



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 DE  
ZARAGOZA

## **PROYECTO-TRABAJO FIN DE CARRERA**

# **EFFECTO DEL DILUYENTE SEMINAL SOBRE LA DINÁMICA DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO Y OTROS PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL EN MORUECO**

AUTOR:	<b>VÍCTOR VAL SANTOLARIA</b>
ENSEÑANZA:	<b>INGENIERO AGRÓNOMO</b>
DIRECTOR/ES:	<b>JESÚS YÁNIZ PÉREZ DE ALBÉNIZ</b>
FECHA:	<b>ABRIL DE 2012</b>

## ÍNDICE GENERAL.

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
1.1. RESUMEN EN CASTELLANO .....	1
1.2. RESUMEN EN INGLÉS .....	2
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>6</b>
<b>4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>7</b>
4.1. EL SEMEN .....	7
4.1.1. <i>El plasma seminal</i> .....	7
4.2. EL ESPERMATOZOIDE EN MAMÍFEROS.....	8
4.2.1. Morfología del espermatozoide.....	8
4.2.1.1. <i>La cabeza del espermatozoide</i> .....	9
4.2.1.2. <i>El flagelo del espermatozoide</i> .....	11
4.2.2. Producción y maduración espermática.....	12
4.2.2.1. <i>Espermatogénesis</i> .....	13
4.2.2.2. <i>Maduración del espermatozoide en el epidídimo</i> .....	14
4.2.3. El ADN del espermatozoide en los mamíferos .....	14
4.2.3.1. <i>Diferencias con las células somáticas</i> .....	14
4.2.3.2. <i>La remodelación de la cromatina</i> .....	18
4.2.3.3. <i>La fragmentación del ADN del espermatozoide</i> .....	21
4.2.3.4. <i>Posibles daños en el ADN del espermatozoide</i> .....	24
4.2.4. Fisiología del espermatozoide .....	25
4.3. TECNOLOGIA DE LA MANIPULACIÓN ESPERMÁTICA .....	26
4.3.1. Inseminación artificial .....	26
4.3.1.1. <i>Ventajas de la inseminación artificial</i> .....	26
4.3.1.2. <i>Desventajas de la inseminación artificial</i> .....	29
4.3.1.3. <i>Beneficio económico del uso de la inseminación artificial</i> . ..	30
4.3.2. Obtención del semen .....	30
4.3.2.1. <i>La vagina artificial</i> .....	30
4.3.2.2. <i>Factores que pueden alterar o dañar a los espermatozoides</i> .....	31
4.3.3. Dilución del semen .....	31
4.3.3.1. <i>Diluyente seminal</i> .....	32
4.3.3.2. <i>Funciones del diluyente</i> .....	33
4.3.3.3. <i>Diluyentes empleados</i> .....	34
4.3.4. Valoración espermática o espermograma .....	35
4.3.4.1. <i>Métodos clásicos</i> .....	36
4.3.4.2. <i>Otros métodos de evaluación de la calidad seminal</i> .....	39
4.3.4.3. <i>La evaluación de la fragmentación del ADN del espermatozoide</i> .....	50
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>60</b>
5.1. PREPARACIÓN DE LOS DILUYENTES .....	60
5.2. RECOGIDA, DILUCIÓN Y PREPARACIÓN DEL SEMEN.....	61

<b>5.3. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE MOVILIDAD MEDIANTE UN SISTEMA DE ANÁLISIS COMPUTERIZADO (CASA) .....</b>	<b>65</b>
<b>5.4. EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE MEMBRANA MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y ANÁLISIS DE IMAGEN.....</b>	<b>69</b>
<b>5.5. ANÁLISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO MEDIANTE EL TEST SCD.....</b>	<b>70</b>
<b>5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>71</b>
<b>6. <u>RESULTADOS</u>.....</b>	<b>73</b>
<b>7. <u>DISCUSIÓN</u>.....</b>	<b>80</b>
<b>8. <u>CONCLUSIONES</u> .....</b>	<b>85</b>
<b>9. <u>AGRADECIMIENTOS</u> .....</b>	<b>86</b>
<b>10. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....</b>	<b>87</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Esquema de las regiones (a) y ultraestructura (b) del espermatozoide de mamífero (Modificado de Fawcett, DW. Tratado de Histología. Interamericana McGraw-Hill, 1989).....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 2. Esquema de la ultraestructura de la cabeza de un espermatozoide de mamífero (Figura 2a: modificado de McKinnon, AO y Voss, JL. Equine Reproduction. Malvern, PA: Lea y Febiger, 1993) y micrografía electrónica de la región del acrosoma (Figura 2b: modificado de Fawcett, DW. Tratado de Histología. Interamericana McGraw-Hill, 1989).....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 3. Estructuras del cuello del espermatozoide de mamífero (modificado de McKinnon, AO y Voss, JL. Equine Reproduction. Malvern, PA: Lea y Febiger, 1993).....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 4. Estructura del flagelo del espermatozoide de mamífero (modificado de McKinnon, AO y Voss, JL. Equine Reproduction. Malvern, PA: Lea y Febiger, 1993).....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 5. Niveles de empaquetamiento de la cromatina de las células somáticas y los espermatozoides. Extraído de Ward (1993) y De Jonge y Barratt (2006)The Sperm Cell, modificado a partir del modelo de Sotolongo y col. (2003).....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 6. Modelo hipotético de la eliminación de los superenrollamientos durante la espermogénesis. (Boissonneault, 2002).....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 7. Sistema CASA para el análisis espermático compuesto por un microscopio de contraste de fase conectado a una pletina atemperada, a una cámara de video y a un software de análisis de imágenes por ordenador. .....</i>	<i>46</i>

<i>Figura 8. Terminología estándar de algunos parámetros de movilidad evaluados mediante el sistema CASA.....</i>	48/67
<i>Figura 9. Microscopio de fluorescencia conectado a una cámara fotográfica para el análisis de la integridad de membrana.....</i>	50
<i>Figura 10. Visualización de la integridad del ADN mediante el ensayo de cometas. Los espermatozoides que presentan ADN fragmentado muestran un claro desplazamiento de los fragmentos de ADN al ser sometidos a la acción de un campo eléctrico.....</i>	54
<i>Figura 11. Visualización de la integridad del ADN mediante el método SCD combinado con DBD-FISH en humano. a) Los halos de dispersión de la cromatina muestran espermatozoides con su ADN íntegro (núcleos 1,2,5,6) mientras que los que no presentan halo o este es de tamaño reducido, contienen ADN fragmentado (núcleos 3, 4). Tinción DAPI. b) Representa el mismo campo que la figura a) tras DBD-FISH. Tan solo los espermatozoides etiquetados como 3 y 4 muestran una clara señal de hibridación, es decir, con roturas del ADN.....</i>	57
<i>Figura 12. Estufa a 37°C para atemperado del material de recogida seminal. ..</i>	61
<i>Figura 13. Machos usados para la recogida de eyaculados.....</i>	62
<i>Figura 14. Vagina artificial. ..</i>	63
<i>Figura 15 Momento de la recogida del eyaculado. ..</i>	63
<i>Figura 16. Momento de la dilución de los eyaculados. ..</i>	64
<i>Figura 17. Cámara a 15°C para transporte de las muestras. ....</i>	64
<i>Figura18. Captura de pantalla del programa CASA (ISAS, PROISER®, Valencia, España) de un campo de una muestra de semen de morueco, capturado utilizando un microscopio Olympus BX40 (Olympus Optical co., Tokyo, Japón) para el análisis de los parámetros de movilidad espermática. ....</i>	68
<i>Figura 19. Hoja de datos generada por el sistema CASA. ....</i>	68
<i>Figura 20. Imagen de una muestra con espermatozoides marcados mediante fluorescencia bajo un microscopio de epifluorescencia (DM4500B Leica, Alemania), los verdes marcados con naranja de acridina (AO) corresponden con espermatozoides viables, los rojos marcados con ioduro de propido (PI) corresponden con espermatozoides con daño en la membrana. ....</i>	69
<i>Figura 21. Imagen de una muestra con espermatozoides analizados con el test SCD. El espermatozoide de la parte superior de la imagen no presenta ADN fragmentado y muestra un halo de dispersión pequeño, compacto e intensamente teñido. El espermatozoide de la parte inferior presenta ADN</i>	

<i>fragmentado y muestra halo de difusión de la cromatina muy grande y ligeramente teñido. ....</i>	70
<i>Figura 22. Efecto de los diferentes diluyentes en la movilidad de los espermatozoides de morueco durante la incubación a 37°C hasta las 24 horas. ....</i>	73
<i>Figura 23. Efecto de los diferentes diluyentes en la cantidad de espermatozoides de morueco con movimiento progresivo durante la incubación hasta las 24 horas. ....</i>	74
<i>Figura 24. Efecto de los diferentes diluyentes en los espermatozoides de morueco durante la incubación a 37°C hasta las 24 horas en parámetros cinéticos: a) velocidad curvilínea, b) velocidad rectilínea y c) velocidad media. ....</i>	75
<i>Figura 25. Efecto de los diferentes diluyentes en los espermatozoides de morueco durante la incubación a 37°C hasta las 24 horas en parámetros de calidad de movimiento: a) índice de linealidad, b) índice de rectitud, c) índice de oscilación y d) amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza. ....</i>	77
<i>Figura 26. Efecto de los diferentes diluyentes en los espermatozoides de morueco durante la incubación hasta las 24 horas en el porcentaje de espermatozoides viables en referencia a la integridad de la membrana de los mismos. ....</i>	78
<i>Figura 27. Efecto de los diferentes diluyentes en el índice de fragmentación del ADN de los espermatozoides de morueco durante la incubación a 37°C hasta las 24 horas. ....</i>	79
<i>Figura 28. Variación del pH en los diferentes diluyentes de semen de morueco durante la incubación hasta las 24 horas. ....</i>	79

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Constituyentes del plasma seminal. ....</i>	7
<i>Tabla 2. Parámetros de movilidad analizados en el presente proyecto mediante el sistema CASA ....</i>	47/66

## 1. **RESUMEN.**

### 1.1. **RESUMEN EN CASTELLANO.**

Tradicionalmente la valoración de la calidad del semen como método predictivo de la fertilidad del macho y del eyaculado incluye la evaluación de una serie de parámetros macro y microscópicos entre los que se incluyen el volumen del eyaculado, movimiento o morfología espermática. La fragmentación del ADN de los espermatozoides se considera un nuevo indicador importante de la calidad seminal y la fertilidad. Los valores de fragmentación de la molécula ADN transportada por el espermatozoide y su relación con la fertilidad, es un tema de enorme interés, tanto en humanos como en el resto de las especies, dado el papel implícito que se le otorga al ADN en el momento de producir una descendencia. El objetivo general de este trabajo fue evaluar el efecto del diluyente seminal sobre la dinámica de fragmentación del ADN espermático y otros parámetros de calidad en semen ovino de la raza Rasa Aragonesa, con el objetivo final de avanzar en el diseño de diluyentes más eficaces. El semen se recogió mediante una vagina artificial de los segundos eyaculados de seis machos adultos de la Rasa Aragonesa. Se tomaron 100  $\mu$ l de semen de cada macho y se añadió a cada uno de los 8 diluyentes preparados el día anterior: basados en citrato, fosfato, TES, HEPES, MOPS, TRIS, leche e INRA96. Las muestras se incubaron a 37°C pretendiendo emular las condiciones del aparato genital de la hembra y acelerar los procesos de degradación espermática. Se realizaron estudios de los parámetros de movilidad, integridad de membrana y fragmentación del ADN espermático a las 0, 3, 6 y 24 horas de incubación. Para la evaluación de los parámetros de movilidad se utilizó un sistema de análisis computerizado (CASA). El análisis de la integridad de membrana se realizó mediante microscopía de fluorescencia. La dinámica de fragmentación del ADN espermático se estudió mediante el test SCD. El estudio estadístico de las variables obtenidas se realizó mediante el paquete estadístico SPSS. El nivel de significación estadística se fijó en  $P < 0,05$ . Los diluyentes basados en tampones del grupo zwiterion (TES, MOPS y HEPES) son los que obtuvieron mejores resultados globales de movilidad, integridad de membrana, viabilidad espermática y fragmentación del ADN hasta las 24h de incubación a 37°C. Los diluyentes basados en la leche o sus componentes (Leche e INRA) presentaron un aumento claro de la fragmentación del ADN espermático a partir de las 6h de incubación, posiblemente asociado a un menor pH del medio. El TRIS provocó una alteración de las variables relacionadas con la calidad del movimiento, y el citrato y fosfato presentaron unos malos resultados de movilidad durante la incubación. Sin embargo, estos tres últimos diluyentes presentaron porcentajes reducidos de fragmentación del ADN espermático hasta las 24h.

## 1.2. RESUMEN EN INGLÉS.

Traditionally the sperm quality assessment as a predictive method of the potential fertility of the male ejaculate includes the macro-and microscopic parameters evaluation which include ejaculate volume, motility, or sperm morphology. Sperm DNA fragmentation is considered a new important semen quality and a fertility indicator. The fragmentation values of the sperm DNA molecule and its relation with fertility has a great interest, both in humans and in other species. The overall objective of this study was to evaluate the effect of various diluents on the sperm DNA fragmentation dynamics and other semen quality parameters in Rasa Aragonesa rams, with the ultimate goal of advancing the design of more effective diluents. Second ejaculates from six adult males were collected using an artificial vagina. A 100  $\mu$ l sample from each male and was added to each of the 8 extenders prepared the day before: citrate, phosphate, TES, MOPS, HEPES and TRIS-based diluents, milk and INRA96. The samples were incubated at 37°C to emulate the female genital tract conditions and accelerate the sperm degradation process. Studies were made of the parameters of motility, membrane integrity and sperm DNA fragmentation at 0, 24 and 48 hours. For sperm motility assessment a computerized analysis system (CASA) was used. Analysis of membrane integrity was performed by fluorescence microscopy. The dynamics of sperm DNA fragmentation was studied by the SCD test. The statistical analysis of the obtained variables was performed using SPSS. The level of statistical significance was set at  $P < 0.05$ . From the results obtained in the study were drawn the following conclusions: The group of zwitterionic compounds, MOPS, TES and HEPES obtained the best overall results in motility, membrane integrity, sperm viability and DNA fragmentation up to 24 hours of incubation at 37° C. Sperm DNA fragmentation clearly increase after 6h of incubation in milk-based diluents (milk and INRA), possibly associated to the lower pH of the medium. TRIS-based diluent caused dramatic changes in the kinetic parameters of sperm during incubation and citrate and phosphate showed poor results of motility during incubation. However, these last three diluents had low sperm DNA fragmentation percentages until 24h.

## 2. INTRODUCCIÓN.

La inseminación artificial (IA), junto con la utilización de tests de progenie precisos, juega un papel importante en la mejora genética del ovino (Evans y Maxwell, 1987). La IA permite fragmentar cada eyaculado en más de una dosis seminal, posibilitando obtener un mayor rendimiento de cada macho, pasando de aproximadamente 30 ovejas cubiertas al año con monta natural a más de 1.000 mediante inseminación artificial con semen refrigerado (Maxwell, 1984). Por ello, la IA es la principal técnica en el desarrollo de todos los Esquemas de Selección Ovina, incluidos los desarrollados en Aragón. Una vez que el Esquema de Selección ha alcanzado un nivel de mejora de un determinado carácter, la difusión de la misma se convierte en un objetivo prioritario. Tal es el caso, por ejemplo, del Esquema de Selección desarrollado por UPRA-Carnes Oviaragón, cuyo principal objetivo es el aumento de la prolificidad de la raza Rasa Aragonesa.

En la actualidad, en ganado ovino se utiliza principalmente la inseminación exocervical con semen refrigerado, asociada normalmente a un programa de mejora genética. La inadecuada conservación del semen y la dificultad para pasar el cuello del útero durante la inseminación artificial son los principales obstáculos para el uso extensivo de semen refrigerado en los programas de inseminación artificial en ovino. La deposición exocervical del semen conservado a 15°C por menos de 8 horas, sigue siendo la técnica de IA que utilizan predominantemente en los países del Mediterráneo.

Tradicionalmente la valoración de la calidad del esperma como método predictivo de la fertilidad del macho y del eyaculado incluye la evaluación de una serie de parámetros macro y microscópicos entre los que se incluyen el volumen del eyaculado, movimiento o morfología espermática. Saacke et al (1988, 1994) sugirieron que los factores asociados a la calidad seminal que afectan a la fertilidad pueden ser clasificados en compensables o no compensables. Los factores compensables son sensibles al número de espermatozoides totales inseminados, mientras que los no-compensables no lo son. Conforme aumenta el número de espermatozoides por dosis de inseminación, aumenta la fertilidad hasta que se alcanza una meseta (den Dass, 1992). En este punto, los factores compensables no tienen un efecto adicional en la fertilidad. En la inseminación comercial en ovino se utilizan elevadas concentraciones de espermatozoides por dosis (entre 250 y 400 millones en los países mediterráneos), lo que asegura que se supere la meseta antes comentada. Son por lo tanto los factores no compensables los que pueden contribuir en mayor medida a las diferencias de fertilidad entre los moruecos.

Un defecto no compensable de los espermatozoides podría ser aquel en el que un espermatozoide llegase al sitio de fecundación e iniciase el proceso de activación oocitaria, pero no fuera capaz de mantener el desarrollo del cigoto, embrión o feto (Ostenmeier y col., 2001). Tales defectos se han encontrado en espermatozoides de toros que difieren en fertilidad (Eid y col., 1994). Por lo tanto, las causas de factores no compensables podrían ser la cromatina incorrectamente condensada, o el DNA dañado dentro del núcleo del espermatozoide (Ostenmeier y col., 2001). Parece lógico asumir que la transferencia de la molécula del DNA íntegra e intacta desde el espermatozoide al óvulo, es crucial para conseguir una fecundación con ciertas perspectivas de éxito. En este sentido, es bien conocido que la presencia de defectos en el material genético, tales como anomalías en la condensación de la cromatina, en relación con el proceso de la

maduración del espermatozoide, la integridad de la molécula de DNA asociada con la presencia de roturas tanto de doble cadena como de cadena sencilla del DNA, o la presencia de anomalías cromosómicas, como pueden ser las aneuploidías o las reordenaciones genómicas estructurales, se asocian estrechamente con la infertilidad (Aravindan y col., 1997).

Por lo tanto, la fragmentación del ADN de los espermatozoides se considera un indicador importante de la calidad seminal y la fertilidad. El espermatozoide es la célula encargada de transportar el material genético masculino al óvulo. La calidad de la información genética contenida en la molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) transmitida por el espermatozoide es importante para el correcto desarrollo del embrión. Por tanto los valores de fragmentación de la molécula ADN transportada por el espermatozoide y su relación con la fertilidad, es un tema de enorme interés, tanto en humanos como en el resto de las especies, dado el papel implícito que se le otorga al ADN en el momento de producir una descendencia. Sin embargo, el estudio de cuán fragmentado se encuentra el ADN del espermatozoide no es una tarea sencilla debido a que la evolución ha blindado la información genética para ser transportada, haciéndola poco accesible a todo tipo de factores externos que puedan modificarla.

Aunque existe mucha información sobre la fragmentación del ADN del espermatozoide a partir de estudios realizados en espermatozoides humanos, los trabajos disponibles en animales son más escasos. Los pocos estudios efectuados en mamíferos apuntan en la misma dirección que los realizados en humanos, un alto nivel de fragmentación parece estar asociado con una fertilidad reducida (Evenson y Jost, 1994; Rybar y col., 2004).

En varios trabajos se ha explorado la utilidad de este parámetro en la valoración de la calidad seminal y en la predicción de la fertilidad, de manera que existe una gran variedad de pruebas para estimar la integridad del ADN de los espermatozoides. En el presente trabajo se utiliza la llamada Test de Dispersión de la Cromatina del Espermatozoide (SCD) que está basada en la respuesta diferencial que ofrecen los núcleos espermáticos a la descondensación. Esta técnica, desarrollada inicialmente para espermatozoides humanos, se ha utilizado en este estudio para su utilización en espermatozoides de ovino mediante la técnica desarrollada por Halotech dna<sup>®</sup>, Ovis-Halomax<sup>®</sup>.

Recientemente se ha propuesto que la incorporación de nuevas técnicas de evaluación de la calidad seminal, entre las que se incluyen la fragmentación del ADN, puede resultar muy útil para mejorar los diluyentes seminales (delValle y col., 2009). A diferencia de otras especies como el porcino o vacuno, en ovino se ha avanzado muy poco en el diseño de diluyentes seminales más eficaces que permitan aumentar la conservación del semen. En esta especie, los componentes biológicos en los diluyentes, como la leche o la yema de huevo no han sido sustituidos de manera eficiente en la utilización práctica de la inseminación artificial. De hecho, la leche desnatada, un complejo y variable componente biológico, es el principal diluyente utilizado para preservar el semen de ovino a 15 °C para IA en numerosos países, incluido España.

La utilización de muestras de semen refrigerado o congelado para su uso posterior en reproducción asistida presenta dos cuellos de botella importantes: la rotura provocada de la temperatura en las muestras de semen, al ser refrigeradas o congeladas,

genera una situación de daño irreversible, y el hecho de que la fecundación no ocurra de forma instantánea tras la inseminación, genera un espacio de tiempo suficiente para que el daño basal con el que se inició el proceso de inseminación se incremente tras depositar el semen en el seno materno. Estas dos situaciones deben tener una relevancia especial en el caso del ganado ovino y caprino, dado que la vida media de los espermatozoides, una vez extraídos del macho, se podría considerar efímera desde que se produce la extracción hasta que se realiza fecundación. Por ello la evaluación puntual de la calidad seminal puede no ser un indicador suficiente de fertilidad potencial. La incubación de las muestras a 37-38 °C, evaluando la calidad a lo largo del tiempo, se ha propuesto como un método alternativo que permite predecir la evolución de los espermatozoides en el aparato genital de la hembra tras la IA.

En un trabajo previo desarrollado por nuestro grupo (Yániz y col., 2011), comparamos el efecto de el efecto del sistema tampón utilizado en el almacenamiento de semen ovino a 15 °C. Se concluyó que los tampones zwitterion (TES, MOPS y HEPES) podrían ser una alternativa aceptable para su inclusión en la composición de diluyentes para el almacenamiento refrigerado semen en ovino. Por otro lado, el TRIS, generalmente incluido en la composición de diluyentes de semen de ovino, en comparación con otros estudios realizados parecía causar modificaciones drásticas en los parámetros de calidad del movimiento espermático durante el almacenamiento a 15 °C. En la evaluación de la calidad seminal se utilizaron dos técnicas principales, la movilidad determinada mediante un sistema CASA y la integridad de membrana. En el presente trabajo fin de carrera además utilizaremos la dinámica de fragmentación del ADN espermático para la comparación de 8 diluyentes seminales con el objetivo final de avanzar en el diseño de diluyentes más eficaces.

### 3. OBJETIVOS.

El objetivo general de este trabajo es evaluar el efecto del diluyente seminal sobre la dinámica de fragmentación del ADN espermático y otros parámetros de calidad en semen ovino de la raza Rasa Aragonesa. Los objetivos concretos fueron los siguientes:

1. Estudiar “*in Vitro*” el efecto de ocho diluyentes (leche, MOPS, TRIS, citrato, TES, HEPES, INRA y fosfato) sobre la dinámica de fragmentación del ADN espermático, analizado mediante el test de la dispersión de la cromática espermática (SCD), durante la incubación del semen de morueco a 37°C hasta las 24 horas.
2. Estudiar “*in Vitro*” el efecto de los mismos diluyentes sobre diversos parámetros de movilidad espermática estudiados mediante un sistema de evaluación computerizada (CASA) durante la incubación del semen de morueco a 37°C hasta las 24 horas.
3. Estudiar “*in Vitro*” el efecto de los mismos diluyentes sobre la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide de morueco durante la incubación del semen de morueco a 37°C hasta las 24 horas.

#### 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

Para comprender las bases en las que se fundamentan el estudio de la fragmentación del ADN y el análisis seminal o espermiograma es necesario explicar los principios morfológicos y fisiológicos en los que se basan las diferentes técnicas de análisis. Por ello vamos a realizar una breve introducción sobre morfología y fisiología del espermatozoide, para pasar después a describir los diferentes métodos de análisis.

##### 4.1. EL SEMEN.

El semen es la suspensión celular líquida que contiene los espermatozoides y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino. La porción líquida de dicha suspensión, formada durante la eyaculación, es el plasma seminal.

