



e s c u e l a
p o l i t é c n i c a
s u p e r i o r
d e h u e s c a



Universidad
Zaragoza

TRABAJO FIN DE GRADO

“FACTORES QUE AFECTAN A LA MORFOMETRÍA DEL NÚCLEO ESPERMÁTICO EN *Bos taurus*”

AUTOR: LEYRE VILLANOVA SEBASTIÁN

DIRECTORES: JESÚS YÁNIZ PÉREZ DE ALBÉNIZ

SANDRA VICENTE FIEL

ENSEÑANZA: GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO
RURAL

FECHA: NOVIEMBRE 2014

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

En este apartado quisiera agradecer a todas las personas que me han ayudado en la realización de este Trabajo Fin de Grado.

En primer lugar a mis dos directores: Jesús Yániz y Sandra Vicente por su continua dedicación, dirección, ayuda y por todo lo que me han enseñado durante el desarrollo de este trabajo. Agradecerles que me hayan apoyado y animado en todo momento.

A mi familia: en especial a mis padres, Manolo y Arantxa, por darme su cariño y animarme durante toda mi formación, sin su esfuerzo nada de esto hubiera sido posible. A mi abuela: Aurelia, se que esté donde esté estará muy orgullosa de mí. A mi novio: Chema, por confiar en mí, apoyarme y darme su cariño durante todo este tiempo.

Por último a mis amigos y amigas: tanto a mis compañeros de carrera como a los de siempre. En especial a Andrea, María y Miguel, por todos los momentos vividos.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL	Nº DE PÁGINA
1.-RESUMEN	1
2.-ABSTRACT.....	2
3.-INTRODUCCIÓN.....	3
4.-OBJETIVOS.....	5
5.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
5.1.-El espermatozoide en mamíferos	6
5.1.1. Morfología del espermatozoide	6
5.1.1.1.-La cabeza del espermatozoide	7
5.1.1.2.- El flagelo del espermatozoide.....	9
5.1.1.3.-Membrana plasmática	9
5.2.-Espermiograma	10
5.2.1.- Estudio del volumen y concentración espermática	11
5.2.2.-Estudio de la movilidad	12
5.2.3.- Estudio de la viabilidad espermática.....	12
5.3.-Estudio de la morfología espermática	13
5.4.-Estudio de la morfometría espermática	14
5.4.1.-Factores que afectan a la morfometría.....	16
5.4.1.1.-Citometría de flujo.....	18
5.4.1.2.-Hibridación fluorescente in situ (FISH)	19
6.-MATERIAL Y MÉTODOS	21
6.1.-Reactivos	21
6.2.-Recogida y obtención del semen	21
6.3.- Manipulación del semen.....	21
6.3.1.-Movilidad espermática.....	22
6.4.- Preparación de las muestras para su evaluación morfométrica	23
6.4.1.-Fresco	23

6.4.1.1.- Tratamiento Fresco-1: Marcaje con H342 + IP	23
6.4.1.2.- Tratamiento Fresco-2: Marcaje solamente con H342	23
6.4.1.3.- Tratamiento Fresco-3: Marcaje con IP	23
6.4.2.- Frotis.....	23
6.4.2.1.- Tratamiento Frotis-1: Marcaje con H342	24
6.4.2.2.-Tratamiento Frotis-2: Marcaje con IP.....	24
6.5.- Imagen de fluorescencia y CASMA	24
6.6.- Hibridación fluorescente in situ (FISH)	25
6.6.1.-Preparación de muestras espermáticas.....	26
6.6.2.- Hibridación	26
6.6.3.- Marcaje fluorescente	27
6.7.-Diseño experimental.....	28
6.7.1-Estudio 1: Efecto de la viabilidad del espermatozoide en la morfometría del núcleo espermático.....	28
6.7.2.-Estudio 2: Efecto de la centrifugación sobre la morfometría del núcleo espermático espermático.....	28
6.7.3.-Estudio 3: Diferencias morfométricas entre espermatozoides portadores del cromosoma X y del cromosoma Y	28
6.8.-Análisis estadístico.....	29
7.-RESULTADOS	30
7.1.- Estudio 1: Efecto de la viabilidad del espermatozoide en la morfometría del núcleo espermático	30
7.2.-Estudio 2: Efecto de la centrifugación sobre la morfometría del núcleo espermático ..33	
7.3.-Estudio 3: Diferencias morfométricas entre espermatozoides portadores del cromosomas X y del cromosoma Y	35
8.-DISCUSIÓN	39
9.-CONCLUSIONES.....	42
10.-BIBLIOGRAFÍA.....	43

ÍNDICE DE TABLAS	Nº DE PÁGINA
Tabla 1. Diferencias existentes entre espermatozoides X e Y, utilizadas por diferentes autores como base para la separación espermática (Adaptación de Parrilla, 2003).....	17
Tabla 2. Diferencias morfométricas de los parámetros primarios entre espermatozoides vivos y muertos	34
Tabla 3. Diferencias morfométricas de los parámetros secundarios entre espermatozoides vivos y muertos	34
Tabla 4. Diferencias morfométricas intra-macho entre muestras sin centrifugar y centrifugadas	36
Tabla 5. Diferencias morfométricas intra-macho entre espermatozoides con cromosoma X y cromosoma Y.....	39
Tabla 6. Diferencias de los parámetros morfométricos primarios y secundarios intra-macho entre muestras sexadas y no sexadas	40

ÍNDICE DE FIGURAS	Nº DE PÁGINA
Figura 1: Estructura del espermatozoide (Audesirk et al, 2003).....	6
Figura 2: A- División estructural del espermatozoide. B- Corte sagital de la célula espermática: 1. Membrana espermática, 2. Membrana acrosomal externa, 3. Contenido acrosomal, 4. Membrana acrosomal interna, 5. Núcleo celular, 6. Contenido de ADN altamente condensado, 7. Anillo posterior, 8. Pieza media, 9. Mitocondria, 10. Anillo anular, 11. Flagelo, C y D- Reacción acrosomal (Flesch y Gadella, 2000).	7
Figura 3: Representación gráfica de las principales anomalías espermáticas	14
Figura 4: Parámetros morfométricos medidos en este estudio	15
Figura 5: Esquema general del citómetro de flujo	19
Figura 6: Esquema de la hibridación fluorescente <i>in situ</i>	20
Figura 7: Cámara Makler en posición para su visionado al microscopio.	23
Figura 8: Sistema CASA – microscopio óptico conectado a un software de análisis de imágenes en el ordenador.....	23
Figura 9: Microscopio de epifluorescencia (DM4500B, Leica, Alemania), al que va acoplado una cámara Canon Eos 400D digital que se controlaba mediante un ordenador con el programa DSLR Remote Pro software (Sistemas de Breeze).....	26
Figura 10: Núcleos espermáticos capturados automáticamente con el software Image J	32
Figura 11: A) Núcleos espermáticos teñidos en fresco con H342 e IP (FRESCO-1). B) Núcleos espermáticos teñidos en fresco con H342 (FRESCO-2). C) Núcleos espermáticos teñidos en fresco con IP (FRESCO-3). D) Núcleos espermáticos de frotis teñidos con H342 (FROTIS-1). E) Núcleos espermáticos de frotis teñidos con IP (FROTIS-2)..	32
Figura 12: Fotografías, realizadas con distintos filtros, de núcleos espermáticos portadores de cromosomas X o Y marcados con fluorescencia.	35

Figura 13: A) Núcleos espermáticos portadores del cromosoma Y. B) Núcleos espermáticos portadores del cromosoma X. C) Fotografía utilizada para el análisis morfométrico, en la cual los núcleos espermáticos estaban fijados con glutaraldehído y teñidos con H342..... 38

RESUMEN

ABSTRACT

1.-RESUMEN

El éxito de la IA en el sector bovino radica en la utilización de eyaculados de buena calidad, que se evalúan mediante un espermiograma en el que se miden numerosos parámetros. Entre ellos se encuentra el estudio de la morfología espermática, cuya determinación se ha automatizado mediante el desarrollo de un nuevo método para el análisis morfométrico (CASMA-F). Dada la importancia de este análisis es importante conocer los factores que puedan influir en los resultados. El objetivo general de este Trabajo Fin de Grado será estudiar dichos factores utilizando el método CASMA-F y para ello se realizaron tres estudios. En el primero se ha analizado el efecto de la viabilidad del espermatozoide en la morfometría del núcleo espermático. Para ello se recogieron muestras de 10 machos que se trataron con dos presentaciones distintas (fresco y frotis). En el caso de las muestras en fresco se tiñeron con Hoechst 33342 e Ioduro de Propidio (IP) por separado y combinando ambos. En el caso de la presentación en frotis, las muestras se fijaron con glutaraldehído y posteriormente se tiñeron con H342 y con IP por separado. En el segundo estudio se evaluó el efecto de la centrifugación en la morfometría del núcleo espermático. Se prepararon frotis con muestras procedentes de 5 machos distintos antes y después de centrifugar durante 10 minutos a 2000g, se fijaron con glutaraldehído y se tiñeron con H342. Por último, en el tercer estudio se determinaron las posibles diferencias morfométricas entre espermatozoides portadores del cromosoma X y del cromosoma Y. En este estudio se realizaron dos ensayos, en el primero se analizaron 8 machos procedentes de la técnica FISH y se analizaron los espermatozoides portadores de cromosomas X e Y. En el segundo ensayo se analizaron 4 machos de los que se tenían muestras sexadas y sin sexar. Se realizaron frotis, se fijaron con glutaraldehído y se tiñeron con H342. En todos los estudios se realizaron las capturas de las imágenes con un microscopio de fluorescencia y una cámara digital. Las imágenes fueron procesadas con el software Image J analizando 200 espermatozoides de cada macho, tratamiento y tinción. Las medidas del núcleo espermático en fresco fueron mayores en los espermatozoides viables que en los no viables. Los núcleos espermáticos de las muestras centrifugadas presentaron en general mayores dimensiones que los espermatozoides sin centrifugar. En el último estudio se obtuvieron mayores valores morfométricos en todos los parámetros estudiados en los espermatozoides portadores del cromosoma X que en los portadores del cromosoma Y. En el segundo ensayo de este estudio, las dosis sexadas (los espermatozoides portaban el cromosoma X), presentaron mayores dimensiones morfométricas frente a las dosis no-sexadas.

2.-ABSTRACT

IA success in cattle production relay on utilization of good quality ejaculates that are evaluated in the spermiogram, where numerous parameters are measured. One of the most important parameters is sperm morphology, whose determination has been automated through the development of a new method of sperm morphometry analysis (CASMA-F). Due to the importance of this analysis, it is essential to know the factors that can influence the morphometric results. The general aim of this work was the analysis of some these factors. The work was divided into three studies. In the first study, the effect of sperm viability in the nuclear sperm morphometry was analyzed. To do that, ten samples were collected and processed in two different ways (fresh or smears). Fresh samples were stained with Hoechst 33342 (H342) and Propidium Iodide (PI) separately and then combined. In the second study the effect of centrifugation on the nuclear sperm morphometry was evaluated. Smear samples were prepared from five different males after and before centrifugation during 10min at 2000g, fixed with glutaraldehyde (2%) and stained with H342. In the third study possible morphometric different between sperm with X-chromosome and Y-chromosome were determined. In this study two assays were made, in the first assay 8 males were analyzed using FISH method and differences between sperm with X-chromosome and Y-chromosome were analyzed. In the second assay sexed and non-sexed samples from 4 males were analyzed. Smears were done, fixed with glutaraldehyde and stained with H342. All cases were photographed by a Leica fluorescence microscope and a digital camera. Pictures were analyzed using Image J software processing 200 sperm per each male, treatment and stain. Nuclear sperm size in fresh samples was bigger in viable sperm than in non-viable sperm. In general nuclear sperm size in centrifuged sperm showed higher values than non-centrifuged sperm. In the last study, higher mophometry values were found in all the studied parameters in X-bearing sperm than Y-bearing sperm. In the second assay, sexed doses (with X-chromosome), showed higher morphometric values than non-sexed doses.

INTRODUCCIÓN

3.-INTRODUCCIÓN:

El sector bovino es uno de los de mayor relevancia económica en España. En esta especie es común la utilización de la inseminación artificial como método reproductivo ya que se trata de la biotecnología reproductiva más exitosa. Parte de su éxito radica en la utilización de eyaculados de buena calidad, aspecto que se determina mediante el análisis seminal o espermiograma. La calidad del eyaculado se evalúa normalmente mediante el espermiograma clásico, basado en la aplicación de una serie de pruebas de ejecución relativamente simples y que pueden ser realizadas con un coste moderado. En este espermiograma clásico se miden el volumen, la concentración, la movilidad, el estado acrosómico y la morfología espermática. Entre ellos, el estudio de la morfología espermática es uno de los más relevantes, ya que el aumento de espermatozoides anómalos reduce la viabilidad de la dosis seminal y la fertilidad *in vivo*. Pero se trata de un parámetro poco repetible ya que se realiza de una manera subjetiva. Para solucionar este problema se han creado nuevos sistemas de análisis de la morfometría espermática asistida por ordenador (ASMA o CASMA).

En un trabajo anterior realizado por nuestro grupo, se desarrolló y estandarizó un método para el análisis morfométrico de la cabeza del espermatozoide (CASMA-F), basado en la utilización de un software libre y microscopía de fluorescencia (Yaniz *et al.*, 2012). Este método se centraba en el estudio del núcleo espermático, principal constituyente de la cabeza del espermatozoide. Este método ha permitido automatizar el análisis morfométrico, reduciendo el procesado de las muestras y la variabilidad, aumentando la precisión. A pesar de obtener resultados más repetibles con el nuevo método, se conoce poco sobre los factores que pueden influir en la morfometría del núcleo espermático, entre los que podrían destacar el procesado de las muestras, la viabilidad espermática (espermatozoides vivos y muertos) y el sexo de los espermatozoides, entre otros. Se han realizado estudios previos sobre las diferencias morfométricas entre espermatozoides vivos y muertos y de diferente sexo pero los resultados obtenidos son contradictorios.

La utilización de semen sexado está cada vez más extendida en ganado vacuno de leche, ya que la selección del sexo permite obtener un mayor número de hembras de reposición. Para lograr una mayor difusión de esta tecnología será necesario que las dosis tengan una alta viabilidad espermática además de no tener un coste excesivamente elevado. El método utilizado para el sexaje de muestras espermáticas es la citometría de flujo, basada en las diferencias de contenido de ADN entre los espermatozoides X e Y. Para determinar el sexo de los espermatozoides tras el sexaje se utilizan técnicas complejas y caras, como la PCR a

tiempo real (RT-PCR) o la hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Dado que en el método CASMA-F se analiza el núcleo espermático, constituido por cromatina principalmente, las diferencias morfométricas entre los espermatozoides portadores del cromosoma X e Y pueden ser mayores de lo descrito mediante otras técnicas morfométricas. Nuestra hipótesis de trabajo es que el método CASMA-F puede ser utilizado para la determinación del sexo espermático y, por tanto, como un método sencillo de análisis de calidad de las muestras de semen sexado.

