HP	1					
	AI	0.297	1				
	IM	0.709**	0.317	1			
<u>40 MIN</u>	HP	0.590**	-0.053	0.509*	1		
	AI	-0.008	0.669**	-0.054	-0.159	1	
	IM	0.540*	0.021	0.720**	0.701**	-0.024	1

HP: Respuesta positiva a HOST o WT. AI: Integridad acrosómica. IM: Integridad de membrana plasmática. HOST- TRIS: HOST basado en solución TRIS. * P < 0,05 (bilateral). ** P < 0,01 (bilateral).

Tabla 12. Correlaciones entre los porcentajes medios (\pm SEM) de parámetros espermáticos después del test de agua (WT) a 5 y 40 minutos de incubación a 37°C.

		WT					
		<u>5 MIN</u>			<u>40 MIN</u>		
		HP	AI	IM	HP	AI	IM
<u>5 MIN</u>	HP	1					
	AI	-0.144	1				
	IM	0.349	0.320	1			
<u>40 MIN</u>	HP	0.873**	-0.123	0.424	1		
	AI	-0.099	0.619**	0.337	0.036	1	
	IM	0.413	0.178	0.849**	0.473*	0.429	1

HP: Respuesta positiva a HOST o WT. AI: Integridad acrosómica. IM: Integridad de membrana plasmática. WT: Water test. * P < 0,05 (bilateral). ** P < 0,01 (bilateral)

5. DISCUSIÓN

Las pruebas tradicionales de evaluación de la calidad seminal *in vitro* están limitadas por el hecho de que diferentes parámetros son evaluados individualmente en la muestra como un todo. El análisis global para cada variable resulta menos informativo que si se centrara en los espermatozoides con posibilidades de éxito, es decir, aquellos que sean normales, móviles y con los componentes intactos. Surge así la necesidad de desarrollar nuevos métodos de análisis de la calidad seminal más integradores, que permitan evaluar diferentes parámetros simultáneamente para el mismo espermatozoide.

Con este objetivo se han ensayado diferentes combinaciones de sondas fluorescentes, lo que ha llevado a las determinaciones de calidad seminal multi-paramétricas. Así, se han preparado conjugados fluorescentes para evaluar simultáneamente la integridad de la membrana plasmática y acrosómica (Peña *et al.*, 1999; Nagy *et al.*, 2003) y también para comprobar la actividad mitocondrial (Bussalleu *et al.*, 2005; De Andrade *et al.*, 2007). En esta tesis hemos pretendido avanzar en esta línea de trabajo, analizando simultáneamente parámetros que hasta la fecha no se habían podido integrar, tales como la motilidad con la integridad de la membrana plasmática y acrosómica o la morfometría de los componentes de la cabeza del espermatozoide en muestras húmedas.

La membrana plasmática y acrosómica son esenciales para la función del espermatozoide. Un plasmalema intacto es necesario para las funciones metabólicas, la capacitación, la interacción con las células del oviducto, proceso de unión al oocito y reacción acrosómica (Yániz *et al.*, 2013b). El acrosoma es imprescindible para llevar a cabo la fecundación, haciendo posible el paso por la zona pelúcida y la fusión con el vitelo (Yániz *et al.*, 2014). Sin embargo, de poco le servirá al espermatozoide tener estos componentes celulares intactos si no es capaz de moverse a través del aparato genital de la hembra, alcanzar y fecundar al oocito. En la primera parte de la tesis se estudió la capacidad del nuevo método combinado para evaluar simultáneamente la integridad de la membrana plasmática, la integridad acrosómica, la funcionalidad y la motilidad espermáticas. Se definieron diferentes subpoblaciones espermáticas en base a sus peculiaridades fluorescentes y se encontraron claras diferencias de motilidad entre las diferentes subpoblaciones de espermatozoides.

Entre los espermatozoides con la membrana plasmática intacta, la subpoblación con acrosoma dañado presentó una menor proporción de espermatozoides móviles y una aparente menor velocidad de los mismos, si bien

este último parámetro deberá evaluarse adecuadamente en futuros trabajos. También se describió una subpoblación de espermatozoides con fluorescencia más intensa con un patrón de motilidad diferenciado, en el sentido de que presentaron una menor proporción de espermatozoides móviles en relación a los de fluorescencia menor, y que una proporción de los mismos mostraron una velocidad aparentemente incrementada. Podría tratarse de espermatozoides capacitados, aunque se requieren confirmaciones adicionales para verificar este supuesto. Hay evidencias de que la capacitación espermática se asocia a cambios en la motilidad del espermatozoide (Fujinoki *et al.*, 2016) y en el porcentaje de las diferentes subpoblaciones cinéticas presentes en el eyaculado (Ramio *et al.*, 2008).

Que sepamos, este es el primer trabajo en el que se ha estudiado directamente la motilidad de los diferentes tipos de espermatozoides de manera individualizada. Los estudios previos sobre el tema se han basado en la comparación entre parámetros de calidad seminal evaluados de manera independiente en diferentes alícuotas de la muestra. En ellos se observaron evidencias que indicaban que los espermatozoides con el acrosoma dañado tienen unos parámetros de motilidad más bajos que los de acrosoma intacto. En toro se ha descrito una relación positiva entre la motilidad progresiva y la integridad acrosómica (Sharma *et al.*, 2012). En el caballo se ha relacionado también la proporción de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto y el porcentaje de espermatozoides móviles, con motilidad progresiva y con la membrana intacta (Kirk *et al.*, 2005). En algunos estudios se ha descrito una correlación negativa entre los parámetros de motilidad espermática, especialmente la motilidad progresiva, y la proporción de espermatozoides que con reacción acrosómica espontánea (Parinaud *et al.*, 1996), si bien no se debe confundir la reacción acrosómica con el daño acrosómico.

La relación entre la motilidad y la integridad de la membrana plasmática resulta evidente, ya que aquellos espermatozoides con daño en el plasmalema no se pueden mover. Diversos trabajos han descrito la existencia de correlaciones altamente significativas entre los parámetros de motilidad e integridad de la membrana plasmática (Fraser *et al.*, 2001; Kirk *et al.*, 2005; Yániz *et al.*, 2008b). Sin embargo, existe una proporción variable de espermatozoides con la membrana intacta pero inmóviles, por lo que el estudio de ambos parámetros está justificado.

En el segundo trabajo hemos utilizado el nuevo método de tinción múltiple fluorescente para estudiar la morfometría de las diferentes subpoblaciones espermáticas en muestras líquidas. Los métodos tradicionales de procesamiento

de las muestras para morfometría incluyen diversos pasos, tales como la extensión en portas y secado, la fijación y la tinción, que matan todos los espermatozoides y alteran las estructuras celulares, lo que potencialmente podría tener un efecto en los resultados morfométricos (Yániz *et al.*, 2015). Solamente unos pocos estudios han evaluado el impacto del procesamiento de las muestras en los resultados morfométricos (Jones, 1973; Katz *et al.*, 1986; Ball y Mohammed, 1995; Yániz *et al.*, 2012; Vicente-Fiel *et al.*, 2013). Generalmente se asume que el secado y fijación provoca una disminución de las dimensiones del espermatozoide en una magnitud que podría estar próxima al 30 % para el área de la cabeza (Katz *et al.*, 1986), mientras la disminución del tamaño nuclear podría ser mucho menor (entre el 0% y el 9 % dependiendo de la especie) (Yániz *et al.*, 2012; Vicente-Fiel *et al.*, 2013).