###### 4.1.1. El plasma seminal.

La importancia funcional del plasma seminal es cuestionable, ya que en algunas especies es posible inducir la preñez por inseminación con espermatozoides epididimarios. Sin embargo, dicho plasma parece ser componente esencial en el apareamiento natural porque sirve como portador y protector de los espermatozoides. La importancia de esta función varía, puesto que en algunas especies la eyaculación se realiza directamente en el útero (p. ej., cerda y yegua), mientras que el plasma seminal parece ser más importante en el apareamiento natural de la oveja y la vaca, en las cuales el eyaculado se deposita en la vagina (Hafez, 1985).

El plasma seminal está constituido por las secreciones de las glándulas bulbouretrales, la próstata, las vesículas seminales, el epidídimo y los conductos deferentes, siendo un vehículo isotónico, nutritivo y protector al permanecer tamponado, tendiendo hacia un PH normalmente neutro (5,9 – 7,3). Contiene también agentes antimicrobianos como la seminalplasmina e inmunoglobulinas, principalmente IgA y una gran variedad de hormonas como andrógenos, estrógenos, FSH, LH, gonadotropina coriónica, hormona del crecimiento, insulina, glucagón, prolactina, relaxina, destacando entre ellas las prostaglandinas.

Constituyentes del plasma seminal:	
<b>Agua</b>	75 %
<b>Fructuosa</b>	250 mg / 100 ml
<b>Ácido cítrico</b>	110-260 mg / 100 ml
<b>Sorbitol</b>	26-170 mg / 100 ml
<b>Inositol</b>	7- 14 mg / 100 ml
<b>Glicerilfosforilcolina</b>	1100-2100 mg / 100 ml
<b>Sodio</b>	178 mg / 100 ml
<b>Potasio</b>	89 mg / 100 ml
<b>Calcio</b>	6 mg / 100 ml
<b>Magnesio</b>	6 mg / 100 ml
<b>Cloro</b>	86 mg / 100 ml
<b>Prostaglandinas</b>	740 µg / ml
<b>Proteínas</b>	5 g / 100 ml

Tabla 1. Constituyentes del plasma seminal.

El eyaculado generalmente es expulsado en cuatro fracciones diferentes:

- Fracción pre-eyacularia con consistencia mucosa y con ausencia de espermatozoides.
- Fracción previa fluida, proviene de la próstata, y también carente de espermatozoides. Tiene un pH ácido y se caracteriza por su elevada concentración de fosfatasa ácida y ácido cítrico. Corresponde del 13 al 33% del eyaculado.
- Fracción principal constituida por elementos líquidos y gelatinosos, es rica en espermatozoides y procede del epidídimo, vaso deferente y ampolla deferencial.
- Fracción terminal gelatinosa, es la más abundante del eyaculado, entre el 50 y el 80%. Procede de las vesículas seminales y es rica en fructosa. Su pH es alcalino y contiene espermatozoides, mayoritariamente inmóviles.

## 4.2. EL ESPERMATOZOIDE EN MAMÍFEROS.

El espermatozoide 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 zigoto 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.

Los espermatozoides constituyen aproximadamente el 25% del volumen del eyaculado (semen normal) y lo restante es secreción de tubos y glándulas.

### 4.2.1. Morfología del espermatozoide.

Los espermatozoides son las únicas células de los mamíferos que poseen flagelo; esto le ayuda a ser una célula con alta movilidad, capaz de nadar libremente. Se componen principalmente de dos partes: una cabeza y su flagelo, pero dentro de ellas podemos distinguir varias estructuras, las cuales, en orden cefálico-caudal, son: acrosoma, núcleo, membrana, cuello, pieza media, cola y pieza terminal.

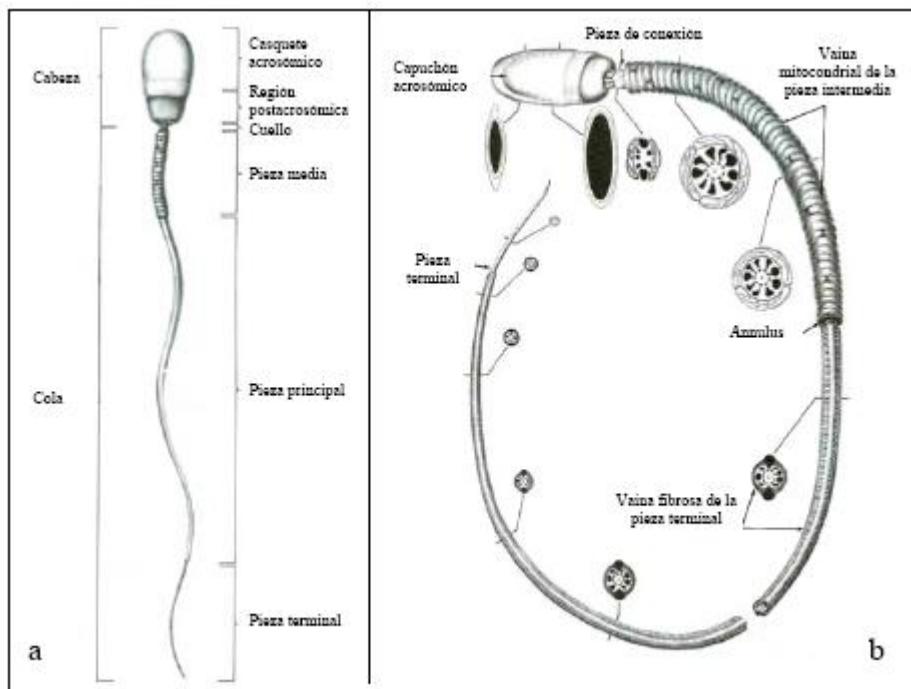


Figura 1. Esquema de las regiones (a) y ultraestructura (b) del espermatozoide de mamífero (Modificado de Fawcett, DW. Tratado de Histología. Interamericana McGraw-Hill, 1989)

#### 4.2.1.1. La cabeza del espermatozoide.

La cabeza de los espermatozoides de los mamíferos presenta variaciones importantes en su forma entre las diferentes especies. En la cabeza se localizan dos estructuras fundamentales: el acrosoma y el núcleo espermático; el primero es una vesícula membranosa en forma de capuchón, que se encuentra localizada en el borde apical de la cabeza adaptado estrechamente al contorno de la parte anterior aguda del núcleo del espermatozoide (Figura 2).

En el acrosoma distinguimos la membrana acrosomal interna (próxima a la parte anterior de la membrana nuclear externa) y la membrana acrosomal externa (próxima a la cara interna de la membrana plásmatica). Entre ambas se forma un saco que contiene diversas enzimas hidrolíticas incluyendo, entre otras, proacrosina, hialuronidasas, esterasas e hidrolasas. El contenido acrosomal se libera al exterior en un proceso denominado reacción acrosómica necesario para la fecundación del oocito. Durante la llamada reacción acrosómica, la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática se fusionan (a través de vesiculaciones) liberando al exterior la mayor parte del contenido acrosomal.

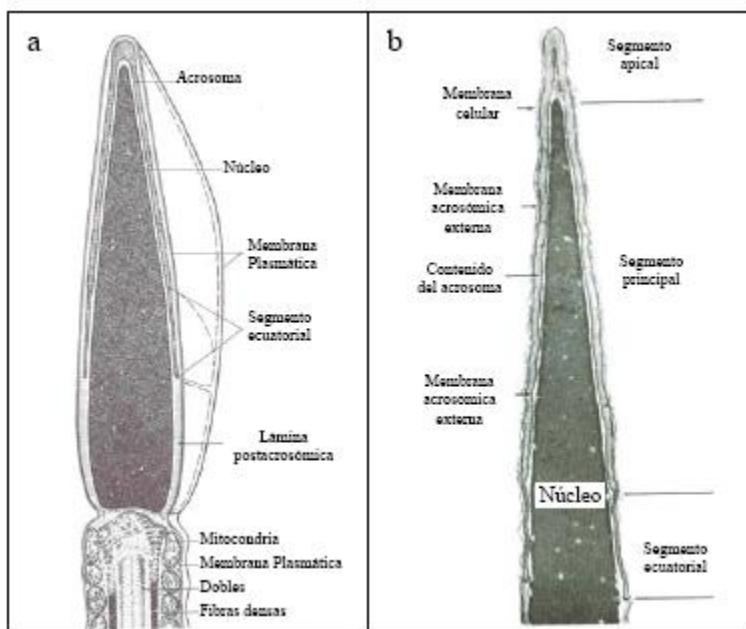


Figura 2. Esquema de la ultraestructura de la cabeza de un espermatozoide de mamífero (Figura 2a: modificado de McKinnon, AO y Voss, JL. *Equine Reproduction*. Malvern, PA: Lea y Febiger, 1993) y micrografía electrónica de la región del acrosoma (Figura 2b: modificado de Fawcett, DW. *Tratado de Histología. Interamericana McGraw-Hill*, 1989).

El núcleo (Figura 2) contiene un número haploide de cromosomas y nucleoproteínas, fundamentalmente protaminas espermáticas, y está envuelto por la membrana nuclear. 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. 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 en el oocito, el espermatozoide debe descondensar su cromatina para formar el pronúcleo masculino. 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 y col., 1995).

En posición caudal con respecto al acrosoma, hay una capa densa especializada entre la membrana plasmática y la envoltura nuclear, que muestra un patrón característico de su estructura fina diferente entre especies, y que se denomina lámina postacrosómica. Esta estructura es importante ya que, justamente es la que se fusiona primero con la membrana del oocito en el momento de la fecundación (Fawcett, 1969).

La envoltura nuclear que se extiende por detrás del núcleo reviste la fosa de implantación, lugar donde el flagelo se une a la cabeza.

#### 4.2.1.2. *El flagelo del espermatozoide.*

El flagelo o cola comprende cuatro regiones principales: el cuello, la pieza intermedia, y los segmentos principal y terminal (Figura 1 b). El cuello es la región del espermatozoide que une la cabeza con el flagelo (Figuras 2 y 3). Es una zona frágil y estructuralmente compleja en la que se diferencia la pieza de conexión y algunas mitocondrias. Inmediatamente detrás de la cabeza se encuentra la pieza de conexión que estructuralmente se compone de capítulo, columnas segmentadas, placa basal y centriolo proximal. El capítulo constituye el borde craneal del flagelo y su forma se adapta a la de la fosa de implantación, ubicada en la base de la cabeza, donde queda adherido a la placa basal. Las columnas segmentadas sirven de origen para la formación de las llamadas fibras densas, que en número de nueve, se extienden hasta el final de la pieza principal. El centriolo proximal, orientado transversalmente, se sitúa inmediatamente debajo de la superficie articular del capítulo, entre las columnas segmentadas mayores. Esta estructura es el origen del axonema que se prolonga distalmente en el flagelo. En la región del cuello, fuera de la pieza de conexión, pueden encontrarse una o dos mitocondrias orientadas longitudinalmente.

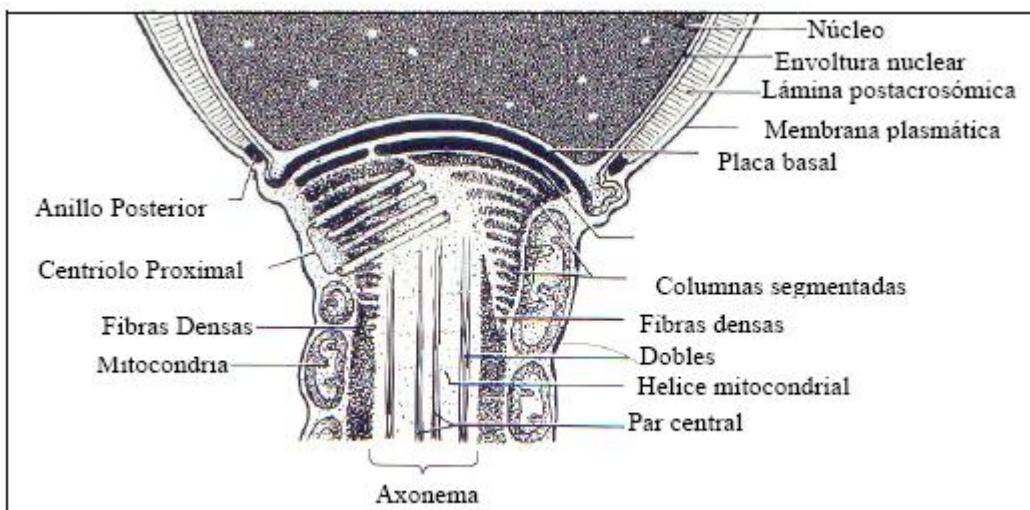


Figura 3. Estructuras del cuello del espermatozoide de mamífero (modificado de McKinnon, AO y Voss, JL. *Equine Reproduction*. Malvern, PA: Lea y Febiger, 1993)

En la pieza intermedia (Figura 4), continuación del cuello, se dispone como eje del flagelo el axonema, formado por dos microtúbulos centrales rodeados de nueve dobletes de microtúbulos regularmente distribuidos. Esta estructura microtubular, designada ordinariamente con la fórmula 9+2 se prolonga distalmente a lo largo de toda la cola hasta cerca de la punta de la pieza terminal. El axonema queda rodeado de las nueve fibras densas procedentes de cada una de las columnas segmentadas de la pieza de conexión, de forma que cada una de ellas lleva un trayecto longitudinal en relación estrecha con uno de los nueve dobletes del axonema. Se considera que el componente

motor del flagelo es el axonema y las fibras densas. 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. Inmediatamente distal a la última vuelta de la vaina mitocondrial se dispone el anillo, que se fija a la membrana para impedir el retroceso de las mitocondrias hacia las zonas distales de la cola.

La pieza principal del espermatozoide va adelgazando progresivamente hasta la pieza terminal (Figura 4). Se compone de una vaina fibrosa que rodea, en el eje central, al axonema y sus fibras densas. La asimetría de la vaina fibrosa parece estar implicada en la modulación del plano de batida del flagelo espermático (Fawcett, 1989). La pieza terminal es la porción de la cola posterior a la terminación de la vaina fibrosa. Esta contiene únicamente el axonema central cubierto por la membrana plasmática (Figura 4).

Externamente a la cabeza y flagelo se dispone la membrana plasmática (Figuras 1 a 4), que responde al modelo de mosaico fluido (Singer y Nicholson, 1972), compuesta por proteínas integradas en una bicapa de fosfolipídos. 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.

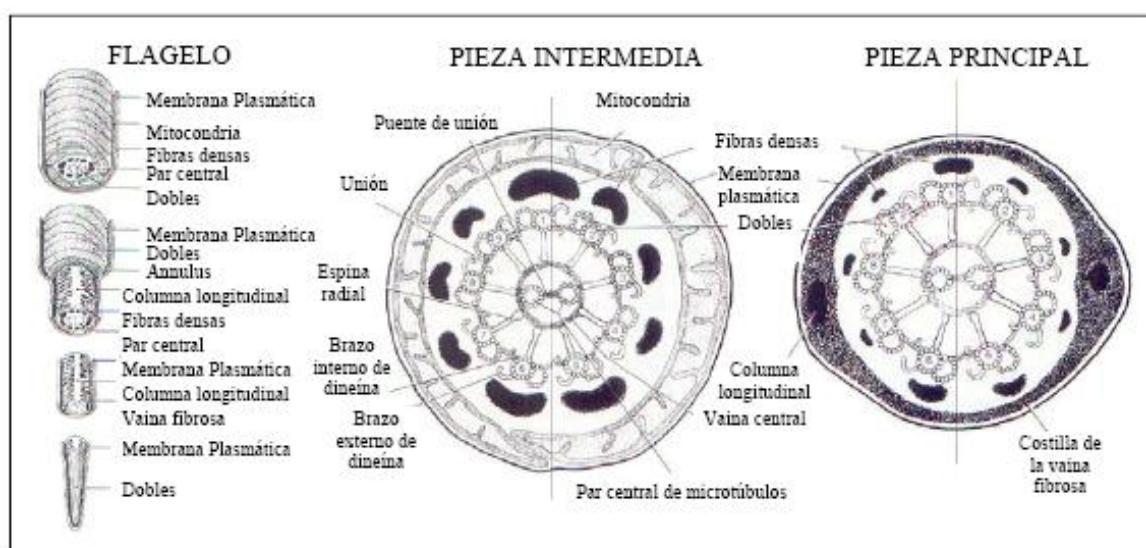


Figura 4. Estructura del flagelo del espermatozoide de mamífero (modificado de McKinnon, AO y Voss, JL. *Equine Reproduction*. Malvern, PA: Lea y Febiger, 1993).

#### 4.2.2. Producción y maduración espermática.

En el proceso de espermatoformación las células madre se transforman en espermatozoides, posteriormente se produce una maduración en el epidídimos para adquirir movimiento y capacidad fecundante, y por último, ya en el tracto reproductor femenino, ocurre el proceso de capacitación.

#### 4.2.2.1. *Espermatogénesis.*

La espermatogénesis es el proceso por el cual las espermatogonias o células madre se transforman en espermatozoides. Durante las primeras fases del desarrollo embrionario y antes de la diferenciación sexual, las células germinales primordiales migran desde el saco vitelino a las gónadas del embrión, donde se dividen y forman los gonocitos. A partir del periodo fetal, estos se localizan en el interior de los túbulos seminíferos, y poco antes de la pubertad se dividen y diferencian dando lugar a las espermatogonias o células madre.

La espermatogénesis comprende una serie de fenómenos de división y diferenciación celular, mediante el cual las espermatogonias ubicadas en la base de los túbulos seminíferos se dividen por mitosis para producir cíclicamente espermatocitos, que por meiosis producirán espermátidas haploides, las cuales se diferenciarán en espermatozoides que se liberan hacia la luz tubular. Se trata de un proceso cíclico que en los pequeños rumiantes tiene una duración aproximada de 49 días (Franca y col., 1999; Folch, 2000). Este proceso requiere la intervención de la testosterona bajo el estímulo de la LH (Hormona Luteinizante), y de la FSH (Hormona Folículo Estimulante). La espermatogénesis se puede dividir en tres fases: espermatocitogénesis (mitosis), meiosis y espermiogénesis.

En la primera fase, de división celular, las espermatogonias en el epitelio seminífero, entran en mitosis mediante mecanismos locales de regulación. Las espermatogonias más primitivas proliferan por división mitótica para perpetuarse a sí mismas y dar a la vez origen a varias generaciones sucesivas de espermatogonias. La división de la última generación de espermatogonias da lugar a los espermatocitos primarios.

Durante la meiosis, se produce la diferenciación celular originándose a partir de una célula diploide cuatro células haploides, combinando dos divisiones celulares completas con una sola replicación de ADN. Los espermatocitos primarios son los que sufren la primera división meiótica o meiosis reduccional. Durante la profase, se replica el ADN, de manera que los espermatocitos son células tetraploides. Se incrementa la formación de quiasma, así cada célula resultante tiene un genotipo diferente. En la metafase, se disuelve la membrana nuclear y se forma el huso acromático. En la anafase, la mitad del número original de cromosomas emigra hacia cada polo celular. En la telofase, se desenrollan los cromosomas y vuelve a formarse una nueva membrana nuclear. Tras dividirse el citoplasma quedan dos células hijas, los espermatocitos secundarios, unidas por puentes intercelulares. La segunda división meiótica, o meiosis ecuacional, permite que de cada espermatocito secundario se formen dos espermátidas haploides sin replicación del ADN.

La espermiogénesis es un proceso de transformación y maduración, en el que ya no se produce división celular, y en el que acontecen una serie de cambios morfológicos que incluyen la formación del acrosoma, desarrollo del flagelo, condensación de la cromatina y reorganización de los orgánulos del citoplasma.

#### **4.2.2.2. Maduración del espermatozoide en el epidídimo.**

Una vez concluida la espermogénesis, los espermatozoides de los mamíferos están altamente diferenciados, pero, sin embargo, aun no poseen el movimiento adecuado ni la capacidad de fusionarse al oocito; es durante su tránsito y almacenamiento en el epidídimo y posterior transporte a través del tracto reproductor de la hembra donde experimentan una secuencia de cambios morfológicos, bioquímicos y cinemáticos a través de los cuales adquieren su capacidad fecundante (Cooper, 1986).

Los espermatozoides de morueco permanecen alrededor de 14 días en el epidídimo en fase de maduración. El cambio morfológico más importante es la migración de la gota citoplasmática de proximal a distal y su posterior eliminación del flagelo. La morfología del núcleo no cambia drásticamente pero si se incrementa la estabilidad de la cromatina espermática.

Durante su paso por el epidídimo, los espermatozoides también sufren cambios bioquímicos, las mayores modificaciones se centran en la membrana plasmática (Yanagimachi, 1988). También, la acción de sustancias secretadas por el epitelio epididimario modifica la cubierta glicoproteica. Además la cantidad y composición de los lípidos de la membrana espermática también varía y se da un aumento en la cantidad de colesterol.

La cinética de los espermatozoides también se modifica durante su tránsito epididimario. Durante el tránsito epididimal, los espermatozoides adquieren el potencial de movilidad, consecuencia del aumento de los puentes disulfuro de la superficie nuclear y flagelar durante dicho tránsito (Glover y col., 1990).

#### **4.2.3. El ADN del espermatozoide en los mamíferos.**

El ADN del espermatozoide de los mamíferos está extremadamente condensado, es el ADN eucariótico más condensado, hasta seis veces más que el cromosoma mitótico (Pogany y col., 1981; Braun, 2001). Esta condensación extrema sólo es posible gracias a sus componentes estructurales y a su organización específica.

##### **4.2.3.1. Diferencias con las células somáticas.**

El núcleo de las células somáticas está organizado en unidades discretas llamadas nucleosomas en las que aproximadamente 200 pares de bases de ADN rodean, dando casi dos vueltas, un octámero de histonas (Olins y col, 1974; Felsenfeld, 1978; Lilley y Pardon, 1979; McGhee y Felsenfeld, 1980). A su vez, series lineales de estos nucleosomas (fibra 10 nm) se enrollan de manera radial en hélices regulares para formar la fibra de 30 nm también llamada solenoide (Finch y Klug, 1976; Bak y col., 1977; Marsden y Laemmli, 1979) (Figura 5 A-C). Sin embargo, y aunque existen algunos casos de espermatozoides empaquetados siguiendo este modelo de nucleosomas (Keichline y Wassarman, 1979; Kharchenko y Nalivaeva, 1979), el espermatozoide de los mamíferos no tiene volumen suficiente para albergar el ADN empaquetado de esta manera (Pogany y col., 1981), por tanto, requiere una organización de la cromatina distinta (Balhorn, 1982).

Varios estudios han revelado que el ADN del espermatozoide de la mayoría de los vertebrados está asociado a un tipo de proteínas llamadas protaminas (Balhorn, 1982). Las protaminas son pequeñas proteínas básicas, su tamaño es aproximadamente la mitad que el de las histonas y contienen entre un 55 y 70% de argininas (Coelingh y col., 1969; Bellve y col., 1975; Kawashima y Ando, 1978). Algunos animales presentan varios tipos de protaminas que difieren en la secuencia de aminoácidos, además el número de estas variantes varía de una especie a otra. Los espermatozoides de toro (Coelingh y col., 1972), cerdo (Tobita y col., 1983), oveja (Loir y Lanneau, 1975; Loir y Lanneau, 1978) y rata (Calvin, 1976; Kistler y col., 1976) contienen un solo tipo de protaminas mientras que el ratón tiene dos y los humanos tres (Puwaravutipanich y Panyim, 1975; Calvin, 1976; Sautière y col. 1988).

Balhorn en 1982 propone un modelo para la estructura de la cromatina del espermatozoide, en el que detalla cómo se unen las protaminas al ADN y la forma en la que se establecen las interacciones entre las mismas. El modelo describe que las protaminas, en su segmento central rico en argininas, adoptan una estructura extendida que se une al ADN en el surco menor. Esta unión neutraliza las cargas negativas de los grupos fosfato del ADN de manera que la repulsión electrostática desaparece y los complejos ADN-protaminas cercanos pueden aproximarse y unirse de manera estrecha (Feughelman y col., 1955).

Para minimizar el volumen, el modelo propone que la parte de las protaminas que no está unida al surco menor de una molécula de ADN, se coloca en el surco mayor de las moléculas de ADN adyacentes. De manera que los surcos menores de una molécula se yuxtaponen con los surcos mayores de la siguiente. Los complejos ADN-protaminas se unen unos a otros lateralmente mediante fuerzas de Van der Waals en una estructura lineal (Figura 5).