OBJETIVOS

4.-OBJETIVOS

El objetivo general de este Trabajo Fin de Grado es estudiar los factores que influyen en la morfometría del núcleo espermático utilizando el método CASMA-F. Los objetivos específicos son los siguientes:

1. Estudiar el efecto de la viabilidad del espermatozoide en la morfometría del núcleo espermático.
2. Comprobar si el proceso de centrifugación de la muestra de semen puede afectar a la morfometría del núcleo del espermatozoide.
3. Analizar las diferencias morfométricas entre espermatozoides portadores del cromosoma X y del cromosoma Y utilizando el método CASMA_F.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

5.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

5.1.-El espermatozoide en mamíferos

El espermatozoide (del griego *esperma*-semilla y *zoon*-animal) es una célula altamente especializada que ha evolucionado para cumplir una función biológica compleja, fecundar al oocito. Se trata de una célula haploide, producto final del proceso de la gametogénesis en el macho, portadora de la información genética paterna. Las células germinales masculinas reducen el número diploide de cromosomas al comenzar la pubertad, manteniendo los procesos de división y diferenciación de forma cíclica durante toda la vida. La reducción del número de cromosomas a la mitad es necesaria para que tras la fecundación se origine un cigoto diploide, pero además, durante la meiosis se produce el proceso de entrecruzamiento cromosómico y en consecuencia el intercambio genético, lo que supone un incremento en la diversidad genética (Benito, 2010).

Los espermatozoides constituyen aproximadamente el 25% del volumen del eyaculado (semen normal) y lo restante es secreción de tubos y glándulas. Físico-químicamente están integrados por un 86% de agua, sustancias inorgánicas (sodio, potasio, calcio, magnesio, fósforo, etc.), sustancias orgánicas (proteínas, hidratos de carbono, ácido láctico y cítrico, vitaminas, etc.) y otros componentes en menor cuantía.

5.1.1. Morfología del espermatozoide

Los espermatozoides son células altamente diferenciadas de 50 a 80 μm de longitud. Podemos dividir la célula espermática en 2 regiones principales y diferenciadas: la cabeza y el flagelo o cola. Dentro de ellas podemos distinguir varias estructuras, en orden cefálico-caudal serían: en la cabeza, el acrosoma y el núcleo, el cuello, y la cola, con la pieza intermedia, la pieza principal y la pieza terminal (Fig 1). A continuación describiremos cada una de sus partes.

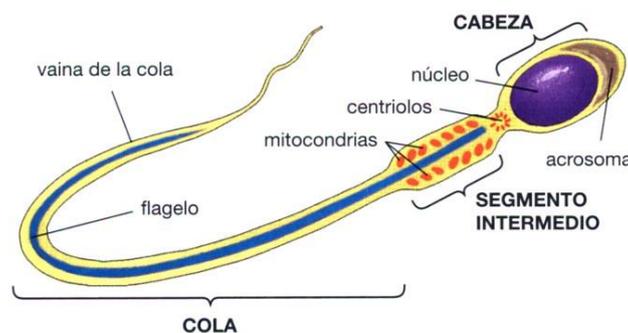


Figura 1: Estructura del espermatozoide (Audesirk et al, 2003)

5.1.1.1.-La cabeza del espermatozoide

Presenta variaciones morfológicas importantes entre las distintas especies. En el caso del toro es ovoide y plana. En cuanto al tamaño también existen considerables diferencias (Bhattacharyya *et al.*, 1982; Eddy *et al.*, 1988). Por ejemplo, la cabeza del espermatozoide de morueco mide 8,7 μm de longitud y 4,6 μm de ancho (Sancho *et al.*, 1998), el de toro mide 8,7-9,7 μm de longitud y 4,6-4,8 μm de ancho (Cummins y Woodwall, 1985), mientras que el espermatozoide humano presenta 5-6 μm de longitud y 2,5-3,5 μm de ancho (WHO, 1999).

Podemos distinguir dos estructuras fundamentales: el acrosoma y el núcleo, además de una pequeña cantidad de estructuras citoesqueléticas, un reducido citoplasma y la membrana plasmática.

Estructuralmente podemos dividir la cabeza en 4 segmentos: apical, pre-ecuatorial, ecuatorial y post-ecuatorial (Fig 2-A).

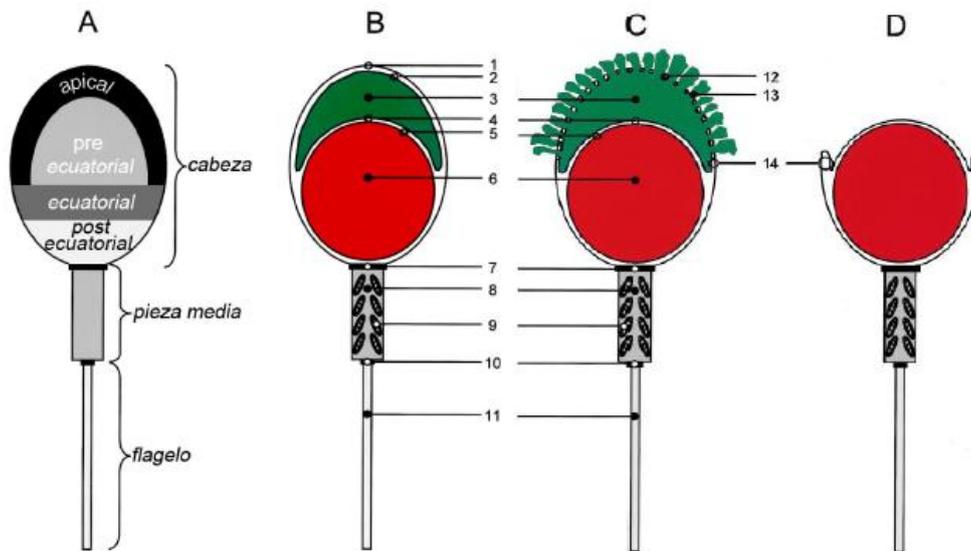


Figura 2: A- División estructural del espermatozoide. B- Corte sagital de la célula espermática: 1. Membrana espermática, 2. Membrana acrosomal externa, 3. Contenido acrosomal, 4. Membrana acrosomal interna, 5. Núcleo celular, 6. Contenido de ADN altamente condensado, 7. Anillo posterior, 8. Pieza media, 9. Mitocondria, 10. Anillo anular, 11. Flagelo, C y D- Reacción acrosomal (Flesch y Gadella, 2000).

El acrosoma cubre aproximadamente los dos primeros tercios de la cabeza del espermatozoide. Se pueden diferenciar tres regiones: la porción más proximal denominada segmento apical, situada por encima del núcleo; la porción principal, conocida como segmento principal; y la región caudal, llamada segmento ecuatorial en la que se produce un abrupto

estrechamiento con una ligera condensación de su contenido. Tiene una membrana interna y una membrana externa que delimitan su contenido (Fig 2-B). Posee diversas enzimas hidrolíticas incluyendo, entre otras, proacrosina, hialuronidasas, esterases e hidrolasas. Estas enzimas son esenciales para la lisis de la zona pelúcida y la penetración de las células que rodean al ovocito. La liberación de estas enzimas al exterior como consecuencia de la fusión de ambas membranas es un proceso conocido como reacción acrosomal (Fig. 2-C, D) (Avilés López, 2011).

El núcleo contiene un número haploide de cromosomas y nucleoproteínas, principalmente protaminas, y en menor cantidad estructuras del citoesqueleto. Todo ello rodeado por la membrana nuclear. Estas proteínas tienen funciones estructurales y enzimáticas. La cromatina espermática se encuentra altamente compactada, ocupando menos espacio que en las células somáticas, de forma que el empaquetamiento del ADN con las proteínas nucleares es tan estrecho que la transcripción resulta casi imposible. Durante la espermiogénesis ocurre una remodelación que conlleva a la producción de una célula altamente especializada pero con un núcleo transcripcionalmente inactivo y con la totalidad del citoplasma encapsulado en forma de cuerpo residual. Durante este proceso se produce una condensación progresiva de la cromatina que está asociada a modificaciones químicas en el ADN y proteínas nucleares, con una sustitución de las histonas por protaminas, proteínas pequeñas ricas en cisteína. Durante el tránsito epididimario se estabiliza este mecanismo de condensación con el incremento de puentes disulfuro a partir de los grupos tiol de los residuos de cisteína. La condensación de la cromatina disminuye el volumen del núcleo facilitando así la movilidad del espermatozoide y es fundamental para proteger el material genético del gameto masculino durante su exposición a ambientes agresivos como pueda ser la elevada acidez del tracto reproductor femenino. Cuando se ha producido la penetración del ovocito, el espermatozoide debe descondensar su cromatina para formar el pronúcleo masculino, reduciendo, como requisito, las uniones disulfuro del núcleo espermático. La capacidad fecundante del espermatozoide dependerá, entre otros factores, de la adecuada sucesión de estos tres eventos: condensación de la cromatina durante la espermatogénesis, estabilización durante la maduración espermática y descondensación dentro del ovocito para su fecundación. Cualquier daño del núcleo, dada su inercia metabólica sería imposible de reparar, lo que llevaría a una caída de la fertilidad (Sakkas *et al.*, 1995).

5.1.1.2.- El flagelo del espermatozoide

El flagelo o cola comprende cuatro regiones principales: el cuello, la pieza intermedia, y los segmentos principal y terminal (Fig 2).

El cuello es la región del espermatozoide que une la cabeza con el flagelo. Es una zona frágil y estructuralmente compleja en la que se diferencia la pieza de conexión, los centriolos y algunas mitocondrias.

La pieza intermedia se encuentra a continuación del cuello. Está caracterizada por la presencia de una gran cantidad de mitocondrias concentradas en una vaina helicoidal que rodea al complejo axonema y las fibras densas. El axonema consiste en un par de microtúbulos únicos que están rodeados por un paquete cilíndrico de dobles microtúbulos dispuestos uniformemente. Dicha estructura se conoce ordinariamente con la fórmula $9 + 2$ y se prolonga distalmente a lo largo de toda la cola hasta casi la punta de la pieza terminal. Se considera que el componente motor del flagelo es el axonema y las fibras densas, debido a su composición de proteínas ricas en cisteína, que presentan grupos sulfhidrilo (-SH) lo que da lugar a la formación de puentes disulfuro (-S-S-) durante la maduración espermática y que podrían conferir propiedades elásticas y facilitar así la propagación del movimiento ondulatorio a través del flagelo (Soler *et al.*, 1994). La pieza intermedia se caracteriza por presentar bajo la membrana plasmática, una vaina de mitocondrias orientadas circularmente y dispuestas helicoidalmente. Las mitocondrias son las encargadas de producir la energía necesaria que requiere el movimiento espermático. La parte caudal de la vaina mitocondrial es denominada anillo de Jensen, e indica la barrera entre pieza media y la pieza principal.

La pieza principal está constituida por vainas fibrosas, el citoesqueleto que rodea el axonema y las fibras densas del exterior. Su función principal es la de proporcionar movilidad al espermatozoide (Pesch y Bergmann, 2006).

Por último, la pieza terminal es la parte distal de la vaina fibrosa. Esta contiene únicamente el axonema central cubierto por la membrana plasmática.

5.1.1.3.-Membrana plasmática

La membrana plasmática, o plasmalema, es esencial para la función de los espermatozoides. Esta delicada e inestable capa proporciona protección física a la célula, actúa como una barrera selectiva para el paso de sustancias, y desempeña un papel fundamental en

las interacciones con otras células, como las células epiteliales en el tracto genital de la hembra y los oocitos.

Está situada externamente a la cabeza y flagelo del espermatozoide y responde al modelo de mosaico fluido (Singer y Nicholson, 1972), compuesta por proteínas integradas en una bicapa de fosfolípidos. En su composición química, además presenta moléculas de colesterol, que juegan un papel determinante como sustancias moduladoras de la fluidez de membrana. Los ácidos grasos y los glicolípidos son poco abundantes. En las membranas espermáticas de mamíferos, la cantidad de proteínas es casi la misma que la de lípidos totales. Una característica única de la membrana plasmática del espermatozoide es la presencia de dominios, regiones perfectamente definidas en las que varía su composición y función. En los mamíferos los principales dominios se encuentran en la cabeza, en la región acrosomal y en la región postacrosomal (parte posterior de la cabeza y pieza conectiva). La región acrosomal (parte anterior de la cabeza), a su vez se subdivide en tres dominios para los segmentos apical, principal y ecuatorial. Los segmentos apical y principal juntos suelen referirse como “capuchón acrosomal”.

5.2.-Espermiograma

Durante mucho tiempo se ha realizado un análisis rutinario del semen como única herramienta para valorar los eyaculados (Chan *et al.*, 1985). En este examen rutinario se incluye la valoración del número de células presentes en el eyaculado, el estudio de la motilidad y su morfología. Se caracteriza por la utilización de una serie de técnicas de simple ejecución, con un coste relativamente bajo y basado en una evaluación subjetiva, que ha permitido su amplia difusión en los centros de inseminación artificial. Por contra, presenta unas tasas de correlación con la fertilidad generalmente bajas (McClure y Tom, 1991) y dificulta la reproducibilidad satisfactoria tanto intra- como entre- técnicos. Por ello se han desarrollado los sistemas de análisis de semen asistido por ordenador (CASA, computer assisted sperm analysis); (Davis *et al.*, 1992; Kruger *et al.*, 1993). Los sistemas CASA proporcionan una serie de parámetros de movilidad y morfométricos objetivos que facilitan la estandarización de la evaluación del espermatozoide. Los principales limitantes de esta técnica son que requiere mucho tiempo en lo referente a la evaluación morfométrica y que el coste es mayor. Estos sistemas constan de varias unidades interdependientes: un microscopio conectado a una cámara de vídeo, que envía la imagen desde el microscopio a un ordenador, donde un analizador digital de imagen captura varias fotografías seriadas de cada campo microscópico seleccionado, normalmente en menos de 1 segundo.

5.2.1.- Estudio del volumen y concentración espermática

La determinación del volumen se realiza inmediatamente después de su recogida, valorándolo directamente en el tubo colector (graduado en escala de 0,1 ml), evitando el error producido al pasar el eyaculado de un recipiente a otro para su valoración (Maxwell y Evans, 1990). La determinación precisa del volumen de un eyaculado es imprescindible para determinar el número total de espermatozoides contenido en el mismo. El volumen de un eyaculado de toro es de 4-8 ml y tiene una concentración espermática de entre 1500-2500 millones de espermatozoides/ml.

La posibilidad de estudiar adecuadamente la concentración espermática es un importante factor en el campo de la inseminación artificial. Podemos encontrar grandes diferencias de concentración entre un eyaculado y otro, siendo importante conocer el número de espermatozoides que existe en cada uno de ellos.

Las técnicas más utilizadas son el recuento en cámaras hemocitométricas y la utilización de espectrofotómetros (Quintero, 2003) ya que los contadores de partículas, los métodos fluorométricos y los sistemas de análisis de semen asistidos por ordenador son más complejos.

El recuento en cámara es el más utilizado por su bajo coste y su alta precisión, ya que se realiza una medición directa del número de espermatozoides presentes en una cámara de volumen conocido. Tradicionalmente, la cámara de Neubauer ha sido la más utilizada ya que está recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), aunque se producen variaciones debido a distribuciones no homogéneas de las células dentro de la cámara y a imprecisiones en el proceso de dilución (Woelders, 1991). Para aumentar la precisión del procedimiento y la reproducibilidad de los resultados se han creado nuevas cámaras que utilizan la muestra sin diluir (Cardona Maya *et al.*, 2008), como la cámara Makler® (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel), Microcell (Concepcion Technologies, Natick, MA, EE.UU.), Horwell® (Horwell Ltd, Londres, Reino Unido), Blaubrand®, Bürker®, ISAS® y Cámara de recuento Leja®, para determinar la concentración de espermatozoides.

La determinación de la concentración espermática mediante espectrofotometría es un método rápido y de fácil uso que se ha extendido en centros de inseminación artificial donde procesan un gran número de muestras. También podemos encontrar otros métodos como el contador de partículas y las técnicas de análisis automatizados de imagen que permiten medir muy rápidamente un gran número de partículas por unidad de volumen (Gadea, 1997).

5.2.2.-Estudio de la movilidad

El estudio de la movilidad de los espermatozoides es un importante indicador de la viabilidad celular, de la integridad de la membrana y de la funcionalidad del metabolismo intracelular. Para Shanis *et al.*, (1989) es uno de los parámetros que mejor se correlaciona con la fertilidad.