En los últimos años, varios grupos han propuesto alternativas para el estudio de morfometría espermática de muestras líquidas. Estas incluyen el uso de fluorescencia (computer-assisted sperm morphometry-fluorescence, CASMA-F) (Yániz *et al.*, 2012) y los métodos de contraste de fases (Marco-Jimenez *et al.*, 2006; Marco-Jimenez *et al.*, 2010; Soler *et al.*, 2015; Soler *et al.*, 2016). Para evitar que los espermatozoides se sitúen en diferentes planos y obtener una orientación de sus cabezas paralela al cubreobjetos, estas técnicas deberían combinarse con un método de que disminuya el espacio entre el portaobjetos y el cubreobjetos, como por ejemplo el Trumorph (Soler *et al.*, 2015, 2016).

A pesar de los avances, los métodos actualmente disponibles no permiten la identificación y estudio morfométrico separado de los componentes de los espermatozoides vivos y muertos y sus componentes en artiodáctilos. Para superar esta limitación, el grupo de investigación TECNOGAM ha desarrollado un método novedoso de fluorescencia combinada que permite este tipo de análisis. En concreto hace posible por primera vez el estudio detallado de la morfometría de los componentes de la cabeza de espermatozoides vivos y muertos presentes en muestras líquidas del semen de toro. Los resultados obtenidos con el nuevo método se compararon con los derivados de la utilización de un método previamente desarrollado por nuestro grupo (CASMA-F) para medir en núcleo y acrosoma de espermatozoides en frotis secados y fijados (Yániz *et al.*, 2012; Yániz *et al.*, 2014). Aunque se trata de un estudio muy preliminar, los resultados mostraron que el área de la cabeza del espermatozoide en preparaciones húmedas son entre un 3 y un 4% mayores que las del espermatozoide de los frotis. Dentro de las preparaciones húmedas, no se observó una diferencia clara de tamaño entre los espermatozoides vivos y muertos, pero sí entre los que presentaban o no el acrosoma intacto (un área en torno al 10% mayor en estos últimos).

Los resultados preliminares de este estudio no mostraron diferencias morfométricas en la cabeza de los espermatozoides vivos y muertos cuando ambos presentaban el acrosoma intacto o en el núcleo de ambos tipos de espermatozoides. En un estudio anterior, Marco-Jiménez *et al.* demostraron que los espermatozoides muertos presentaban un menor tamaño de la cabeza que los vivos (Marco-Jimenez *et al.*, 2006). El efecto del acrosoma sobre la morfometría de la cabeza del espermatozoide es muy relevante, ya que una porción del mismo supera los límites nucleares formando un margen libre (Saacke y Marshall, 1968). El hecho de que los espermatozoides muertos presenten una proporción mucho mayor de acrosomas dañados hace que el tamaño de su cabeza sea inferior.

A pesar de la importancia funcional del acrosoma, los métodos clásicos de tinción y CASMA sólo han permitido la evaluación de la morfometría acrosómica en algunas especies, como la humana (Soler *et al.*, 2003; Falzone *et al.*, 2011) y canina (Nunez-Martinez *et al.*, 2007), pero no en otras como las de especies de artiodáctilos. En estas especies, los protocolos tradicionales no ofrecen suficiente contraste para estudiar el acrosoma del espermatozoide por separado con sistemas de CASMA, aunque recientemente el grupo TECNOGAM ha desarrollado nuevos protocolos para la evaluación morfométrica de esta estructura, basados en contrastes ópticos (Yániz *et al.*, 2013a) o en microscopía de fluorescencia (Yániz *et al.*, 2014), que permiten la evaluación simultánea de la cabeza y acrosoma del espermatozoide en extensiones de semen. El estudio independiente de la cabeza, núcleo y acrosoma espermáticos proporciona más información que el análisis conjunto de la cabeza (Yániz *et al.*, 2015). Durante el proceso de la reacción acrosómica se produce una pérdida de estructura del acrosoma, por lo que en algunos casos la superficie del mismo se incrementa considerablemente en el extremo anterior de la espermatozoide y esto puede ser una causa de la sobreestimación del tamaño de la cabeza espermática (Yániz *et al.*, 2015). Sin embargo, los métodos desarrollados con anterioridad requerían la realización de frotis y se ha descrito que la extensión y secado de las muestras provoca alteración de estructuras celulares como el acrosoma (Lybaert *et al.*, 2009). Por lo tanto, el método descrito en esta tesis para muestras líquidas seguramente proporciona información más fiable sobre las dimensiones reales del espermatozoide y sus componentes.

Al considerar la morfometría del acrosoma, el parámetro más frecuentemente descrito en la literatura es la proporción de la cabeza cubierta por el acrosoma. Sin embargo, el análisis independiente de parámetros acrosómicos como el área y el perímetro también puede ser de interés (Yániz *et al.*, 2014; Yániz *et al.*, 2015). Además es necesario tener en cuenta que hay diferencias

importantes entre los métodos en los segmentos del acrosoma analizados en diferentes trabajos. El segmento ecuatorial de acrosoma, por ejemplo, no se suele teñir con los métodos habituales, mostrando una imagen convexa en esta región. El margen libre del acrosoma alrededor del núcleo tampoco se observa mediante técnicas de tinción convencionales (Yániz *et al.*, 2014). Esta parte acrosómica puede ser importante, ya que su regularidad puede ser un indicador de la integridad acrosómica, con posibles implicaciones funcionales. La combinación fluorescente que hemos estudiado permite cuantificar tanto el segmento ecuatorial como el margen libre del acrosoma, lo que da una idea mucho más precisa de las dimensiones reales del mismo en condiciones fisiológicas.

En el tercer estudio se aplicó el nuevo método de tinción múltiple fluorescente combinado con el test hipo-osmótico (HOST) y el test de agua (WT), que se compararon. En la bibliografía se han descrito diferentes métodos para evaluar la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática y acrosómica, incluyendo su respuesta a soluciones hipotónicas (Jeyendran *et al.*, 1992; Correa y Zavos, 1994; Brito *et al.*, 2003). En rumiantes, la mayoría estudios de evaluación de HOST se han centrado en la determinación del enrollamiento de la cola después del tratamiento, más fácil de realizar que la evaluación de la integridad acrosómica con las técnicas disponibles. Aunque la utilización de técnicas combinadas puede proporcionar información adicional, en muy pocos estudios se ha combinado el enrollamiento de la cola y la integridad de la membrana utilizando fluorocromos (Perez-Llano *et al.*, 2003). El nuevo método de tinción fluorescente estudiado en esta tesis permite evaluar de manera sencilla tanto el enrollamiento del flagelo como la integridad de la membrana plasmática y del acrosoma. La principal novedad reside en la evaluación simplificada del acrosoma, que con las técnicas anteriores debía realizarse con contraste de fases, lo que resultaba más laborioso y confuso.

Los resultados del HOST y WT se han comparado en diferentes estudios (Fazano *et al.*, 1993; Fuse *et al.*, 1993b; Lin *et al.*, 1998; Bahamondes *et al.*, 2001; Hishinuma y Sekine, 2003). En la mayoría de los casos, la osmolaridad final y el pH de las soluciones no fueron controlados, y probablemente fueron diferentes en el WT y HOST, lo que pudo haber influido en los resultados. Sin embargo, los resultados de enrollamiento de colas de los espermatozoides fueron similares en la mayoría de los trabajos, en coincidencia con nuestro estudio. Sin embargo, en este trabajo hemos controlado la osmolaridad final de las soluciones, de modo que las diferencias entre los tratamientos no pueden ser atribuidas a este factor. A pesar de que el porcentaje de enrollamiento de las colas fue similar entre tratamientos, el WT causó una mayor modificación de los espermatozoides que el HOST, con las colas más intensamente enrolladas y un mayor daño de

membrana plasmática y del acrosoma. Es posible que el agua cause un mayor estrés osmótico hasta la homogeneización de la solución que el provocado por las soluciones hipo-osmóticas. El tiempo no influyó en la distribución de las subpoblaciones dentro de los tratamientos.