En este modelo, el ADN no presenta superenrollamiento (Risley y col., 1986; Ward y col., 1989; Ward y Coffey, 1991). En el espermatozoide, el ADN está organizado de manera más compacta que en las células somáticas pero menos enrollado. El modelo propone también la forma en la que se establecerían las interacciones entre las protaminas en algunos mamíferos. Las protaminas se unen por los extremos alrededor del ADN mediante la formación de puentes disulfuro inter e intra protaminas. Cómo se organiza tridimensionalmente esta estructura ha sido también motivo de estudio para muchos investigadores. En las células somáticas la fibra de 30 nm se organiza uniéndose cada 60.000 pares de bases de ADN a una estructura llamada matriz nuclear formando una serie de bucles o asas superenrolladas (Cook y col., 1976; Vogelstein y col., 1980; Pienta y Coffey, 1984) (Figura 5 D-E). Esta estructura permite la organización de la cromatina de manera tridimensional en el núcleo (Nelson y col., 1986) y varía según el tipo celular (Fey y Penman, 1988; Getzenberg y col., 1990). Cada bucle de cromatina representa una unidad de replicación cuyo origen está asociado permanentemente a la matriz (Vogelstein y col., 1980; Buongiorno- Nardelli y col., 1982; Dijkwel y col., 1986; Vaughn y col., 1990).

Los bucles de ADN de los espermatozoides difieren de los de las células somáticas en el tamaño, son más pequeños, y en la ausencia de superenrollamiento (Risley y col., 1986; Ward y col., 1989; Ward y Coffey, 1991). El tamaño de los bucles no parece estar relacionado con el contenido haploide del ADN del espermatozoide sino

con su función. Se sabe que el ADN del espermatozoide está organizado en bucles unidos a la matriz nuclear, pero no cómo están empaquetados estos bucles en el núcleo.

Ward en 1993 propone un modelo de plegamiento de los bucles de ADN en el núcleo del espermatozoide. En este modelo, cada bucle de ADN se estructura de manera circular en anchos círculos concéntricos superpuestos y se pliega en una estructura toroidal de aproximadamente 65 nm de diámetro (Hud y col., 1993; Brewer y col., 1999; Brewer y col., 2003). Estos toroides están conectados por segmentos compuestos por cromatina más sensible a agentes dañinos como la ADNasa I llamados “toroid linkers” o conectores (Sotolongo y col., 2003) (Figura 5 H-K).

Los diferentes niveles de empaquetamiento de la cromatina se comparan en la Figura 5 para células somáticas y espermatozoides. En las células somáticas, aproximadamente 200 pares de bases de ADN (A) rodean dando casi dos vueltas, un octámero de histonas formando unas estructuras llamadas nucleosomas (B). A su vez estos nucleosomas se enrollan en hélices regulares de seis nucleosomas por vuelta formando la fibra de 30 nm (C). El ADN en esta fibra con forma de solenoide está unido cada 60 kb a la matriz nuclear formando bucles (D). En las células somáticas, estos bucles, contenidos dentro del núcleo, pueden visualizarse fuera de él mediante la extracción de las histonas (E). En el caso del espermatozoide, las protaminas se unen al ADN neutralizando las cargas negativas del ADN (G). El complejo ADN-protaminas se organiza en círculos concéntricos (H). Los círculos de un bucle se pliegan en una estructura toroidal (I) en la cual los complejos ADN-protaminas están unidos por fuerzas de Van der Waals (I, detalle). Cada toroide representa un bucle de ADN unido a la matriz nuclear (J). Los bucles de ADN de los núcleos espermáticos son más pequeños que los de las células somáticas (E-J). Los toroides están conectados entre sí mediante regiones de cromatina más sensibles a agentes dañinos como la ADNasa I, llamadas “toroid linkers” o conectores (K). La estructura interna de las fibras de ADN-protaminas dentro del toroide, comparada con la de las células somáticas, parece que proporciona una mayor protección frente a agentes dañinos pues la mayoría de las fibras de ADN y protaminas (fibras internas) están dispuestas en el interior del toroide (K). De acuerdo con este modelo, los conectores serían las regiones con más posibilidades de daño de ADN en los espermatozoides maduros.

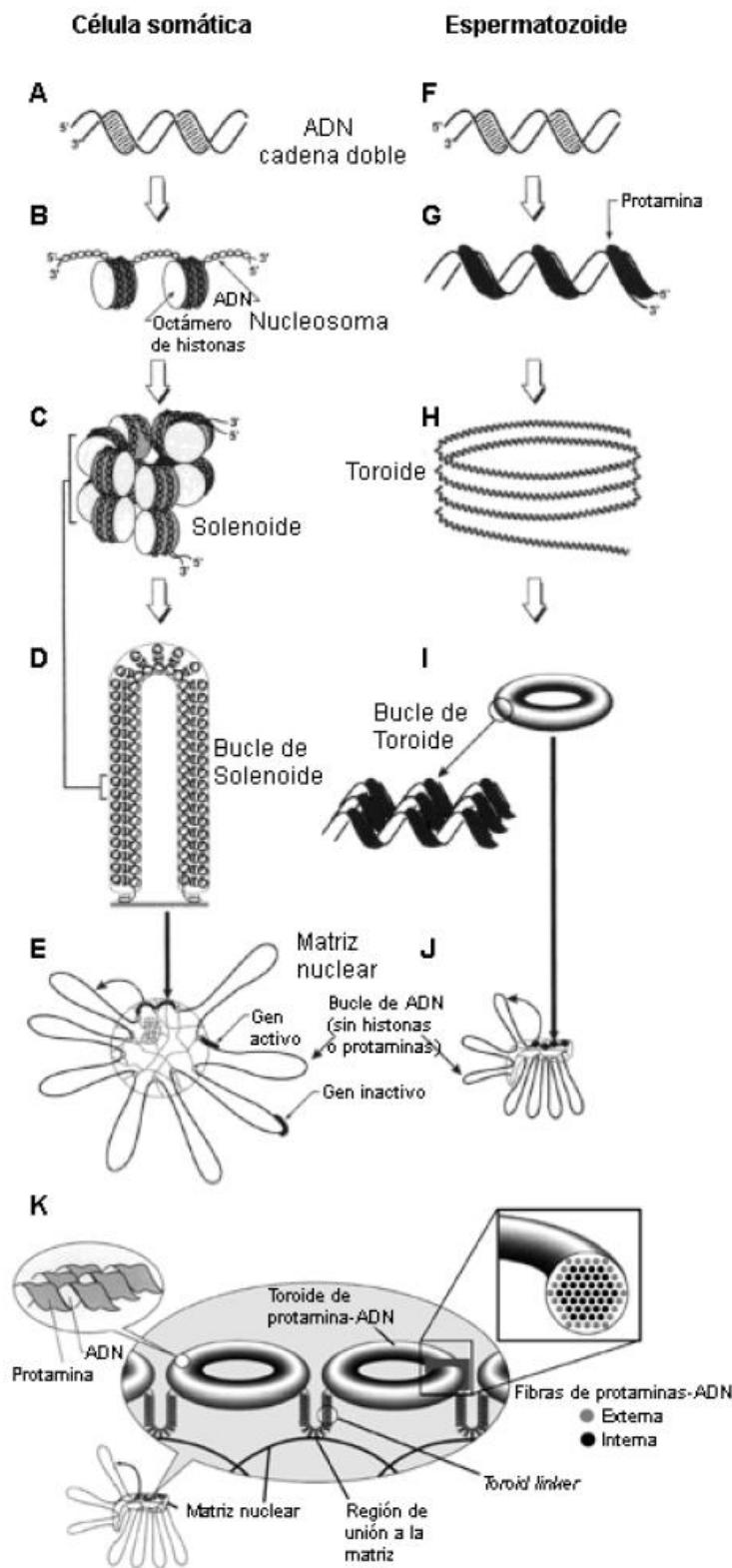


Figura 5. Niveles de empaquetamiento de la cromatina de las células somáticas y los espermatozoides. Extraído de Ward (1993) y De Jonge y Barratt (2006) *The Sperm Cell*, modificado a partir del modelo de Sotolongo y col. (2003).

#### 4.2.3.2. *La remodelación de la cromatina.*

El proceso de remodelación de la cromatina para compactar al máximo la molécula de ADN dentro del espermatozoide, aunque no se conoce del todo, está bastante documentado. Durante este proceso, las histonas que conforman los nucleosomas en las células somáticas son reemplazadas en primer lugar por proteínas de transición y finalmente por protaminas (Steger y col., 1998; Wouters-Tyrou y col., 1998; Meistrich y col., 2003), de manera que se elimina la organización del ADN de las células somáticas.

Las proteínas de transición son un grupo heterogéneo de proteínas básicas. Se sabe poco sobre las funciones específicas de las proteínas de transición. Parece que estas proteínas estabilizan el ADN tras la eliminación de los superenrollamientos y promueven la condensación (Levesque y col., 1998). Además, se ha propuesto que también participan en la reparación de las roturas de ADN que se producen durante la espermiogénesis (Caron y col., 2001a; Kierszenbaum, 2001).

Las protaminas son proteínas muy básicas de bajo peso molecular que están asociadas al ADN en los núcleos espermáticos maduros. Se han identificado dos tipos de protaminas en varios mamíferos, las protaminas 1 y 2. La protamina 1 es un polipéptido de unos 50 aminoácidos rico en arginina y cisteína. Su secuencia puede dividirse en tres dominios estructurales: la región amino-terminal que se caracteriza por la presencia de serina y treonina en la posición 8. Una región central rica en argininas que se presume que es la que se une al ADN, y una región carboxilo-terminal variable que contiene la mayoría de los aminoácidos hidrofóbicos. La protamina 2 es un poco más grande, entre 54 y 62 aminoácidos, y posee una gran cantidad de residuos de histidina. La zona central está constituida principalmente por varios grupos de 3 ó 4 residuos de arginina mientras que la histidina y la cisteína están localizadas a intervalos irregulares a lo largo de la molécula (Dadoune, 2003).

Cómo se produce el reemplazo de histonas por protaminas no está muy claro, pero parece estar asociado a modificaciones en la estructura de la cromatina como la acetilación (Meistrich y col., 1992; Pivot-Pajot y col., 2003), la metilación (Sims y col., 2003), la fosforilación (Prigent y Dimitrov, 2003; Zhang y col., 2004) o la degradación por ubiquitinización (Chen y col., 1998; Baarends y col., 2000; Jason y col., 2002). Se ha propuesto que estas modificaciones definen señales específicas que son reconocidas por determinados factores capaces de modificar la estructura y función de determinados dominios de la cromatina (Jenuwein y Allis, 2001; Govin y col., 2004; Khorasanizadeh, 2004). Las modificaciones más estudiadas son la acetilación y la degradación por ubiquitinización. Se cree que la acetilación facilita la sustitución de las histonas por protaminas y que la ubiquitinización está implicada en la eliminación de las histonas. Además, las histonas somáticas son sustituidas por variantes testiculares, histonas específicas del testículo (Lewis y col., 2003) que se ha visto que están implicadas en determinadas funciones como la descompactación de la cromatina (De Lucia y col., 1994; Khadake y Rao, 1995) o la reparación del ADN (Malik y Henikoff, 2003).

Se desconoce el mecanismo molecular de eliminación de los nucleosomas, sin duda los factores anteriormente descritos han de estar involucrados. La eliminación de los nucleosomas genera un gran número de superenrollamientos libres que no están presentes en el espermatozoide maduro, de manera que estos superenrollamientos han

de ser eliminados. Esta eliminación de los superenrollamientos se produce mediante la introducción de roturas de cadena sencilla o doble en el ADN. Un solo corte por bucle de ADN no es suficiente para liberar la tensión torsional de éste, ni siquiera si todos los nucleosomas se liberan a la vez (Boissonneault, 2002). Se cree que los superenrollamientos se eliminan gradualmente a medida que los nucleosomas se liberan, y, para que el cambio topológico sea eficiente, se necesita un número considerable de roturas (Figura 6). De hecho, varios estudios detectan numerosos cortes en el ADN durante las fases intermedias de la espermiogénesis (McPherson y Longo, 1993; Sakkas y col., 1995; Smith y Haaf, 1998).

Tras la eliminación de los superenrollamientos se necesita un mecanismo eficiente para reparar los cortes producidos en el ADN, pues estas lesiones no se detectan en las etapas finales de la espermatogénesis. Parece que el proceso de condensación iniciado por las proteínas de transición y completado por las protaminas juega un papel importante en la reparación de estas roturas. De hecho, algunos estudios han correlacionado alteraciones en el estado de condensación del ADN de los espermatozoides con altos niveles de fragmentación (Gorczyca y col., 1993; Manicardi y col., 1998; Aoki y col., 2006; Benchaib y col., 2007).

Sin embargo, aunque las proteínas básicas nucleares promueven la aproximación de las cadenas de ADN, ni las proteínas de transición ni las protaminas, poseen una actividad ligasa. Además de la topoisomerasa II, se piensa que la ADN ligasa III específica del testículo (ADN ligasa III  $\beta$ ) podría participar en la formación de los puentes fosfato del ADN (Mackey y col., 1997; Chew y col., 2000; Caron y col., 2001).

En la Figura 6 se representa el modelo hipotético según Boissonneault (2002) de la eliminación de los superenrollamientos durante la espermiogénesis. En cada bucle de ADN la eliminación de los nucleosomas deja superenrollamientos libres entre los puntos de anclaje del bucle. Los superenrollamientos entre estos puntos son eliminados mediante roturas de ADN de cadena doble o sencilla producidas por un mecanismo desconocido por el momento. La siguiente eliminación de nucleosomas en otras regiones topológicamente constreñidas del bucle deja superenrollamientos libres que son eliminados de manera similar. Finalmente, la deposición de las proteínas de transición y de las protaminas estimula la reparación de las roturas de ADN estabilizando el ADN en una estructura sin superenrollamientos (Boissonneault, 2002).

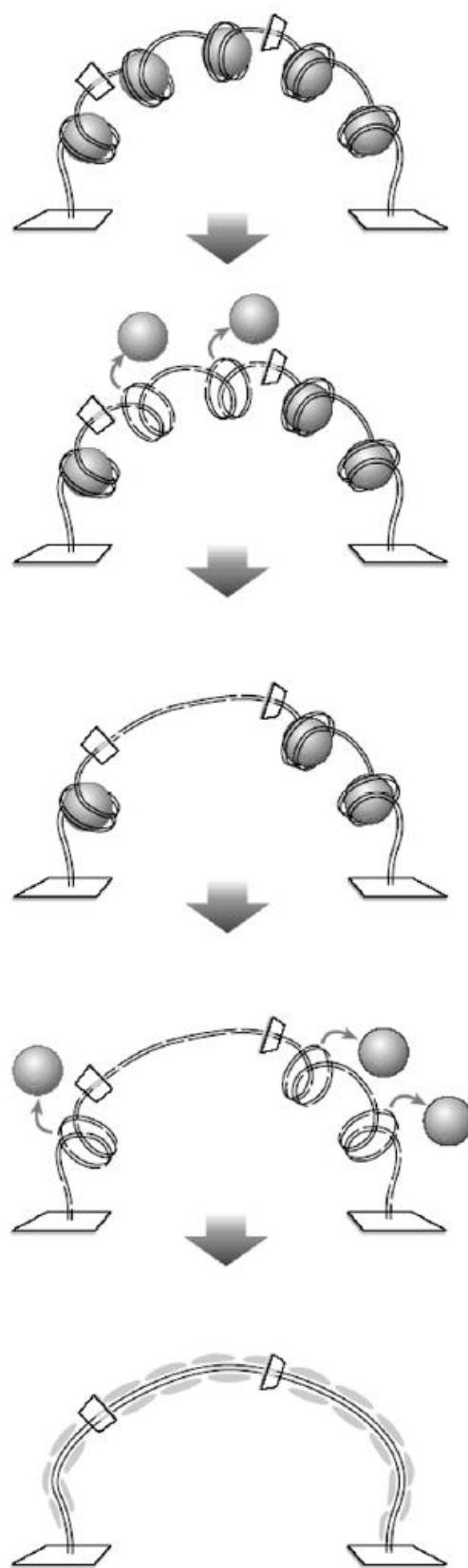


Figura 6. Modelo hipotético de la eliminación de los superenrollamientos durante la espermogénesis. (Boissonneault, 2002).

El siguiente paso es la condensación de la cromatina. En la compactación participan dos procesos: la fosforilación y defosforilación de los residuos de serina y treonina de las protaminas (Marushige, 1978; Mayer y col., 1981) y la formación de puentes disulfuro entre los residuos de cisteína de las protaminas (Bedford y Calvin, 1974; Rodman y col., 1979; Balhorn y col., 1991; Ward y Coffey, 1991). En las etapas finales de la espermiogénesis, cuando las protaminas son transportadas al núcleo una vez sintetizadas, se fosforilan de manera masiva (Papoutsopoulou y col., 1999; Wu y Hecht, 2000). Esta fosforilación facilita la unión de las protaminas al ADN y va seguida de una defosforilación que parece estar asociada con el aumento de la condensación de la cromatina del espermatozoide (Oliva y Dixon, 1991). A continuación se forman puentes disulfuro entre los grupos tiol de las protaminas adyacentes que confieren estabilidad a la cromatina (Marushige, 1978; Balhorn y col., 1984). Se ha comprobado en distintas especies animales que esta estabilización de la cromatina comienza en el testículo y continúa en el tránsito por el epidídimo (Saowaros y Panyim, 1979; Tobita y col., 1983; Huang y col., 1984; Shalgi y col., 1989; Yossefi y col., 1994).

La función de la extrema condensación de la cromatina del núcleo del espermatozoide no está muy clara. Se cree que la estabilidad y compactación que las protaminas confieren al núcleo lo protegen en su tránsito hacia el ovocito. Las protaminas condensan tanto el ADN que lo hacen resistente tanto al estrés mecánico como a la sonicación (Yanagida y col., 1991; Tateno y col., 2000) e incluso a la ebullición (Yanagida y col., 1991). Además, la condensación del ADN del espermatozoide parece importante para la fecundación, en concreto para la penetración de las capas que rodean al ovocito (Bedford y Calvin, 1974). Aún con este nivel de condensación los espermatozoides son susceptibles de daño, la adecuada organización de la cromatina en el espermatozoide es importante para protegerlo de los efectos nocivos de muchos agentes genotóxicos. Los defectos en la organización de la cromatina se han asociado en muchos casos con la infertilidad.

#### **4.2.3.3. *La fragmentación del ADN del espermatozoide.***

La fragmentación de la molécula de ADN en los gametos masculinos es un parámetro tiene un notable interés dado que la transferencia de la molécula de ADN íntegra e intacta desde el espermatozoide al óvulo, es esencial para conseguir la gestación de un individuo normal.

Las células de los organismos eucariotas tienen en su núcleo una larga molécula de ADN en la que se recoge toda la información necesaria para el desarrollo del individuo. Cualquier error en su estructura, por ejemplo la perdida de continuidad en el ADN por presentar roturas, acarrearía problemas de difícil solución. En su estado natural, esta molécula larga de ADN es discontinua debido a que, en los núcleos de cualquier célula, la información genética está compartimentalizada en elementos discretos que conocemos como cromosomas.

Por lo tanto, el ADN nuclear presenta una serie de discontinuidades equivalente a roturas de la doble cadena, o "roturas biológicamente correctas". Los extremos de rotura están sellados por unas estructuras de ADN y proteínas específicas que cumplen la misión de dar autonomía a cada cromosoma, los telómeros. Es decir, un núcleo diploide, en el que su ADN se haya replicado para posteriormente generar dos nuevas células, deberá presentar  $4xn$  "roturas biológicamente correctas", siendo  $n$  = número de

cromosomas de la especie en cuestión. Un ejemplo, en el caso de los humanos, donde cada núcleo presenta 46 cromosomas, si estos están replicados, existirán 184 "roturas biológicamente correctas" o 184 telómeros por célula. Tan sólo una rotura extra de la doble cadena, no estabilizada por los mecanismos de reparación en cualquier cromosoma, en cualquier lugar del ADN, puede entrañar problemas a la célula que lo presente. En otras palabras, las roturas de doble cadena que se producen y persisten en el ADN son fuertes condicionantes de la estabilidad de los cromosomas en las siguientes divisiones celulares y si estas se presentan en los espermatozoides, pueden ser trasmítidas en el momento de la fecundación.

Los mecanismos por los que se producen las anomalías de la cromatina nuclear en los espermatozoides están en parte identificados, pero la procedencia del daño, una vez que éste se localiza en el espermatozoide maduro, no se puede identificar con facilidad. Nos enfrentamos con toda seguridad a un efecto de naturaleza multifactorial y no del todo delimitada.

Se han propuesto tres posibles orígenes. En primer lugar, se cree que podría ser el resultado del empaquetamiento anormal de la cromatina durante la espermogénesis; en segundo lugar, consecuencia de la apoptosis defectuosa antes de la eyaculación; y por último, inducido por la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno en el eyaculado.

***a) Empaquetamiento anormal de la cromatina espermática.***

Durante la espermogénesis tiene lugar una reorganización de la cromatina espermática en la que se reemplazan las histonas por protaminas. Se postula que en este proceso es necesaria la actividad de enzimas que corten y liguen el ADN en determinadas etapas de la espermogénesis (Marcon y Boissonneault, 2004) liberando el estrés de torsión y facilitando la protaminación y el empaquetamiento de la cromatina (McPherson y Longo, 1992; McPherson y Longo, 1993). La presencia de anomalías que impidan que todo el proceso concluya, podría dar lugar a una compactación incompleta de la cromatina durante el proceso de maduración, de tal forma que regiones con roturas no reparadas pueden persistir en las células del esperma maduro. Por lo que un fallo en la reparación de estos cortes podría provocar que el espermatozoide llegara al eyaculado con su ADN fragmentado. De modo que, la presencia de roturas en el ADN de los espermatozoides eyaculados podría ser indicativa de un proceso de maduración incompleto (Manicardi y col., 1995; Ollero y col., 2001).

***b) Apoptosis defectuosa antes de la eyaculación.***

La apoptosis es una muerte celular programada estrictamente regulada utilizada por las células somáticas para el desarrollo adecuado, la homeostasis y la eliminación de células dañadas o peligrosas (Kerr y col., 1972). Se caracteriza por condensación de la cromatina, cambios en la membrana plasmática, fragmentación de ADN, externalización de ciertos componentes de la membrana interna y fragmentación celular originando cuerpos apoptóticos (Nagata, 2000; Alberts y col., 2007).

En los testículos de los mamíferos, las células germinales se expanden clonalmente en varias rondas de mitosis antes de iniciar su diferenciación a espermatozoides maduros. Esta expansión es excesiva y está equilibrada por un

mecanismo de apoptosis selectivo (Billig y col., 1996; Sinha Hikim y Swerdloff, 1999). Un fallo en esta apoptosis permitiría que espermatozoides morfológicamente anómalos, con funciones bioquímicas irregulares y/o con daño de ADN, no fueran eliminados y estuvieran presentes en el eyaculado, indicando que ha tenido lugar un mecanismo apoptótico incompleto (Gorczyca y col., 1993; Sakkas y col., 2002; Weng y col., 2002). La presencia en los espermatozoides del eyaculado de marcadores apoptóticos podría ser el resultado no sólo de una apoptosis abortiva sino también de una apoptosis iniciada tras la eyaculación. Se ha visto que ciertas nucleasas endógenas pueden activarse en determinadas condiciones y son capaces de digerir la cromatina del espermatozoide (Maione y col., 1997; Sotolongo y Ward, 2000; Sotolongo y col., 2003; Jones, 2004; Sotolongo y col., 2005).

La presencia de apoptosis, como un suceso de muerte celular programada, tiene lugar durante el proceso de formación de las espermátidas en las paredes de los túbulos seminíferos del testículo (Tomlinson y col., 2001; Erenpreiss y col., 2002). En este caso, las células de Sertoli, presentes también en las paredes de dichos túbulos, fagocitan y limpian los residuos celulares. No obstante, es interesante destacar que si la incidencia del fenómeno apoptótico tiene lugar tras la espermiación, o salida del espermatozoide a la luz de los túbulos seminíferos, podrían generarse una serie de metabolitos presentes en el líquido seminal, que no serán retirados una vez que se ha producido la eyaculación y que podrían contribuir a acelerar el proceso de degradación del ADN de otros espermatozoides.

Esta situación es especialmente crítica cuando se maneja semen de eyaculado para una posterior inseminación o cuando las muestras se congelan. En estas circunstancias se genera un acumulo no deseable de metabolitos altamente reactivos, tales como enzimas celulares, enzimas procedentes del acrosoma, nucleasas y enzimas de remodelación de la cromatina, como la topoisomerasa, que pueden ser activas sobre núcleos espermáticos normales. En este escenario de daño directo o indirecto sobre la molécula de ADN del espermatozoide, se ha sugerido que la salud del embrión, la del feto, e incluso la de la descendencia, puede verse afectada (Brinkworth, 2000; Perreault, 2003).