Tradicionalmente se viene haciendo una observación microscópica de una muestra y se cuenta el porcentaje del número de células que están en movimiento, en función del tipo de movimiento que presente cada una de ellas. Dado que se trata de una estimación subjetiva se han desarrollado otras técnicas, siendo hoy en día los analizadores de imágenes por ordenador los más utilizados. El software discrimina a los espermatozoides de otras partículas que puedan aparecer en la imagen por su tamaño, y analiza la trayectoria recorrida por cada espermatozoide individual durante esa fracción de segundo (Muiño, 2007). Se basan en numerosos parámetros para clasificar el movimiento de los espermatozoides en 4 categorías: a) movilidad progresiva rápida, b) movilidad progresiva lenta o lineal, c) movilidad no progresiva y d) espermatozoides inmóviles (Padrón *et al.*, 1998).

5.2.3.- Estudio de la viabilidad espermática

El estudio de la viabilidad espermática normalmente se basa en el análisis de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides, mediante el uso de dos fluorocromos combinados: uno de ellos sólo es capaz de atravesar las membranas plasmáticas dañadas o degeneradas, y por tanto permite identificar a las células muertas o en proceso de degeneración, mientras que el otro es capaz de atravesar membranas celulares intactas y por tanto permite identificar la población de células viables (Garner *et al.*, 1997).

Para identificar las células muertas se utiliza una sustancia que es impermeable a la membrana plasmática y que tiene afinidad por el ADN presente en el núcleo del espermatozoide, por lo que únicamente se verán teñidos aquellos espermatozoides con la membrana estructuralmente dañada. Uno de los fluorocromos más utilizados es el Ioduro de propidio (IP), pero también podemos encontrar otros marcadores fluorescentes con acción similar como por ejemplo, el Hoeschst 33258 (Pintado *et al.*, 2000) o el bromuro de etidio (Evenson *et al.*, 1982), que tiñen el núcleo de las células alteradas.

En el caso de identificar células vivas será necesaria la utilización de sustancias permeables. Entre los fluorocromos más utilizados encontramos: el diacetato de carboxifluoresceína (CFDA); compuesto no fluorescente capaz de atravesar membranas

celulares intactas. En el interior de las células, debido a la acción de esterazas se convierte en carboxifluoresceína, emitiendo fluorescencia verde en células con membranas celulares intactas; el SYBR-14, capaz de atravesar membranas intactas y unirse al ADN de los espermatozoides, lo que supone que toda partícula que no contenga dicho material no se marcará., el Hoeschst 33258 para identificar células vivas y la naranja de acridina (AO) que reacciona con el ADN de la célula tiñendo de verde las células en fase de división activa (Garner *et al.*, 1988).

La detección de esta fluorescencia se realiza mediante la utilización de técnicas de citometría de flujo (Garner *et al.*, 1986), o bien mediante la observación directa en el microscopio de fluorescencia después de haber fijado la muestra espermática con una pequeña concentración de formaldehído (Harrison y Vickers, 1990) o sin necesidad de fijación (Althouse y Hopkins, 1995). La introducción de los sistemas CASA, nombrados anteriormente, en los análisis rutinarios de semen, ha permitido su adaptación para los análisis de la integridad de la membrana espermática.

5.3.-Estudio de la morfología espermática

Para que un espermatozoide sea viable, aparte de tener una movilidad correcta es necesario que sea morfológicamente normal. Los espermatozoides con una morfología anormal estarán en desventaja con respecto al resto. A medida que aparecen anomalías que afecten a cualquier parámetro del espermatozoide dificulta en mayor o menor medida su unión al ovocito. Por tanto la fertilidad disminuye a medida que aumentan las formas anormales en el eyaculado.

Entre las anomalías más comunes asociadas con fertilidad reducida podemos encontrar cabezas anormales, espermatozoides decapitados, anormalidades de la pieza intermedia y colas dobladas o enrolladas en espiral, así como determinadas anomalías heredables (Dresdner y Katz, 1981) (Fig 3). La clasificación más interesante podría ser la división entre anomalías mayores (originadas en el testículo) o anomalías menores (originadas tras la eyaculación) haciendo referencia a la alteración de la funcionalidad que éstas producen. Cualquier anomalía, mayor o menor, si afecta a un número elevado de espermatozoides, puede llegar a comprometer la fertilidad del semen.

Otra anomalía relativamente frecuente son los espermatozoides con la cabeza de forma piriforme. Los espermatozoides con este defecto presentan menor capacidad de unión y de penetración de la zona pelúcida, y si consiguen fecundar a algún ovocito, los cigotos

resultantes tenían menor capacidad para iniciar su desarrollo y degeneraban a las pocas horas (Thundathil *et al.*, 1999).



Figura 3: Representación gráfica de las principales anomalías espermáticas

5.4.-Estudio de la morfometría espermática

La introducción de los sistemas CASMA (Computer-Assisted Sperm Morphometry Analysis) en el mercado ha sido un gran avance para acabar con la subjetividad de los análisis morfológicos ya que han conseguido realizar análisis objetivos y precisos, consiguiendo resultados fiables y su consecuente repetitividad entre laboratorios. Es interesante disponer de estos datos morfométricos para intentar mejorar la capacidad fecundante in vivo de las dosis seminales, puesto que se ha comprobado que la morfometría anormal de las cabezas espermáticas influye negativamente en la fertilidad de los sementales bovinos (Gravance *et al.*, 1996).

Las nuevas tecnologías de análisis por imagen permiten estudiar de forma individualizada las características de los espermatozoides, lo que ha permitido vislumbrar la heterogeneidad celular existente tanto entre los eyaculados de mamíferos como entre sus individuos. La tecnología de análisis por imagen de la morfometría espermática ha

permitido evidenciar, entre otras, diferencias sutiles entre eyaculados o individuos que son imposibles de detectar mediante los métodos tradicionales de observación al microscopio. En este sentido, estudios previos han observado diferencias en las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides entre machos fértiles y subfértiles (Casey *et al.*, 1997).

El análisis morfométrico también se ha empleado para valorar el efecto de la congelación-descongelación sobre las dimensiones espermáticas (Gravance *et al.*, 1995), llegándose a postular que las diferencias morfométricas observadas puedan servir como indicadores de la capacidad para congelar de individuos o de eyaculados concretos.

En el análisis morfométrico, los parámetros que se suelen medir en la cabeza del espermatozoide son el área (A, en μm^2 , como la suma de toda el área de píxeles contenidos dentro de los límites), el perímetro (P, en μm , como la suma de las fronteras exteriores), la anchura (W) y la longitud (L) (en μm , los valores máximo y mínimo, respectivamente, de los diámetros de la núcleo, es decir, la proyección del núcleo del espermatozoide en el eje horizontal, medido en ángulo de rotación de 0, 30, 60, 90, 120 y 150 grados, longitud y anchura no son necesariamente ortogonales) (Fig 4), que se denominan parámetros primarios. Además, con estas cuatro parámetros obtienen otros cuatro derivados de estos que también son de interés para este tipo de análisis: la elipticidad (L / W , grado de circularidad), rugosidad ($4\pi A/P^2$, estrías del borde del núcleo espermático), elongación ($[(L - W) / (L + W)]$, proporción entre la longitud y la anchura, alargamiento), y regularidad ($\pi L W / 4 A$, uniformidad) (Fig 4), denominados parámetros secundarios.

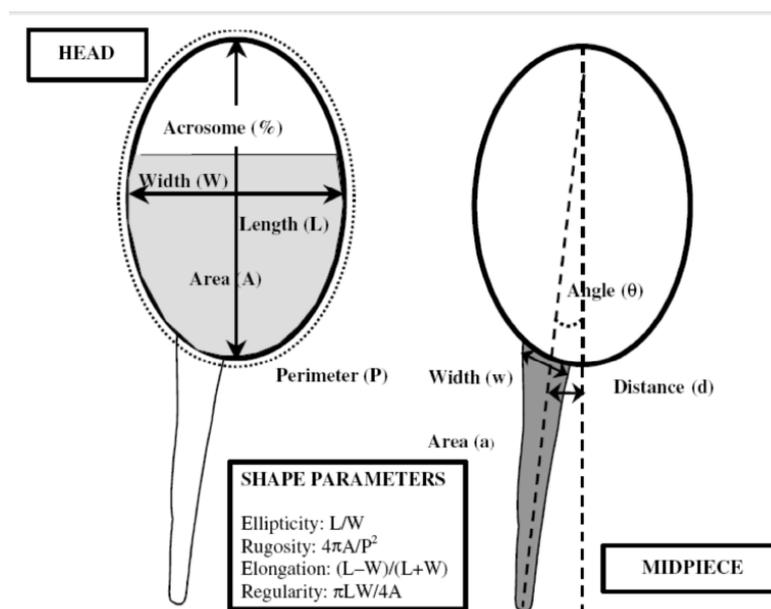


Figura 4: Parámetros morfométricos medidos en este estudio

Estos parámetros morfométricos pueden verse afectados por distintos factores, como por ejemplo, procesos de centrifugación, diferencias de tamaño entre espermatozoides vivos y muertos y entre espermatozoides X e Y.

5.4.1.-Factores que afectan a la morfometría

A la hora de hacer un análisis morfométrico se han encontrado algunos problemas en relación a la preparación y tinción de muestras así como con el análisis morfológico (Boersma, 1999 y 2001; Davis, 1993 y 1994). Ball y Mohammed, 1995; comprobaron que el secado y fijación provocan una reducción del 20% de longitud y de un 13% de anchura en el espermatozoide de caballo. Por otro lado el método ASMA ha permitido observar una reducción de tamaño de las cabezas en la especie bovina tras su criopreservación (Gravance, 1991). Algunos estudios hablan también de la diferencia del tamaño de la cabeza entre espermatozoides X e Y en especie bovina (Van Munster, 1999).

Los parámetros morfométricos también pueden verse afectados al recibir determinados tratamientos, por ejemplo la centrifugación, muy utilizada para realizar lavados en las muestras. Tras someter la muestra a un proceso de centrifugación de larga duración se produce un efecto deletéreo sobre el ADN incluso en los casos de tratamientos más agresivos una degradación de la membrana plasmática (Urrego, 2008). También podemos encontrar diferencias morfométricas entre espermatozoides vivos y muertos, ya que los espermatozoides muertos presentar un menor tamaño de la cabeza debido como consecuencia de la degradación de su membrana plasmática (Marco-Jiménez, 2006).

Las diferencias entre espermatozoides X e Y pueden aprovecharse por ejemplo para determinar la predeterminación del sexo de la descendencia mediante separación espermática, ya que agrupa a todos aquellos métodos que se basan en diferencias existentes entre los espermatozoides X y los Y (Parrilla, 2005). Se han propuesto numerosos métodos en los últimos años para la separación de espermatozoides X e Y (Tabla 1). Sin embargo, las experiencias realizadas por Johnson, 1988; para comprobar la efectividad de estas técnicas demostraron que ni los métodos basados en las diferencias físicas entre los espermatozoides portadores del cromosoma X y los portadores del cromosoma Y, ni aquellos que se apoyaban en las diferencias existentes en la superficie espermática presentaban una efectividad aceptable.

Tabla 2: Diferencias existentes entre espermatozoides X e Y, utilizadas por diferentes autores como base para la separación espermática (Adaptación de Parrilla, 2003).

Parámetro	Diferencia entre X e Y	Referencia
DNA	Mayor contenido de DNA en el espermatozoide X	Pinkel <i>et al.</i> , 1982 Moruzzi, 1979 Johnson <i>et al.</i> , 1989 Johnson, 1991 Cran <i>et al.</i> , 1995
Tamaño	Mayor tamaño del espermatozoide X	Cui y Mathew, 1993 Van Munster <i>et al.</i> , 1999a Van Munster <i>et al.</i> , 1999b Van Munster, 2002
Motilidad	Mayor rapidez del espermatozoide Y	Ericsson <i>et al.</i> , 1973 Ericsson, 1999 Ollero <i>et al.</i> , 2000
Carga superficial	Espermatozoides portadores del cromosoma X migran al cátodo	Kiddy y Hafs, 197; Kaneko <i>et al.</i> , 1984 Mohri <i>et al.</i> , 1987
Superficie del espermatozoide	Existencia del antígeno H-Y en espermatozoides portadores del cromosoma Y Presencia de una proteína específica del sexo (sex specific protein, SSPs)	Hendriksen <i>et al.</i> , 1993 Hoppe y Koo, 1984 Howes <i>et al.</i> , 1997 Hendriksen <i>et al.</i> , 1996
F-body	Brazo largo del cromosoma Y	Barlow and Vosa (1970)

Sin embargo, según Johnson, 2000; el método idóneo para predeterminar el sexo de la descendencia consistiría en separar los espermatozoides según su carga cromosómica sexual. El método más utilizado hoy en día para dicha separación por ser el más fiable y eficaz, aunque el más costoso, es el basado en la citometría de flujo (Chandler, 1999). Su principal objetivo es obtener espermatozoides separados en poblaciones X e Y manteniendo su viabilidad el máximo tiempo posible para garantizar la fecundación.

5.4.1.1.-Citometría de flujo

Esta separación está basada en la distinta cantidad de ADN que presentan los espermatozoides con dotación cromosómica X e Y, y en que, tras su tinción, el ADN de una célula emite una cantidad de fluorescencia proporcional a su contenido (Pinkel *et al.*, 1982; Seidel y Johnson, 1999; Vázquez y col, 2001). En el caso del toro, el espermatozoide X contiene en torno al 4 % más ADN que el Y (Garner, 2006). El procedimiento de separación de espermatozoides X e Y se puede dividir en 3 fases diferentes:

- 1.-Preparación y tinción de la muestra
- 2.-Análisis de la muestra y discriminación de las poblaciones de espermatozoides X e Y
- 3.-Separación de los espermatozoides X e Y

Los componentes básicos de un citómetro son el circuito de admisión de la muestra, el haz de luz láser que excitará el fluorocromo, la cámara de flujo o lugar de encuentro entre la célula y el láser, y el bloque óptico cuyo objetivo es el de recoger la fluorescencia emitida por la célula y de este modo poder cuantificar esa emisión y analizar la célula en función de la misma. Los resultados de fluorescencia obtenidos son analizados mediante diferentes programas informáticos y son representados en forma de poblaciones obedeciendo a sus características de fluorescencia (Shapiro, 2003) (Fig 5).