Por último, en este trabajo se han descrito las correlaciones positivas entre los resultados de HOST y diferentes parámetros de calidad seminal. Estos resultados coinciden con los obtenidos en diferentes estudios en diferentes especies ((humana (Jeyendran *et al.*, 1992; Almogazy *et al.*, 1993; Fuse *et al.*, 1993a); bovina (Lodhi *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2012).

6. CONCLUSIONES

El método de tinción múltiple fluorescente permitió, por vez primera, estudiar en el mismo espermatozoide la integridad de la membrana plasmática y acrosómica, la funcionalidad y motilidad.

Las diferentes subpoblaciones fluorescentes de espermatozoides presentes en el semen de toro mostraron diferentes patrones de motilidad, de manera que en los espermatozoides con el acrosoma dañado se observó una motilidad inferior.

El nuevo método fluorescente permitió realizar determinaciones morfométricas de los componentes de la cabeza del espermatozoide por vez primera en muestras líquidas y espermatozoides intactos de toro.

Las diferentes subpoblaciones de espermatozoides presentes en la muestra obtuvieron resultados morfométricos muy diferentes. En consecuencia, el estudio morfométrico de una muestra en conjunto realizada hasta la fecha podría tener escaso valor, ya que no considera la integridad de sus estructuras celulares.

Los resultados de enrollamiento de flagelos son similares entre el test hipo-osmótico y el test de agua, aunque la determinación resultó más sencilla con este último.

El test de agua tuvo un efecto perjudicial sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosómica en relación a los dos test hipo-osmóticos evaluados. Este efecto no puede atribuirse a diferencias de osmolaridad o pH de las soluciones.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo N.J., Bame H., Kuehn L.A., Hohenboken W.D., Evenson D.P., Saacke R.G. 2002. Sperm chromatin structure assay (SCSA) and sperm morphology. In: Proc. 19th Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod. 84-90.
- Agarwal A., Makker K., Sharma R. 2008. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol.* 59: 2-11.
- Agarwal A., Varghese A.C., Sharma R.K. 2009. Markers of oxidative stress and sperm chromatin integrity. *Methods Mol Biol.* 590: 377–402.
- Aisen E.G., Medina V.H., Venturino A. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology.* 57: 1801-1808.
- Aitken R., Wingate J., De Iullis G., Mclaughlin E. 2007. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. *Mol Hum Reprod.* 13: 203–211.
- Almogazy H.M., Alkhadra S., Kenawy G., Alzeftawy A., Mostafa T., Attia A., Attia A.M. 1993. Correlation between Human Sperm Hypo-osmotic Swelling Test and Other Semen Parameters. *J Clin Lab Anal.* 7: 243-246.
- Álvarez-Lleó C. 2003. Análisis integrado de morfología y movilidad espermática humana con el uso del Sperm Class Analyzer. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Valencia. Tesis Doctoral.
- Amann R.P., Graham J.K. 1993. Spermatozoa function. In: *Equine Reproduction.* McKinnon A.O., Voss J.L. (Ed.). Philadelphia: Lea & Febiger. 715-745.
- Anchordoguy T., Rudolph A., Carpenter J., Crowe J. 1987. Mode of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology.* 24: 324-31.
- Anel L., Gerra C., Alvarez M., Anel E., Martínez A.F., Boixo C.J., Kaabi M., Herraéz P., Paz P. 2002. Effect of postmortem interval in quality of epididymal spermatozoa in Iberian Red Deer (*Cervus Elaphus Hispanicus*). *Theriogenology.* 57:577.
- Angelino J.N. 2009. Manual de evaluación de semen en bovinos. Trabajo Práctico Educativo. FMVZ, Universidad Veracruzana. Veracruz, México.
- Anzar M., He L., Buhr M.M., Kroetsch T.G., Pauls K.P. 2002. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol Reprod.* 66: 354–360.
- Aravindan G.R., Bjordahl J., Jost L.K., Evenson D.P. 1997. Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp Cell Res.* 236: 231–237.

- Bacinoglu S., Tas M., Cirit U., Özdaş Ö.B., Ak K. 2008. The potential fertility estimation capacity of the hypo-osmotic swelling test, the thermal stress test and a modified cervical mucus penetration test in the bovine. *Animal Reproduction Science*. 104: 38-46.
- Bahamondes L., Fazano F., de Lucio M.A., Neves P.A., Luiz F.B., Lorenzetti G.B. 2001. Evaluation of human sperm membrane integrity using the water test and the hypo-osmotic test. *Andrologia*. 33: 75-77.
- Bailey J.L., Robertson L., Buhr M.M. 1994. Relations among in vivo fertility, computer-analysed motility and Ca^{2+} influx in bovine spermatozoa. *Can J Anim Sci*. 74: 53–58.
- Ball B.A., Mohammed H.O. 1995. Morphometry of stallion spermatozoa by computerassisted image analysis. *Theriogenology*. 44: 367-377.
- Ballachey B., Hohenboken W., Evenson D. 1987. Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. *Biol. Reprod*. 36: 915-925.
- Barrios A.D. 2002. Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem. XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. Valera. Venezuela. 1-14.
- Barth A., Oko R.J. 1989. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Iowa State University Press. Ames, Iowa.
- Bassiri F., Tavalae M., Shiravi A.H., Mansouri S., Nasr-Esfahani M.H. 2012. Is there an association between HOST grades and sperm quality?. *Hum Reprod*. 27: 2277 –2284.
- Baust J.M. 2002. Molecular mechanisms of cellular demise associated with cryopreservation failure. *Cell Preserv Technol*. 1: 17–31.
- Beletti M.E., Mello M.L.S. 2004. Comparison between the toluidine blue stain and the feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. *Theriogenology*. 62(3-4): 398-402.
- Bianchi P., Manicardi G., Bizzaro D., Bianchi U., Sakkas D. 1993. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and In Situ Nick Translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod*. 49: 1083-1088.
- Brito L.F.C., Barth A.D., Bilodeau-Goeseels S., Panich P.L., Kastelic J.P. 2003. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology*. 60: 1539–1551.
- Brito L.F.C., Silva A.E.D.F., Unanian M.M., Dode M.A.N., Barbosa R.T., Kastelic J.P. 2004. Sexual maturation in early and late maturing *Bos indicus* and *Bos*