*c) Producción excesiva de especies reactivas de oxígeno en el eyaculado.*

Las especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species , ROS) son agentes oxidantes altamente reactivos que pueden provocar roturas en el ADN del espermatozoide (Aitken y Krausz, 2001; Aitken y col., 2003). Normalmente este tipo de daño suele generar daños en las bases y roturas en una de las dos hebras de la doble cadena del ADN. En diversos estudios se ha descrito que la presencia de niveles altos de ROS es una causa importante de lesión en el ADN del espermatozoide (Kodama y col., 1997; Aitken y col., 1998; Lopes y col., 1998; Saleh y Agarwal, 2002; Moustafa y col., 2004).

La presencia de estrés oxidativo en el tracto reproductivo masculino tiene lugar cuando hay una producción excesiva de ROS por parte de los leucocitos activados o por los macrófagos (Saleh y Agarwal, 2002; Agarwal y col., 2003), de los espermatozoides anormales (Gil-Guzman y col., 2001) o porque se produce una disminución de la capacidad antioxidante del semen (Saleh y Agarwal, 2002), y la

producción de ROS supera la actividad de los agentes antioxidantes presentes en el plasma seminal.

Los altos niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS), podrán ser consecuencia de su liberación por los leucocitos activados o por los macrófagos, por ejemplo, frente a una respuesta inflamatoria generada ante un proceso infeccioso. La presencia de células inmaduras en el esperma y que mantienen cantidades excesivas de citoplasma, como por ejemplo la presencia de gotas citoplasmáticas proximales o distales pueden también contribuir a provocar altos valores de oxidación, en este caso de tipo endogéno. El estrés oxidativo puede desencadenarse cuando la producción de ROS supera la actividad de los agentes antioxidantes presentes en el plasma seminal, incluyendo enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa o la glutatión peroxidasa, así como agentes que bloquean la cascada de reacciones redox.

Adicionalmente, existen causas de naturaleza exógena a la propia dinámica de la formación del gameto tras el proceso meiótico, que resultan en un incremento notable en el daño que se observa en el espermatozoide. De esta forma, el uso de ciertos fármacos, la contaminación atmosférica, el tabaquismo, los episodios de fiebre alta, una temperatura testicular elevada, anomalías anatómicas tales como el varicocele, o una edad avanzada, contribuyen de forma notable a incrementar las tasas de daño registrado en el ADN del espermatozoide (Ji y col., 1997; Weber y col., 2005; Rubes y col., 2005; Enciso y col., 2006).

Finalmente, debemos tener en cuenta que la presencia de ADN fragmentado en un espermatozoide maduro puede ser el resultado de diferentes procesos combinados, dado que los mecanismos propuestos en las tres hipótesis no son excluyentes y lo más probable es que no operan como fenómenos aislados. Por ejemplo, se podría asumir que el proceso apoptótico y el daño generado por ROS puedan estar asociados, y lo mismo podría ocurrir tras un proceso de espermiogénesis anormal con acumulación de roturas, hecho que podría ser detectado por el proceso de señalización de la apoptosis.

#### **4.2.3.4. Posibles daños en el ADN del espermatozoide.**

El origen de la fragmentación del ADN en los espermatozoides se relaciona, en algunos casos, con actividades enzimáticas, por acción de nucleasas, ya sean endógenas o exógenas. Estas enzimas pueden producir roturas en el ADN, bien en una sola cadena (SSB, *single stranded breakage*) y/o en ambas cadenas del ADN (DSB, *double stranded breakage*). La topoisomerasa II, una de las enzimas que participan en la remodelación de la cromatina espermática, podría generar DSB en la molécula de ADN en el proceso de liberación de histonas y un correcto reemplazo por protaminas. Evidentemente, las enzimas que participan en el proceso apoptótico y que generan DSB, también deberían considerarse como efectores endógenos de daño en el ADN. Alternativamente, determinados reactivos con capacidad oxidativa (ROS) y otras moléculas, como los derivados del óxido nítrico, parecen generar principalmente SSB y daños en las bases. La base nitrogenada típica generada por ROS es la 8-oxoguanina (8-oxoG), que se suele determinar como marcadora del daño oxidativo.

Si bien está por demostrar de forma experimental, tal vez las lesiones más peligrosas sean las DSB. En las células somáticas, son las principales responsables de la producción de alteraciones cromosómicas tipo inversiones, traslocaciones, cromosomas

dicéntricos y formación de micronúcleos, y parece ser que este tipo de anomalías disparan el proceso apoptótico.

En general, no se espera que las DSB estén producidas directamente por ROS, a menos de que hubiera una producción extrema muy localizada dentro del mismo espermatozoide y muy cercana a un área concreta del núcleo. Sin embargo, las ROS podrían producir DSB a través de una activación de las nucleasas.

#### **4.2.4. Fisiología del espermatozoide**

Las funciones del espermatozoide son aportar la dotación paterna de cromosomas e iniciar la división celular del óvulo.

El logro de estos objetivos se realiza en varias fases:

- a) Inseminación o cubrición: colocación de los espermatozoides en el aparato genital de la hembra.
- b) Movimiento o traslación de los espermatozoides a los oviductos.
- c) Penetración de la pared celular del óvulo por un espermatozoide.
- d) Pérdida del cuerpo y cola del espermatozoide.
- e) Unión de los gametos masculino y femenino, formando el huevo o cigoto.

La supervivencia de los espermatozoides dentro del aparato genital femenino del ovino, no pasa de las 36-48 horas, existiendo variaciones considerables en los diversos tramos del mismo. En toro se ha descrito de la presencia de espermatozoides móviles en el mucus cervical 48 a 72 horas posteriores al coito. (Hafez, 1973).

Las contracciones uterinas, mediante la hormona oxitocina secretada por la hipófisis, influyen notablemente en el transporte de los espermatozoides a través del tracto genital femenino, tardando escasos minutos (10 a 20 aproximadamente) a alcanzar los oviductos, lugar donde se llevará a cabo la fecundación, que es la fusión entre un óvulo y un espermatozoide, resultando en una célula denominada embrión o cigoto.

Los espermatozoides necesitan adquirir la capacidad de fecundar durante el tránsito en el aparato reproductor de la hembra, iniciándose con la reacción acrosómica, y modificando el patrón de movimiento (hipercinesis).

La reacción acrosómica implica la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa en diferentes puntos, en los que se forman pequeñas vesículas a través de las que se libera la mayor parte del contenido acrosomal.

Por otro lado, los factores que inducen esta reacción no son conocidos. Si bien en algunas especies la viabilidad de los espermatozoides capacitados se reduce considerablemente, es posible que exista algún mecanismo sincronizado con la ovulación.

#### **4.3. TECNOLOGÍA DE LA MANIPULACIÓN ESPERMÁTICA.**

La tecnología de la manipulación espermática constituye todos los procedimientos que se dan desde la recogida del semen hasta la inseminación artificial (IA) de la hembra. Entre los que se incluyen la valoración de la calidad espermática y la dilución del semen para su correcta conservación.

Primero haremos una reflexión sobre la importancia de la inseminación artificial en ovino. Después desarrollaremos las técnicas propias de la manipulación espermática fundamentales para el éxito posterior de la inseminación artificial.

##### **4.3.1. Inseminación artificial.**

Aun cuando la IA se ha extendido ampliamente en relación con las industrias lecheras, en los países más desarrollados, todavía no ha recibido la atención que merece en los ovinos y caprinos, aunque existen muchas razones para ello. A menudo los costes para implantar un programa de IA sobrepasan los beneficios económicos en una industria que opera con manejos comerciales muy limitados, el coste y el mantenimiento de los machos reproductores puede que sea relativamente bajo, pero el poco éxito que se consiguiera en el pasado con el uso de semen congelado de morueco y macho cabrío ha sido un factor limitante de gran importancia. Los procedimientos implicados en la utilización de esta técnica deben cumplir satisfactoriamente sus objetivos: costos y beneficios potenciales. Al igual que con cualquier tecnología existen ventajas y desventajas relacionadas con su uso.

###### ***4.3.1.1. Ventajas de la inseminación artificial.***

###### **1. Mejora genética.**

Los ganaderos, por lo general, están muy interesados en mejorar las producciones de sus rebaños y para ello seleccionan los animales de calidad superior. Como un macho produce más crías que una hembra se hace especial hincapié en la selección de aquellos.

La utilización de sementales superiores puede tener un beneficio directo sobre la producción de la progenie resultante y esto puede que sea todo lo que el ganadero precise. También existe un efecto a más largo plazo sobre la producción de las generaciones futuras si esos programas continúan. Naturalmente, los progresos genéticos acelerarán al utilizar sementales superiores (seleccionados sobre la base de estimación fiable de su valor reproductor), siempre y cuando se evite el que aparezcan problemas de consanguinidad.

Con el uso de la IA se puede incrementar el número de crías por semental y año. Utilizando un sistema de cruce convencional, en un rebaño normal un semental puede cubrir de 50 a 100 hembras por año. Cuando se utiliza semen fresco diluido, con inseminación cervical, un semental de ovino o caprino puede ser utilizado para inseminar más de 100 hembras en un período de 2-3 semanas. Depositando intrauterinamente semen conservado mediante congelación se pueden inseminar miles de ovejas con el semen de un solo semental, en un año. Aunque se tenga en cuenta la

baja fertilidad que se observa, en ocasiones, utilizando la IA, el número de crías por semental supera con creces al que se obtiene mediante la inseminación natural.

Recientemente, se ha despertado mucho interés por los esquemas de cría en núcleo y cooperativas. La estructura de estos esquemas permite una mayor intensidad de la selección que la que obtienen los ganaderos actuando aisladamente (o por ganaderos aislados con rebaños de tamaño comparable que no utilicen la idea de los núcleos). En estos esquemas, el semen procedente de los machos de núcleo de rebaños alcanza a sucesivas generaciones con lo que los genotipos mejorados únicamente alcanzan la producción básica del rebaño. La IA se utiliza para que los genes mejorantes alcancen sus objetivos con mayor rapidez que cuando se utilizan métodos convencionales de producción y, consecuentemente, se reduce el tiempo que se tarda en conseguir los beneficios esperados. Cuanto acabamos de decir se aplica mejor en las grandes ganaderías con estructuras de producción escalonada.

Otro uso de la IA es el de cruzar nuevas estirpes o genotipos de animales. Un ejemplo de esto es el uso de sementales de Angora en rebaños de cabras salvajes. Esto se obtiene por cruce de cada generación de hembras con sementales de pura raza Angora. La utilización de sementales mejorantes tiene un campo de aplicación más amplio con la IA que con la inseminación natural. De igual forma, la IA permite un uso más amplio de sementales selectos con el propósito de cambiar el tipo de los animales en un rebaño para acomodarse a los requisitos del mercado.

## 2. Fácil transporte de material genético.

A menudo, los criadores desean introducir “sangre fresca” en sus rebaños y el transportar el semen es mucho más barato que transportar a los sementales y, de esta forma, se evita también el riesgo de extender posibles enfermedades. La IA ha posibilitado la importación de nuevos genes, procedentes de otros continentes, a países que no permiten la entrada de animales vivos. En suma, la IA ha hecho posible el intercambio internacional de semen. La utilización de semen congelado ha facilitado, también la operación de producción cooperativa y el uso de esquemas de sementales de referencia por cuanto los mejores sementales, de esta forma, pueden mantenerse en los centros de reproducción desde los cuales se envía el semen a los dueños de los rebaños.

## 3. Conservación prolongada del semen.

El semen procedente de sementales valiosos se puede conservar para utilizarlo en años venideros, incluso después de muerto aquel. Algunos ganaderos conservan el semen de sus mejores sementales para prevenir el trastorno que ocasionaría una muerte temprana de los mismos. Los bancos de semen se pueden utilizar también para conservar el semen “control” en los programas de selección a largo plazo. En este caso, el semen se conserva para uso futuro, con lo que los animales producidos después de varios años de selección se pueden comparar con los “animales básicos” como monitores de los progresos genéticos.

## 4. Aumento de la eficacia reproductora.

Los moruecos y machos cabríos subfértiles pueden identificarse con facilidad y eliminarlos del grupo de sementales. La inseminación artificial puede asegurar el que se

inseminen todas las hembras, evitándose así problemas relacionados con las preferencias macho-hembra que a menudo se manifiestan en algunos estros de hembras.

5. Reducción o eliminación de sementales en la ganadería.

Los pequeños ganaderos no precisan mantener sementales en sus explotaciones siempre que puedan obtener el semen de otros lugares. El costo y los inconvenientes de mantener los sementales quedan eliminados. Por otro lado, existen razones de tipo estético ya que en los rebaños de cabras no es necesario mantener a los machos malolientes, sobre todo en aquellos rebaños que estén próximos a zonas urbanas.

6. Prevención y control de enfermedades.

La IA elimina el contacto directo entre el macho y la hembra con lo que se controla o previene el propagar enfermedades venéreas u otras enfermedades. Es conveniente advertir que la IA es una medida profiláctica, pero no curativa, de la enfermedad.

7. Utilización de machos incapacitados.

En muchas ocasiones machos de estimable valor no pueden ser utilizados para cubrir por sufrir lesiones o por razones de edad. Si su semen es de calidad suficiente con la IA se pueden seguir utilizando.

8. Mantenimiento de registros seguros.

La utilización de la IA permite mantener unos registros de reproducción muy seguros. Estos registros se pueden utilizar para aumentar la seguridad de la selección o para eliminar caracteres indeseables en un rebaño.

9. Utilización de reproducción sincronizada o reproducción en época no propicia.

En ocasiones los ganaderos desean usar tecnologías que les permitan sincronizar la reproducción de sus hembras. Cuando este proceder se desea practicar en rebaños grandes es necesario usar la IA, por cuanto no es posible mantener suficientes machos para practicar la monta natural. Fuera de la estación reproductora, los programas de cría pueden coincidir con la época del año en que la calidad del semen es baja, problema particularmente importante en el caso de las cabras; en esta especie puede que sea necesario inseminar hembras con semen congelado, recogido en la época reproductora que cuando mejor calidad tiene el semen.

10. Uso de otra tecnología.

Cuando las hembras son superovuladas para producir gran cantidad de embriones para ser transferidos, la monta natural no proporciona buenos índices de fertilidad. La inseminación intrauterina mejora los resultados de fecundación; por otra parte, y en cierta medida se puede intentar la predeterminación del sexo de las crías, lo que se puede hacer separando los cromosomas X e Y que portan los espermatozoides.

#### **4.3.1.2. Desventajas de la inseminación artificial.**

##### **1. Consanguinidad.**

Cuando la intensidad de la selección es muy alta pueden surgir problemas de consanguinidad. De hecho en la industria lechera, de vacuno, ha sucedido lo contrario. La utilización de IA ha permitido el uso de más machos, sin parentesco (caso opuesto al uso local de machos emparentados), con lo que el nivel de consanguinidad ha descendido. La naturaleza extensiva de las ovejas y las cabras nos asegura el mantenimiento de una gran masa genética con lo que es poco probable que la consanguinidad sea un problema. A pesar de todo, se debe poner especial atención cuando se utilice la IA en rebaños pequeños y/o próximos desde el punto de vista del parentesco.

##### **2. Reproductividad insegura.**

Cuando se emplee la IA existen dos posibilidades de inseguridad: (i) cuando se utilice semen de sementales individuales y no se haya puesto especial atención a su etiquetado pueden surgir errores accidentales, sobre todo cuando se utilicen simultáneamente varios sementales, y (ii) cuando el valor de los sementales se ha sobreestimado o determinado incorrectamente. Esto nos puede acarrear más pérdidas que ganancias. El uso de sementales con defectos genéticos inapreciables puede producir una rápida propagación de tales efectos. Por ello, es muy importante disponer de buenos registros y consultar a un genetista cualificado si se tiene alguna duda sobre el valor de algunos machos que se usen en programas de IA.

##### **3. Propagación de enfermedades.**

Si los sementales no han sido controlados en lo que a enfermedades venéreas se refiere la IA puede extender la enfermedad más rápidamente que la inseminación natural.

##### **4. Fertilidad reducida.**

En comparación con la inseminación natural, la IA puede, bajo ciertas circunstancias, reducir la fertilidad, particularmente cuando no se empleen, apropiadamente, métodos de controlar el estío o en casos de poco cuidado por parte del personal auxiliar o por negligencias cuando se maneje el semen.

##### **5. Costes.**

Como con cualquier otra tecnología, han de tenerse en cuenta los costes a la hora de utilizar la IA. Entre los costes se incluyen el empleo de los técnicos, equipo, fármacos y hormonas, registros y la compra de semen o selección y mantenimiento de sementales. Como el equipo de inseminación es muy simple y duradero, los costes por inseminación son relativamente bajos. De igual forma los costes de sementales son bajos al utilizarse menor número que cuando se practica la inseminación natural. En definitiva, los mayores costes son por mano de obra, manejo, fármacos y hormonas (en caso de que se utilicen).

#### **4.3.1.3. Beneficio económico del uso de la inseminación artificial.**

Las recompensas del empleo de programas de mejora genética, que incorporen la IA, se pueden medir como ganancias a corto plazo o mejoras a más largo plazo, bien sea en términos de aumentar la prolificidad, calidad de la lana, la producción de leche, la calidad de la carne, etc. Aunque las ganancias a corto plazo nos pueden proporcionar una rápida recuperación de la inversión; a menudo, las ganancias monetarias tangibles solo lo son a más largo plazo. Por otro lado, y también refiriéndonos a largo plazo, los ganaderos que no hayan obtenido beneficios en sus rebaños se encontrarán en desventaja competitiva con aquellos que sí los hayan obtenido.

El incremento de eficacia en el método de inseminación en ovino, se ha visto aumentado ahora con el uso de técnicas modernas, mejores métodos de identificación de los sementales de alto valor y utilizando programas de reproducción mejor informatizados; todo ello ha contribuido a hacer a la IA un método económicamente viable para ganaderos que jamás hayan pensado en eso.

#### **4.3.2. Obtención del semen.**

En la especie ovina, como en la mayoría de las especies domésticas, el método de elección para la obtención de semen es el realizado mediante vagina artificial. Mediante esta técnica, el macho que eyacula desarrolla completamente la cadena de reflejos y la mecánica del coito fisiológico, aunque no exista penetración ni eyaculación en la vagina de una hembra. Los machos seleccionados para la recolección de semen mediante este método deben ser dóciles y estar entrenados. En el caso de los animales no entrenados, indóciles o de baja libido puede recurrirse a la obtención de semen mediante la electroeyaculación. La electroeyaculación está basada en la aplicación rítmica de un estímulo eléctrico por vía transrectal estimulando el sistema nervioso autónomo y somático, que conduce a la obtención de secreciones de las glándulas accesorias y finalmente a la eyaculación (Cebrán-Pérez y col., 2010).

Todos los métodos para estimular la salida del semen deben cumplir unos requisitos:

1. Garantizar la calidad del semen.
2. No provocar daños en el macho.
3. Ser de fácil aplicación y de bajo coste.
4. Debe evitar que los espermatozoides se contaminen o se estresen.

##### **4.3.2.1. La vagina artificial.**

Lo más normal es el uso de vaginas artificiales, que son receptáculos que simulan el aparato reproductor de la hembra, en las condiciones de presión y temperatura en las que se la encontraría el macho durante la monta. Esta vagina se coloca en el momento en que el macho procede a dar el salto sobre la hembra, de manera que el pene, en vez de introducirse en la hembra, se introduce en la vagina artificial.

*Ventajas de la vagina artificial:*

- Obtención de la totalidad del eyaculado.
- El esperma está perfecto y sin daño.
- Podemos obtener la medida exacta del eyaculado.

*Inconvenientes de la vagina artificial:*

- Derivados de la inexperiencia del operario, que puede llevar a hacer daño al animal, con lo que éste se viene abajo.
- Animales que no saltan espontáneamente, tardando mucho tiempo.
- El semen debe estar el menor tiempo posible en la vagina artificial, se ha de evitar el shock térmico con la temperatura ambiente.

**4.3.2.2. Factores que pueden alterar o dañar a los espermatozoides.**

Los siguientes factores se han de tener muy cuenta durante la obtención y manipulación de las muestras seminales:

- 1) Oxígeno: provoca excitación en los espermatozoides, que hace que se muevan, con lo que el movimiento los agota, elimina sus reservas y mueren.
- 2) Temperatura: el espermatozoide sale a una temperatura aproximada de 38,5-42°C. De ahí para abajo se conserva bien; si bajamos hasta congelación, el aguante depende de la especie. Pero una temperatura de 50°C para arriba destruye totalmente a los espermatozoides, pues sus estructuras proteicas se coagulan.
- 3) Acción de sustancias químicas: pueden provocar el llamado shock químico. Estas sustancias pueden estar como residuos en aparatos recolectores, que parece que puedan estar limpios.
- 4) Luz: la luz intensa, sobre todo el rayo de sol directo, debido al infrarrojo afecta a los espermatozoides. La luz intensa activa al espermatozoide igual que el oxígeno, con lo que se fatiga y muere.
- 5) pH: un pH alcalino provoca una excitación igual que el oxígeno. Un pH ácido paraliza al espermatozoide.
- 6) Contenido residual de recipientes: antisépticos, jabones, etc.
- 7) Características del agua: se recomienda el uso del agua bidestilada con agentes pirógenos. El agua de uso corriente es muy dañina por los residuos minerales.
- 8) Contaminación bacteriana asociada a una falta de higiene durante la recogida o manipulación del semen.

**4.3.3. Dilución del semen.**

La dilución que se realiza en las muestras de semen para su conservación se hace en un medio que se conoce como diluyente seminal. El semen recogido deberemos

diluirlo y conservarlo hasta su procesado en el laboratorio, esto permitirá aumentar el volumen espermático y reducir la concentración para un análisis más sencillo y práctico, además el espermatozoide estará en un medio favorable para su supervivencia.

#### **4.3.3.1. Diluyente seminal.**

Por diluyente entendemos la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias y preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado. Gracias al conocimiento de las características y funciones del plasma seminal que forma junto con los espermatozoides al eyaculado, se han podido diseñar los diluyentes para el semen que se utilizan en la inseminación artificial.

A pesar de la complejidad del eyaculado, los diluyentes de uso común para el semen están constituidos principalmente por agua, TRIS o citrato de sodio como amortiguadores, azúcar como fuente de energía, glicerol o yema de huevo como protectores del enfriamiento o la congelación y antibióticos. Un diluyente para el semen en fresco ampliamente utilizado, por su fácil adquisición y manejo es la leche de vaca, ya sea entera o descremada, a la que únicamente se le agregan los antibióticos. Actualmente, también se está empezando a utilizar el INRA-96, este diluyente comercial para la conservación de semen, está elaborado a partir de fracciones purificadas de la leche (Vázquez y col., 2010).

El plasma seminal suministra los nutrientes necesarios para mantener la elevada actividad metabólica necesaria para el proceso de transporte espermático a través del tracto genital femenino. En el eyaculado, esta actividad metabólica solo puede mantenerse durante un periodo de tiempo muy limitado, como es conocido desde los primeros estudios sobre la conservación del semen porcino (Lewis, 1911). Para poder conservar los espermatozoides durante periodos prolongados es necesario que se reduzca la actividad metabólica de los espermatozoides, mediante la dilución en un medio adecuado y la reducción de la temperatura.

Los espermatozoides son muy sensibles al choque por frío, que produce una alteración de la viabilidad espermática. En concreto la composición lipídica de sus membranas parece ser la responsable de esta situación. Así, cuando se reduce la temperatura los movimientos laterales de los fosfolípidos que componen la membrana se ven reducidos y se producen separaciones de fases lipídicas, situación asociada a alteraciones irreversibles de las proteínas de las membranas. Todo hace que se altere la funcionalidad de la membrana espermática y la viabilidad celular se vea comprometida (revisado por White, 1993). Esta susceptibilidad al choque por frío, supone en la práctica que las muestras seminales deban ser conservadas a 15-20° C, ya que una reducción en la temperatura de almacenamiento limita la viabilidad de las muestras seminales (Paulenz y col., 2000).

La conservación a estas temperaturas moderadamente reducidas limita la capacidad de almacenamiento de las muestras por una parte porque no puede reducirse el metabolismo celular y por otra parte porque no pueden controlarse las condiciones microbiológicas con la misma efectividad de temperaturas inferiores (5° C).