Debido a la variabilidad en los resultados para obtener una muestra sexada con un determinado porcentaje de espermatozoides X o Y, es necesario desarrollar métodos eficientes y precisos para verificar el sexaje para su posterior comercialización. Una de las herramientas más utilizadas en los últimos años para determinar si una muestra está sexada correctamente es la hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

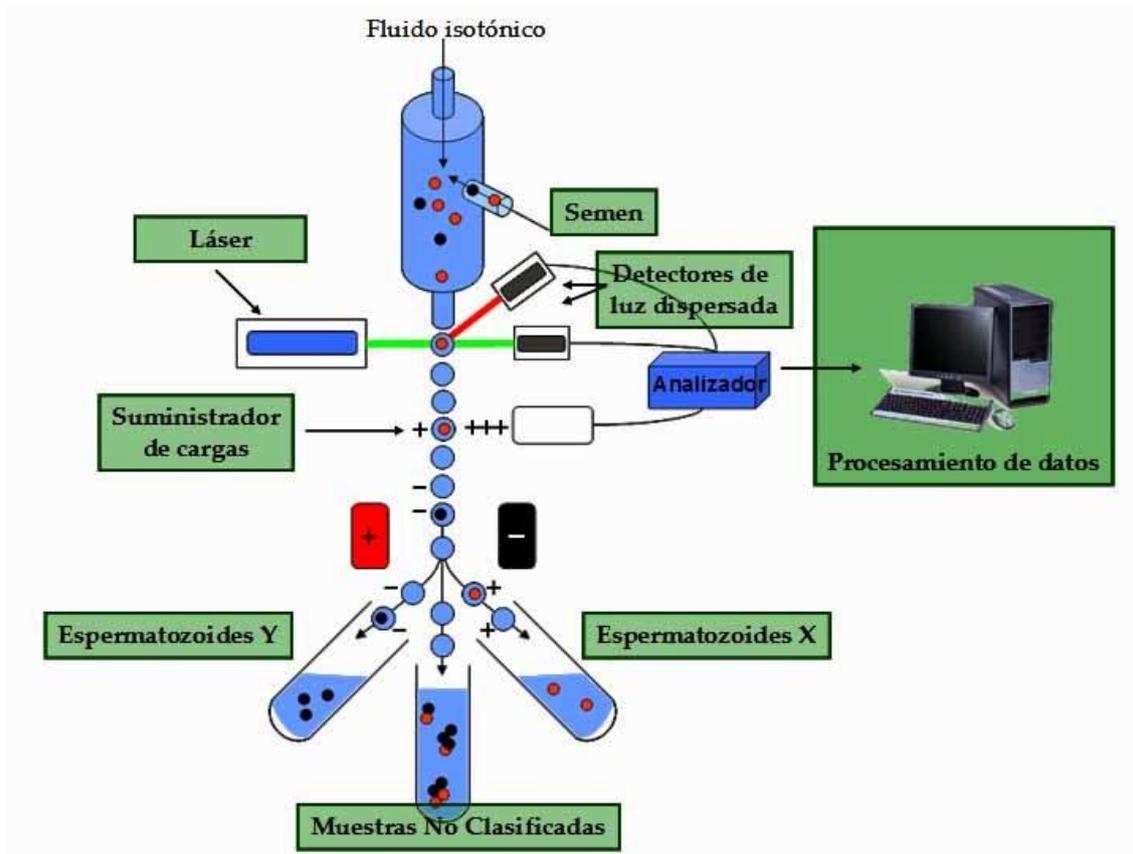


Figura 5: Esquema general del citómetro de flujo

5.4.1.2.-Hibridación fluorescente in situ (FISH)

En los últimos años esta técnica se ha convertido en la herramienta más importante para los análisis citogenéticos de las regiones cromosómicas (anomalías estructurales, mapeo de genes, evolución cromosómica), el sexaje de espermatozoides o embriones, la investigación de la expresión génica en tejidos morfológicamente conservados, etc. La hibridación *in situ* permite la localización de una secuencia de ADN (o ARN) mediante la hibridación de una sonda complementaria previamente marcada con fluorescencia (Rèvay, 2003). Se puede utilizar para la identificación y caracterización de los cromosomas o segmentos de cromosomas. También podemos examinar la organización del genoma. Además la hibridación *in situ* muestra reordenamientos cromosómicos y cambios en las secuencias ocurridos a lo largo de la evolución, del desarrollo del organismo o de una enfermedad. La técnica FISH ha sido utilizada para la detección de defectos genéticos, tales como enfermedades.

Pero una de las mayores ventajas que ofrece este método es la posibilidad de cuantificar el número concreto de espermatozoides X o Y que hay en una muestra (Welch y

Johnson, 1999), por tanto puede ser un método interesante para posteriormente estudiar las diferencias entre ambos tipos de espermatozoide.

En esta técnica aprovecha la capacidad de los ácidos nucleicos del ADN para des- y renaturalizarse. El proceso se basa en realizar las preparaciones sobre portaobjetos tratados con fijadores para preservar las características morfológicas del cromosoma aunque también pueden ser células, núcleos o ADN puro, todos ellos reciben el nombre de ADN diana. Se marca la sonda de ADN por ejemplo con un fluorocromo. Será necesario desnaturalizar el ADN para permitir la hibridación con la sonda por lo que el siguiente paso será la desnaturalización de ambas. Posteriormente se produce la hibridación de la sonda de ADN diana y de ADN marcada. Se realizarán lavados y se observará al microscopio de fluorescencia (Fig 6).

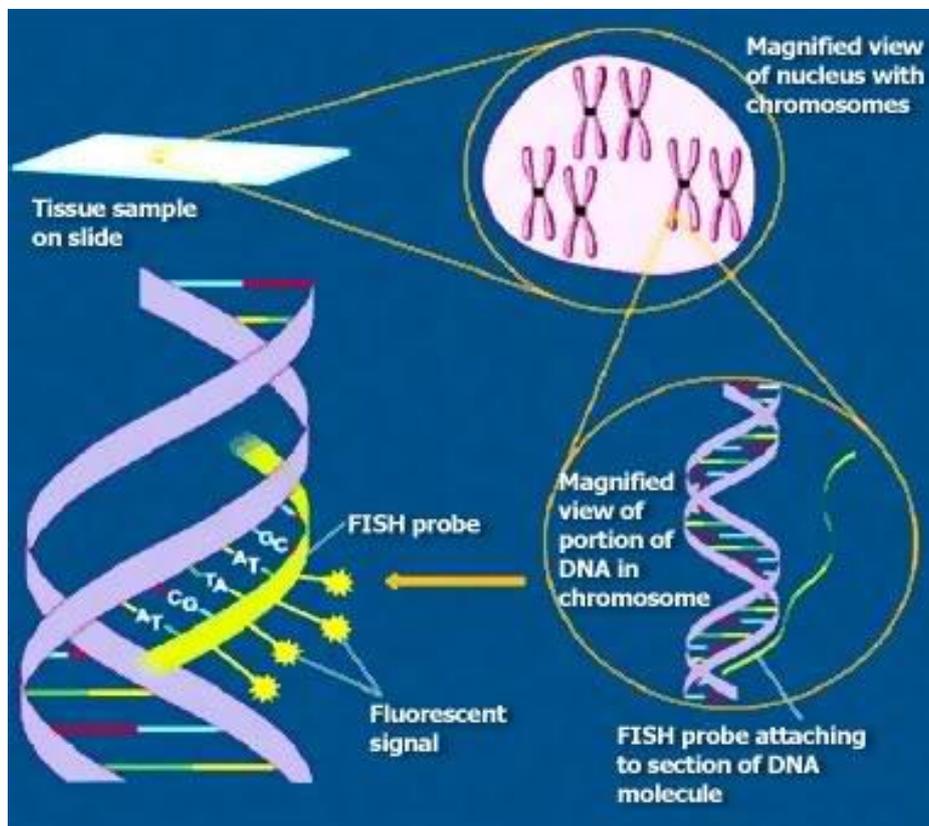


Figura 6: Esquema de la hibridación fluorescente *in situ*.

MATERIAL Y MÉTODOS

6.-MATERIAL Y MÉTODOS

6.1.-Reactivos

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

6.2.-Recogida y obtención del semen

Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con el reglamento de Protección Animal Español RD223/1988, cumpliendo con el Reglamento de la Unión Europea 86/609.

Se trabajó con la especie bovina. Para el primer ensayo se analizaron 10 toros, para el ensayo 2 se analizaron 5, mientras que para el tercer ensayo, en el primer apartado se analizaron 8 machos y en el segundo apartado 4 machos. Las dosis seminales utilizadas se enviaron al laboratorio de la Escuela Politécnica Superior de Huesca fraccionadas en forma de pajuelas de 0,25ml o 0,5ml procedentes de diferentes centros de inseminación. En todos ellos la extracción se realizó mediante vagina artificial en machos de la raza Frisona, que se alimentaron con una dieta estándar y siguieron un manejo regular de extracciones seminales.

6.3.- Manipulación del semen

Anterior al análisis de la morfometría se procedía a comprobar el estado de las muestras para homogeneizarlas mediante la medición de la concentración y la movilidad.

Las pajuelas se sumergían 30 segundos en agua a 37°C para su descongelación para posteriormente realizar una centrifugación (solo en los casos en los que era necesario como explicaremos más adelante) a 1500g, durante 7 minutos y a 20°C, obteniendo el pellet.

Se incubaron en la estufa a 37°C 995 µl de un diluyente basado en TRIS a los que se añadió 5 µl de formaldehído y 5 µl de semen. Se vertió una gota de 10 µl en una cámara Makler (Fig 7) y se observó al microscopio x100 (Olympus BX40, Olympus Optical Co., Ltd., Japón). Se tomaron 8 imágenes de campos diferentes utilizando un analizador de esperma asistido por ordenador (CASA, ISAS[®], Versión 1.0, PROISER, Valencia, España) (Fig 8), con el módulo de concentración utilizando el objetivo de fases negativo (10/x0,30), anotando el valor de la concentración resultante. En todos los casos la concentración medida era la adecuada para los posteriores análisis que se iban a realizar.

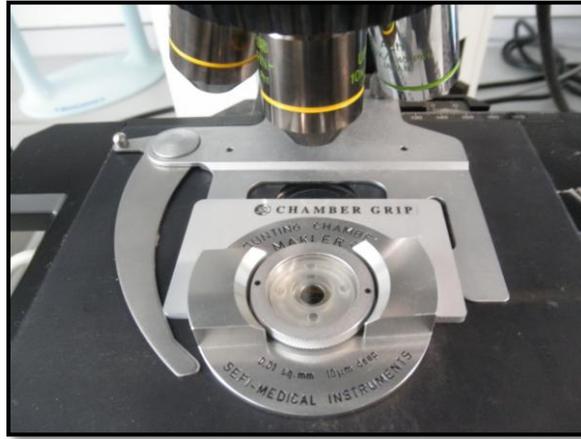


Figura 7: Cámara Makler en posición para su visionado al microscopio.

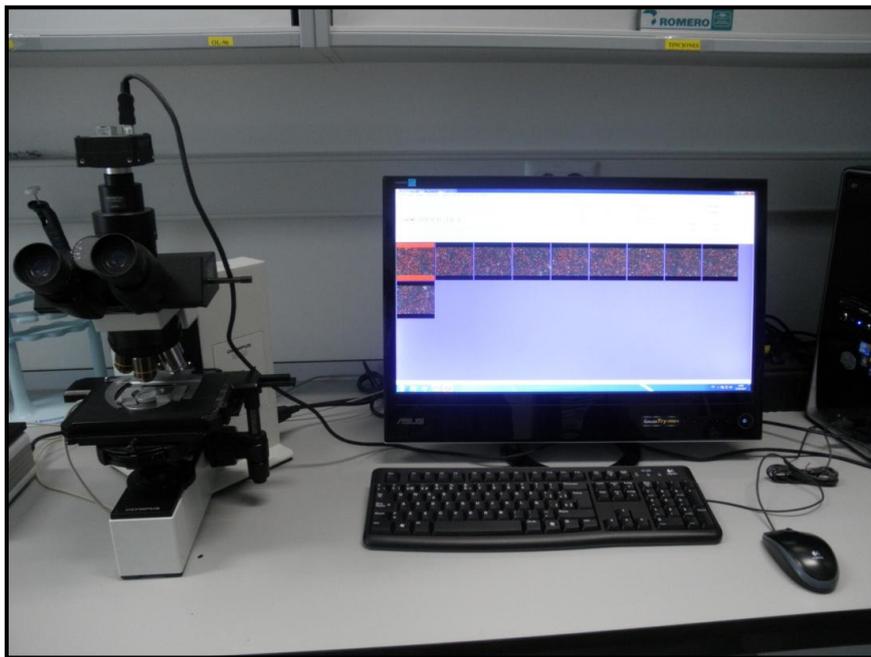


Figura 8: Sistema CASA, microscopio óptico conectado a una cámara que a su vez se controla por un software de análisis de imágenes en el ordenador.

6.3.1.-Movilidad espermática

De la muestra de semen se colocaron dos gotas de 5 μ l en un portaobjetos y se cubrieron con dos cubreobjetos, siempre con la máxima rapidez y se observaron al microscopio óptico (Olympus BX40) con una pletina térmica. Utilizamos un objetivo de fases negativas a 100x. Mediante el programa ISAS (ISAS [®], Versión 1.0, PROISER, Valencia, España) con el módulo de movilidad, 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 movilidad mínima del 60%.

Después de seleccionar las muestras válidas se procedió a la preparación de las muestras para su posterior análisis morfométrico.

6.4.- Preparación de las muestras para su evaluación morfométrica

Se prepararon 5 tratamientos diferentes siendo 3 de ellos en fresco y 2 en frotis.

6.4.1.-Fresco

Para el análisis en fresco, se descongelaron las pajuelas como se ha indicado anteriormente y se realizaron 3 tratamientos.

6.4.1.1.- Tratamiento Fresco-1: Marcaje con H342 + IP

Se tomaron en un eppendorf, 25 μ l de semen, diluidos en 25 μ l de diluyente TRIS, 5 μ l de H342 (Hoechts 33342, marcador fluorescente con afinidad específica por el ADN que permite marcar todos los espermatozoides de cualquier especie de manera semejante, de un color azul) y 5 μ l de IP (Ioduro de Propidio, marcador fluorescente que marca solo los espermatozoides dañados de un color rojo). Se incubaron a 37°C durante 20 minutos.

6.4.1.2.- Tratamiento Fresco-2: Marcaje con H342

En este caso, se añadieron a un eppendorf, 25 μ l de semen, diluidos en 25 μ l de diluyente TRIS, y 5 μ l de H342 y se incubaron también 20 minutos en estufa a 37°C.

6.4.1.3.- Tratamiento Fresco-3: Marcaje con IP

Las muestras de semen se dejaron a temperatura ambiente durante dos días como mínimo para producir la muerte de los espermatozoides, posteriormente se tomaron 25 μ l de estas muestras y se diluyeron en 25 μ l de diluyente TRIS con 5 μ l de I.P. Se depositaron 2 gotas de 5 μ l en un porta, se tapó con cubres y se observó al microscopio.

6.4.2.- Frotis

Se prepararon 2 frotis de cada macho. En un portaobjetos se extendía una gota de 5 μ l de semen dejando secar como mínimo 24 horas y resguardado de la luz solar. Posteriormente se realizaron dos tratamientos distintos.

6.4.2.1.- Tratamiento Frotis-1: Marcaje con H342

Se sumergió el frotis ya secado en un recipiente que contenía 2% de glutaraldehído en PBS durante 3 minutos. Se preparó una solución que contenía 20 µl de H342 diluidos en 480 µl de diluyente TRIS. Una vez secados los frotis, se añadieron 2 gotas de esta solución y se dejaron incubar 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

6.4.2.2.-Tratamiento Frotis-2: Marcaje con IP

El frotis se sumergió en un recipiente que contenía 2% de glutaraldehído en PBS durante 15 minutos. Se prepararon 5 µl de IP en 100 µl de diluyente TRIS. Tras secar los frotis se añadieron 2 gotas de esta solución dejando incubar 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente.

Las muestras preparadas tanto en fresco como en frotis fueron evaluadas al microscopio de fluorescencia.

6.5.- Imagen de fluorescencia y CASMA

Las imágenes digitalizadas de los espermatozoides marcados con fluorescencia se registraron en una instalación compuesta por un microscopio de epifluorescencia (DM4500B, Leica, Alemania), con un objetivo de 63x plan de apocromáticos y los juegos de filtros apropiados, y se fotografiaron con una cámara Canon Eos 400D digital. La cámara se controlaba mediante un ordenador con el programa DSLR Remote Pro software (Breeze Systems) (Fig 9).