- indicus × *Bos taurus* crossbred bulls in Brazil. *Theriogenology*. 62: 1198-1217.
- Brown J.R.D.W., Senger P.L., Becker W.C. 1991. Effect of group thawing on post-thaw viability of bovine spermatozoa packaged in 5.0 ml French straws. *J Anim Sci*. 69: 2303-309.
- Bussalleu E., Pinart E., Yeste M., Briz M., Sancho S., GarciaGil N., Badia E., Bassols J., Pruneda A., Casas I., Bonet S. 2005. Development of a protocol for multiple staining with fluorochromes to assess the functional status of boar spermatozoa. *Microsc Res Tech*. 68: 277–283.
- Cancino S.A. 2009. Comparación de la motilidad postdescongelado del semen bovino criopreservado mediante la utilización de la técnica manual y automática con el diluyente comercial One Step. Tesis Licenciatura. FMVZ, Universidad Veracruzana. Veracruz, México.
- Castelo T.S., Frota T.R., Silva A.R. 2008. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Vet Bras*. 2: 67-75.
- Castrillón M., Carou N. 2007. Cátedra de reproducción animal. Colecta d semen. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de las Lomas de Zamora. Buenos Aires, Argentina.
- Catena M., Cabodevila J. 1999. Evaluación de Semen Bovino Congelado. *Taurus*. 3: 18-31.
- Check J.H., Epstein R., Nowroozi K., Shanis B.S., Wu C.H., Bollendorf A. 1989. The hypo-osmotic swelling test as a useful adjunct to the sperm analysis to predict fertility potential. *Fertil Steril*. 52: 159–161.
- Cheng F.P., Fazeli A., Voorhout W.F., Marks A., Bevers M.M., Colenbrander B. 1996. Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *J Androl*. 17: 674–82.
- Chohan K., Griffin J., Lafromboise M., De Jonge C., Carrell D. 2006. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl*. 27(1):53-59.
- Cincik M., Ergur A.R., Tutuncu L., Muhcu M., Kilic M., Balaban B., Urman B. 2007. Combination of hypo-osmotic swelling/eosin Y test for sperm membrane integrity evaluation: correlations with other sperm parameters to predict ICSI cycles. *Archives of Andrology*. 53: 25–28.
- Correa J.R., Heersche J.G., Zavos P.M. 1997a. Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypo-osmotic swelling test incubation at varying temperatures. *Theriogenology*. 47: 715-721.
- Correa J.R., Pace M.M., Zavos P.M. 1997b. 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.
- Cortés-Gutiérrez E.I., Dávila-Rodríguez M.I., López-Fernández C., Fernández J.L., Gosálvez J. 2007. Evaluación del daño en el ADN espermático. *Actas Urológicas Esp*. 31(2): 120-131.
- Cross N.X., Morales P., Overstreet J.W., Hanson F.W. 1986. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res*. 15: 213-226.
- Cseh S., Polichronopoulos T., Solti L. 2004. Prediction of bull fertility by computer assisted semen analysis. *Reprod Fertil Dev*. 16 (2): 128-129.
- Davis R.O., Bain D.E., Siemers R.J., Thal D.M., Andrew J.B., Gravance C.G. 1992. Accuracy and precision of the CellForm-Human automated sperm morphometry instrument. *Fertil Steril*. 58: 763-769.
- De Andrade A.F.C., Arruda R.P., Celeghini E.C.C., Nascimento J., Martins S.M. M.K., Raphael C.F., Moretti A.S. 2007. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. *Reprod Dom Anim*. 42: 190–194.
- De Leeuw F.E., De Chen C.H., Colenbrander B., Verkleij A. J. 1990. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*. 27: 171-83.
- Dresdner R.D., Katz D.F. 1981. Relationship of mammalian sperm motility and morphology to hydrodynamic aspects of cell function. *Biol Reprod*. 25: 920–930.
- Drevius L., Eriksson H. 1966. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa, *Experimental Cell Research*. 42: 136-56.
- Duarte C.C. 2008. Efecto de la aplicación de oxitocina sobre la calidad seminal en bovinos en el trópico húmedo. Tesis Licenciatura. FMVZ, Universidad Veracruzana. Veracruz, México.
- Enciso M., Johnston S.D., Gosálvez J. 2011. Differential resistance of mammalian sperm chromatin to oxidative stress as assessed by a two-tailed comet assay. *Reprod Fertil Dev*. 23(5): 633-637.
- Enciso M., Sarasa J., Agarwal A., Fernández J. L., Gosálvez J. 2009. A two-tailed comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reprod Biomed*. 18: 609-616.
- Ericsson S.A., Garner D.L., Thomas C.A., Downing T.W., Marshall C.E. 1993. Interrrelationships among fluorometric analyser of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology*. 39: 1009-1024.

- Evenson D.P. 1983. Rapid analysis of normal and abnormal cell types in human semen and testis biopsies by flow cytometry. *J Histochem Cytochem.* 31: 248-253.
- Evenson D.P., Darznikiewicz Z., Melamed M.R. 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity of fertility. *Science.* 210: 1131–4.
- Evenson D.P., Darznikiewicz Z., Melamed M.R. 1982. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J Histochem Cytochem.* 30: 279-280.
- 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.
- Everett R.W., Bean B. 1982. Environmental Influences on Semen Output. *J Dairy Sci.* 65(7): 1303–1310.
- Falzone N., Huyser C., Becker P., Leszczynski D., Franken D.R. 2011. The effect of pulsed 900-MHz GSM mobile phone radiation on the acrosome reaction, head morphometry and zona binding of human spermatozoa. *Int J Androl.* 34: 20-26.
- Farah O.I., Cuiling L., Jiaojiao W., Huiping Z. 2013. Use of fluorescent dyes for readily recognizing sperm damage. *J Reprod Infertil.* 14: 120-125.
- Farrell P.B., Presicce G.A., Brockett C.C., Foote R.H. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology.* 49: 871–879.
- Fatehi A., Bevers M., Schoevers E., Roelen B., Colenbrander B., Gadella B. 2005. DNA damage in bovine sperm cells does not block fertilization but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl.* 27: 176-188.
- Fazano F., Burmeister M.L., Delucio M.A., Luiz F.B., Neves P.A., Bahamondes L. 1993. Correlation between hypo-osmotic swelling test and water test to assess human sperm membrane integrity. *Andrologia.* 25:351-353.
- Fazeli A., Hage W.J., Cheng F.P., Voorhout W.F., Marks A., Bevers M.M., Colenbrander B. 1997. Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida in vitro. *Biol Reprod.* 56: 430–8.
- Fernández J.L., Gosálvez J., Santiso R., Goyanes V., López-Fernández C. 2007. In: *Adaptation of the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) Test to Determine DNA Fragmentation from Bull Sperm.* Valentino R.G. (Ed.). Nova Biochemical Books, New York. 69-84.
- Fernández J.L., Goyanes V., Gosálvez J. 2002. DNA Breakage Detection-FISH (DBD-FISH). In: *FISH Technology— Springer Lab Manual.* Rautenstrauss B., Liehr T. (Ed.). Heidelberg: Springer-Verlag. 282–290.
- Fernández J.L., Muriel L., Goyanes V., Segrelles E., Gosálvez J., Enciso M., Lafromboise M., De Jonge C. 2005. Simple determination of human sperm

- DNA fragmentation with an improved Sperm Chromatin Dispersion Test (SCD). *Fertil Steril.* 84(4): 833-842.
- Fernández J.L., Muriel L., Rivero M., Goyanes V., Vázquez R., Álvarez J. 2003. The Sperm Chromatin Dispersion Test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J. Androl.* 24(1): 59-66.
- Fernández J.L., Vázquez-Gundín F., Delgado A., Goyanes V.J., Ramiro-Díaz J., de la Torre J., Gosálvez J. 2000. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat Res.* 45: 77–82.
- Franco J.G., Mauri A.L., Petersen C.G., Massaro F.C., Silva L.F., Felipe V., Cavagna M., Pontes A., Baruffi R.L., Oliveira J.B., Vagnini L.D. 2011. Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin packaging in human spermatozoa. *Int J Androl.* 35: 46–51.
- Fraser L., Gorszczaruk K., Strzeżek J. 2001. Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reprod Domest Anim.* 36: 325-329.
- Fujinoki M., Takei G.L., Kon H. 2016. Non-genomic regulation and disruption of spermatozoal in vitro hyperactivation by oviductal hormones. *J Physiol Sci.* 66:207-212.
- Fuse H., Iwasaki M., Katayama T. 1993a. Correlation between the Hypo-osmotic Swelling Test and Various Sperm Function-Tests. *Int J Fertil.* 38: 311-315.
- Fuse H., Ohta S., Sakamoto M., Kazama T., Katayama T. 1993b. Hypo-osmotic swelling test with a medium of distilled water. *Arch Androl.* 30: 111-116.
- Gadella B.M., Harrison R.A. 2002. Capacitation induces cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod.* 67: 340–50.
- Gaffney E.A., Gadelha H., Smith D.J., Blake J.R., Kirkman-Brown J.C. 2011. Mammalian sperm motility: observation and theory. *Annu. Rev. Fluid Mech.* 43: 501-28.
- Gamboa S., Ramalho-Santos J. 2005. SNARE proteins and caveolin-1 in stallion spermatozoa: possible implications for fertility. *Theriogenology.* 64(2): 275-291.
- García-Artiga C. 1992. Viabilidad del semen congelado de morueco. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. España.
- García-Ispuerto I., López-Gatius F., Bech-Sabat G., Santolaria P., Yániz J.L., Nogareda C., De Rensis F., López-Béjar M. 2007a. Climate factors affecting conception rate of high producing dairy cows in northeastern Spain. *Theriogenology.* 67: 1379-1385.