Por otro lado, el efecto de dilución lleva a que determinados compuestos presentes en el plasma seminal estén en muy bajas concentraciones en el semen diluido y alteren la viabilidad espermática, como por ejemplo la adición de albúmina sérica bovina (BSA), ya que se ha demostrado que esta adición estimula la movilidad (Waberski y col., 1989) y mejora las tasas de fertilidad del semen conservado (Waberski y col., 1994)

#### **4.3.3.2. Funciones del diluyente.**

Para llevar a cabo su misión el diluyente debe aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (glucosa), la protección frente al shock térmico por frío (BSA), controlar el pH del medio (bicarbonato, TRIS, HEPES,...) la presión osmótica (sales NaCl, KCl...) y la inhibición del desarrollo microbiano (antibióticos). Además los medios de dilución han de cumplir estos requisitos:

- Que el medio tenga presión osmótica isotónica con el espermatozoide y que se mantenga. Si esto no ocurriera, habría lisis o arrugamiento del espermatozoide.
- Que el pH del medio no se modifique, es decir, el diluyente debe ser tampón. Esto es sobre todo importante en el toro y el morueco (pH 6.8-7).
- Que el medio diluyente lleve sustancias que permitan la protección adicional del espermatozoide.
- Que el medio favorezca la vitalidad y longevidad del espermatozoide.
- Que el medio sea estéril, libre de sustancias químicas, bacterias, virus, etc., que dañasen directamente al espermatozoide.
- Que el medio permita la esterilización fácil de los utensilios.
- Que el medio sea fácil de preparar, rápido y que sea económico.

Los tres principales aspectos básicos que un buen diluyente ha de cubrir se desarrollan a continuación:

##### **a) Nutrientes.**

El espermatozoide tiene la capacidad de producir la energía necesaria para mantener su metabolismo celular y generar el movimiento del flagelo, principalmente a través de las vías glicolíticas. Estos procesos se desarrollan en las mitocondrias localizadas en la porción intermedia del espermatozoide. La fuente de energía más frecuentemente utilizada en la composición de los diluyentes es la glucosa, aunque se han usado otras (galactosa, fructosa, ribosa o trehalosa) sin que los resultados hayan superado a la glucosa.

**b) Regulación del pH.**

El pH del semen recién eyaculado se encuentra próximo a  $7.4 \pm 0.2$ , al igual que otros fluidos orgánicos, y cuando se reduce este pH al mismo tiempo se reduce el metabolismo energético del espermatozoide y su movilidad. El metabolismo glicolítico que desarrolla el espermatozoide (carbohidrato principal es la glucosa) hace que el pH intracelular disminuya y el metabolismo celular quede reducido. El ácido láctico es el principal metabolito de este proceso y ha sido utilizado como índice de calidad seminal (Rigau y col., 1996).

La adición de agentes tamponadores ayudan, por tanto a controlar el pH del medio. Entre las soluciones tampón más simples se encuentran el bicarbonato y el citrato (sódico) que presentan una capacidad de tamponar limitada, mientras que otros más complejos (TES, HEPES, MOPS, TRIS) pueden regular el pH en un rango más amplio y no son dependientes de la temperatura (MOPS Y HEPES).

El pH de los diluyentes normalmente utilizados oscila entre 6.8 y 7.2, pero hemos de tener en consideración que el pH de estos medios no se estabiliza hasta pasado unos 60-90 minutos del inicio de la dilución en agua y que los distintos diluyentes presentan un diferente patrón de cambio de su pH a lo largo del tiempo (Newth y Levis, 1999). Por lo que se han de tomar las medidas oportunas en el proceso de preparación de los diluyentes antes de su uso, para evitar problemas en el proceso de conservación.

**c) Regulación osmótica.**

El espermatozoide ovino presenta una presión osmótica de 290-300 mOsm, y es capaz de tolerar un rango de presiones osmóticas bastante amplio (240-380 mOsm). Diversos estudios han evaluado la tolerancia a diversas presiones osmóticas, llegando a la conclusión que ni la movilidad ni la viabilidad espermática se ve afectada por la presión osmótica en rangos comprendidos entre 250 y 290 mOsm (Fraser y col., 2001), mientras que cuando se reduce por debajo de 200 mOsm se detecta un reducción significativa de la movilidad (Gilmore y col., 1996, Fraser y col., 2001).

En cualquier caso, los diluyentes isotónicos (300 mOsm) o ligeramente hipertónicos son los que mejores resultados han dado en condiciones de utilización comercial. Para regular la presión osmótica se utiliza principalmente sales de iones inorgánicos como el cloruro sódico y potásico.

**4.3.3.3. Diluyentes empleados.**

Para la evaluación de la cinética de fragmentación de la cromatina espermática y otros parámetros de calidad seminal, objeto de estudio en el presente proyecto, se trabajó con diluyentes basados en los compuestos: TES, MOPS, HEPES, TRIS, INRA, fosfato, leche y citrato.

En un trabajo previo desarrollado por nuestro grupo (Yániz y col., 2011), comparamos el efecto del sistema tampón utilizado en el almacenamiento

de semen ovino a 15 °C. Concretamente se estudiaron los diluyentes basados en componentes tampón tales como MOPS, TRIS, TES, HEPES, citrato o fosfato.

Se concluyó que los tampones zwitterion (TES, MOPS y HEPES) podrían ser una alternativa aceptable para su inclusión en la composición de diluyentes para el almacenamiento refrigerado semen en ovino. Por otro lado, el TRIS, generalmente incluido en la composición de diluyentes de semen de ovino, en comparación con otros estudios realizados parece causar modificaciones drásticas en los parámetros de calidad del movimiento espermático durante el almacenamiento a 15 °C. En la evaluación de la calidad seminal se utilizaron dos técnicas principales, la movilidad determinada mediante un sistema CASA y la integridad de membrana.

En el presente trabajo fin de carrera utilizaremos además la dinámica de fragmentación del ADN espermático para la comparación de ocho diluyentes seminales con el objetivo final de avanzar en el diseño de diluyentes más eficaces. Por continuar con la línea de investigación marcada por el anterior trabajo realizado se estudiarán los mismos diluyentes, a los que se añadirá para su estudio la leche y el INRA debido a su alta implantación como diluyentes mayoritariamente empleados en ovino.

#### **4.3.4. Valoración espermática o espermograma.**

Tradicionalmente la valoración de la calidad del esperma como método predictivo de la fertilidad del macho incluye la evaluación de una serie de parámetros macro y microscópicos entre los que se incluyen el volumen del eyaculado, movimiento o morfología espermática. Aunque en el caso de movimiento espermático, actualmente cada vez son más los laboratorios que emplean sistemas computerizados para su análisis objetivo, las anomalías en la morfología espermática, pese a ser un importante indicador del descenso en la fertilidad tanto en el hombre (Kruger y col.,1988), como en animales (Voss y col.,1981; Chandler y col.,1988; Sekoni y Gustafsson, 1987), de forma rutinaria se siguen evaluando subjetivamente, lo que condiciona el análisis a una serie de variables que dificultan la interpretación adecuada de los resultados dentro y entre laboratorios, haciendo necesario el desarrollo de técnicas objetivas, precisas y repetibles.

La introducción de los sistemas automáticos de análisis de la morfometría y movilidad espermática, entre los que se encuentra el CASA, intenta solventar este problema. Si bien originalmente se emplearon para el análisis del espermatozoide humano, actualmente se están desarrollando para su uso en las distintas especies animales, para lo cual resulta imprescindible la estandarización de una serie de variables analíticas que intervienen en el proceso del análisis morfométrico y cinético, como son, la preparación y tinción de las muestras o el número de espermatozoides a analizar.

La valoración de la fragmentación del ADN de los espermatozoides es un nuevo parámetro que se considera un indicador importante de la calidad seminal y la fertilidad. Es un tema de enorme interés, tanto en humanos como en el resto de las especies, dado el papel implícito que se le otorga al ADN en el momento de producir una la descendencia.

#### 4.3.4.1. *Métodos clásicos.*

La valoración de la calidad del esperma se emplea habitualmente como método predictivo de la fertilidad del macho (Rodríguez y col., 1989; Colembrander y col., 2003) y aunque el mejor sistema para determinarla sería estimar el porcentaje de gestaciones que se obtienen tras realizar la inseminación en un número suficiente de hembras, normalmente se recurre a la evaluación en condiciones de laboratorio de una serie de parámetros seminales relacionados con la fertilidad, ya que el primer método requiere desarrollar ensayos de campo que suponen un gran esfuerzo, que eleva los costes y retrasa considerablemente la obtención de la información.

La fecundación es una función biológica compleja, para la cual el espermatozoide es una célula altamente especializada constituida por una serie de compartimentos necesarios para desarrollar su función y que deben ser evaluados. El hecho de que se hayan desarrollado numerosas técnicas de análisis, indica que hasta el momento no se ha encontrado un test único de valoración que permita integrar todos los compartimentos para predecir la fertilidad con cierto rigor. Las técnicas actuales exploran facetas concretas del proceso reproductivo y sólo ofrecen una información parcial del potencial del espermatozoide, aunque al combinar varias pruebas “*in vitro*” se puede estudiar con mayor amplitud y precisión la viabilidad espermática (Graham y col., 1980).

Tradicionalmente la calidad del esperma se viene evaluando a través de una serie de parámetros macro y microscópicos que se integran en una prueba de valoración “*in vitro*” que podemos denominar espermograma clásico. A pesar de que la correlación entre estos parámetros y la fertilidad no es definitiva, si ofrecen información valida a cerca de la calidad seminal, ya que si bien una muestra de buena calidad seminal puede no ser siempre fértil, una de baja calidad rara vez lo será (Hidalgo, 2003). Entre los parámetros que se evalúan en el espermograma clásico se incluye el volumen, movimiento, concentración, morfología y acrosoma.

##### a) *Volumen y concentración.*

El eyaculado del morueco es de escaso volumen (0.7-2 ml) y elevada concentración espermática ( $2-5 \times 10^9$  spz/ml) (Evans y Maxwell, 1987). Este último es un parámetro importante a la hora de valorar la calidad de un eyaculado y preparar las dosis diluyoconservadas, no estando recomendado emplear aquellos cuya concentración sea inferior a  $2.5 \times 10^9$  espermatozoides/ml (Evans y Maxwell, 1987, Dorado, 2003).

El volumen se determina en el colector de recogida, graduado en milímetros. Su valor es necesario para calcular el número total de espermatozoides eyaculados. La concentración se puede determinar empleando un hemocitómetro, espectrofotómetro, contador de partículas computerizado o fluorometría. La técnica del hemocitómetro permite determinar el número de espermatozoides presentes en una cámara de volumen conocido. Su bajo coste hace de este método uno de los más empleados, sin embargo, presenta una variabilidad entre réplicas relativamente elevada, causada por las diluciones previas o la falta de homogeneidad en la distribución de la muestra en la cámara. Más rápido y de fácil uso es el espectrofotómetro, de tipo indirecto, que relaciona el grado de absorción o dispersión de la luz que provocan los espermatozoides

de una muestra de esperma con su concentración. Sin embargo, para que este método se muestre preciso requiere una calibración previa mediante una curva determinada por recuento microscópico en cámara, debido a que la transmitancia varía de acuerdo a la concentración espermática pero también depende del tamaño y forma del espermatozoide y del índice de refracción, factores que además son variables entre individuos. Asimismo, pueden realizarse recuentos muy rápidos, aunque a mayor coste, con contadores de partículas (Coulter Counter) o sistemas computerizados de imagen; aunque para que el recuento de partículas sea correcto, los equipos deben estar correctamente calibrados. Una técnica en desarrollo consiste en valorar la concentración mediante fluorometría. Este método cuantifica de forma precisa el ADN previamente teñido de forma específica con un fluorocromo (H33258), calculando el número de células en base a que la cantidad de ADN presente en un espermatozoide es un valor constante (Gadea, 1998).

**b) Movimiento.**

La movilidad espermática es una de las pruebas más empleadas para obtener información a cerca de la calidad del esperma. Los eyaculados de morueco se caracterizan por presentar alto porcentaje de espermatozoides móviles (70-90 %) (Chemineau y col., 1991). Para algunos autores es uno de los parámetros que mejor se correlaciona con la fertilidad (Shanes y col., 1989); sin embargo, los resultados están limitados tanto por la subjetividad de la prueba como por la elevada sensibilidad de esta variable a la manipulación necesaria para su valoración (Boixo, 1994). El movimiento espermático ha venido valorándose de forma subjetiva mediante la observación al microscopio del porcentaje de células móviles, mostrando un gran variabilidad en su correlación con la fertilidad (Uwland, 1984). Debido a esto, varios autores señalan que otras pruebas de laboratorio como la capacidad de penetración del espermatozoide a través del mucus cervical o gel de poliacrilamida (Eggert- Kruse y col., 1993) en tubos capilares, así como, la técnica de filtración en columna de Sephadex, desarrollada por Graham y col. (1976), tienen mayor importancia que las pruebas de movilidad por simple observación microscópica (Mole y Fitzgerald, 1990).

Para salvar el problema de la subjetividad, se empezó a investigar la forma de automatizar el análisis del movimiento espermático mediante sistemas informáticos. Los primeros valores objetivos se obtuvieron con métodos directos como la cine o videomicrografía (Overstreet y col., 1979). Posteriormente, con el desarrollo de la tecnología de digitalización de la imagen de video se incorporaron al mercado los sistemas semiautomáticos (Jagoe y col., 1986) y automáticos (Davis y Katz, 1989), genéricamente denominados CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis), que actualmente permiten valorar, de forma rápida y fiable la movilidad de los espermatozoides y algunas de sus características como la velocidad, linealidad o desplazamiento lateral de la cabeza que serían imposibles de cuantificar por observación al microscopio. Los sistemas automáticos están basados en la captura y digitalización sucesiva de imágenes microscópicas, identificando las células espermáticas en la primera de ellas y analizando su trayectoria a lo largo de la secuencia de imágenes en el tiempo, a partir de la cual se calculan los parámetros que caracterizan el movimiento espermático. Entre estos parámetros cinéticos, hay dos que parecen destacar sobre los demás como principales indicadores del movimiento espermático, que son la velocidad rectilínea (VSL) y el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) (Aitken, 1990). Sin embargo, tanto el hardware como el software para la identificación de los

espermatozoides y el análisis de las características de su movimiento difieren considerablemente entre los sistemas comercialmente disponibles, de manera que pueden obtenerse resultados diferentes en el análisis de una única muestra de esperma.

En cualquier caso, se ha comprobado que la correlación obtenida entre los resultados de diversos sistemas CASA es muy significativa (Davis y col., 1992). Por otro lado, la exactitud de los resultados depende de factores técnicos y biológicos como son: las condiciones en las que se realizan los análisis (temperatura, cámara, etc.), tipo de muestra de esperma que se está analizando (especie de procedencia, estado de la muestra –esperma fresco, refrigerado, congelado o capacitado-, concentración de las muestras, diluyente empleado, etc.) y del sistema de análisis (aumentos utilizados, iluminación, calibración del equipo, etc.).

La caracterización del patrón de movimiento espermático para las distintas especies animales es un punto importante para determinar aquellos parámetros cinéticos más relacionados con la fertilidad (Anel, 1999).

*c) Morfología.*

La evaluación morfológica clásica, incluida la acrosomal (Saacke, 1984), ha sido utilizada durante años para estimar la calidad del esperma (Uwland, 1984). El eyaculado de morocho y macho cabrío se caracterizan por presentar un bajo porcentaje de morfoanomalías (5-15%) (Roca y col., 1992). Por diversos trabajos es conocida la correlación entre el porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales y la fertilidad de los animales domésticos (Voss y col., 1981; Sekoni y Gustafsson, 1987), incluido el ganado ovino (Chandler y col., 1988). En este sentido, Evans y Maxwell (1987) determinan que aquellos eyaculados de pequeños rumiantes que presenten entre un 15-20% de células espermáticas anormales mantendrán su capacidad fertilizante intacta.

Entre las morfoanomalías asociadas con fertilidad reducida, se encuentran las 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).

La morfología espermática se valora tradicionalmente mediante observación visual al microscopio de muestras de esperma teñidas con diferentes técnicas. Entre los métodos de tinción más empleados se incluye la Espina-Nigrosina (Colas, 1980), Trypan azul y Giemsa (Kusunoki y col., 1988) Papanicolau (Hafez, 1987) y Spermac (Oettle, 1986).

*d) Acrosoma.*

La capacitación es un fenómeno fisiológico importante e imprescindible para la fecundación del oocito (Cognie y col., 1991) que tiene en parte lugar en el aparato genital femenino, y entre cuyas manifestaciones se encuentra la reacción del acrosoma (Martinez y col., 1989). Pero también se puede producir como un proceso degenerativo causado por muerte celular, agentes físicos (proceso de refrigeración y congelación-descongelación), químicos, etc. Por tanto, la evaluación de la integridad del acrosoma constituye una prueba de valoración espermática muy importante dada la gran

trascendencia de esta estructura para la funcionalidad del espermatozoide (Graham y col., 1990), teniendo un gran valor predictivo de la fertilidad potencial del esperma (Benoff y col., 1993; Bielsa y col., 1994). Asimismo, son varios los autores que obtienen una alta correlación entre el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro y la fertilidad (Saacke y White, 1972; Juneja y col., 1989).

La evaluación de la integridad acrosómica puede realizarse mediante fijación de las células y observación con microscopía de contraste de fases (Söderquist y col., 1997), con muestras teñidas bajo iluminación normal (Varner y col., 1987; Vázquez y col., 1992), o con microscopía de interferencia y fluorescencia (Johnson y col., 1996). En las preparaciones sin teñir, lo más frecuente es fijar las células en glutaraldehído (Saacke y Marshall, 1968) o soluciones salinas formoladas (Memon y Ott, 1981), realizando la lectura bajo contraste de fases.

Entre las técnicas de tinción, la tinción triple (TST), desarrollada en espermatozoides humanos (Talbot y Chacon, 1981), ha sido adaptada a distintas especies animales como ratón (Talbot y Chacon, 1981), toro (Didion y Graves, 1986), caballo (Varner y col., 1987) y macho cabrío (Kusunoki y col., 1989); Vázquez y col. (1992), presentan la ventaja de poder diferenciar de forma conjunta la integridad del acrosoma y la viabilidad de las células espermáticas, mediante el empleo de tres colorantes, el azul Tripán (colorante vital), marrón Bismark (colorante postacrosómico) y rosa de Bengala (colorante acrosómico).

La bibliografía actual muestra, que en los últimos años, se han desarrollado numerosas técnicas que se fundamentan en el empleo de sustancias fluorescentes y en la capacidad de las membranas espermáticas para permitir o no el paso de las mismas dependiendo de su estado funcional; describiéndose técnicas de tinción simple o dobles; así como, fluorocromos (diacetato de carboxifluorosceína, yoduro de propidio (PI), pisum sativum agglutinin lectin (PSA), Hoechst 33342, SYBR-14, entre otros) para determinar la viabilidad de la célula espermática (Graham y col., 1990; Johnson y col., 1996). Otra técnica similar a las descritas es la del colorante del ADN H33258, sustancia fluorescente que no penetra en aquellas células espermáticas cuya membrana esté intacta, haciéndolo, sin embargo, en las que su membrana esté dañada (Cross y col., 1986), uniéndose al ADN y presentando por tanto estos espermatozoides una mayor fluorescencia. Actualmente, el empleo de fluorocromos específicos y citometría de flujo permite evaluar de forma precisa las alteraciones acrosómicas del espermatozoide (Ericcson y col., 1990).

#### **4.3.4.2. Otros métodos de evaluación de la calidad seminal.**

Otros métodos utilizados para evaluar la calidad espermática son los que se citan a continuación, aunque muchos de ellos se utilizan solamente en investigación. Para el presente proyecto se hizo uso de los dos últimos que se describen: la evaluación computerizada de la movilidad espermática mediante sistemas CASA y la evaluación de la integridad de membrana.

**a) Citometría de flujo.**

La citometría de flujo es una técnica que permite identificar, cuantificar y separar las distintas subpoblaciones celulares presentes en una muestra de células en suspensión, en función de los distintos patrones de tinción adquiridos tras el marcaje con diferentes colorantes fluorescentes, que se unen a estructuras celulares específicas o se acumulan selectivamente en compartimentos intracelulares.

A lo largo de las dos últimas décadas, la citometría de flujo se ha convertido en una herramienta de gran utilidad para la investigación de poblaciones espermáticas. Se han desarrollado muchos métodos de tinción y combinaciones de fluorocromos, se han comercializado muchos fluorógenos nuevos, que permiten analizar una gran variedad de funciones espermáticas, y como resultado, hoy en día, el uso de esta técnica ofrece la posibilidad de analizar múltiples características espermáticas, simultáneamente en la misma muestra de semen, de una forma rápida, precisa y objetiva. Debido al creciente número de parámetros analizables y al desarrollo de citómetros a un coste accesible, se ha extendido su uso tanto en laboratorios de investigación como en centros de IA. Además, la citometría de flujo también permite obtener muestras de espermatozoides sexados, bien para su uso en IA o en fecundación “in vitro” (Garner y col., 1983).

**b) Análisis de la actividad mitocondrial.**

El fluorocromo Rodamina 123 fue el primero que se utilizó para evaluar la funcionalidad mitocondrial en espermatozoides humanos, y posteriormente en los de otras especies domésticas (Evenson y col., 1982; Agner y col., 1989; Graham y col. 1990). Este fluorocromo penetra en mitocondrias con actividad respiratoria y se acumula en su interior. Al inducir la luz del láser sobre espermatozoides teñidos con Rodamina 123, la pieza intermedia de los espermatozoides con mitocondrias activas emite una intensa fluorescencia verde (Ericsson y col., 1993). La Rodamina 123 suele utilizarse en combinación con IP (Ioduro de Propilio), que tiñe de rojo el núcleo de los espermatozoides degenerados y por tanto sin actividad mitocondrial. Aunque la Rodamina 123 permite cuantificar la población de espermatozoides con mitocondrias activas, no permite diferenciar el grado de actividad respiratoria de las células (Graham y col., 2001). Evaluando dosis de semen bovino congelado, Gillam y col. (2005) observaron una elevada correlación entre el porcentaje de espermatozoides positivos a Rodamina123 y el porcentaje de espermatozoides positivos a SYBR-14, lo que indica que los espermatozoides vivos en la mayor parte de los casos tienen funcionalidad mitocondrial.

Thomas y col. (1998) y Garner y Cheryl (1999) desarrollaron una nueva tinción mitocondrial utilizando el fluorocromo JC-1, que permite diferenciar entre espermatozoides con baja y alta actividad respiratoria. El JC-1 se acumula en el interior de las mitocondrias, si la actividad respiratoria es elevada forma agregados intramitocondriales que emiten fluorescencia naranja, y si la actividad respiratoria es baja, el JC-1 no llega a formar agregados y emite fluorescencia verde.

**c) Test de endosmosis celular (HOST, hiposmotic swelling test).**

Este es un test que permite evaluar la funcionalidad de la membrana espermática. Dicha evaluación se realiza mediante el método de Jeyendran y col. (1984)

para espermatozoides humanos. En conejo Amorim y col. (2008) evaluaron la prueba hipoosmótica en semen fresco. El test se basa en la capacidad de responder a cambios osmóticos que tienen los espermatozoides. Dicha capacidad está relacionada con la capacidad funcional de la membrana (funcionamiento de los canales iónicos, intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ,...). Así pues, estas células sometidas a un medio hipoosmótico incorporaran agua del medio mientras que si el medio es hiperosmótico liberarán agua al exterior. Este comportamiento se dará siempre y cuando la membrana del espermatozoide no presente daños. En un medio hipoosmótico como el de la prueba, si la célula presenta intactas sus membranas se producirá una entrada de agua desde el medio que quedará incorporada en la cola, permaneciendo ésta hinchada y enroscada. El resultado de este test se basa la proporción de los espermatozoides con cola enrollada respecto el total de espermatozoides contados.

*d) Test de resistencia osmótica (O.R.T).*

Este es otro test de funcionalidad espermática. Consiste en someter a los espermatozoides a un medio hipoosmótico. En este caso los espermatozoides con integridad de membrana se caracterizarán por tener un alto porcentaje de normalidad acrosómica. González (2002) describe esta técnica para semen fresco de conejo. Para la realización de este test se incuba semen diluido en solución isoosmótica de citrato sódico, y también semen diluido en solución hipoosmótica de citrato sódico. Finalizado el periodo de incubación, se fija la muestra con solución de glutaraldehido, se mezcla con colorante y se extiende. Se contabilizan 150 espermatozoides bajo microscopio de campo claro, comprobándose el estado de los acrosomas y contabilizándose el porcentaje de acrosomias.