Se observó que el tamaño de los núcleos de los espermatozoides obtenidos por microscopía de epifluorescencia puede ser alterado mediante la modificación de la intensidad de fluorescencia. Para evitar esta variación, antes de iniciar la captura de las imágenes para cada muestra, algunas fotografías fueron tomadas y procesadas mediante el software Image J libre (versión 1.44h, disponibles en línea en <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) para determinar la intensidad de fluorescencia en la cabeza del espermatozoide. Esta intensidad se ajustó, cuando fue necesario, modificando el tiempo de exposición de la cámara o la intensidad de la lámpara, a 80-120% del estándar de fluorescencia.

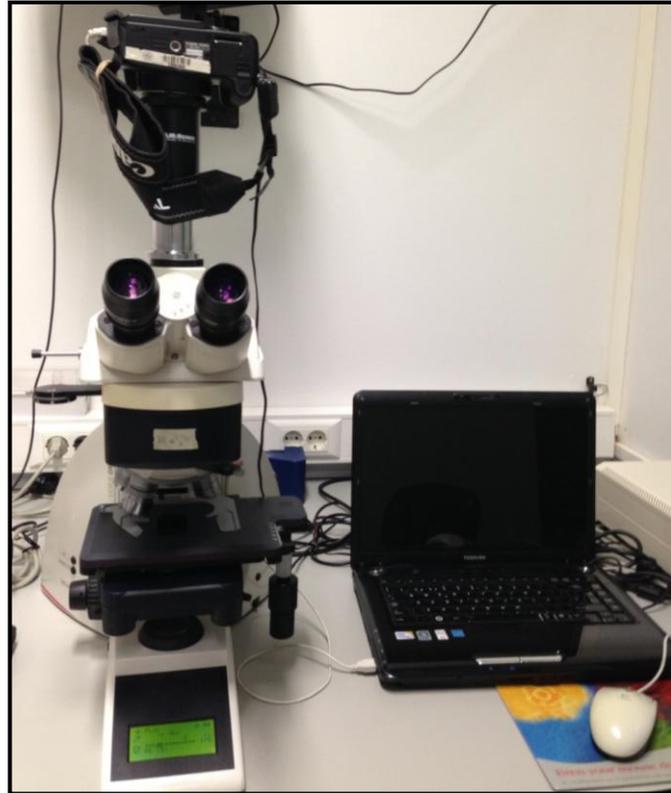


Figura 9: Microscopio de epifluorescencia (DM4500B, Leica, Alemania), al que va acoplado una cámara Canon Eos 400D digital que se controlaba mediante un ordenador con el programa DSLR Remote Pro software (Sistemas de Breeze).

De cada imagen, las cabezas de los espermatozoides se capturaron automáticamente y se analizaron con el programa Image J, con un macro creado para este fin. En cada macro queda definido el método de valor umbral (Thersholding Methods), los pixeles y valores máximos y mínimos a los que se va a trabajar.

Los espermatozoides se mostraron en el monitor con un brillo equivalente para todas las mediciones. Las cabezas de los espermatozoides que no se superponen y los espermatozoides que no presentaban anomalías fueron los que se consideraron para el análisis. De cada tratamiento se capturaron y analizaron 200 cabezas.

6.6.- Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

La Hibridación Fluorescente *In situ* (FISH) consiste en la unión específica de una sonda de ADN marcada con fluorescencia y cuya secuencia es complementaria con una región diana

del ADN de una célula. En este caso se marcaron los cromosomas X e Y de los espermatozoides para posteriormente realizar un análisis morfométrico.

6.6.1.-Preparación de muestras espermáticas

Las pajuelas se descongelaron sumergiéndolas al baño maría a 37°C durante 30 segundos para las de 0,25 ml y durante 60 segundos para las de 0,5 ml.

Posteriormente se realizaron tres lavados en tubos de 15 ml que contenían 10 ml de PBS (solución tampón o buffer, sin Ca-Mg) y EDTA (agente quelante) y se centrifugaron durante 10 minutos a 2000g. En cada uno de los lavados se eliminó rápidamente el sobrenadante mediante volcado. En el último lavado se retiró el sobrenadante con pipeta dejando sólo el pellet con algo de sobrenadante.

Se fijaron las muestras resuspendiéndolas en 1 ml de fijador de Carnoy (3:1 metanol:ácido acético a 20°C) en tubos de 1,5 ml. Se centrifugaron durante un minuto a 13200g y 0°C. Se tiró el sobrenadante. Este lavado permitió eliminar restos de PBS. Se repitió el proceso dejando 100 µl y resuspendiendo el sedimento. La acción del fijador es muy importante ya que permite quitar los lípidos y desnaturalizar las proteínas lo que conlleva que la membrana plasmática se vuelva muy frágil. Esto ayuda a la extensión de los cromosomas.

Posteriormente se ajustó la concentración a 20-40 x 10⁶ Spz/ml. Una vez ajustada la concentración se añadió una gota de 10-15 µl de muestra sobre un portaobjetos Marenfield y se dejó secar durante toda la noche a temperatura ambiente.

6.6.2.- Hibridación

Las sondas se desnaturalizaron sumergiéndolas en baño maría a 75°C durante 10 minutos. Para detener la desnaturalización las incubamos en hielo durante 3 minutos. Se incubaron a 37°C durante una hora para asegurarnos el preannealing con el competidor.

Una vez secos, los portas Marenfield se sumergieron en NaOH 3M durante 3 minutos para desnaturalizar las muestras. Para eliminar los restos de NaOH se lavó la muestra en agua destilada 2 veces. Para detener la desnaturalización las muestras se sumergieron en concentraciones ascendentes de etanol (70-90-100%) a -20°C durante 2 minutos en cada una de ellas. Se secaron las muestras con la ayuda de un secador para evitar la re-naturalización de las muestras.

Los cubreobjetos y portaobjetos que se utilizaron fueron lavados, secados, etc., anteriormente para asegurarse su máxima limpieza. Se colocaron 15 μ l de la sonda mix en cada cubreobjetos y se unieron al portaobjetos. Se sellaron con rubber cement (pegamento especial de sellado) y se colocaron en una caja de portas con agua debajo (para propiciar un ambiente de humedad) y se dejaron incubando a 37°C durante toda la noche.

6.6.3.- Marcaje fluorescente

Se eliminó el rubber cement con una hoja de bisturí. Para eliminar los cubreobjetos se colocaron los portas en una gradilla de cerámica con SSC 2X (tampón salino de citrato sódico) sobre la plataforma de balanceo durante 30 minutos.

Los portas se lavaron en una solución de formamida 50% en SSC 2X a 42°C durante 4 minutos. Se repitió 3 veces la operación. Después se lavaron tres veces más en SSC 2X a 42°C durante 4 minutos.

Se colocaron en PBS-Tween 20 durante 5 minutos a temperatura ambiente. A su vez, se preparó una solución PBT (solución salina amortiguadora) para diluir los anticuerpos: 10 ml de PBS-T (solución tampón) y 10 mg de BSA (albúmina de suero bovino).

Todos los procesos que se explican a continuación se realizaron en oscuridad. Se añadieron 1 μ l de AntiDIG y 1 μ l de Avidina a 248 μ l de la solución de PBT. Tras realizar los lavados se eliminó el exceso de líquido y se aplicaron 50 μ l de esta solución a cada porta, cubriendo con un cubre. Se colocaron en caja de cubres con agua debajo y se incubaron con 100% de humedad a 37°C durante una hora. Se retiraron los cubres y se lavaron 3 veces sumergiendo en gradilla con PBS-T durante 5 minutos en plataforma de balanceo y tapado. Se retiró el exceso de líquido y se añadió 12 μ l de antifade con DAPI (el DAPI es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en Adenina y Timina en secuencias de ADN) el cubre de 24 x 24 mm. Se colocó el porta sobre el cubre con la gota y se incubó en la oscuridad durante 5 minutos.

Se observaron en un microscopio de epifluorescencia DM4500B (Leica, Alemania), con un objetivo de 63x plan apocromático y los conjuntos de filtros apropiados. Las imágenes se capturaron con una cámara Canon EOS 400D digital controlada mediante un ordenador con DSLR Remote Pro software (Breeze Systems).

Al igual que en anterior caso las fotos fueron analizadas con el software Image J y analizaron 400 espermatozoides de cada macho.

6.7.-Diseño experimental

El trabajo se dividió en tres estudios:

6.7.1-Estudio 1: Efecto de la viabilidad del espermatozoide en la morfometría del núcleo espermático

En el primer ensayo se estudió el efecto de la viabilidad espermática sobre la morfometría del núcleo espermático. Para ello se analizaron 200 núcleos espermáticos de cada uno de los tratamientos realizados. El ensayo se realizó en 10 machos distintos de la especie bovina por lo que en total se analizaron 10000 núcleos espermáticos. En el caso de las muestras teñidas con H342 las imágenes se capturaron con el filtro A (Azul) del microscopio de fluorescencia, en las teñidas con I.P se utilizó el filtro N21 (Rojo) y por último en el caso de la combinación H342 + I.P se capturó la misma imagen con tres filtros distintos, el doble, el A y el N21.

6.7.2.-Estudio 2: Efecto de la centrifugación sobre la morfometría del núcleo espermático

En el ensayo 2 se estudió el efecto de la centrifugación de las muestras de semen sobre la morfometría del núcleo espermático. En este experimento se descongelaron 5 pajuelas de machos distintos de la raza Frisona. Se prepararon 2 frotis de cada macho. El primer frotis se realizó tras descongelar la pajuela y, tras someter a las muestras a un proceso de centrifugación de 2000g durante 10 minutos, se preparó el segundo frotis. Estos frotis se dejaron sacar durante un mínimo de 24h. Una vez secos se procedió de la misma forma que se describe en el apartado 6.5.2.1.

La captura de las imágenes se realizó únicamente con el filtro A del microscopio de fluorescencia. Se analizaron un total de 2000 núcleos espermáticos.

6.7.3.-Estudio 3: Diferencias morfométricas entre espermatozoides portadores del cromosoma X y del cromosoma Y

En el tercer ensayo se estudió el efecto del sexo sobre la morfometría del núcleo espermático. Este ensayo, a su vez, se dividió en dos apartados. En el primero se procesaron 8 muestras seminales para la determinación del sexo de los espermatozoides mediante FISH y se analizaron las diferencias morfométricas entre los espermatozoides portadores del cromosoma X e Y. Se analizaron un total de 3200 núcleos espermáticos. En cuanto a la captura de las imágenes, al igual que en el estudio 1, se realizó con los tres filtros nombrados anteriormente, el doble, el A y el N21.

En el segundo apartado se comparó la morfometría del núcleo espermático entre muestras sexadas y no sexadas de un mismo macho. Para ello se analizaron 4 machos distintos de los que se tenían muestras sexadas y muestras no sexadas. Al igual que en los ensayos anteriores, se procedió a descongelar las pajuelas al baño maría a 37°C y se realizó un frotis de cada muestra dejándolo secar al menos 2 días. Una vez seco, se procedió de la misma forma que se describe en el apartado 6.5.2.1. Posteriormente se realizó la captura de las imágenes con el filtro A del microscopio de fluorescencia. Se analizaron un total de 1600 núcleos espermáticos

6.8.-Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS, versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.). El nivel de significación estadística se fijó en $P < 0,05$. Todos los valores se expresaron como media \pm error típico de la media.

La normalidad de las distribuciones y la homogeneidad de las varianzas de los valores medios para cada prueba fueron verificadas por la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Como todos los datos siguieron distribución normal, se utilizaron pruebas paramétricas para su análisis. En todos los casos, las diferencias en los parámetros morfométricos del núcleo del espermatozoide fueron examinadas a través del análisis de varianza (ANOVA) mediante modelos lineales generalizados.

RESULTADOS

7.-RESULTADOS

Tras realizar la captura automática de los núcleos espermáticos mediante el software Image J, tal y como se muestra en la Figura 10, se analizaron aquellos espermatozoides correctamente capturados en cada una de las imágenes.

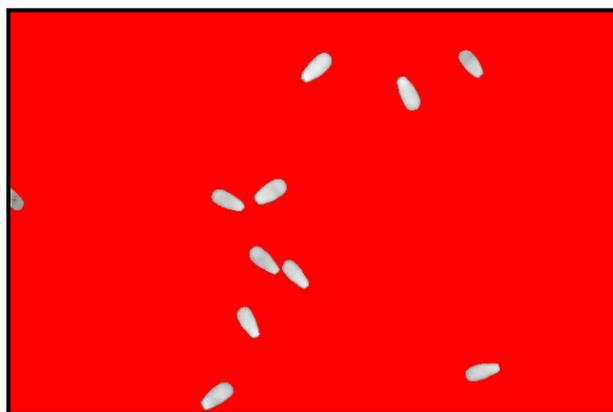


Figura 10: Núcleos espermáticos capturados automáticamente con el software Image J

7.1.- Estudio 1: Efecto de la viabilidad del espermatozoide en la morfometría del núcleo espermático

Como se ha descrito anteriormente, este experimento se realizó para muestras en 2 presentaciones distintas, en fresco y en frotis, realizándose tres tinciones diferentes para fresco y dos tinciones para frotis, de manera que se pudiera diferenciar el efecto de la viabilidad del de la tinción realizada (Fig 2).

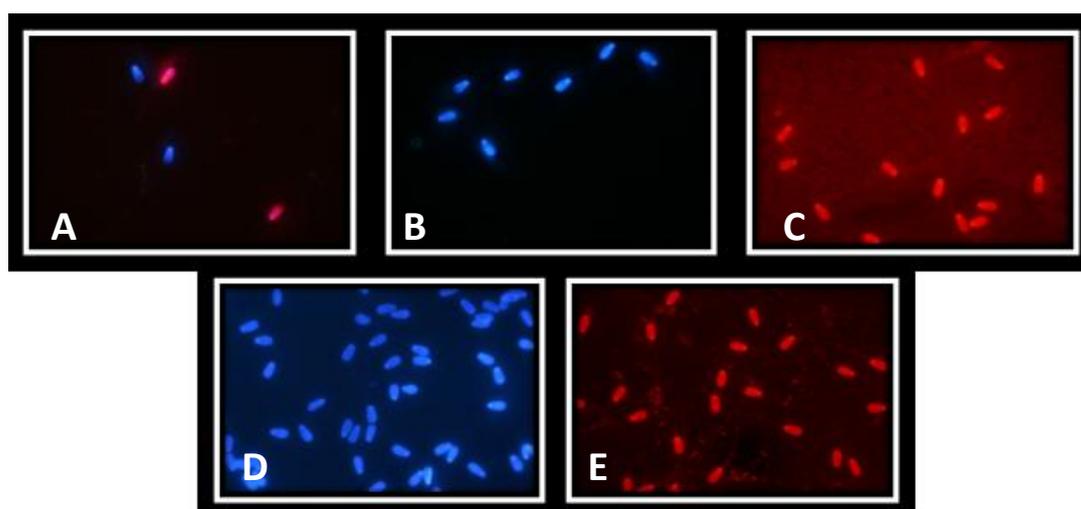


Figura 11: A) Núcleos espermáticos teñidos en fresco con H342 e IP (FRESCO-1). B) Núcleos espermáticos teñidos en fresco con H342 (FRESCO-2). C) Núcleos espermáticos teñidos en fresco con IP (FRESCO-3). D) Núcleos espermáticos de frotis teñidos con H342 (FROTIS-1). E) Núcleos espermáticos de frotis teñidos con IP (FROTIS-2).

Para las muestras en fresco, los espermatozoides vivos (teñidos con H342) presentaron unas mayores dimensiones que los muertos (teñidos con IP) para la mayoría de los parámetros primarios (Tabla 2). En relación a los parámetros secundarios, los espermatozoides muertos presentaron una elipticidad y elongación ligeramente mayor que los vivos (Tabla 3).