- Garcia-Ispuerto I., López-Gatius F., Santolaria P., Yániz J.L., Nogareda C., López-Béjar M. 2007b. Factors affecting the fertility of high producing dairy herds in northeastern Spain. *Theriogenology*. 67: 632- 638.
- Garner D.L., Cheryl A.T. 1999. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. *Mol Reprod Dev*. 53: 222-229.
- 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: 620–629.
- Garner D.L., Pinkel D.P., Johnson L.A., Pace M.M. 1986. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. *Biol Reprod*. 34: 127-138.
- Garner D.L., Schenk J.L., Seidel G.E. 2001. Chromatin stability in sexsorted sperm. In: *Andrology in the Twenty-first Century. Proceedings of the VIIIth International Congress of Andrology, Montreal, Canada: Short Communications*. Robaire B., Chemes H., Morales C., Medimond R. (Ed.). Englewood, NJ, USA. 3–7.
- Garner D.L., Thomas C.A., Joerg H.W., DeJarnette J.M., Marshall C.E. 1997. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod*. 57: 1401–6.
- Garrido N., Meseguer M., Simon C., Pellicer A., Remohi J. 2004. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J Androl*. 6: 59-65.
- Gasque G. 2008. En: *Enciclopedia Bovina*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gil J., Januskaukas A., Håård M., Johannisson A., Söderquist I., Rodríguez-Martínez H. 2000. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-plus® and Triladyl®. *Reprod Dom Anim*. 35: 69-77.
- Gillan L., Kroetsch T., Maxwell W.M., Evans G. 2008. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal Reproduction Science*. Manchester. 103(3-4): 201-214.
- Gillian L., Evans G., Maxwell W.M.C. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*. 63: 445-457.
- Gledhill B. 1966. Studies of the DNA content, dry mass and optical area of morphologically normal and abnormal bull spermatozoal heads. *Acta Vet Scand*. 7: 1-20.
- Gorzcyca W., Gong J., Darzynkiewicz Z. 1993: Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Can Res*. 53: 945–951.

- Gosálvez J., Fernández J.L., Gosálbez A., Arrollo A., Agarwal A., López-Fernández C. 2007. Dynamics of sperm DNA fragmentation in mammalian species as assessed by the SCD methodology. *Fertil Steril*. 88: S365- S365.
- Gosálvez J., López-Fernández C., Fernández J.L., Gouraud A., Holt H.V. 2011. Correlations between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from 11 species. *Mol Reprod De*. 78: 951-961.
- Graham J.K., 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci*. 68: 239–247.
- Graham E.F., Schmehl M.K.L., Nelson D.S. 1980. Problems with laboratory assays. In: Proc. 8th Natl. Assoc. Anim. Breeders Tech. Conf. AI Reprod. 59–66.
- Gravance C.G., Garner D.L., Baumber J., Ball B.A. 2000. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology*. 53: 1691–703.
- Gundogan M., Yeni D., Avdatek F., Fidan A.F. 2010. Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Animal Reproduction Science*. 122(3–4): 200-207.
- Hackett A., Macpherson J. 1965. Some staining procedures for spermatozoa. *Can Vet J*. 6: 55-62.
- Hallap T., Nagy S., Jaakma U., Johannisson A., Rodriguez-Martinez H. 2005. Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633. *Theriogenology*. 63: 2311-2322.
- Hammerstedt R.H. 1996. Evaluation of sperm quality: identification of the subfertile male and courses of action. *Anim Reprod Sci*. 42:77– 87.
- Hammerstedt R., Graham J., Nolan J. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm. What we ask them to survive. *Journal of Andrology*. 11: 73-88.
- Harrison R.A.P., Vickers S.E. 1990. Use of fluorescent probes to assess membranne integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fert*. 88: 343-352.
- Harstine B.R., Maquivar M., Helser L.A., Utt M.D., Premanandan C., DeJarnette J.M., Day M.L.J. 2015. Effects of dietary energy on sexual maturation and sperm production in Holstein bulls. *J Anim Sci*. 93: 2759–2766.
- Henry M.A., Noiles E.E., Gao D., Mazur P., Critser J.K. 1993. Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertility and Sterility*. 60: 911-918.
- Hirano M., Anderson D.E., Erickson H.P., Hirano T. 2001. Bimodal activation of SMC ATPase by intra- and inter-molecular interactions. *EMBO J*. 20: 3238–3250.

- Hishinuma M., Sekine J. 2003. Evaluation of membrane integrity of canine epididymal spermatozoa by short hypo-osmotic swelling test with ultrapure water. *J Vet Med Sci.* 65: 817-820.
- Hochi S., Semple E, Leibo S. P. 1996. Effect of cooling and warming rates during Cryopreservation on survival of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology.* 46: 837-47.
- Holt W.V. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology.* 53: 47-58.
- Ikawa M., Inoue N., Benham A.M., Okabe M. 2010. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J Clin Invest.* 120: 984-994.
- 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.
- Januskauskas A., Johannisson A., Rodríguez-Martínez H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology.* 60(4): 743–58.
- Januskauskas A., Johannisson A., Söderquist L, Rodríguez- Martínez H. 2000. Assessment of the fertilizing potential of frozen-thawed bovine spermatozoa by calcium ionophore A23187-induced acrosome reaction in vitro. *Theriogenology.* 53: 859–875.
- Jeyendran R.S., Van der Ven H.H., Perez-Pelaes 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: 219-288.
- Jeyendran R.S., Van der Ven H.H., Zaneveld L.J. 1992. The hypo-osmotic swelling test: an update. *Arch Androl.* 29: 105-116.
- Jones R.C. 1973. Preparation of spermatozoa for electron and light microscopy. *J Reprod Fertil.* 33: 145-149.
- Juonala T., Salonen E., Nurtila T., Andersson M. 1999. Three fluorescence methods for assessing boar sperm viability. *Reprod Dom Anim.* 34: 83–87.
- Karabinus D.S., Evenson D.P., Jost L., Baer R., Kaproth M. 1990. Comparison of semen quality in young and mature Holstein bulls measured by light microscopy and flow cytometry. *J Dairy Sci.* 73(9): 2364-2371
- Kasimanickam R., Kasimanickam V., Thatcher C.D., Nebel R.L., Cassell B.G. 2007. Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. *Theriogenology.* 67: 1004–1012.