*e) Estudios bioquímicos.*

Los estudios bioquímicos del semen se desarrollaron con el fin de medir de forma objetiva la calidad del semen, pero tienen como limitación los requisitos de tiempo, de una instrumentación y de un personal especializado que los hacen costosos. Aún cuando estos ensayos son una medida más objetiva de la muestra seminal, las correlaciones con la fertilidad obtenidas hasta el momento no han sido muy consistentes (Graham y col., 1980; Jeyendran y col., 1989; Gerfen y col., 1994), por lo que la utilización de estas técnicas ha quedado relegada a los estudios experimentales.

Se han estudiado los procesos metabólicos del semen, realizando análisis enzimáticos y cuantificado los constituyentes químicos del semen y del plasma seminal.

*1. Estudios metabólicos.*

El nivel metabólico de la célula espermática ha sido valorado con parámetros como el índice de fructolisis, el consumo de oxígeno, el test de la reducción del azul de metileno o de la resazurina (Cooper y col., 1996). También se ha analizado el contenido de ATP en el eyaculado como un índice de la actividad metabólica.

El movimiento del espermatozoide es el proceso que más energía demanda, siendo la desfosforilización del ATP la fuente primaria de energía (Salisbury y col., 1978). El ATP se produce en las mitocondrias de la porción intermedia del espermatozoide y es transportado por los microtúbulos del flagelo. La energía obtenida

es utilizada por la dineína para contraerse y en definitiva propulsar el espermatozoide, de manera que se espera que el contenido de ATP esté correlacionado con la movilidad espermática. Esta hipótesis ha sido confirmada en la especie humana (Calamera y col., 1991; Chan y col., 1990; Hofmann y col., 1992), en el ganado vacuno (Söderquist y Larsson, 1985; Söderquist y Stalhammar, 1991; Söderquist y col., 1991) y del mismo modo Aalbers y col. (1985) en el ganado porcino.

## 2. *Análisis enzimáticos.*

Se han determinado las actividades enzimáticas presentes en el eyaculado buscando un marcador bioquímico que fuese indicador objetivo del estado de los espermatozoides. La presencia de actividad enzimática en el plasma está asociada con la secreción de las glándulas anejas y en consecuencia es una valoración de la funcionalidad de estas glándulas (ej.: fosfatasa ácida), con el daño celular en el espermatozoide (ej.: aspartato amino transferasa, ASAT) o bien la actividad enzimática puede ser un índice de la funcionalidad espermática (ej.: acrosina). La relación entre las fosfatases y otros parámetros de la calidad seminal como la concentración, la vitalidad y movilidad espermática ha sido estudiada en diferentes especies con resultados contradictorios (Graham y col., 1967; Iyer y col., 1988). La relación con la fertilidad en los casos analizados tampoco muestra buenos resultados, aunque Stallcup (1965) relacionó la actividad del enzima fosfatasa ácida con la fertilidad en el ganado vacuno. Esta enzima es secretada en cantidades importantes por la próstata, junto con zinc, magnesio y ácido cítrico y de hecho se ha utilizado en la especie humana como un marcador de la actividad prostática (Upadhyaya y col., 1986). En el plasma seminal del verraco se ha encontrado una elevada actividad fosfatasa alcalina que supera la actividad de la fosfatasa ácida (Graham y col., 1967), estando igualmente asociada a la presencia de los iones zinc y magnesio (Iyer y col., 1988). La aspartato aminotransferasa (ASAT) es una enzima que se libera como consecuencia de una alteración de las membranas espermáticas (Ciereszko y col., 1994). Por esta razón se ha utilizado la medición de la actividad de esta enzima como un marcador bioquímico de la calidad espermática. Diversos autores han descrito su utilidad en la valoración del daño celular que se produce en la conservación del semen mediante técnicas de congelación (Graham y Pace, 1967; Hammit y Martin, 1989) y han encontrado una buena correlación con los resultados reproductivos ( $r=-0'50$  y  $-0'29$ ,  $p<0'01$ ) con la tasa de no retorno al estro y el tamaño de camada, respectivamente (Strzezek y Skaweta, 1984). Sin embargo, Hammit y col. (1989) no encuentran correlaciones significativas con los índices de fertilidad, al igual que ha sido descrito en el ganado vacuno (revisado por Graham y col., 1980).

La acrosina es una proteinasa neutra que se encuentra en el acrosoma y que tiene una función muy importante en la penetración de la zona pelúcida. La teoría mantenida hasta ahora era que la acrosina era imprescindible en el paso de la zona pelúcida, de tal manera que si se inhibía la actividad de esta enzima no se producía la fecundación (Zanelved, 1976); sin embargo a la luz de los nuevos descubrimientos su función está siendo reevaluada (Baba y col., 1994). En la especie humana la relación de la acrosina con la fertilidad no ha llegado a ser concluyente (Liu y Baker, 1988), mientras que en la especie porcina, Hammit y col. (1989) correlacionan el contenido de acrosina con la fertilidad, pero la información que aporta la medición de la acrosina es equivalente a la que se obtiene del estudio del estado del acrosoma, por lo que su utilidad queda muy limitada.

### 3. Constituyentes del plasma seminal.

La funcionalidad del espermatozoide depende en gran medida del medio extracelular en el que éste se encuentra y entre los constituyentes del plasma seminal tiene particular importancia el balance iónico (Crabo y col., 1976). Desde que Loeb en 1915 (citado por Graham y col., 1967) descubriera que en ausencia de calcio extracelular no era posible la fecundación del erizo de mar, se han realizado un gran número de estudios sobre la importancia del contenido iónico en el proceso reproductivo. Los cationes se encuentran en el plasma seminal en forma libre o combinados con proteínas, con unos rangos de variación amplios y diferencias entre las distintas especies (Mann y Lutwak-Mann, 1981). Su medición se realiza de forma sencilla mediante un espectrofotómetro de absorción atómica. Entre los cationes estudiados se encuentran:

3a.- Sodio. Este es el catión que se encuentra en mayor proporción en el medio extracelular del espermatozoide aún cuando se presenta en una proporción mucho menor que en el medio sanguíneo. Se conoce muy poco del mecanismo por medio del cual interviene en los diferentes procesos espermáticos (Fraser, 1995), aunque junto con el potasio tiene una gran importancia en el proceso de regulación de la movilidad espermática (Gatti y col., 1993).

3b.- Potasio. La secreción de las glándulas vesiculares porcinas es muy rica en potasio lo que permite equilibrar los altos contenidos en aniones (fundamentalmente citrato). Su función en el proceso de capacitación espermática parece no ser fundamental (Fraser, 1995). Sin embargo, las concentraciones de potasio en el tracto reproductivo de los mamíferos, tanto en el femenino (oviducto y útero) como en el masculino (epidídimo) son muy altas comparadas con los valores sanguíneos (12-25 mM frente a 3-6 mM). Se ha demostrado en experiencias con ratones que es necesaria al menos una pequeña concentración de potasio para que se pueda producir la fecundación (Fraser, 1995), así mismo, Lee y col. (1996) demuestran que es necesaria una concentración extracelular de potasio para que se produzca la penetración de los ovocitos en un sistema FIV con ovocitos porcinos madurados *in vitro*.

3c.- Calcio. El ion calcio juega un papel fundamental en el proceso de la fecundación de la mayoría de los animales tanto vertebrados como invertebrados (Yanagimachi, 1981). Interviene de forma fundamental en el proceso de capacitación y reacción acrosómica y es necesario que se presente un adecuado nivel de calcio extracelular para que se produzca la hiperactivación de la movilidad (Fraser y cols., 1995).

3d.- Magnesio. El magnesio se encuentra en mayores concentraciones en el interior del espermatozoide que en el plasma seminal (Mann y Lutwak-Mann, 1981). Aunque se conoce muy poco de su función, participa como activador de la acrosina e incrementa la actividad de la fosfatasa alcalina (Parrish y Polakoski, 1981).

3e.- Zinc. La función fisiológica del zinc en el plasma seminal no está totalmente aclarada, aunque se conoce su actividad en la estabilización de la cromatina, en las propiedades mecánicas de las fibras accesorias y en la movilidad del espermatozoide, así como en la regulación de la actividad de ciertas enzimas como la fosfatasa ácida y

alcalina (Iyer y col., 1988). En el ganado vacuno se ha encontrado una relación inversa entre el contenido en zinc en el plasma seminal y la fertilidad (Swarup y Sekhon, 1976).

En cuanto a la relación entre los constituyentes químicos del plasma seminal y la fertilidad, Jeyendran y col. (1989) ponen de manifiesto una baja correlación en la especie humana, con unos niveles insuficientes para servir como factor predictivo de la fecundación.

*f) Evaluación computerizada de la movilidad espermática mediante sistemas CASA.*

Muchos investigadores del área de producción animal están tratando de diseñar el análisis seminal ideal, que valore adecuadamente y prediga la fertilidad de una muestra seminal. Así, el análisis de semen ideal será aquel que de forma sencilla y eficaz permita conocer de manera predictiva la capacidad fecundante de un eyaculado concreto.

Según Graham (1996), las cualidades que deben tener los espermatozoides de un eyaculado fecundante son: movilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una movilidad hiperactivada, integridad funcional y estructural de la membrana, integridad de los enzimas relacionados con la fecundación, capacidad de penetración y de transmisión del material genético. Sin embargo este análisis integral es muy difícil de desarrollar, debido a la enorme complejidad inherente a la función espermática (Amann y Hammerstedt, 1993; Graham 1996; Caiza de la Cueva, 1997). Esta complejidad eleva a la evidencia el hecho de que el análisis clásico basado en el estudio de la movilidad, la concentración, la viabilidad, las anomalías morfológicas y el estado del acrosoma no permiten evaluar todas las características funcionales espermáticas, sobreestimado o subestimado así el potencial fecundante de una muestra (Butler y Roberts, 1975; Graham y col., 1980; Saacke y col., 1980; Pace y col., 1981).

Los espermatozoides de mamíferos adquieren la capacidad de movimiento durante su paso por el epidídimo. La movilidad flagelar es estimulada mediante la eyaculación, modulándose mediante el transito a través del tracto reproductivo de la hembra (Davis y Siemers, 1995). El tránsito de los espermatozoides a través del tracto genital femenino implica cambios secuenciales importantes en los patrones de movilidad espermática. Estos cambios reflejan variaciones en la actividad metabólica de los espermatozoides, puesto que la movilidad es la principal causa del consumo energético espermático (Roldán, 1998). Por lo tanto, en un eyaculado fértil deberá existir un porcentaje significativo de espermatozoides capaces de llevar a cabo estos cambios de movilidad. Así la profundización en los estudios sobre el control de la movilidad es importante para llevar a cabo un buen diagnóstico sobre la capacidad fecundante del eyaculado (Katz y Overstreet, 1980).

Hasta hace pocos años, el estudio de la movilidad espermática se hacía exclusivamente mediante métodos semicuantitativos. Estos métodos evalúan el porcentaje de espermatozoides móviles, así como el tipo de movimiento que presentaba la media de una población espermática (Vázquez y col., 1997). Estas medidas ofrecen una descripción general de la movilidad espermática, pero la exactitud y precisión están limitadas por las condiciones del sistema de medida y por la destreza del observador

(Deibel y col., 1976). A pesar de ello la valoración subjetiva de la movilidad por personas experimentadas es de gran valor, debido a que la información se presenta de forma inmediata al tiempo que es un método económico y fácil en su ejecución (Davis y Siemers, 1995). Por éste motivo el análisis de movilidad “de visu” en granjas es el método más usado hoy en día para la evaluación de la movilidad. No obstante hay que ser consciente de que la subjetividad del método puede llevar a la obtención de resultados dispares para una misma muestra (Vázquez y col., 1997).

Los primeros intentos de objetivizar el movimiento espermático se basaron en exposiciones fotográficas múltiples o en video-micrografías. Estos métodos son tediosos, largos y costosos, por lo que hoy en día no son de elección (Boyers y col., 1989). Sin embargo, la aparición de los sistemas informatizados de digitalización de imágenes abrieron un nuevo campo en el estudio de la movilidad de los espermatozoides. Estos sistemas denominados genéricamente CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) han automatizado y simplificado el proceso. El análisis computerizado de la movilidad fue propuesto hace tres décadas y es usado actualmente en centros de investigaciones en andrología y en centros de reproducción asistida. Las imágenes obtenidas permiten evaluar varios parámetros, incluyendo concentración, morfología y movimiento espermático. El CASA establece de una manera efectiva medidas cuantitativas del movimiento individual de los espermatozoides (Mortimer, 2000). Con éste tipo de análisis se espera obtener medidas correctas de la movilidad espermática que proporcionen información precisa acerca del estado funcional del axonema y de las membranas espermáticas. Cuando el análisis se hace en condiciones óptimas, las medidas detalladas de la movilidad proporcionan información predictiva sobre la función espermática (Davis y Siemers, 1995). Sin embargo hay que tener en cuenta que la exactitud de los valores obtenidos por técnicas cinemáticas está limitada por factores técnicos y biológicos que posteriormente se mencionaran. De éste modo la interpretación de los datos es dependiente del conocimiento que tengamos de las condiciones del análisis (Mortimer, 2000 y 2002).

Los sistemas automáticos de medición de imágenes se basan en la captura sucesiva de espermatozoides en movimiento procedentes de un microscopio. Estas imágenes se digitalizan identificando las células espermáticas que contiene la primera imagen. Luego se procede al seguimiento de estas células en imágenes sucesivas y al establecimiento de trayectorias definitivas. Las trayectorias se procesan matemáticamente, obteniendo así unos resultados numéricos precisos (Krause, 1995).

Los parámetros determinados para cada espermatozoide son la velocidad del movimiento en base a varios descriptores, la trayectoria que realiza la cabeza del espermatozoide y la frecuencia de los cambios de dirección que ésta realiza (Serres, 1984). Los descriptores del movimiento espermático obtenidos en el CASA han sido descritos por Boyers y col. (1989). Actualmente, también existen en el mercado varios tipos de CASA que capturan el movimiento espermático y lo analizan tanto a tiempo real como de manera diferida, aportando un gran volumen de información. De una manera global, este último sistema consta de un microscopio de contraste de fase conectado a una platina atemperada que permite mantener las muestras a 37°C, una cámara de video de alta resolución conectada a una pantalla de televisión y un software de análisis de imágenes por ordenador. (Figura 7)



*Figura 7. Sistema CASA para el análisis espermático compuesto por un microscopio de contraste de fase conectado a una pletina atemperada, a una cámara de video y a un software de análisis de imágenes por ordenador.*

El análisis de la movilidad mediante CASA se hace al capturar las imágenes con espermatozoides en movimiento previamente diluidos en un medio adecuado y en el microscopio a 100-200 aumentos. Tras la captura, la información es guardada hasta su análisis. Una vez realizado el análisis la información obtenida es transferida a un procesador matemático que fragmenta la movilidad espermática en diversos descriptores de la movilidad individual que caracterizan la linealidad, la angularidad del movimiento espermático y del desplazamiento de la cabeza del espermatozoide. Por describir un ejemplo el sistema CASA diseñado por Proiser (Valencia) utilizado en este proyecto describe hasta 22 parámetros de movilidad y la captura de las imágenes se basa en el análisis de 25 imágenes fotografiadas en alta resolución (768 x 576), digitalizadas y tomadas en un tiempo de 1 segundo por muestra (Tabla 2). Se han comparado datos usando diferentes sistemas disponibles en el mercado y se ha demostrado que no hay muchas diferencias en los resultados (Verstengen y col., 2002). En cambio, se han encontrado grandes diferencias entre los operadores y la metodología de preparación de las muestras a analizar (Verstengen y col., 2002).

Parámetro	Unidad	Definición
VCL (Velocidad curvilínea)	μm/s	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo.
VSL (Velocidad rectilínea)	μm/s	Distancia recorrida por el espermatozoide en el primer punto y el último de su trayectoria.
VAP (Velocidad media)	μm/s	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media.
LIN ( Índice de linealidad)	%	Relación porcentual entre VSL y VCL.
STR ( Índice de rectitud)	%	Relación porcentual entre VSL y VAP.
WOB ( Índice de oscilación)	%	Relación porcentual entre VAP y VCL.
ALH (Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide)	μm/s	Desplazamiento medio efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.
% de espermatozoides móviles	%	Cantidad de espermatozoides móviles respecto al total
% de espermatozoides progresivos	%	Cantidad de espermatozoides respecto al total de móviles que tienen un movimiento progresivo.

Tabla 2. Parámetros de movilidad analizados en el presente proyecto mediante el sistema CASA.

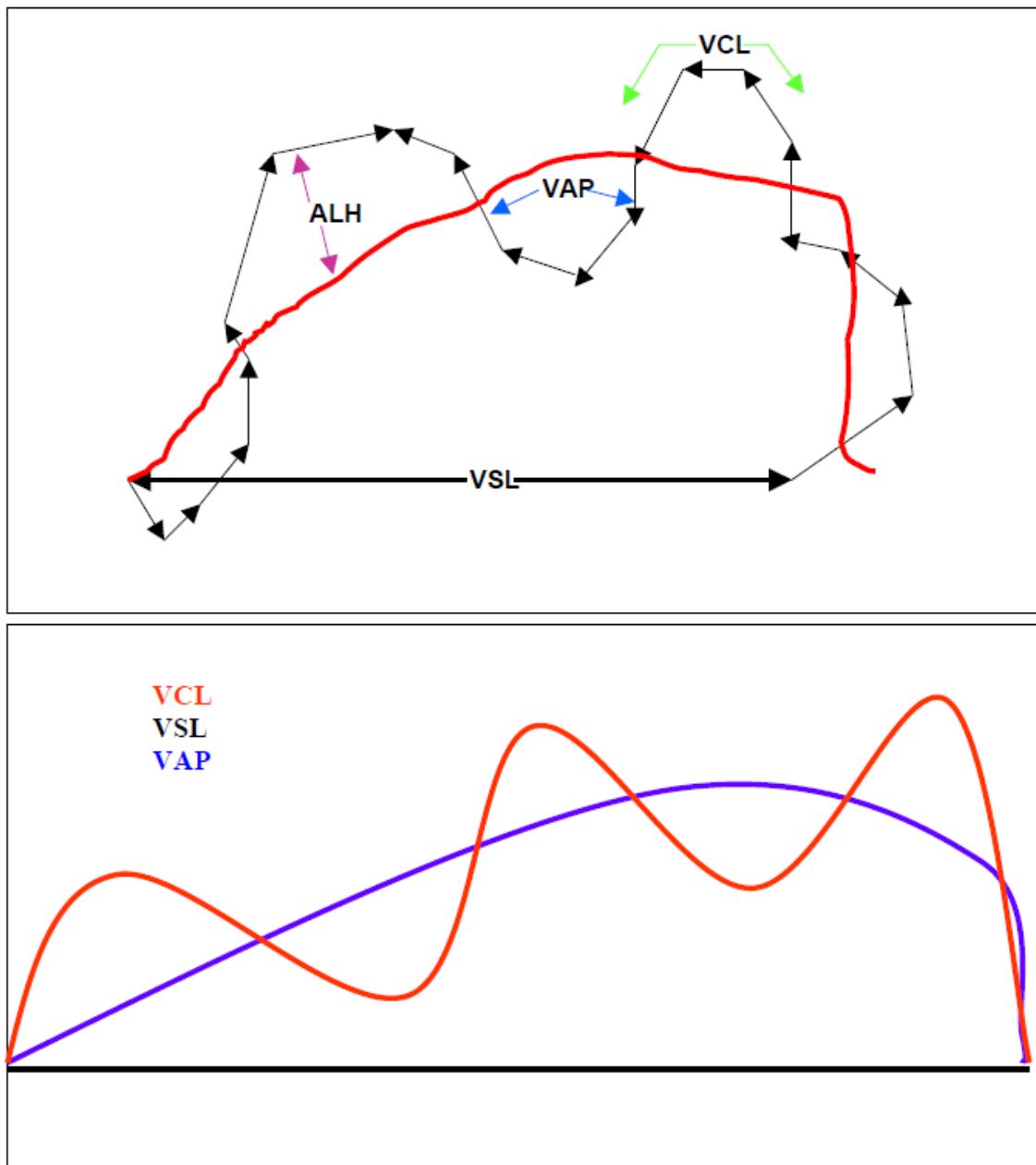


Figura 8. Terminología estándar de algunos parámetros de movilidad evaluados mediante el sistema CASA.

**g) Evaluación de la integridad de membrana.**

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.

Muchos de los métodos que se utilizan actualmente para evaluar el estado de la membrana plasmática se basan en el aumento de la permeabilidad de las membranas de los espermatozoides dañados a las diferentes sustancias. Estos procedimientos ampliamente utilizados son la medición de la permeabilidad de la membrana al agua en

una solución hiposmótica (prueba de hinchamiento osmótico, HOST), a los tintes de color (eosina método Nigrosin), o a sondas fluorescentes (Hoescht o yoduro de propidio, PI, solo o combinado con fluorocromos permeables o CFDA SYBR).

Técnicas complementarias han sido usadas para aumentar la precisión y la viabilidad de las medidas de la integridad de membrana de los espermatozoides. Entre estas, la citometría de flujo o la fluorimetría sirven para evaluar la integridad de la membrana de un gran número de espermatozoides teñidos con fluorocromos en un período relativamente corto de tiempo. Un reciente sistema de análisis de semen desarrollado con ayuda de un ordenador (CASA; SpermVision, Minitub, Alemania) permite la evaluación automatizada de la integridad de membrana de los espermatozoides situados en un campo de la muestra al microscopio.

Los métodos basados en el marcado con fluorocromos de los espermatozoides para evaluar la integridad de la membrana, a través de microscopía de fluorescencia, citometría de flujo o fluorometría (Alm y col, 2001; Garner y Johnson, 1995; Garner y col, 1986), están sustituyendo progresivamente a las metodologías clásicas basadas en microscopía luminosa. Esto ocurre porque además de los resultados más homogéneos obtenidos entre los diferentes ensayos experimentales, son compatibles con la automatización (Yaniz y col., 2012).

Estos métodos son vistos como avances importantes en la evaluación de la calidad del esperma. Sin embargo, considerando que no todos los laboratorios de análisis de esperma tienen un citómetro de flujo, un fluorímetro o están adaptados a los nuevos Sistema CASA, Yániz y col. (2008) desarrollaron un novedoso y simple método de evaluación de la integridad de la membrana de los espermatozoides de morueco en la que un microscopio de fluorescencia y un ordenador con software de código abierto son las piezas principales del equipo necesario. En este caso, la microscopía de contraste negativo de fases, combinado con un emisor de fluorocromo como el ioduro de propidio (PI), bajo microscopía de fluorescencia, se utiliza para determinar el número de espermatozoides totales y con la membrana dañada en un campo dado.

Un estudio posterior de Yaniz y col. (2012) constituye un paso más allá, mejora los fundamentos de la metodología anterior. Por un lado disminuye el tiempo de incubación de los espermatozoides necesario para el marcado utilizando una sonda de doble ADN fluorescente (Naranja de acridina (AO) / ioduro de propidio (PI)). Por otro lado, en combinación con el software libre Image J, permite contar automáticamente en el porcentaje de daño de membrana si la necesidad del contraste de fases. El uso específico de AO se seleccionó debido al pequeño tamaño de la molécula, en comparación con otros fluorocromos de ADN tales como los de la familia Brand Synergy. Esto facilita la rápida interacción con la molécula de ADN por difusión rápida a través de la membrana celular, evitando los tiempos de incubación relativamente largos que pueden causar daño iatrogénico indeseado en los espermatozoides. Este es el método que se va a utilizar en el presente proyecto para el análisis de la integridad de membrana.