El posible efecto de la viabilidad se evaluó en el tratamiento fresco-2 y fresco-3, tiñendo muestras con una alta proporción de espermatozoides viables con el fluorocromo H342 (Fresco-2) y las mismas muestras con todos los espermatozoides muertos con el fluorocromo IP (Fresco-3). Los resultados obtenidos fueron muy parecidos a los ya descritos. Los espermatozoides muertos presentaron un área y anchura nuclear menor que los vivos, mientras que la longitud y el perímetro fue algo mayor en los muertos (Tabla 1). Para los parámetros secundarios, los espermatozoides muertos presentaron una elipticidad y elongación ligeramente mayor que los vivos (Tabla 3).

El posible efecto de la tinción fluorescente se evaluó con los tratamientos frotis-1 y frotis-2 observándose diferencias significativas en todos los parámetros, siendo los espermatozoides teñidos con IP de mayores dimensiones que los teñidos con H342 (Tabla 2 y 3), a pesar de la menor intensidad fluorescente en el caso del IP. El fluorocromo apenas influyó sobre los parámetros secundarios (Tabla 3). A su vez existen diferencias significativas entre los frotis y las muestras en fresco teñidas con HOE (frotis-1 y fresco-2 respectivamente) y no existen diferencias significativas entre los frotis y las muestras teñidas con IP (frotis-2 y fresco-3 respectivamente).

Tabla 2. Diferencias morfométricas de los parámetros primarios entre espermatozoides vivos y muertos.

TRATAMIENTO	TINCIÓN	AREA (μm^2)	INT. FLUO	PERIMETRO (μm)	LONGITUD (μm)	ANCHURA (μm)	
FRESCO-1	HOE+I.P	HOE	34,66±0,09 ^a	112,19±0,81 ^a	24,96±0,044 ^a	9,19±0,014 ^a	4,83±0,009 ^a
FRESCO-1		I.P	34,08±0,13 ^b	70,61±1,09 ^b	24,80±0,048 ^b	9,22±0,017 ^a	4,71±0,012 ^b
FRESCO-2	HOE	33,84±0,07 ^a	117,08±0,43 ^a	24,46±0,023 ^a	9,11±0,011 ^a	4,74±0,006 ^a	
FRESCO-3	I.P	33,34±0,09 ^b	68,38±0,29 ^b	24,62±0,030 ^b	9,19±0,012 ^b	4,64±0,008 ^b	
FROTIS-1	HOE	32,48±0,07 ^a	115,05±0,48 ^a	24,14±0,029 ^a	9,09±0,009 ^a	4,50±0,007 ^a	
FROTIS-2	I.P	33,58±0,09 ^b	59,42±0,14 ^b	24,31±0,029 ^b	9,25±0,011 ^b	4,58±0,008 ^b	

- HOE: fluorocromo Hoeschst 33258. I.P: fluorocromo Ioduro de Propidio. ^{ab}Letras distintas en cada grupo de tratamientos indican diferencias significativas entre ambas tinciones (P<0,05)

Tabla 3. Diferencias morfométricas de los parámetros secundarios entre espermatozoides vivos y muertos.

TRATAMIENTO	TINCIÓN	ELIPTICIDAD (%)	RUGOSIDAD	ELONGACIÓN	REGULARIDAD	
FRESCO-1	HOE+I.P	HOE	1,91±0,004 ^a	0,70±0,001 ^a	0,31±0,001 ^a	1,01±0,002 ^a
FRESCO-1		I.P	1,97±0,005 ^b	0,70±0,002 ^a	0,32±0,001 ^b	1,00±0,001 ^a
FRESCO-2	HOE	1,93±0,003 ^a	0,71±0,001 ^a	0,32±0,001 ^a	1,00±0,005 ^a	
FRESCO-3	I.P	1,99±0,003 ^b	0,69±0,001 ^b	0,33±0,001 ^b	1,01±0,001 ^b	
FROTIS-1	HOE	2,03±0,003 ^a	0,70±0,001 ^a	0,34±0,001 ^a	0,99±0,0004 ^a	
FROTIS-2	I.P	2,03±0,003 ^a	0,71±0,001 ^b	0,34±0,001 ^a	1,00±0,0004	

- HOE: -fluorocromo Hoeschst 33258. I.P: fluorocromo Ioduro de Propidio. ^{ab}Letras distintas en cada grupo de tratamientos indican diferencias significativas entre ambas tinciones (P<0,05)

7.2.-Estudio 2: Efecto de la centrifugación sobre la morfometría del núcleo espermático

Se analizaron un total de 1000 núcleos espermáticos sin centrifugar y de 1000 núcleos espermáticos tras ser centrifugados, procedentes de 4 toros (Fig 12).

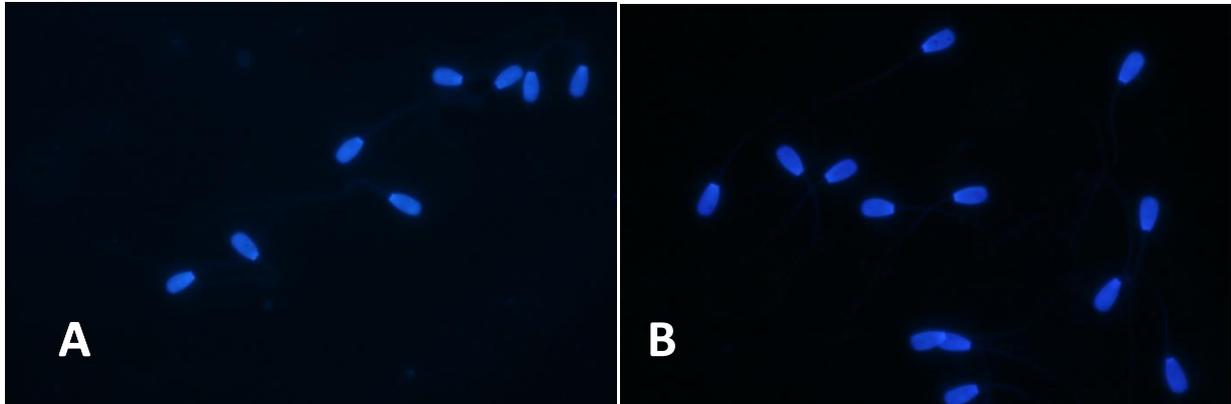


Figura 12: A: Núcleos espermáticos de toro fijados con glutaraldehído y teñidos con H342 antes de centrifugar (A) y después de centrifugar (B).

En general, se obtuvieron diferencias significativas en todos los parámetros estudiados tanto en los primarios como en los secundarios entre las muestras antes de centrifugar y después. En promedio, las muestras centrifugadas presentaron mayores valores morfométricos que las muestras sin centrifugar (Tabla 4).

Tabla 4. Diferencias morfométricas intra-macho entre muestras sin centrifugar y centrifugadas.

MACHO	CENTRIFUGACIÓN	AREA (μm^2)	INT. FLUO	PERIMETRO (μm)	LONGITUD (μm)	ANCHURA (μm)	ELIPTICIDAD (%)	RUGOSIDAD	ELONGACIÓN	REGULARIDAD
1	0	29,16±0,17 ^a	110,37±0,83 ^a	22,41±0,063 ^a	8,43±0,027 ^a	4,35±0,015 ^a	1,94±0,007 ^a	0,73±0,002 ^a	0,32±0,002 ^a	0,99±0,001 ^a
	2000g 10min	32,84±0,16 ^b	88,82±0,37 ^b	23,53±0,055 ^b	8,80±0,022 ^b	4,68±0,015 ^b	1,88±0,006 ^b	0,74±0,001 ^b	0,31±0,001 ^b	0,99±0,001 ^b
2	0	32,38±0,13 ^a	105,82±0,62 ^a	23,44±0,048 ^a	8,78±0,020 ^a	4,63±0,013 ^a	1,90±0,006 ^a	0,74±0,001 ^a	0,31±0,001 ^a	0,99±0,001 ^a
	2000g 10min	31,73±0,12 ^b	104,89±0,53 ^a	23,21±0,043 ^b	8,74±0,019 ^a	4,54±0,012 ^b	1,93±0,005 ^b	0,74±0,001 ^a	0,32±0,001 ^b	0,98±0,001 ^b
3	0	30,93±0,15 ^a	88,43±0,63 ^a	23,32±0,049 ^a	8,89±0,022 ^a	4,44±0,013 ^a	2,00±0,006 ^a	0,71±0,001 ^a	0,33±0,001 ^a	1,00±0,001 ^a
	2000g 10min	30,72±0,13 ^a	86,71±1,24 ^a	23,23±0,050 ^a	8,86±0,024 ^a	4,42±0,016 ^a	2,01±0,008 ^a	0,72±0,002 ^a	0,33±0,002 ^a	1,00±0,001 ^a
4	0	30,84±0,18 ^a	96,93±1,10 ^a	23,31±0,057 ^a	8,89±0,026 ^a	4,38±0,015 ^a	2,03±0,009 ^a	0,71±0,002 ^a	0,34±0,002 ^a	0,99±0,002 ^a
	2000g 10min	31,03±0,18 ^a	96,80±0,88 ^a	23,30±0,062 ^a	8,89±0,027 ^a	4,40±0,016 ^a	2,02±0,008 ^a	0,72±0,002 ^a	0,34±0,002 ^a	0,99±0,002 ^a
5	0	29,51±0,18 ^a	82,15±0,88 ^a	22,91±0,066 ^a	8,65±0,025 ^a	4,29±0,017 ^a	2,02±0,008 ^a	0,71±0,002 ^a	0,34±0,002 ^a	0,99±0,001 ^a
	2000g 10min	30,45±0,21 ^b	77,88±0,77 ^b	22,97±0,078 ^a	8,72±0,029 ^a	4,39±0,018 ^b	1,99±0,007 ^b	0,72±0,001 ^b	0,33±0,002 ^b	0,99±0,001 ^a
MEDIAS	0	30,56±0,08 ^a	96,74±0,50 ^a	23,08±0,028 ^a	8,73±0,012 ^a	4,42±0,008 ^a	1,98±0,004 ^a	0,72±0,001 ^a	0,33±0,001 ^a	0,99±0,001 ^a
	2000g 10min	31,35±0,08 ^b	91,02±0,47 ^b	23,25±0,027 ^b	8,80±0,011 ^b	4,49±0,008 ^b	1,97±0,008 ^b	0,73±0,001 ^b	0,32±0,001 ^b	0,99±0,001 ^b

- ^{ab}: Letras distintas en cada macho indican diferencias significativas entre ambos tipos de centrifugación (P<0,05)

7.3.-Estudio 3: Diferencias morfométricas entre espermatozoides portadores del cromosoma X y del cromosoma Y

En la primera parte de este estudio se realizó un ensayo en el que se analizaron 8 machos distintos de la especie bovina tras realizar la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH), que permite distinguir claramente los espermatozoides de ambos sexos. Se midieron los valores de los parámetros primarios, de los parámetros secundarios y la intensidad fluorescente. Esto permitió estudiar las posibles diferencias entre las dimensiones del núcleo espermático en espermatozoides portadores del cromosoma X y del cromosoma Y (Fig 13).

Se obtuvieron diferencias significativas en todos los parámetros primarios estudiados. En todos los casos, área, perímetro, anchura, y longitud así como para la intensidad fluorescente se obtuvieron mayores valores morfométricos en los espermatozoides con cromosoma X que en los portadores del cromosoma Y (Tabla 5). En el caso de los parámetros secundarios se obtuvieron diferencias significativas en la rugosidad y la regularidad, siendo los valores algo mayores para los espermatozoides con cromosoma Y (Tabla 5).

En el segundo ensayo dentro de este estudio se comparó la morfometría de muestras sexadas y sin sexar perteneciente al mismo macho como método de confirmación. Para ello se analizaron 4 machos distintos de los que se tenían dosis sexadas y sin sexar.

Se obtuvieron diferencias significativas en área, perímetro, longitud, anchura, elipticidad, rugosidad y elongación. La regularidad fue el único parámetro en el que no se obtuvieron diferencias significativas. Las muestras sexadas presentaban mayores valores para todos los parámetros morfométricos que las muestras no sexadas excepto para la elipticidad (Tabla 6).

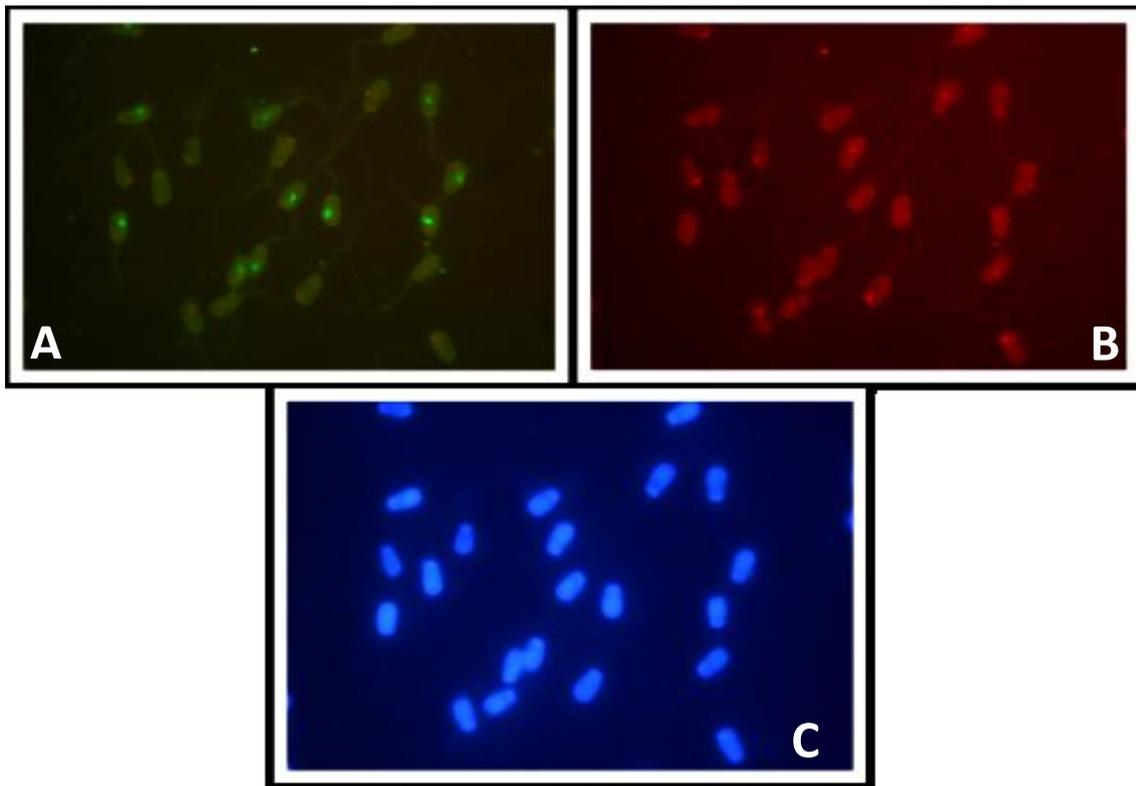


Figura 13: A) Núcleos espermáticos portadores del cromosoma Y. B) Núcleos espermáticos portadores del cromosoma X. C) Fotografía utilizada para el análisis morfométrico, en la cual los núcleos espermáticos estaban fijados con glutaraldehído y teñidos con H342.

Resultados

Tabla 5. Diferencias morfométricas intra-macho entre espermatozoides con cromosoma X y cromosoma Y.