- Kastelic J.P., Cook R.B., Coulter G.H., Wallins G.L., Entz T. 1996. Environmental factors affecting measurement of bovine scrotal surface temperature with infrared thermography. *Anim Reprod Sci.* 41: 153-159.
- Kastelic J.P., Coulter G.H., Cook R.B. 1995. Scrotal surface, subcutaneous, intratesticular, and intraepididymal temperatures in Bulls. *Theriogenology.* 44: 147-152.
- Katz D.F., Overstreet J.W., Samuels S.J., Niswander P.W., Bloom T.D., Lewis E.L. 1986. Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male-fertility. *J Androl.* 7: 203-210.
- Khalifa T.A.A., Rekkas C.A., Lymberopoulos A.G., Sioga A., Dimitriadis I., Papanikolaou T.H. 2008. Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. *Animal Reproduction Science.* 104: 143-163.
- Kim S.H., Yu D.H., Kim Y.J. 2010. Apoptosis-like change, ROS, and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques. *Anim Reprod Sci.* 119: 106-14.
- Kirk E.S., Squires E.L., Graham J.K. 2005. Comparison of in vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. *Theriogenology.* 64: 1422-1439.
- Kjaestad H., Ropstad E., Andersen Berg K. 1993. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Vet Scand.* 34: 299–303.
- Kruger T.F., DuToit T.C., Franken D.R., Acosta A.A., Oehninger S.C., Menkveld R., Lombard C.J. 1993. A new computerized method of reading sperm morphology (strict criteria) is as efficient as technician reading. *Fertil Steril.* 59: 202-209.
- Kumi-Diaka J. 1993. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology.* 39: 1279-1289.
- Landsverk K. 2000. Packaging and distribution - their impact on fertility. In: IV International Conference on Boar semen preservation. Johnston L.A., Guthrie H.D. (Ed.). Maryland, USA. 137-139.
- Langlois M.R., Oorlynck L., Vandekerckhove F., Criel A., Bernard D., Blaton V. 2005. Discrepancy between sperm acrosin activity and sperm morphology: significance for fertilization in vitro. *Clin Chim Acta.* 351: 121–129.
- Lavara R. 2013. Genetics of fresh and frozen-thawed semen traits and their relationship with growth rate in rabbits. Tesis.
- Lin M.H., Morshedi M., Srisombut C., Nassar A., Oehninger S. 1998. Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of the results of the hypo-osmotic swelling test, the water test, and eosin-Y staining. *Fertil Steril.* 70: 1148-1155.
- Lindahl P.E., Drevius L.O. 1964. Observations on bull spermatozoa in a hypotonic medium related to sperm mobility mechanisms. *Exp Cell Res.* 36: 632-646.

- Lodhi L.A., Zubair M., Qureshi Z.I., Ahamad I., Jamil H. 2008. Correlation between hypo-osmotic swelling test and various conventional semen evaluation parameters in fresh Nili-Ravi buffalo and Sahiwal cow bull semen. *Pak Vet J.* 28: 186-188.
- Lomeo A.M., Giambersio A.M. 1991. Water-test: a simple method to assess sperm-membrane integrity. *Int J Androl.* 14: 278–282.
- Lopes S., Sun J., Jurisicova A., Meriano J., Casper R. 1998. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 69(3): 528-532.
- López A., Pérez-Clariget R., Álvarez F., Queirolo D., Burgueño J. 2007. Influencia de Factores Medioambientales sobre la Producción Espermática en Toros del Uruguay. Sitio Argentino de Producción Animal APPA – ALPA. Cusco, Perú. Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía. Montevideo, Uruguay.
- López-Fernández C., Fernández J.L., Gosálvez A., Arroyo F., Vázquez J.M., Holt W.V., Gosálvez J. 2008. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals III. *Ram. Theriogenology.* 70: 898-908.
- Love C.C., Thompson J.A., Brinsko S.P., Rigby S.L., Blanchard T.L., Lowry V.K., Varner D.D. 2003. Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology.* 60: 1127-1138.
- Lucy M.C. 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J. Dairy Sci.* 84: 1277-1293.
- Lybaert P., Danguy A., Leleux F., Meuris S., Lebrun P. 2009. Improved methodology for the detection and quantification of the acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Histol Histopathol.* 24: 999-1007.
- Madrid-Bury N. 2004. Relación entre los métodos de valoración seminal in vitro y la fertilidad in vivo del semen descongelado de toros frisonos. Universidad Complutense de Madrid. División de Estudios de Postgrado. Facultad de Veterinaria. Tesis Doctoral. España.
- Mahi C.A., Yanagimachi R. 1973. The effect of temperature, osmolarity and hydrogen ion concentration on the activation and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 35: 55-66.
- Malcotti V., Pelufo V., Bergamo N., Aisen E. 2012. Recovery of epididymal spermatozoa from bull and red deer, stored at different times and temperatures before freezing–thawing. *Anim Prod Sci.* 52: 741-745.
- Malo A.F., Garde J.J., Soler A.J., Garcia A.J., Gomendio M., Roldan E.R.S. 2005. Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biol Reprod.* 72: 822-829.

- Mansour M. Mansour. 2009. Modification of Hipo-Osmotic Swelling Test to Evaluate the Integrity of Stallion Sperm Plasma Membrane. *Global Veterinaria*. 3(4): 302-307.
- Marco-Jimenez F., Vicente J.S., Lavara R., Balasch S., Viudes-De-Castro M.P. 2010. Poor Prediction Value of Sperm Head Morphometry for Fertility and Litter Size in Rabbit. *Reprod Domest Anim*. 45: E118-E123.
- Marco-Jimenez F., Viudes-de-Castro M.P., Balasch S., Moce E., Silvestre M.A., Gomez E.A., Vicente J.S. 2006. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology*. 52: 295-304.
- Martínez-Pastor F., Fernández-Santos M.R., Domínguez-Rebolledo A.E., Estesó M.C., Garde J.J. 2009. DNA status on thawed semen from fighting bull: A comparison between the SCD and the SCSA tests. *Reprod Domest Anim*. 44: 424-431.
- Mayer D.T., Squiers C.D., Bogart R., Oloufa M.M. 1951. The technique for characterizing mammalian spermatozoa as dead or living by differential staining. *The tech Journal Animal Science*. 10: 226-235.
- Mazur P. 1970. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*. 168 (934): 939-49.
- Medina-Robles V.M., Velasco-Santamaría Y.M., Cruz-Casallas P.E. 2005. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Rev Col Cien Pec*. 18: 34-48.
- Medina-Robles V.M., Velasco-Santamaría Y.M., Cruz-Casallas P.E. 2006. Los bancos de recursos genéticos y su papel en la conservación de la biodiversidad. *Revista Orinoquía*. 10: 71-77.
- Mello M.S. 1982. Induced metachromasia in bull spermatozoa. *Histochemistry*. 74: 387-392.
- Mocé E. En: *Manual de Reproducción Animal. Máster en Mejora Genética Animal y Biotecnología de la Reproducción 2014 – 2015. Tecnología del Semen II, Tecnología del Semen III*. Valencia, España.
- Mocé E., Graham J.K. 2008. In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science*. 105: 104-118.
- Morillo M., Salazar S., Castillo E. 2012. Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Maracay, Venezuela. 23-28.
- Mota P.C., Ramalho-Santos J. 2006. Comparison between different markers for sperm quality in the cat: Diff-Quik as a simple optical technique to assess changes in the DNA of feline epididymal sperm. *Theriogenology*. 65: 1360-1375.
- Myles D.G. 1993. Molecular mechanisms of sperm-egg membrane binding and fusion in mammals. *Develop Biol*. 158: 35.