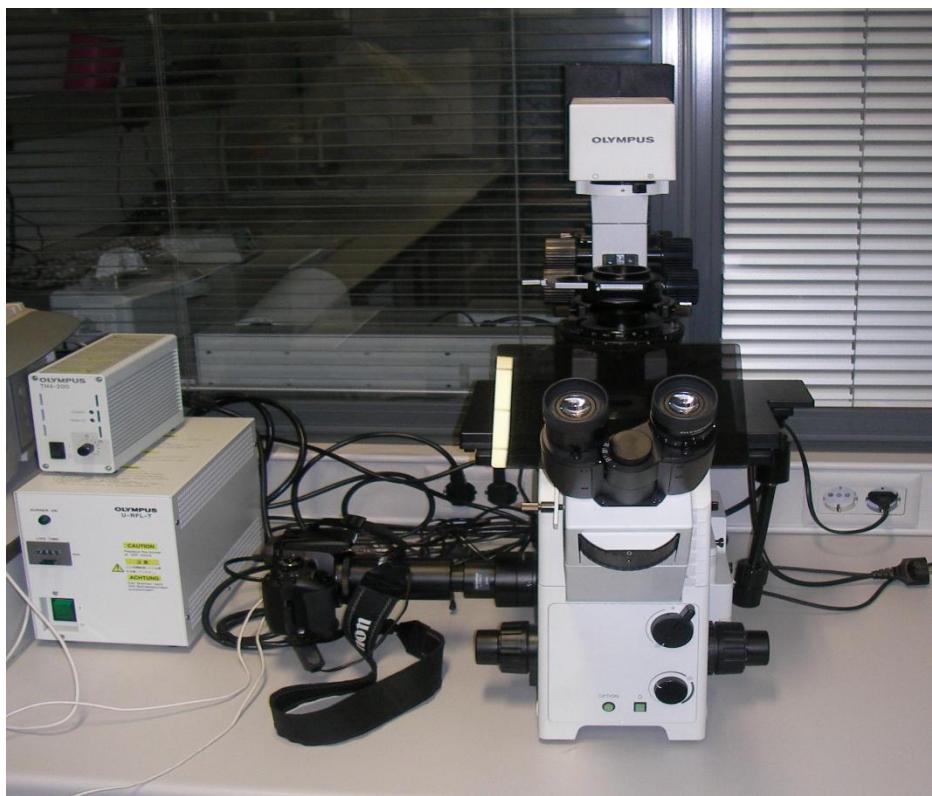


Figura 9. Microscopio de fluorescencia conectado a una cámara fotográfica para el análisis de la integridad de membrana.

#### 4.3.4.3. La evaluación de la fragmentación del ADN del espermatozoide.

Los valores de fragmentación de la molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) transportada por el espermatozoide y su relación con la fertilidad, es un tema de enorme interés, tanto en humanos como en el resto de las especies, dado el papel implícito que se le otorga al ADN en el momento de producir una descendencia que, dentro de unos límites, represente el acervo genético de los genomas parentales. Sin embargo, el estudio de cuán fragmentado se encuentra el ADN del espermatozoide no es una tarea sencilla debido a que la evolución ha blindado la información genética para ser transportada, haciéndola poco accesible a todo tipo de factores externos que puedan modificar el sentido real del mensaje que se intenta transmitir.

Existen dos estrategias diferentes para estudiar la fragmentación del DNA espermático. La primera, incluye aquellas metodologías encaminadas a marcar las roturas, tanto de cadena sencilla como de cadena doble, que se registran de forma natural o fortuita en la molécula de DNA. Dentro de este grupo, podríamos incluir el uso de procesos enzimáticos para la incorporación *in situ* de nucleótidos marcados, tales como la *Terminal dUTP Nick-End Labeling* (TUNEL) o la *In Situ Nick Translation* (ISNT). Dado que las roturas del DNA incrementan la susceptibilidad del DNA a la desnaturización, al iniciarse esta a partir de los extremos de la rotura, la segunda estrategia incluye aquellas tecnologías que miden la distinta capacidad de la cromatina y en particular del DNA, para desnaturizarse frente a determinados tratamientos. En este grupo se incluyen técnicas tales como el *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA), el *DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization* (DBD-FISH), una

metodología que utiliza la hibridación *in situ* de ácidos nucleicos, el ensayo cometa bajo condiciones desnaturalizantes, o la prueba *Sperm Chromatin Dispersion* (SCD). Adicionalmente, existen otras pruebas para el análisis del estado de la cromatina en el espermatozoide que comentaremos con menor detalle debido a que no son tan utilizadas, o bien en algunos casos, son controvertidas.

**a) *Ensayo SCSA.***

La técnica SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) se basa en el principio de que la cromatina anormal presenta una mayor susceptibilidad *in situ* a desnaturalizarse parcialmente (Evenson y Jost, 1994). El grado de desnaturalización resultante tras un tratamiento ácido se determina midiendo el cambio metacromático del fluorocromo naranja de acridina de fluorescencia verde a fluorescencia roja (Darzynkiewicz y col., 1975; Evenson y col., 1980). Este proceso se basa en la susceptibilidad que presentan los extremos rotos del ADN, tanto sean SSB o DSB, a producir ADN de cadena sencilla utilizando como punto de partida las roturas.

La desnaturalización se realiza de forma controlada enfrentando el ADN a una solución ácida. Este proceso sólo desnaturaliza de forma parcial el ADN fragmentado y deja intacta la molécula que mantenga una configuración de ADN en doble cadena. Posteriormente, se utiliza un colorante con características metacromáticas, como el naranja de acridina, para la tinción. Este colorante tiene la capacidad de emitir fluorescencia en el rojo anaranjado al interaccionar con ADN de cadena sencilla (el procedente de la desnaturalización controlada), mientras que la emisión es en verde cuando el ADN permanece intacto. La discriminación entre ambas emisiones se realiza con citometría de flujo. El cociente de la fluorescencia roja y la fluorescencia roja más la verde permite calcular el índice de fragmentación de ADN (DFI, DNA Fragmentation Index) de una muestra. En esta prueba, el DFI es una medida de la cantidad de cromatina de un espermatozoide que puede ser desnaturalizada por tratamiento ácido.

La técnica fue desarrollada por Evenson y col. hace ahora casi 25 años, se viene considerando como el referente para el análisis de la fragmentación del DNA en el espermatozoide. Su aplicación está relativamente extendida en humanos y también ofrece buenos resultados en animales utilizados para explotación ganadera, tales como ganado porcino y bovino. Esta técnica es la más aceptada para establecer correlaciones entre fragmentación de DNA y fertilidad de un individuo. El inconveniente que tiene esta tecnología es que no es accesible a la mayoría de los laboratorios, ya que al fundamentarse en la utilización de la citometría de flujo, restringe su uso además tiene que estandarizarse muy bien, tanto en los parámetros de desnaturalización del ADN y las concentraciones y tiempos de tinción, como en el calibrado del citómetro. La presunta objetividad derivada del uso del citómetro está condicionada en parte por las condiciones de discriminación introducidas por el técnico que lo maneja.

En el caso de los animales, la técnica SCSA queda relegada al estudio de algunos aspectos en investigación de carácter básico. A pesar de estos problemas, debido a la amplia experiencia con la técnica, el SCSA es quizás la metodología más aceptada por la comunidad científica para establecer correlaciones entre fragmentación de ADN y fertilidad de un individuo.

**b) *Ensayo TUNEL.***

Otra estrategia para visualizar el daño producido en el ADN de los espermatozoides y que se basa en introducir nucleótidos modificados en ciertos sitios de rotura del ADN: el ensayo TUNEL (Terminal deoxinucleotidyl transferase-mediated deoxyUridine triphosphate-Nick End Labeling). Deriva del campo de la biología molecular aplicada a la biología celular y permiten visualizar la incorporación de nucleótidos marcados en los extremos de las roturas existentes en el ADN, bien sean de cadena simple o doble. La reacción se cataliza, *in situ*, mediante la acción de una transferasa terminal llamada *Deoxynucleotidyl Transferase* (TdT).

Se detectan roturas de ADN de cadena sencilla y doble en una reacción enzimática catalizada por la transferasa terminal (Gavrieli y col., 1992; Gorczyca y col., 1993) que une nucleótidos (dUTP) modificados al grupo hidroxilo libre del extremo 3'. Estas enzimas incorporan nucleótidos modificados con biotina o digoxigenina, en el extremo 3'-OH de la cadena afectada. Sólo las roturas con un extremos 3'-OH libre podrán ser susceptibles de ser marcadas. Otros tipos de extremos modificados químicamente no pueden servir de sustratos para las polimerasas.

Posteriormente, los nucleótidos modificados se detectarán tras una reacción con un anticuerpo conjugado con un fluorocromo como molécula trazadora. Cuantas más roturas tenga el ADN mayor será la incorporación de nucleótidos. La cuantificación de los nucleótidos incorporados puede realizarse microscópicamente o mediante citometría de flujo.

La técnica de TUNEL ha tenido una buena aceptación en el estudio de los procesos apoptóticos en células no germinales, dado que es versátil, está comercializado en *kit* y los resultados pueden ser interpretados mediante microscopía de fluorescencia o bien bajo citometría de flujo. El mayor problema que tiene la técnica es que existen niveles de marcaje intermedios e irregulares, o niveles basales variables, que pueden inducir a cierta confusión. Básicamente esto se debe a que el material que se utiliza viene precedido por un proceso de fijación de la cromatina que puede dificultar el acceso de las enzimas limitando su capacidad para introducir nucleótidos modificados o haciéndolo de forma irregular. Su uso queda restringido al campo de la investigación y no se ha expandido en la rutina ya que además requiere un equipo sofisticado para su análisis y personal especializado.

**c) *Ensayo In Situ Nick Translation.***

El ensayo de *In situ Nick Translation* (ISNT) es básicamente una técnica de concepción similar al TUNEL ya que permite cuantificar el grado de daño que se produce en el DNA evaluando tras la incorporación de moléculas de dUTP modificado con botina o digoxigenina, o bien marcado directamente el DNA con un fluorocromo conjugado con un nucleótido modificado, tras utilizar la enzima DNA polimerasa I. La mayor diferencia con el TUNEL radica en que, en este caso, existe una actividad enzimática exonucleasa y la incorporación de nucleótidos es mayor por utilizar la cadena de DNA complementaria como molde.

Cuantifica la incorporación de nucleótidos (dUTPs) modificados a las roturas de ADN de cadena sencilla en una reacción catalizada por una ADN polimerasa I

procedente de *Escherichia coli*. Este ensayo identifica espermatozoides con niveles variables de daño de ADN (Gorczyca y col., 1993; Manicardi y col., 1995). Cuantas más roturas tenga el ADN mayor será la incorporación de dUTPs. La cuantificación de los nucleótidos incorporados se realiza microscópicamente.

En el caso de la ISNT, esta metodología se ha utilizado para el estudio de la presencia de anomalías originadas durante la remodelación de la cromatina del espermatozoide (Gorczyca y col., 1993) o para demostrar la presencia de roturas en la cadena de ADN en el caso del test SCD (Enciso y col., 2006). Desde el punto de vista práctico, esta técnica tiene las mismas limitaciones que el TUNEL, pero no existe disponible de modo comercial para su aplicación directa sobre espermatozoides, con lo cual la tecnología tiene que ser adaptada por cada laboratorio.

**d) *Ensayo DBD-FISH.***

El DBD-FISH (DNA Breakage Detection by Fluorescence in situ Hybridization) permite la detección de roturas de ADN mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH), es un método relativamente reciente basado en la capacidad que tienen ciertas soluciones alcalinas o bien ácidas suaves, de producir desnaturación en la molécula de ADN utilizando los extremos generados por roturas en las cadenas. Básicamente la metodología requiere una desnaturación de la molécula de ADN y una extracción proteica, utilizando una solución de lisis. La desnaturación se produce a partir de los extremos de la rotura, produciéndose tramos restringidos de ADN de cadena sencilla que serán susceptibles de hibridar con una sonda de ADN marcada con un fluorocromo. Cuantas más roturas existan en la cadena de ADN, mayor será el nivel de marcado que se obtenga en el núcleo (Fernández y col., 2000 y 2002).

Esta técnica también detecta aquellos lugares sensibles al álcali, por lo tanto es conveniente establecer los niveles de base de estos lugares presentes en los genomas a analizar, ya que estos son propios de cada especie.

Desde el punto de vista de la investigación, el DBD-FISH tiene mucho interés, ya que es la única técnica disponible que nos permite evaluar daño célula a célula, *in situ*, y en secuencias específicas del ADN (Fernández y col., 2002) Pero, de nuevo, esta técnica no se puede considerar de aplicación rutinaria dado que es compleja y laboriosa, y requiere de personal especializado y de equipamiento no usual en laboratorios de andrología.

**e) *Ensayo SCGE o ensayo cometa.***

El ensayo SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis), también conocido como ensayo cometa, consiste en la lisis y posterior electroforesis de células incluidas en un microgel de agarosa. En realidad este ensayo es una adaptación de la electroforesis de DNA desnudo, comúnmente utilizada en biología molecular, al campo de la biología celular (Collins, 2004). Cuando el ADN descondensado de un espermatozoide se somete a la acción de un campo eléctrico, las moléculas de ADN se desplazan y generan una imagen parecida a un cometa. La cantidad de daño en el ADN se cuantifica midiendo la longitud y la densidad de la cola del cometa (Ostling y Johanson, 1984; Singh y col., 1988).

La metodología básica consiste en incluir una muestra de espermatozoides en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos y someterlo a una solución de lisis que contenga un agente reductor de los grupos sulfidrilo que se encuentran en la protaminas del espermatozoide, como por ejemplo DTT (dithiothreitol). Tras la electroforesis, el microgel se tiñe con sustancias fluorescentes del tipo DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindole), IP (Ioduro de Propidio) o SYBR-GREEN (Synergy Brand).

La idea general es que los fragmentos resultantes de la rotura de la molécula de ADN (DSB) se desplazan con mayor intensidad en el campo electroforético. En este caso, el ADN de un núcleo desprovisto de proteínas y que contenga roturas en su ADN, será movilizado con mayor eficacia hacia el polo positivo del campo eléctrico y esta movilización se relacionará con el tamaño de los fragmentos que contenga el núcleo (Singh, y col., 1991; Aravindan y col., 1997). Esto generaría diferencias entre los núcleos que contienen ADN fragmentado y los que no lo tienen; diferencias que se contemplan bajo el microscopio como una imagen de un "cometa" formado por una cabeza y una cola de cromatina en la dirección del ánodo que es de mayor tamaño a medida que el nivel de fragmentación es mayor. La cantidad y la distancia de migración del ADN que se recoge en la cola del cometa representa de alguna forma el daño registrado. Aquellos espermatozoides con su DNA integro no generan o sólo producen imágenes de discretas colas de cometa, mientras que aquellos núcleos que tienen su DNA dañado muestran un claro desplazamiento de los múltiples fragmentos de DNA (Fig. 10). Hay programas informáticos que permiten un análisis detallado de estos aspectos. Adicionalmente, el ensayo cometa se puede realizar en un ambiente alcalino que ayuda a desnaturizar el ADN si el daño está presente como SSB.



Figura 10. Visualización de la integridad del ADN mediante el ensayo de cometas. Los espermatozoides que presentan ADN fragmentado muestran un claro desplazamiento de los fragmentos de ADN al ser sometidos a la acción de un campo eléctrico.

El cometa es, quizás, la técnica que potencialmente puede generar mejor información acerca del daño en el espermatozoide. Tiene varias limitaciones importantes, es lenta en su aplicación, compleja, hay que conocerla con mucho detalle y requiere de personal especializado. Ahora bien, es muy eficaz para evaluar el daño en secuencias de ADN específicas combinada con FISH.

*f) Test SCD.*

El test SCD (Sperm Chromatin Dispersion) se basa en la respuesta diferencial que ofrecen los núcleos de los espermatozoides cuando se someten a una desnaturización ácida suave y a una posterior lisis de proteínas. Cuantificando los núcleos de cromatina dispersa y los núcleos condensados se puede estimar la fragmentación nuclear (Fernández y col., 2003 y 2005; Enciso y col., 2006).

Este proceso se diseñó para que determinados laboratorios, que no tenían acceso a la citometría de flujo o eran remisos a utilizar técnicas de ámbito más molecular como el TUNEL o la ISNT, pudieran realizar de forma sencilla y en su propio laboratorio un análisis de la fragmentación del ADN de forma rápida y eficaz.

El método se basa, en esencia, en generar desnaturización controlada del ADN y, posteriormente, una desproteinización. El proceso global requiere tres pasos críticos: *a)* integración de la muestra en un material inerte de agarosa, microgel, sobre un portaobjetos; *b)* desnaturización ácida del ADN en los núcleos de espermatozoides con ADN fragmentado, y *c)* tratamiento con una solución de lisis para eliminar proteínas nucleares. Con ello, y tras la tinción de rigor para microscopía de campo claro o para fluorescencia, se generan unos halos de dispersión de la cromatina que se correlacionan con el grado de fragmentación.

El test SCD produce una descondensación diferencial de la cromatina entre aquellos espermatozoides que presentan su ADN fragmentado con respecto a aquellos que lo mantienen intacto. Para ello se actúa directamente con un tratamiento de desproteinización y de esta forma se facilita la relajación de la cromatina. En el caso de las muestras de esperma humano, los diferentes protocolos ensayados muestran que, tras un tratamiento ácido previo a una posterior desproteinización, los espermatozoides que presentan el ADN fragmentado no liberan bucles de ADN y no generan un halo de dispersión de la cromatina o si lo hacen este es de muy pequeño tamaño. Por el contrario, los espermatozoides sin fragmentación de su ADN generan halos amplios de dispersión de los bucles de cromatina, que se diferencian morfológicamente de los anteriores (Fernández y col., 2003). En caso de que la técnica se aplique de igual forma en otras especies animales, los resultados obtenidos son similares, pero la discriminación entre las células que presentan ADN fragmentado de las que no lo presentan, no resulta tan sencilla como en el caso de humanos.

Por ello, la metodología SCD se modificó y la visualización del daño se realiza simplemente tras una lisis controlada. A diferencia de lo que ocurre en humanos, en este caso, los espermatozoides que contienen ADN fragmentado presentan un gran halo, no de bucles de cromatina, sino de fragmentos de la misma, que se han difundido en la matriz de agarosa. Los que no están afectados por este tipo de daño, o bien no presentan halo de bucles de cromatina o este es de tamaño muy reducido y compacto. En el caso de espermatozoides de ovino, los casos de elevada fragmentación se muestran con halos

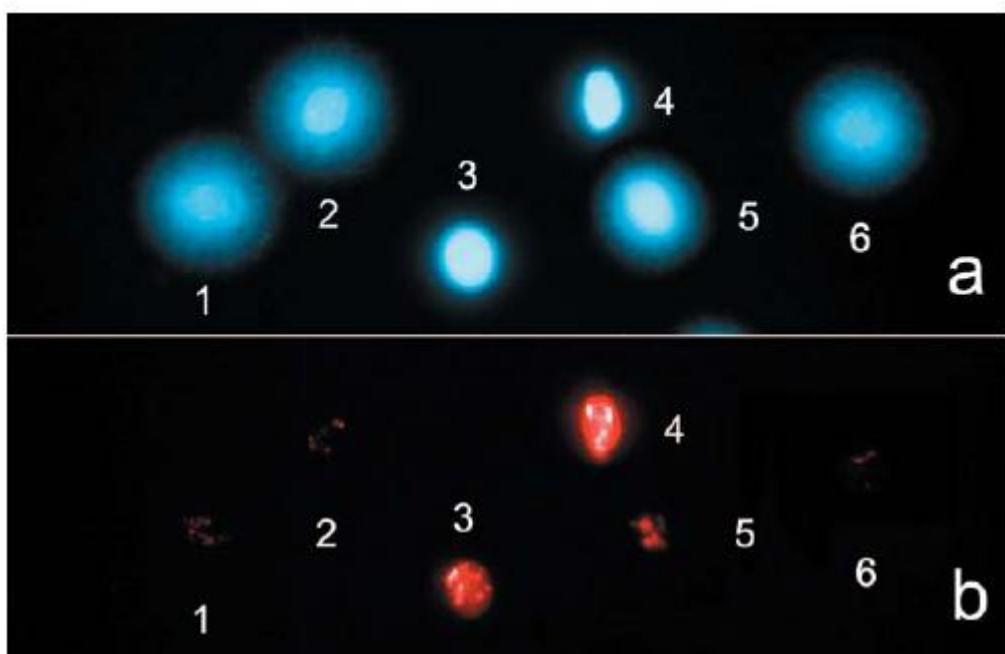
de dispersión muy grandes y dispersos. En los casos de no fragmentación del ADN el espermatozoide muestra un halo pequeño, visible y compacto alrededor de la cabeza. En ambos casos los resultados se observan bajo microscopía de campo claro o bien de fluorescencia, para realizar una valoración del tamaño relativo de los halos producidos. La discriminación visual directa es muy clara y evidente. Además, los flagelos se preservan, permitiéndose la diferenciación de los espermatozoides de otros tipos celulares presentes en la muestra.

Con ello, se calculan los índices de fragmentación del ADN (DFI) que presenta una muestra seminal determinada y que se expresan como un porcentaje (Enciso y col., 2006; Pérez-Llano y col., 2006).

La técnica requiere que los espermatozoides se incluyan en microgeles de agarosa para ser procesados en un tiempo que no excede los 60 minutos en el caso de humanos y es habitualmente menor a 20 minutos en las otras especies. Posteriormente se procede a una tinción de los espermatozoides utilizando colorantes específicos de ADN o bien colorantes para proteína. La técnica en su conjunto supone una dificultad mínima con respecto a otro tipo de protocolos y su principal ventaja es que se puede adaptar de forma sencilla en cualquier laboratorio básico de andrología, dado que no necesita de un equipo complejo, ni personal especializado. Por otra parte, la interpretación de los resultados no requiere de una determinación subjetiva de color, ni de intensidad de fluorescencia. Se observa una clara diferencia entre los espermatozoides que presentan y no presentan halo. La utilización de imágenes digitales de campo, al igual que las de fluorescencia, permite acoplar filtros electrónicos sobre ellas. Este tipo de alternativas facilitan la lectura de los resultados. Adicionalmente, las imágenes permiten que este tipo de valoraciones se automaticen empleando programas informáticos asociados a sistemas tipo CASA (*Computer Assisted Sperm Analyzer*).

Lo interesante del SCD es que, adicionalmente al estudio de la fragmentación del ADN espermático, se pueden analizar otros aspectos relacionados con la misma como son: 1) La modificación que sufre la fracción proteica asociada al ADN 2) la visualización del daño en secuencias de ADN específicas o 3) el establecimiento de correlaciones directas con fragmentación y anomalías cromosómicas o con ciertas alteraciones morfológicas del espermatozoide. Este tipo de aproximaciones no son posibles utilizando otro tipo de técnicas.

La metodología SCD es tremadamente versátil y se puede adaptar con eficacia para el estudio de la fragmentación del ADN espermático en distintas especies. Otra de las ventajas que presenta la técnica SCD con respecto a otro tipo de tecnologías es que se pueden realizar varios controles para comprobar que los halos de dispersión se corresponden con ADN fragmentado. Existen varias alternativas experimentales. Una de ellas es aplicar el test SCD y posteriormente realizar un DBD-FISH (Muriel y col., 2004). La otra posibilidad es realizar el test SCD y continuar con un marcado *in situ* del ADN introduciendo nucleótidos marcados utilizando ADN polimerasas.



*Figura 11. Visualización de la integridad del ADN mediante el método SCD combinado con DBD-FISH en humano. a) Los halos de dispersión de la cromatina muestran espermatozoides con su ADN íntegro (núcleos 1,2,5,6) mientras que los que no presentan halo o este es de tamaño reducido, contienen ADN fragmentado (núcleos 3, 4). Tinción DAPI. b) Representa el mismo campo que la figura a) tras DBD-FISH. Tan solo los espermatozoides etiquetados como 3 y 4 muestran una clara señal de hibridación, es decir, con roturas del ADN.*

En ambos casos, la hibridación o la incorporación de nucleótidos marcados ocurre en aquellos espermatozoides que presentan su ADN fragmentado. Por otra parte, los resultados obtenidos tras la aplicación del test SCD, muestran una correlación alta con los resultados derivados de la aplicación de otras técnicas de carácter más tradicional como el SCSA o el TUNEL (Fernández y col., 2005; Chohan y col., 2006). Además, existen distintas versiones comerciales de la metodología SCD tanto para su aplicación en el caso de humanos (HaloSperm, INDAS Biotech, España), como para la determinación de los niveles de fragmentación en el caso de distintas especies animales con interés industrial tales como ganado ovino, porcino, caprino o bovino (ChromaCell SL, Madrid, España). Debido a que la estructura de la cromatina en los espermatozoides de diferentes especies no es igual, la metodología SCD es necesariamente especie-específica, y tiene que ser adaptada para obtener la mayor discriminación visual entre los espermatozoides con ADN fragmentado con respecto a los que no lo tienen.

Para el estudio de la fragmentación de la cromatina en el presente proyecto se hizo uso de la tecnología Halomax® de HALOTECH DNA que permite evaluar la fragmentación de ADN espermático en distintas especies animales, concretamente con el kit para ovino Ovis-Halomax®.