MACHO	CROMOSOMA	AREA (µm ²)	INT. FLUO	PERIMETRO (µm)	LONGITUD (µm)	ANCHURA (µm)	ELIPTICIDAD (%)	RUGOSIDAD	ELONGACIÓN	REGULARIDAD
1	X	30,59±0,17 ^a	95,12±1,10 ^a	23,61±0,072 ^a	8,72±0,027 ^a	4,54±0,018 ^a	1,92±0,008 ^a	0,69±0,002 ^a	0,31±0,002 ^a	1,02±0,002 ^a
	Y	30,05±0,15 ^b	93,66±1,12 ^a	23,39±0,066 ^b	8,70±0,024 ^a	4,49±0,017 ^b	1,94±0,008 ^a	0,69±0,002 ^a	0,32±0,002 ^a	1,02±0,002 ^a
2	X	36,46±0,17 ^a	92,51±0,63 ^a	25,21±0,056 ^a	9,07±0,021 ^a	5,02±0,016 ^a	1,81±0,006 ^a	0,72±0,002 ^a	0,29±0,002 ^a	0,98±0,001 ^a
	Y	36,14±0,15 ^a	92,57±0,49 ^a	25,00±0,059 ^b	9,00±0,019 ^b	5,02±0,017 ^a	1,80±0,006 ^a	0,73±0,002 ^a	0,28±0,002 ^a	0,98±0,001 ^a
3	X	39,07±0,18 ^a	89,41±0,66 ^a	25,83±0,059 ^a	9,31±0,023 ^a	5,24±0,015 ^a	1,78±0,005 ^a	0,74±0,002 ^a	0,28±0,001 ^a	0,98±0,001 ^a
	Y	38,94±0,17 ^a	88,93±0,65 ^a	25,87±0,062 ^a	9,31±0,024 ^a	5,23±0,016 ^a	1,78±0,006 ^a	0,73±0,003 ^a	0,28±0,002 ^a	0,98±0,001 ^b
4	X	32,87±0,18 ^a	85,95±0,72 ^a	24,47±0,068 ^a	9,08±0,029 ^a	4,66±0,016 ^a	1,95±0,008 ^a	0,69±0,003 ^a	0,32±0,002 ^a	1,01±0,002 ^a
	Y	32,64±0,15 ^a	84,87±0,72 ^a	24,43±0,065 ^a	9,05±0,025 ^a	4,64±0,015 ^a	1,96±0,008 ^a	0,69±0,002 ^a	0,32±0,002 ^a	1,01±0,001 ^a
5	X	33,70±0,19 ^a	84,90±0,51 ^a	24,92±0,071 ^a	9,31±0,027 ^a	4,61±0,018 ^a	2,02±0,008 ^a	0,68±0,003 ^a	0,34±0,002 ^a	1,00±0,002 ^a
	Y	33,35±0,15 ^a	83,02±0,48 ^b	24,84±0,059 ^a	9,26±0,023 ^a	4,59±0,017 ^a	2,03±0,008 ^a	0,68±0,002 ^a	0,34±0,002 ^a	1,00±0,002 ^b
6	X	34,25±0,14 ^a	87,70±0,53 ^a	24,03±0,048 ^a	8,80±0,021 ^a	4,89±0,013 ^a	1,80±0,005 ^a	0,74±0,002 ^a	0,29±0,001 ^a	0,99±0,001 ^a
	Y	33,42±0,11 ^b	86,50±0,49 ^a	23,85±0,038 ^b	8,73±0,016 ^b	4,82±0,013 ^b	1,81±0,006 ^a	0,74±0,002 ^b	0,29±0,001 ^a	0,99±0,001 ^a
7	X	38,37±0,16 ^a	95,58±0,24 ^a	26,07±0,059 ^a	9,45±0,023 ^a	5,08±0,015 ^a	1,86±0,006 ^a	0,71±0,002 ^a	0,30±0,002 ^a	0,98±0,002 ^a
	Y	37,67±0,37 ^b	93,74±0,54 ^b	25,93±0,200 ^b	9,38±0,068 ^b	5,04±0,023 ^b	1,86±0,008 ^a	0,71±0,003 ^a	0,30±0,002 ^a	0,99±0,003 ^a
8	X	31,45±0,17 ^a	99,46±1,02 ^a	23,25±0,058 ^a	8,60±0,021 ^a	4,60±0,017 ^a	1,87±0,006 ^a	0,73±0,002 ^a	0,30±0,002 ^a	0,99±0,001 ^a
	Y	30,60±0,17 ^b	97,14±1,13 ^a	23,03±0,057 ^b	8,51±0,020 ^b	4,53±0,017 ^b	1,88±0,006 ^a	0,72±0,002 ^a	0,31±0,001 ^a	0,99±0,001 ^b
MEDIA	X	34,57±0,10 ^a	91,55±0,29 ^a	24,65±0,033 ^a	9,03±0,011 ^a	4,83±0,008 ^a	1,88±0,003 ^a	0,71±0,001 ^a	0,30±0,001 ^a	0,99±0,001 ^a
	Y	34,13±0,10 ^b	89,87±0,28 ^b	24,57±0,039 ^b	9,00±0,013 ^b	4,80±0,009 ^b	1,88±0,003 ^a	0,71±0,001 ^b	0,31±0,001 ^a	1,00±0,001 ^b

- ^{ab}: Comparando intra-macho, letras distintas indican diferencias significativas entre ambos cromosomas (P<0,05)

Resultados

Tabla 6. Diferencias de los parámetros morfométricos primarios y secundarios intra-macho entre muestras sexadas y no sexadas.

MACHOS	MUESTRA	AREA (µm ²)	INT. FLUO	PERIMETRO (µm)	LONGITUD (µm)	ANCHURA (µm)	ELIPTICIDAD (%)	RUGOSIDAD	ELONGACIÓN	REGULARIDAD
ALTAOLIN	No-Sexada	29,16±0,17 ^a	110,37±0,57 ^a	22,41±0,063 ^a	8,43±0,027 ^a	4,35±0,015 ^a	1,94±0,007 ^a	0,73±0,002 ^a	0,32±0,002 ^a	0,99±0,001 ^a
	Sexada	32,38±0,13 ^b	105,82±0,62 ^b	23,44±0,048 ^b	8,78±0,021 ^b	4,63±0,013 ^b	1,90±0,006 ^a	0,74±0,001 ^b	0,31±0,001 ^b	0,99±0,001 ^a
AUGUSTA	No-Sexada	36,02±0,15 ^a	132,09±0,57 ^a	24,60±0,063 ^a	9,05±0,02 ^a	4,99±0,014 ^a	1,82±0,005 ^a	0,75±0,003 ^a	0,29±0,001 ^a	0,99±0,001 ^a
	Sexada	36,14±0,15 ^a	120,14±1,50 ^b	24,70±0,057 ^a	9,20±0,023 ^b	4,92±0,013 ^b	1,87±0,006 ^b	0,74±0,002 ^a	0,30±0,002 ^b	0,98±0,001 ^a
SUPERJET	No-Sexada	34,88±0,15 ^a	122,59±0,97 ^a	24,27±0,049 ^a	9,04±0,019 ^a	4,80±0,014 ^a	1,89±0,005 ^a	0,74±0,001 ^a	0,31±0,001 ^a	0,98±0,001 ^a
	Sexada	35,33±0,17 ^b	119,63±0,79 ^b	24,36±0,059 ^a	9,06±0,021 ^a	4,84±0,017 ^a	1,88±0,005 ^a	0,75±0,002 ^a	0,30±0,001 ^a	0,98±0,001 ^a
TRIANGLE	No-Sexada	30,36±0,18 ^a	82,08±0,98 ^a	23,22±0,066 ^a	8,75±0,026 ^a	4,35±0,017 ^a	2,01±0,008 ^a	0,71±0,002 ^a	0,34±0,002 ^a	0,99±0,001 ^a
	Sexada	33,74±0,13 ^b	104,37±0,61 ^b	23,86±0,059 ^b	8,93±0,023 ^b	4,74±0,013 ^b	1,88±0,006 ^b	0,75±0,002 ^b	0,31±0,001 ^b	0,99±0,001 ^b
MEDIA	No-Sexada	32,61±0,13^a	111,79±0,79^a	23,62±0,043^a	8,82±0,015^a	4,62±0,012^a	1,91±0,004^a	0,73±0,001^a	0,31±0,001^a	0,98±0,015^a
	Sexada	34,40±0,09^b	112,49±0,54^a	24,09±0,033^b	8,99±0,012^b	4,78±0,008^b	1,88±0,003^b	0,74±0,001^b	0,31±0,001^b	0,98±0,001^a

- ^{ab}: Comparando intra-macho, letras distintas indican diferencias significativas entre ambos tipos de muestras (P<0,05)

DISCUSIÓN

8.-DISCUSIÓN

La inseminación artificial (IA), además de ser la biotecnología reproductiva más utilizada en todo el mundo, está adquiriendo un nuevo interés con la incorporación de nuevas tecnologías como el sexaje espermático. La evaluación seminal es un aspecto clave en la clasificación de las muestras de toro destinadas a la IA, ya sean sexadas o no sexadas. En esta evaluación seminal, o espermiograma, también han aparecido nuevas tecnologías que se han incorporado masivamente en los centros de IA. Entre ellas destacan la evaluación espermática asistida por ordenador (CASA). Estos sistemas cuentan normalmente con varios módulos, que entre otros suelen incluir los de concentración, movilidad y morfometría. El módulo de morfometría es quizá el menos utilizado en la práctica, porque el tiempo necesario para el análisis morfométrico es muy elevado. Para disminuir estos requerimientos y hacer la técnica más factible en la práctica, nuestro grupo desarrollo una técnica que permitió la automatización del proceso CASMA-F (Yániz *et al.*, 2012; Vicente-Fiel *et al.*, 2013a, 2013b, 2014; Yániz *et al.*, 2014). En un intento de estandarizar esta técnica, en los trabajos citados ya se describieron algunos factores que condicionan el análisis morfométrico, tales como el secado y fijación de las muestras, entre otros. En este Trabajo Fin de Grado se profundiza en otros factores que pueden influir en los resultados morfométricos, tales como la viabilidad espermática, los procesos de centrifugación durante los lavados y el sexo del espermatozoide.

En el primer estudio se evaluó el efecto de la viabilidad sobre la morfometría del núcleo espermático. Para ello nos basamos en el análisis de la integridad de la membrana plasmática, mediante la utilización de dos fluorocromos combinados (Garner *et al.*, 1997): el I.P capaz de atravesar solo las membranas plasmáticas degeneradas o dañadas, y el H342, para la tinción de células viables. En general, los espermatozoides vivos presentaron unas mayores dimensiones que los muertos para la mayoría de los parámetros primarios. Esta relación entre la viabilidad espermática y la morfometría nuclear no se explica por el diferente fluorocromo utilizado para marcar los espermatozoides vivos y muertos. Cuando se han comparado los dos fluorocromos en frotis sobre portas hemos observado que el IP, de tener efecto, es inverso al descrito en la viabilidad para la mayoría de los parámetros. A diferencia del presente estudio, en un trabajo previo en ovino no observamos diferencias morfométricas entre los núcleos espermáticos de frotis teñidos con IP y con H342.

A pesar del elevado número de trabajos publicados sobre la morfometría espermática en toro, solo unos pocos han estudiado las diferencias debidas a la viabilidad (Revay *et al.*, 2004). La mayor parte de los trabajos han estudiado estas diferencias utilizando tinciones vitales tales como la eosina-nigrosina (Lütke-Holz, 1958), la tinción Feulgen (Baker y Salisbury, 1963) o el azul tripán (Rèvay *et al.*, 2004). A diferencia de nuestros resultados, en estos tres trabajos los espermatozoides muertos presentaron mayor área de la cabeza que los vivos, oscilando entre el 0,8% (Lütke-Holz, 1958) y alrededor de un 10% (Baker y Salisbury, 1963; Rèvay *et al.*, 2004). Sin embargo, dado que el método de tinción tiene un efecto claro sobre la morfometría del núcleo espermático es difícil determinar si tales diferencias se deben al espermatozoide o al propio método de tinción (teñidos vs no teñidos o teñidos con diferentes colorantes en los casos nombrados). En contraposición a estos trabajos, en un estudio previo utilizando técnicas de contraste de fases en espermatozoides de conejo, Marco-Jiménez *et al.* (2006) observaron que las cabezas de los espermatozoides muertos tenían un área menor que las de los vivos, lo que coincide con los resultados obtenidos en nuestro estudio. Este resultado lo atribuyen a que los espermatozoides muertos pierden la membrana plasmática, aunque debemos indicar que los sistemas ópticos convencionales no tienen poder de resolución suficiente para distinguir la membrana. La mayor frecuencia de acrosomas dañados/perdidos en los espermatozoides muertos sí podría explicar tales diferencias, aunque no en nuestro caso por haber teñido solamente el núcleo espermático.

En coincidencia con los trabajos previos del grupo (Yániz *et al.*, 2012; Vicente-Fiel *et al.* 2013), el secado y la fijación disminuyó las dimensiones del núcleo espermático en el presente trabajo. Ball y Mohammed también comprobaron que el secado y fijación provocan una reducción del 20% de longitud y de un 13% de anchura del espermatozoide en caballo.

En el segundo estudio se demostró que el proceso de centrifugación influye notablemente en todos los parámetros morfométricos, con un aumento de las dimensiones en los espermatozoides centrifugados. Las causas de este aumento no son claras, aunque podría deberse a una sedimentación más eficiente de los espermatozoides de mayores dimensiones. En otros estudios se ha demostrado que tras someter la muestra a un proceso de centrifugación de larga duración se produce un efecto deletéreo sobre el ADN incluso en los casos de tratamientos más agresivos, una degradación de la membrana plasmática (Urrego, 2008. y Oliva, 2010), aunque no está claro que esto se relacione con un aumento de tamaño del núcleo espermático. En un estudio reciente en bovino García-Herreros y Leal (2014) han

demostrado que el lavado-centrifugación de las muestras tiene un importante efecto en la distribución de las subpoblaciones morfométricas.

En el último estudio se estudiaron las posibles diferencias entre las dimensiones del núcleo espermático en espermatozoides portadores del cromosoma X y del cromosoma Y, obteniéndose diferencias significativas en la mayoría de los parámetros. Los espermatozoides portadores del cromosoma X presentaron, en general, mayores dimensiones del núcleo que los portadores del cromosoma Y. En algunos estudios previos se ha observado que el tamaño de la cabeza de los X es mayor (Cui y Mathew, 1993; van Munster *et al.*, 1999a; van Munster *et al.*, 1999b; van Munster, 2002), aunque en un trabajo reciente utilizando FISH no se observaron diferencias (Rèvy, 2004). Posiblemente, el método de descondensación de los núcleos espermáticos utilizado en este trabajo, basado en DTT, ha podido camuflar las diferencias existentes entre los espermatozoides X e Y.

También hemos encontrado diferencias morfométricas entre dosis sexadas (para obtener hembras) y no-sexadas de un mismo macho, evitando así el efecto del tratamiento de descondensación necesario para hacer FISH. De nuevo, el área nuclear de los espermatozoides sexados fue mayor que la de los no sexados, lo que confirma los resultados obtenidos utilizando FISH en el primer ensayo. Se ha descrito que, en el caso del toro, el espermatozoide X contiene en torno al 4% más ADN que el Y (Garner, 2006), por lo que parece lógico que esto se refleje en diferencias del área nuclear utilizando la técnica CASMA-F.

CONCLUSIONES

9.-CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente Trabajo Fin de Grado, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La viabilidad tiene un efecto significativo sobre la morfometría del núcleo espermático, que es mayor en los espermatozoides viables, siendo este un aspecto que debe considerarse cuando se realice este tipo de análisis.
2. Los procesos de lavado que incluyan centrifugación de la muestra seminal provocan alteraciones en la morfometría del núcleo espermático, con un aumento de su tamaño. Esto corrobora el hecho de que no se trata de tratamientos inocuos para el espermatozoide.
3. El sistema CASMA-F permite detectar diferencias morfométricas entre los espermatozoides portadores del cromosoma X y los portadores del cromosoma Y, presentando mayor área los primeros. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para comprobar si este método es lo suficientemente sensible para la determinación del sexo del espermatozoide o para verificar la calidad del sexaje espermático.