- Nagy S., Hazas G., Papp A.B., Ivancsics J., Szasz F., Szasz F.Jr., Kovacs A., Foote R.H. 1999. Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. *Theriogenology*. 52: 1153-1159.
- Nagy S., Jansen J., Topper E.K., Gadella B.M. 2003. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol Reprod*. 68: 1828–35.
- Natali A., Turek P.J. 2011. An assessment of new sperm tests for male infertility. *Urology*. 77:1027-34.
- Nava-Trujillo H., Quintero-Moreno A. 2013. Bull sperm with damaged chromatin are distributed differently in morphometrically distinct subpopulations. *Resumen de las XV Jornadas sobre Producción Animal*. Zaragoza, España. 419-421.
- Nunez-Martinez I., Moran J.M., Pena F.J. 2007. Sperm indexes obtained using computer-assisted morphometry provide a forecast of the freezability of canine sperm. *Int J Androl*. 30: 182-189.
- O'Connell M., McClure N., Lewis S.E.M. 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod*. 17: 704-709.
- Ostermeier G.C., Sargeant G.A., Yandell B.S., Evenson D.P., Parrish J.J. 2001. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *J. Androl*. 22(4): 595-603.
- Parinaud J., Vieitez G., Moutaffian H., Richoilley G., Milhet P. 1996. Relationships between motility parameters, morphology and acrosomal status of human spermatozoa. *Hum Reprod*. 11: 1240-1243.
- Parks J.E., Graham J.K. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38: 209–22.
- Partyka A., Nizański W., Ochota M. 2012. Methods of assessment of cryopreserved semen. In: *Current Frontiers in Cryobiology*. Katkov II. (Ed.). Rijeka, Croatia. 547-574.
- Payan-Carreira R., Borges P., Mir F., Fontbonne A. 2013. Molecular Markers in Sperm Analysis. In: *Success in Artificial Insemination - Quality of Semen and Diagnostics Employed*. Lemma A. (Ed.). Rijeka, Croatia. 93–115.
- Payan-Carreira R., Miranda S., Nizanski W. 2011. Artificial Insemination in Dogs. In: *Artificial Insemination in Farm Animals*. Milad Manafi (Ed.). 51-78.
- Peña A., Johannisson A., Linde-Forsberg C. 1999. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology*. 52: 965-980.
- Peña-Martínez A.I. 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci*. 82: 209-24.

- Pérez-Llano B., Enciso M., García-Casado P., Sala R., Gosálvez J. 2006. Sperm DNA fragmentation in boars is delayed or abolished by using sperm extenders. *Theriogenology*. 66: 2137-2143.
- Pérez-Llano B., González J.L., García-Casado P. 1998. Nueva técnica de ORT corta para su evaluación. *Albéitar*. 21: 6-7.
- Pérez-Llano B., Lorenzo J.L., Yenes P., Trejo A., García-Casado P. 2001. A short hypo-osmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology*, 56:387-398.
- Pérez-Llano B., Yenes-García P., García-Casado P. 2003. Four subpopulations of boar spermatozoa defined according to their response to the short hypo-osmotic swelling test and acrosome status during incubation at 37 °C. *Theriogenology*. 60: 1401–1407.
- Pinto C., Kozink D. 2008. Simplified hypo-osmotic swelling testing (HOST) of fresh and frozen-thawed canine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 104: 450 - 455.
- Poot M., Zhang Y.Z., Kramer J.A., Wells K.S., Jones L.J., Hanzel D.K., Lugade A.G., Singer V.L., Haugland R.P. 1996. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *J Histochem Cytochem*. 44: 1363–1372.
- Prathalingam N.S., Holt W.V., Revell S.G., Mirczuck S., Fleck R.A., Watson P.F. 2006. Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. *Theriogenology*. 66: 1894–1900.
- Quintero-Moreno A., Rubio-Guillén J., González D., Palomares R., Madrid-Bury N. 2007. Efecto de la criopreservación sobre la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática de espermatozoides de toros. XI Jornadas Nacionales de la Facultad experimental de Ciencias-LUZ. Maracaibo, Venezuela.
- Ramalho-Santos J., Amaral A., Sousa A.P., Rodrigues A.S., Martins L., Baptista M., Mota P.C., Tavares R., Amaral S., Gamboa S. 2007. Probing the structure and function of mammalian sperm using optical and fluorescence microscopy. In: Mendez-Villas A., Diaz J. (Ed.). *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*. 394-402.
- Ramio L., Rivera M.M., Ramirez A., Concha I.I., Pena A., Rigau T., Rodriguez-Gil J.E. 2008. Dynamics of motile-sperm subpopulation structure in boar ejaculates subjected to "in vitro" capacitation and further "in vitro" acrosome reaction. *Theriogenology*. 69:501-512.
- Ramos S. 1996. Anotaciones sobre inseminación artificial. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de la Salle. Santa Fé de Bogotá. Colombia. 92.
- Rangel P.L.E. Evaluación de la salud de sementales bovinos. Reproducción bovina. FMVZ-UNAM. 2007.

- Rato L., Alves M.G., Socorro S., Duarte A.I., Cavaco J.E., Oliveira P.F. 2012. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nat Rev Urol.* 9:330-338.
- Rawlings N., Evans A.C., Chandolia R.K., Bagu E.T. 2008. Sexual maturation in the bull. *Reproduction in Domestic Animals.* 43: 295-301.
- Revell S.G., Mrode R.A. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci.* 36:77-86.
- Rodriguez-Martinez H. 2000. Evaluación de semen congelado: Métodos Tradicionales y de Actualidad. *Internacional Veterinary Information Service.* Ithaca, New York, USA.
- Rodriguez-Martinez H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still Utopia?. *Reprod Dom Anim.* 38: 312–318.
- Rota A., Penzo N., Vincenti L., Mantovani R. 2000. Hypo-osmotic swelling (hos) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology.* 53: 1415-1420.
- Rubio J. 2006. Efecto de la criopreservación sobre la calidad seminal y la fertilidad de toros Holstein, Brahman y sus mestizos. *Universidad del Zulia (LUZ).* Facultad de Agronomía. Tesis de Maestría.
- Rubio-Guillén J., González D., Garde J.J., Esteso M.C., Fernández-Santos M.R., Rodríguez-Gil J.E., Madrid-Bury N., Quintero-Moreno A. 2007. Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reprod Domest Anim.* 42: 354–357.
- Rybar R., Faldikova L., Faldyna M., Machatcova M., Rubes J. 2004. Bull and boar sperm DNA integrity evaluated by sperm chromatin structure assay. *Vet Med.* 49: 1-8.
- Saacke R.G. 2008. Sperm morphology: its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology.* 70, 473–478.
- Saacke R.G., DeJarnette J.M., Bame J.H., Karabinus D.S., Whitman S. 1998. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle?. *Theriogenology.* 51: 117–128.
- Saacke R.G., Marshall C.E. 1968. Observations 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.
- Sanocka D., Kurpisz M. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 2:12.
- Schilling E., Vengust M. 1985. Determination of osmotic resistance of boar spermatozoa and its relationship with the storage ability of semen samples. *Zuchthygiene.* 20: 61-78.

- Schilling E., Vengust M., Bajt G., Tomcic M. 1986. The osmotic resistance (ORT) of boar spermatozoa and the relation to pregnancy rate and litter size. Proc 9th IPVS Congress. Barcelona, España. 77.
- Setchell B.P. 1998. The Parkes lecture Heat and the testis. *J Reprod Fertil.* 114: 179-194.
- Sharma M., Singh M., Kapoor S., Jasial S. 2012. Inter relationship between some routine semen evaluation parameters in Jersey X local hill cattle crossbred bulls. *Open Vet J.* 2:26-31.
- Silva P.F., Gadella B.M. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology.* 65: 958-78.
- Singh N., Mccoy M., Tice R., Schneider E. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175(1): 184-191.
- Slowinska M., Karol H., Cieresko A. 2008. Comet assay of fresh and cryopreserved bull spermatozoa. *Cryobiology.* 56: 100-102.
- Snell W.J., White J.M. 1996. The molecules of mammalian fertilization. *Cell.* 85: 629.
- Soler C., Blasco F.J. 2013. Method for assessing morphology of spermatozoa and system thereof. Patent number 13160507, 3-1553.
- Soler C., de Monserrat J.J., Gutierrez R., Nuñez J., Nunez M., Sancho M., Perez-Sanchez F., Cooper T.G. 2003. Use of the Sperm-Class Analyser® for objective assessment of human sperm morphology. *International Journal of Andrology.* 26: 262–270.
- Soler C., García-Molina A., Contell J., Silvestre M.A., Sancho M. 2015. The Trumorph® system: The new universal technique for the observation and analysis of the morphology of living sperm. *Animal Reproduction Science.* 158: 1–10.
- Soler C., García-Molina A., Sancho M., Contell J., Nuñez M., Cooper T.G. 2016. A new technique for analysis of human sperm morphology in unstained cells from raw semen. *Reproduction Fertility and Development.* 28: 428-433.
- Soler C., Pérez-Sánchez F., Schulze H., Bergmann M., Oberpenning F., Yeung C., Cooper T.G. 2000. Objective evaluation of the morphology of human epididymal sperm head. *Int J Androl.* 23: 77-84.
- Soler C., Sancho M., García A., Fuentes M., Nuñez J., Cucho H. 2014. Ejaculate fractioning effect on llama sperm head morphometry as assessed by the ISAS((R)) CASA system. *Reprod Domest Anim.* 49: 71-78.
- Sousa A.P., Amaral A., Baptista M., Tavares R., Caballero-Campo P., Caballero-Peregrín P., Freitas A., Paiva A., Almeida-Santos T., Ramalho-Santos J. 2011. Not all sperm are equal: functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential.

- Stalhammar E., Janson L., Philipsson J. 1994. The impact of sperm motility on non-return rate in preselected dairy bulls. *Reprod Nutri Dev.* 34: 37-45.
- Storey B.T. 1997. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 3: 203–213
- Sukhato P., Thongsodseang S., Utha A., Songsasen N. 2001. Effects of cooling and warming conditions on post-thawed motility and fertility of cryopreserved buffalo spermatozoa. *Anim Reprod Scie.* 67: 69–77.
- Sun J., Jurisicova A., Casper R. 1997. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentacion in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod.* 56: 602-607.
- Sutovsky P., Ramalho-Santos J., Moreno R.D., Oko R., Hewitson L., Schatten G. 1999. On-stage selection of single round spermatids using a vital, mitochondrion-specific fluorescent probe MitoTracker™ and high resolution differential interference contrast (DIC) microscopy. *Hum. Reprod.* 14: 2301–2312.
- Tartaglione C.M., Ritta M.N. 2004. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology.* 62: 1245–1252.
- Tejada R.I., Mitchell J.C., Norman A., Marik J.J., Friedman S. 1984. A Test For The Practical Evaluation Of Male Fertility by Acridine Orange (AO) Fluorescence. *Fertil Steril.* 42(1): 87-91.
- Thomas C.A., Garner D.L., Dejarnette J.M., Marshall C.E. 1998. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod.* 58: 786-793.
- Varum S., Bento C., Sousa A.P., Gomes-Santos C.S., Henriques P., Almeida-Santos T., Teodosio C., Paiva A., Ramalho-Santos J. 2007. Characterization of human sperm populations using conventional parameters, surface ubiquitination, and apoptotic markers. *Fertil Steril.* 87: 572–583.
- Velasco-Santamaría Y.M., Medina-Robles V.M, CruzCasallas P.E. 2006. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. *Aquaculture.* 256: 264-71.
- Vera O. 2001. Evaluación seminal comparativa pre y postcongelación en machos bovinos. En: *Reproducción Bovina.* González-Stagnaro C. (Ed.). Fundación Girarz. Maracaibo-Venezuela. Ed. Astro Data, S.A. Maracaibo. Cap. XV: 249-262.
- Vera-Munoz O., Amirat-Briand L., Diaz T., Vasquez L., Schmidt E., Desherces S., Anton M., Bencharif D., Tainturier D. 2009. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: comparison to Triladyl and Bioxcel. *Theriogenology.* 71: 895–900.

- Verstegen J., Iguer-Ouada M., Oclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57: 149–179.
- Vicente-Fiel S., Palacín I., Santolaria P., Hidalgo C.O., Silvestre M.A., Arrebola F., Yániz J.L. 2013. A comparative study of the sperm nuclear morphometry in cattle, goat, sheep, and pigs using a new computer-assisted method (CASMA-F). *Theriogenology*. 79: 436-442.
- Wang M.J., Ou J.X., Chen G.W., Wu J.P., Shi H.J., O W.S., Martin-DeLeon P.A., Chen H. 2012. Does prohibitin expression regulate sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and male fertility?. *Antioxidants & Redox Signaling*. 17: 513–519.
- Waterhouse K.E., Haugan T., Kommisrud E., Tverdal A., Flatberg G., Farstad W., Evenson D., De Angelis P. 2006. Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian Red bulls. *Reprod Fertil Dev*. 18: 781-788.
- Watson P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their postthawing function. *Reprod Fertil Dev*. 7: 871–91.
- Watson P.F., Critser J.K., Mazur P. 1992. Sperm preservation: fundamental cryobiology and practical implications. In: *Infertility*. Templeton A.A., Drife J.O. (Ed.). Springer, London. 102-114.
- Watson P.F., Morris G.J. 1987. Cold Shock Injury in Animal Cells. In: *Temperature and Animal Cells*. Bowler K., Fuller B.J. (Ed.). Company of Biologists Limited, Cambridge. 311-340.
- Webb J.K., Lee A.E., Diamond-Cox H., Ballam J.M., Plunkett E.D., Weisenfeld R.B. 2008. Coulter counter-based evaluation of sperm volume to assess sperm viability of bull semen and application to X/Y sperm sorting. *Theriogenology*. 69: 990-1000.
- Yániz J., Capistrós S., Vicente-Fiel S., Soler C, Nunez de Murga M., Santolaria P. 2013a. Use of relief contrast objective to improve sperm morphometric analysis by Isas Casa System in the ram. *Reprod Domest Anim*. 48: 1019-1024.
- Yániz J.L., Capistrós S., Vicente-Fiel S., Soler C., Nunez de Murga J., Santolaria P. 2014. Study of nuclear and acrosomal sperm morphometry in ram using a computer-assisted sperm morphometry analysis fluorescence (CASMA-F) method. *Theriogenology*. 82: 921–924.
- Yániz J.L., López-Gatius F., Bech-Sàbat G., García-Ispierto I., Serrano B., Santolaria P. 2008a. Relationships between milk production, ovarian function and fertility in high-producing dairy herds in north-eastern Spain. *Reprod Domest Anim*. 43: 38–43.
- Yániz J.L., Palacín I., Vicente-Fiel S., Gosálvez J., López-Fernández C., Santolaria P. 2013b. Comparison of membrane-permeant fluorescent probes

- for sperm viability assessment in the ram. *Reproduction in Domestic Animals*. 48: 598–603.
- Yániz J.L., Palacín I., Vicente-Fiel S., Gosalvez J., López-Fernández C., Santolaria P. 2013c. Evaluation of a commercial kit based on acridine orange/propidium iodide to assess the plasma membrane integrity of ram sperm. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 11(2): 362-365.
- Yániz J.L., Santolaria P., Marco-Aguado M.A., Lopez-Gatius F. 2008b. Use of image analysis to assess the plasma membrane integrity of ram spermatozoa in different diluents. *Theriogenology*. 70: 192-198.
- Yániz J.L., Soler C., Santolaria P. 2015. Computer assisted sperm morphometry in mammals: A review. *Anim Reprod Sci*. 156: 1-12.
- Yániz J.L., Vicente-Fiel S., Capistrós S., Palacín I., Santolaria P. 2012. Automatic evaluation of ram sperm morphometry. *Theriogenology*. 77: 1343-1350.
- Zhang B.R., Larsson B., Lundeheim N., Rodríguez-Martínez H. 1998. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. *Int J Androl*. 21: 207–216.
- Zhu W., Liu X. 2000. Cryodamage to plasma integrity in head and tail region human sperm. *Asian J Androl*. 2: 135-138.