BIBLIOGRAFÍA

10.-BIBLIOGRAFÍA

Althouse, G. C., Hopkins, S. M. (1995). *Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluorophores*. Theriogenology, 43(3), 595-603.

Audesirk *et al.* (2003) *Biología: la vida en la tierra*. ISBN 970-26-0370-6

Avilés Lopez, Karen G. (2011). *Estudio de la funcionalidad espermática, interacción de gametos y análisis proteico en espermatozoides Epididimarios y Eyaculados en la especie porcina*. [Tesis doctoral]. Universidad de Murcia.

Baker, F.N., Salisbury, G.W. Nuclear size of live and dead bovine spermatozoa. *Nature* 1963; 197:820.

Ball, H.O., Mohammed. (1995). *Morphometry of stallion spermatozoa by computer-assisted image analysis*. Theriogenology 44 (1995) 367–377.

Barlow, P., Vosa, C.G. (1970). *The Y chromosome in human spermatozoa*. *Nature*, London: 226: 961-962.

Benito, R. (2010). *Desarrollo de un método de referencia basado en la microscopía de fluorescencia y el análisis de imagen para evaluación morfológica de la cabeza del espermatozoide en mamíferos*. [Proyecto de fin de carrera]. Universidad de Zaragoza.

Bhattacharyya, A. K., Zaneveld, L.J. (1982). *The sperma head., En: Biochemistry of mammalian reproduction. I. Gametes and genital tract fluids.*, Zaneveld, L.J. and Chatterton, R.T. Wiley & Sons INC., New York.

Boersma, A.A., Braun, J., Stolla, R. (1999). *Influence of random factors and two different staining procedures on computer assisted sperm head morphometry in bulls*. *Reprod. Domest. Anim.* 34 77–82.

Boersma, A.A., Rasshofer, R., Stolla, R. (2001). *Influence of simple preparation, staining procedure and analysis conditions on bull sperm head morphometry using the morphology analyser integrated visual optical system*. *Reprod. Domest. Anim.* 36 (2001) 222–229.

Cardona-Maya, W., Berdugo, J., Cadavid, A. (2008) *Comparing the sperm concentration determined by the Makler and the Neubauer chambers*. *Actas Urol. Esp*, 32:443-5.

- Casey, P.J., Gravance, C.G., Davis, R.O., Chabot, D.D., Liu, I.K.M. (1997). *Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions*. Theriogenology, 47:575-82.
- Chan, S.Y., Fox, E.J., Chan, M.M., Tsoi, W., Wang, C., Tang, L.C., Tang, G.W., Ho, P. (1985) *The relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test, routine semen analysis, and the human sperm zona-free hamster ovum penetration assay*. Fertil. Steril. 44:668-672.
- Chandler, J.E., Wilson, M.P., Canal, A.M., Steinholt-Chenevert, H.C. (1999). *Bovine spermatozoal head size variation and evaluation of a separation technique bases on this size*. Theriogenology 52:1021-1034.
- Chandler, M. B., Chandler, V. S., Fulton, R. J. (1999). *U.S. Patent No. 5, 981,180*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Cran, D.G., Johnson, L.A., Polge, C.E. (1995). *Sex preselection in cattle: a field trial*. Vet. Rec.: 136: 495-496.
- Cui, H., Matthews, C.D. (1993). *X larger than Y*. Nature (Lond.): 366: 117-118.
- Cummins, J.M., Woodwall, P.F. (1985). *On mammals sperm dimensions*. J Reprod fertile, 75: 153-175.
- Davis, R.O., Gravance, C.G. (1993). *Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis*. Fertil. Steril. 59 (1993) 412–417.
- Davis R.O., Gravance, C.G. (1994) *Consistency of sperm morphology classification methods*, J. Androl. 15 (1994) 83–91.
- Dresdner, R. D., Katz, D. F. (1981). *Relationships of mammalian sperm motility and morphology to hydrodynamic aspects of cell function*. Biol. Reprod, 25:920–930.
- Eddy, E. M., O'Brien, D. A. (1988). *The spermatozoon*, En: The Physiology of Reproduction, Knobil, E., Neill, J.D., Greenwald, G. S. and Markert, C. L. Raven Press, Ltd., New York.
- Ericsson, R.J., Langevin, C.N., Nishino, M. (1973). *Isolation of fractions rich in Y spermatozoa*. Nature: 246: 421-424.

- Ericsson, R.J., Ericsson, S.A. (1999). *Sex ratios*. En: Encyclopedia of Reproduction. Vol:4; pp: 431-437. Eds. E Knobil and JD Neil. Academic Press, London.
- Evenson, D.P., Darzynkiewicz, 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.
- Flesch, F., Gadella, B. (2000). *Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization*. Blochim Biophys Acta 1469, 197-235.
- Gadea-Mateos, J. (1997) *Predicción de la fertilidad "in vivo" de los eyaculados de verraco mediante parámetros rutinarios de contrastación seminal, pruebas bioquímicas y el test homólogo de penetración "in vitro"*. [Tesis doctoral]. Universidad de Murcia.
- García-Herreros, M., Leal, C. L. (2014). *Comparative study of sperm washing and selection methods after cryopreservation and its influence on sperm subpopulational structure in a bovine model*. Systems biology in reproductive medicine, (0), 1-10.
- Garner, D.L., Pinkel, D., Johnson, L.A., Pace, M.M. (1986). *Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses*. Biol. Reprod. 34, 127-138.
- Garner, D.L., Johnson, L.A., Allen, C.H. (1988). *Fluorometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa extended in egg yolk and milk*. Theriogenology. 30, 369-378.
- Garner, L. (2006). *Flow cytometric sexing of mammalian sperm*. Theriogenology 65: 943-957.
- Gravance C. G., Lewis K. M., Casey P. J. (1995). *Computer automated sperm head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa*. Theriogenology, 44:989-1002.
- Gravance, C.G., Vishwanath, R., Pitt, C., Casey, P.J. (1996). *Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads*. Theriogenology. 46, 1205-1215.
- Gravance, C.G., Vishwanath, R., Pitt, C., Garner, D.L., Casey, P.J. (1998). *Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry*. J. Androl. 19 (1998) 704–709.
- Harrison, R.A.P., Vickers, S.E. (1990). *Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa*. J. Reprod. Fertil. 88, 343-352.

- Hendricksen, P.J.M., Tieman, M., van Der Lende, T., Johnson, L.A. (1993). *Binding of anti H-Y monoclonal antibodies to separated X and Y chromosome bearing porcine spermatozoa*. Mol. Reprod. Dev.: 35: 189-196.
- Hendricksen, P.J.M., Welch, G.R., Grootegoed, J.A., vander Lende, T., Johnson, L.A. (1996). *Comparison of detergent-solubilized membrane and soluble proteins from flow cytometrically sorted X- and Y- chromosome bearing porcine spermatozoa by high resolution 2-D electrophoresis*. Mol. Reprod. Dev.: 45: 342-450.
- Hoppe, P.C., Koo, G.C. (1984). *Reacting mouse sperm with monoclonal H-Y antibodies does not influence sex ratio of eggs fertilized in vitro*. J.Reprod. Immun.: 6: 1-9.
- Howes, E.A., Miller, N.G.A., Dolby, C., Hutchings, A., Butcher, G.W., Jones, R. (1997). *A search for sex-specific antigens on bovine spermatozoa using immunological and biochemical techniques to compare the protein profiles of X and Y chromosomebearing sperm populations separated by fluorescence-activated cell sorting*. J. Repro. Fertil.: 110: 195-204.
- Johnson, L.A. (1988). *Flow cytometric determination of sperm sex ratio in semen purportedly enriched for X- or Y- bearing sperm*. Theriogenology. 29; 265.
- Johnson L.A., Flook J.P., Hawk H.W. (1989). *Sex preselection in rabbits: live births from X- and Y- sperm separated by DNA and cell sorting*. Biol. Reprod.: 41: 199-203.
- Johnson, L.A. (1991). *Sex preselection in swine: altered sex ratios in offspring following surgical insemination of flow sorted X- or Y- bearing sperm*. Reprod. Dom. Anim.: 26 309-314.
- Johnson, L.A. (2000). *Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state of the art*. Anim Reprod Sci: 60-61: 93-107.
- Kiddy, C.A., Hafs, H.D. (Eds). (1971). *Sex ratio at birth – Prospects for control*. American Society of Animal Science, Savoy, IL.
- Kaneko, O., Oshiro, S., Kobayashi, T., Itzuka, R., Mohri, H. (1984). *Human X- and Y Bearing sperm differ incell surface sialic acid content*. Biochem. Biophys. Res. Commun.: 124: 950-955.
- Kruger, T.F., Du Toit, 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.

Lütke-Holz, F.J. (1958) *Vergleichende Messungen von Spermienköpfen an ungefärbtem und vitalgefärbtem Bullensamen unter besonderer Berücksichtigung des Spermatiefkühlverfahrens*. [Thesis]. Hannover, Germany: Tierärztliche Hochschule.

Marco-Jiménez, F., Viudes de Castro M.P., Balasch, S., Mocé, E., Silvestre, M.A., Gomez, E.A., Vicente, J.S. (2006). *Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation*. *Cryobiology* 52 (2006) 295–304

Maxwell, W.M.C., Evans, G. (1990). *Inseminación Artificial de ovejas y cabra*.

McClure, R.D., Tom, R. (1991). *Human sperm hypo-osmotic swelling test: Relationship to sperm fertilizing ability*. *Int. J. Fertil.* 36:360-366.

Mohri, H., Oshio, S., Kaneko, S., Kobayashi, T., Lizuka, R. (1987). *Separation and characterization of mammalian X- and Y- bearing sperm*. *New Horizons in Cell Research*. pp: 469-481. Ed. H. Mohri. Japan Scientific Society Press, Tokyo/Gordon and Breach Scientific Publishers, New York.

Moruzzi, J.F. (1979). *Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y chromosome-bearing spermatozoa*. *J. Reprod. Fertil.*: 57: 319.

Muiño, R. (2007). *Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas*. [Tesis doctoral] Universidad Santiago de Compostela, Facultad de Veterinaria.

Oliva-Hernández, J., Marcos-González, M. (2010). *Efectos de la descongelación-lavado sobre la motilidad, vitalidad y morfología de espermatozoides de baja calidad*. *Andrology* 2010;8(1):14-20.

Ollero, M., Pérez-Pe, R.; Gargallo, I., Morlanes, S., Osada, J., Muiño-Blanco, T., Cebrian-Perez J. (2000). *Separation of ram spermatozoa bearing X and Y chromosome*.

Padrón-Durán, R.S., Fernández-López, G. M., Gallardo-Ríos, M. (1998). *Interpretación del análisis seminal*. *Rev Cubana Endocrinol* 1998; 9(1):81-90

Pesch, S., Bergmann, M. (2006). *Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation*. *Micron* 37, 597-612.

- Pinkel, D., Lake, S., Gledhill, B.L., Van Dilla, M.A., Stephenson, D., Watchmaker, G. (1982). *High resolution DNA content measurements of mammalian sperm*. Cytometry, 3: 1-9.
- Pintado, B., De la Fuente, J., Roldan, E.R.S. (2000). *Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258 or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability*. J. Reprod. Fertil. 118, 145-152.
- Quintero, R.A. (2003). *Treatment of previable premature ruptured membranes*. Clinics in perinatology, 30(3):573-589.
- Rèvay, T. (2003). *Detection of the X- and Y-chromosomes of different bovines species by fluorescence in situ hybridization, studied in the context of their evolution and separation of X- and Y-bearing spermatozoa*. [Tesis Doctoral]. Budapest University of Technology and Economics.
- Rèvay, T., Nagy, S., Kovacs, A., Edvi, M.E., Hidas, A., Rens, W., Gustavsson, I. (2004). *Head area measurements of dead, live, X- and Y-bearing bovine spermatozoa*. Reproduction Fertility and Development 16, 681-687.
- Sakkas, D., Manicardi, G., Bianchi, P.G., Bizarro D., Bianchi, U. (1995). *Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa*. Biol. Reprod, 52:1149-1155.
- Schrader, S.M., Platek, S.F., Zaneveld, L.J.D., Pérez- Pelaez, M., Jeyendran, R.S. (1986). *Sperm viability: A comparison of analytical methods*. Andrologia, 18:530-538.
- Seidel, G.E. Jr., Allen, C.H., Johnson, L.A., Holland, M.D., Brink, Z., Welch, G.R., Graham, J.K., Cattell, M.B. (1997). *Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of non frozen and sexed spermatozoa*. Theriogenology: 48: 1255-64.
- Shanis, B.S., Check, J.H., Bollendorf, A. (1989). *Interpretation and misinterpretation of semen parameters*. Arch. Androl, 23: 213-217.
- Shapiro, H.M. (2003). *Practical flow cytometry*. 4th edition. Eds. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Singer, S.J., Nicholson, G.L. (1972). *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, 175:720-731.

Soler, C., Yeung, C.H., Cooper, T.G. (1994). *Development of sperm motility patterns in the murine epididymis*. Int. J. Androl, 17:271-278.

Thundathil, J., Palasz, A.T., Barth, A.D., Mapletoft, R.J., (1999). *An investigation of the fertilizing characteristics of pyriform shaped bovine spermatozoa*. Anim. Reprod. Sci. 57 (1-2), 35-50.

Urrego, R., Ríos, A., Olivera Ángel, M., Camargo, O. (2008). *Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoidesbovinos*. Rev. Colombiana Ciencias Pecuarias 2008; 21:19-26.

Van Munster E.B., Stap, J., Hoebe, R., te Meerman, G.J., Aten, J.A. (1999a). *Difference in volume of X- and Y- chromosome bearing bovine sperm heads matches difference in DNA content*. Cytometry: 35: 125-128.

Van Munster, E.B., Stap, J., Hoebe, R.A., te Meerman G.J., Aten, J.A. (1999b). *Difference in sperm head volume as a theoretical basis for sorting X- and Y- bearing spermatozoa: Potentials and limitations*. Theriogenology: 52: 1281-1293.

Van Munster, E.B. (2002). *Interferometry in flow to sort unstained X- and Ychromosome bearing bull spermatozoa*. Cytometry: 47: 192-199.

Vázquez, J.M., Martínez, E.M., Roca, J., Lucas, X., Parrilla, I. (2001). *Sex-sorting boar sperm: problems and possibilities*. Arch Animal Breeding Dummerstorf 44: 141-144

Vicente-Fiel, S., Palacín, I., Santolaria, P., Hidalgo C.O., Silvestre, M.A., Arrebola, F., Yániz J.L. (2013a). *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.

Vicente-Fiel, S., Palacin, I., Santolaria, P., Yaniz, J.L. (2013b). *A comparative study of sperm morphometric subpopulations in cattle, goat, sheep and pigs using a computer-assisted fluorescence method (CASMA-F)*. Anim. Reprod. Sci. 139, 182-189.

Welch, G.R., Johnson, L.A. (1999). *Sex preselection: laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X- and Y-sperm by sort reanalysis for DNA*. Theriogenology 52: 1343-1352.

WHO. World Health Organization. (1999).WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press. Nex York. Cambridge.

Woelders, H. (1991) *Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality*. En: *Boar semen preservation II*. Eds.: Johnson, L.A. y Rath, D. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg. 145-164.

Yániz J.L., Vicente-Fiel, S., Capistros, S., Palacín, I., Santolaria, P. (2012). *Automatic evaluation of ram sperm morphometry*. *Theriogenology* 77: 1341-50

Yaniz, J.L., Capistros, 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.