El estudio de la fragmentación del ADN realizado con Halomax® es un parámetro útil para la selección temprana de sementales y para la evaluación del estado

reproductivo del animal ya que es un parámetro sensible a factores externos tales como vacunación, infecciones o patologías. Además es sensible al daño iatrogénico, es decir, al daño causado por el manipulador, por lo que la monitorización de dicho parámetro permite evaluar la calidad de diluyentes, crioprotectores, sistemas de congelación de muestras, así como cualquier otro manejo especial como el sexaje de espermatozoides.

El procedimiento se basa en la tecnología SCD. El protocolo de descondensación diferencial es sencillo y permite la lectura de resultados mediante microscopía de campo claro o microscopía de fluorescencia. La validación de la tecnología SCD del método de Halomax está cotejada con otras técnicas que miden la fragmentación: SCSA, (Sperm Chromatin Structure Assay) y TUNEL.

**g) Metodologías alternativas.**

*Prueba de naranja de acridina.*

Utilizando las propiedades metacromáticas de la naranja de acridina, algunos investigadores han aplicado el mismo principio que el utilizado en el SCSA para visualizar los espermatozoides con DNA fragmentado empleando microscopía de fluorescencia. El mayor problema de esta técnica es el componente de la subjetividad del observador en el momento de discriminar entre la emisión del color verde y el naranja de este fluorocromo, dado que existe toda una serie de colores intermedios que probablemente se relacionan con una sensibilidad diferencial a la desnaturalización de los distintos espermatozoides. Además los resultados no parecen muy reproducibles, ya que parecen variar con el tiempo, y no distingue entre pacientes infériles y donantes .

*Azul de Toluidina.*

El azul de Toluidina es un colorante nuclear básico que genera reacciones metacromáticas cuando interacciona con la cromatina. Cuando este colorante se incorpora en cromatina rica en histonas, con abundancia de lisina, presenta una coloración violeta-azulada intensa, mientras que cuando lo hace a cromatina rica en protaminas presenta una coloración azul-pálida. Se trataría, en realidad, de una prueba de maduración-condensación nuclear, y los espermatozoides con cromatina inmadura tendrían más habitualmente roturas del DNA. La técnica es simple y de un bajo coste y tiene la ventaja de proporcionar preparaciones permanentes para su uso en un microscopio ordinario, aunque las tinciones intermedias son de difícil valoración. El análisis de los resultados también puede realizarse en citometría de flujo, con los inconvenientes ya mencionados. Desafortunadamente, los resultados son poco reproducibles.

*Cromomicina A3 (CMA3).*

La Cromomicina A3 es un fluorocromo ampliamente utilizado en citogenética debido a que produce una buena diferenciación longitudinal de los cromosomas, ya que se ancla específicamente a regiones ricas en guanina-citosina y compite por los mismos lugares en el DNA, que las protaminas. Por lo tanto, cuando los espermatozoides presentan una tinción intensa tras ser teñidos con CMA3, se interpreta que esta población celular muestra unos niveles bajos de protaminación. Es decir, esta técnica revela espermatozoides que tienen un nivel deficiente de empaquetamiento en su

cromatina, siendo también una prueba de maduración-condensación nuclear. De nuevo, una de las limitaciones más importantes de esta técnica es la subjetividad del observador a la hora de establecer los grupos de clasificación. No obstante, algunos estudios la muestran como una prueba de elección frente a la naranja de acridina, o derivados de la toluidina, para el análisis de la maduración nuclear del espermatozoide.

## 5. **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### 5.1. PREPARACIÓN DE LOS DILUYENTES.

Previo paso a la recogida del semen, el día anterior en el laboratorio de la Escuela Politécnica Superior de Huesca, se procedió a preparar los diluyentes en los que el día de recogida se diluyó la muestra.

A menos que se indique lo contrario, todos los productos químicos se obtuvieron de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, EE.UU.), y las diluciones se prepararon utilizando agua Mili-Q (Millipore Ibérica, SA, Barcelona, España).

Se prepararon ocho diluyentes diferentes de los que su composición es la siguiente:

- Diluyente citrato:  
Disolución de citrato 80.6 mM ajustada a pH 7 con una disolución 1M de ácido cítrico, 55.6 mM de glucosa, 0.8% de BSA y 0.1% de PVA.
- Diluyente TRIS:  
Disolución de TRIS 250 mM ajustada a pH 7 con una disolución 1M de ácido cítrico, 55.6 mM de glucosa, 0.8 % BSA y 0.1 % de PVA.
- Diluyente TES:  
Disolución de TES 80 mM ajustada a pH 7 con una disolución 1M de NaOH, 55.6 mM de glucosa, 0.8% de BSA y 0.1% de PVA.
- Diluyente HEPES:  
Disolución de HEPES 125 mM ajustada a pH 7 con una disolución 1M de NaOH, 55.6 mM de glucosa, 0.8% de BSA y 0.1% de PVA.
- Diluyente MOPS:  
Disolución de MOPS 125 mM ajustada a pH 7 con una disolución 1M de NaOH, 55.6 mM de glucosa, 0.8% de BSA y 0.1% de PVA.
- Diluyente fosfato:  
Disolución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  80 mM ajustada a pH 7 con una disolución 220 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 55.6 mM de glucosa y un 0.8% de BSA y un 1% de PVA.
- Diluyente leche:  
Leche UHT desnatada (0,7% grasa).
- Diluyente INRA:  
Diluyente INRA 96 (IMV Technologies, Tours, INRA, Francia), un diluyente de semen elaborado a partir de fracciones purificadas de la leche.

A todos los diluyentes citados anteriormente, excepto al INRA96 se les añadió 2000 IU/ml de penicilina y 0.4 mg/ml de estreptomicina. Excepto para la leche y el INRA96, la osmolaridad se ajustó a 290 mosmol mediante la adición de de NaCl y posteriormente se esterilizaron mediante filtración.

Una vez preparados todos los diluyentes, se añadieron 200  $\mu$ l de cada uno en criotubos para su transporte. El día de la recogida de muestras, para su transporte hasta el C.I.T.A., en Zaragoza, se sumergieron en un baño maría sobre unos 30°C para que conservaran su temperatura hasta el momento de la adición del semen. También se prepararon ocho tubos con cada diluyente, que se mantuvieron a 15°C hasta el día siguiente, para realizar el ajuste de la concentración.

## 5.2. RECOGIDA, DILUCIÓN Y PREPARACIÓN DEL SEMEN.

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

Las muestras de semen se tomaron en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) en Zaragoza. Se utilizaron seis moruecos adultos de la raza Rasa Aragonesa especialmente entrenados por los cuidadores la recogida de los eyaculados mediante vagina artificial.

Se realizaron cuatro réplicas, siendo los días de recogida los siguientes:

ENSAYO 1	06/06/2011
ENSAYO 2	15/06/2011
ENSAYO 3	22/06/2011
ENSAYO 4	07/07/2011

En cada réplica se obtuvieron seis eyaculados, de los que posteriormente se seleccionaron en el laboratorio los tres de mayor calidad. Como primer paso previo a la recogida del semen, se procedió a atemperar todo el material, previamente esterilizado, que va a servir para recoger los eyaculados de los moruecos; mediante la introducción en una estufa a 37°C.



Figura 12. Estufa a 37°C para atemperado del material de recogida seminal.

Todo el material fue perfectamente esterilizado y atemperado para que los eyaculados no se encontraran con un medio contaminado o frío, que puede ser causante de una disminución de la viabilidad de la muestra al producir la muerte a los espermatozoides por agentes espermicidas o por choque térmico, respectivamente.

El semen se recogió mediante una vagina artificial de seis machos de la raza Rasa Aragonesa situados en el C.I.T.A. de Zaragoza. Estos machos se alimentaron mediante una dieta estándar y siguieron un manejo regular de extracciones seminales.



*Figura 13. Machos usados para la recogida de eyaculados.*

La vagina artificial trata de imitar la vagina de la oveja además de servir para recoger las muestras de una manera limpia, rápida y fácil. Esta vagina consta de tres partes fundamentales: un embudo de plástico blando, un tubo de PVC rodeado por una cámara neumática y una vaina de protección térmica. Por el extremo más estrecho del embudo se coloca un tubo de ensayo donde se recoge el eyaculado, y por su extremo más ancho va acoplado el tubo de PVC rodeado de una cámara neumática que permite alojar en su interior agua caliente a presión. Este tubo lleno de agua es el que hace las veces de la vagina de la oveja y estimula al macho para eyacular. Todo este sistema va cubierto por una vaina de protección térmica que evita las pérdidas de temperatura de la vagina previamente atemperada. La cámara de la vagina artificial se llenó con agua a 48°C y de aire para conseguir la presión necesaria.



Figura 14. Vagina artificial.

Los primeros eyaculados fueron desechados. Después se recogieron los segundos eyaculados, de mayor calidad, que son los que se utilizaron. Tras anotar el volumen de eyaculado e inmediatamente después de haber sido recogida la muestra, se procedió a añadirlo a los diluyentes preparados el día anterior. Para ello se tomaron 100  $\mu$ l de semen de cada macho y se añadió a cada uno de los 8 diluyentes diferentes.



Figura 15 Momento de la recogida del eyaculado.

Tras la adición del semen a los diluyentes, se colocaron las muestras en una cámara para su transporte hasta Huesca, manteniendo en todo momento a una temperatura de 15°C.



Figura 16. Momento de la dilución de los eyaculados.



Figura 17. Cámara a 15°C para transporte de las muestras.

Una vez en laboratorio de producción animal de la EPS de Huesca se procedió a evaluar la concentración de los eyaculados de cada macho utilizando una cámara de recuento y el programa CASA. A continuación a cada muestra se le añadió su propio diluyente en cantidad necesaria para conseguir una concentración espermática de 800 millones de espermatozoides por mililitro. Una vez ajustada la concentración las muestras se introdujeron en una estufa a 37°C.

El análisis de las muestras se realizó en el laboratorio del departamento de Producción Animal de la Escuela Politécnica Superior de Huesca (EPSH). Las muestras recogidas se analizaron a las 0, 3, 6 y 24 horas tras la recepción en el laboratorio.

Resumiendo, en total se analizaron 12 eyaculados diferentes, cada uno de los cuales se dividió en 8 alícuotas diluidas en los diluyentes antes descritos hasta una concentración de 800 millones de espermatozoides por mililitro. Las muestras fueron analizadas el mismo día de la recogida, a las 0, 3, y 6 horas tras su recepción en el laboratorio y al día siguiente a las 24 horas. Cada muestra se evaluó mediante el método SCD para la fragmentación de ADN, un sistema computerizado de análisis (CASA) para los parámetros de movilidad y bajo un microscopio de fluorescencia y posterior análisis de imagen para la integridad de la membrana, tal y como se describe a continuación. Los análisis movilidad y de integridad de membrana se realizaron a las horas indicadas, mientras que para los análisis de la fragmentación del ADN se congelaron alícuotas de las muestras a -80°C en los diferentes tiempos para realizar el análisis más adelante.

### **5.3. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE MOVILIDAD MEDIANTE UN SISTEMA DE ANALISIS COMPUTERIZADO (CASA).**

Para evaluar la movilidad espermática se diluyeron las muestras en el mismo medio utilizado para su dilución hasta conseguir una concentración espermática de 50 millones de espermatozoides por mililitro. Para ello se tomaron 20 $\mu$ l de la muestra con 800 millones de espermatozoide por mililitro y se añadieron a 480  $\mu$ l de diluyente a 37°C. Se colocaron 5 $\mu$ l de esta nueva muestra sobre un portaobjetos atemperado a 37°C previamente sobre la pletina del microscopio que también está atemperada y se cubrió rápidamente con un cubreobjetos de 22x22 mm.

Se capturaron 10 campos de cada muestra, mediante el sistema computerizado para el análisis espermático (CASA, ISAS, PROISER®, Valencia, España) utilizando un microscopio Olympus BX40 (Olympus Optical co., Tokyo, Japón) equipado con una platina que mantiene la temperatura a 37°C, un objetivo de contraste de fase negativo 10X y una cámara de video digital de Buxtler.

Los parámetros establecidos fueron: tamaño de célula (min/max), 14/70  $\mu$ m<sup>2</sup>; velocidad curvilínea mínima (VCL) 10  $\mu$ m<sup>-1</sup>; conectividad, 14; y número mínimo de puntos/ trayectoria, 5. Las variables del semen registradas fueron cinéticas: porcentaje de espermatozoides móviles (%), porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva (%), velocidad rectilínea (VSL,  $\mu$ m/s), velocidad curvilínea (VCL,  $\mu$ m/s), velocidad media (VAP,  $\mu$ m/s); y medidas de calidad del movimiento: índice de linealidad (LIN=VSL/VCL), índice de rectitud (STR=VSL/VAP), índice de oscilación (WOB=VAP/VCL), y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH,  $\mu$ m).

Parámetro	Unidad	Definición
VCL (Velocidad curvilínea)	μm/s	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo.
VSL (Velocidad rectilínea)	μm/s	Distancia recorrida por el espermatozoide en el primer punto y el último de su trayectoria.
VAP (Velocidad media)	μm/s	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media.
LIN ( Índice de linealidad)	%	Relación porcentual entre VSL y VCL.
STR ( Índice de rectitud)	%	Relación porcentual entre VSL y VAP.
WOB ( Índice de oscilación)	%	Relación porcentual entre VAP y VCL.
ALH (Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide)	μm/s	Desplazamiento medio efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.
% de espermatozoides móviles	%	Cantidad de espermatozoides móviles respecto al total
% de espermatozoides progresivos	%	Cantidad de espermatozoides respecto al total de móviles que tienen un movimiento progresivo.

Tabla 2. Parámetros de movilidad analizados en el presente proyecto mediante el sistema CASA.

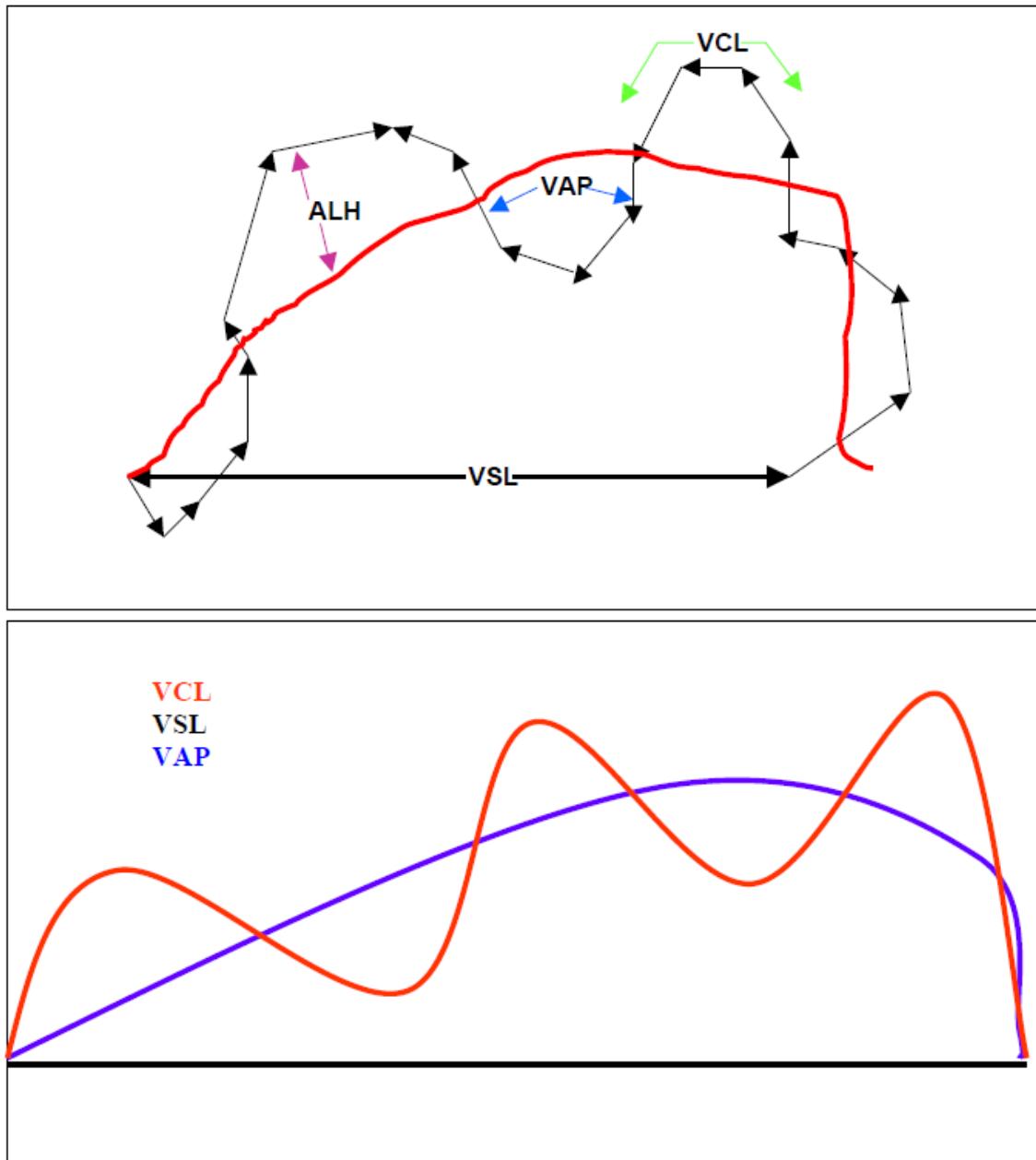


Figura 8. Terminología estándar de algunos parámetros de movilidad evaluados mediante el sistema CASA.

## Material y Métodos.

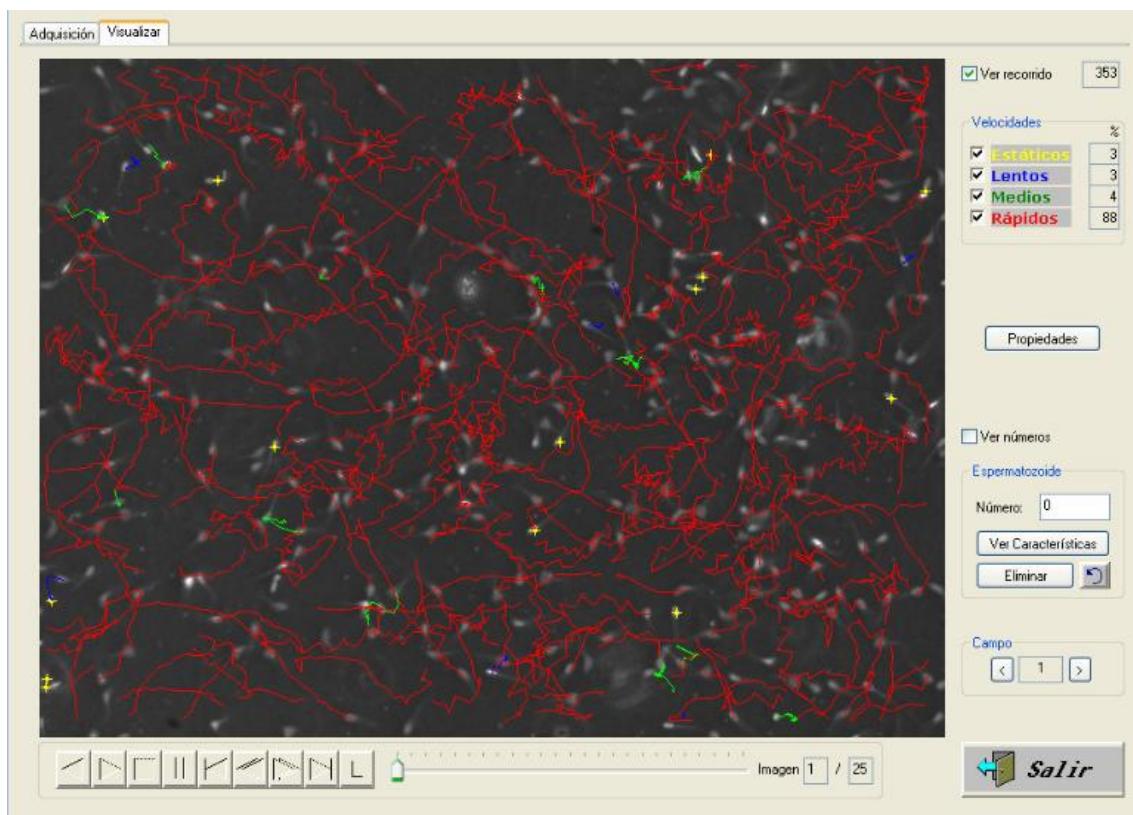


Figura 18. Captura de pantalla del programa CASA (ISAS, PROISER®, Valencia, España) de un campo de una muestra de semen de morueco, capturado utilizando un microscopio Olympus BX40 (Olympus Optical co., Tokyo, Japón) para el análisis de los parámetros de movilidad espermática.

Cuando se capturaron los 10 campos se obtuvo una base de datos donde a cada espermatozoide se le describe detalladamente con cada uno de los parámetros anteriormente señalados.

ESTUDIO CITOMORFOLÓGICO DEL SEMEN Integrated Sperm Analysis System																						
Laboratorio de Análisis Proyectos i Serveis R+D S.L.																						
Campo	# esp.	Primer o	Últim o	#punto	Áre a	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF	Tipo según OMS	Tipo	DANCE	DANCE Medio	Índice de Angularidad (AI)	Velocidad angular media (AV)	Desplazamiento angular medio absoluto (MDAabs)	Desplazamiento angular medio algebraico (MDAalg)	
1	1	1	13	36,8	148,2	132,2	143,5	89,2%	92,2%	96,8%	2,7	3,8		Tipo a	Rápido Progresivo	398,1747254	398,1747254	0	0	15,08053894	-5,920291286	
1	2	1	14	36,3	118,0	115,4	117,4	97,7%	98,3%	99,4%	0,8	1,1		Tipo a	Rápido Progresivo	97,56075974	97,56075974	0	0	5,000179864	2,676065636	
1	4	1	25	35,3	141,3	128,2	140,0	90,7%	91,6%	99,1%	1,3	11,0		Tipo a	Rápido Progresivo	188,0314233	188,0314233	0	0	10,87965	-3,465690511	
1	5	1	25	25	35,3	167,7	82,4	162,7	49,1%	50,6%	97,0%	2,2	2,0		Tipo b	Rápido	371,9704328	371,9704328	0	0	11,81740314	8,751516499
1	6	1	10	37,9	171,6	164,5	166,6	95,9%	98,7%	97,1%	2,3	7,5		Tipo a	Rápido Progresivo	393,2235674	393,2235674	0	0	13,50655192	0,515932255	
1	7	1	25	33,9	169,1	87,6	163,8	51,8%	53,5%	96,8%	2,7	0,0		Tipo b	Rápido	454,3402518	454,3402518	0	0	11,37691691	8,860501661	
1	8	1	25	39,5	180,4	128,0	177,8	71,0%	72,1%	98,4%	2,4	2,0		Tipo b	Rápido	423,3776293	423,3776293	0	0	8,878888661	-6,853790775	
1	10	1	28	25	33,8										Tipo d	Estático						
1	11	1	25	42,8	135,2	117,1	129,1	86,6%	90,7%	95,5%	2,5	3,0		Tipo a	Rápido Progresivo	331,4818547	331,4818547	0	0	47,78939152	13,16821498	
1	12	1	25	37,5	181,2	134,3	176,2	74,1%	76,2%	97,2%	3,1	9,0		Tipo b	Rápido	562,1572425	562,1572425	0	0	28,00002474	8,859702051	
1	13	1	25	36,2	203,9	173,4	202,2	85,1%	85,7%	99,2%	1,8	12,0		Tipo a	Rápido Progresivo	370,1418104	370,1418104	0	0	7,165010996	4,585262421	
1	14	1	25	39,5	142,1	60,7	128,1	42,7%	47,4%	90,2%	4,2	4,0		Tipo b	Rápido	600,291284	600,291284	0	0	60,60950533	-11,1768418	
1	15	1	25	42,6	203,2	187,2	200,0	92,1%	93,6%	98,4%	2,3	8,0		Tipo a	Rápido Progresivo	470,4539644	470,4539644	0	0	9,00877515	-2,588790239	
1	16	1	25	34,6	134,3	59,2	88,1	44,1%	67,2%	65,6%	3,9	6,0		Tipo b	Rápido	526,1114938	526,1114938	0	0	52,12319509	-4,020160202	
1	18	1	25	25	33,2										Tipo d	Estático						
1	19	1	25	38,3	175,2	94,2	171,1	53,8%	55,1%	97,7%	2,4	1,0		Tipo b	Rápido	418,5296064	418,5296064	0	0	23,10997477	7,232579731	
1	20	1	25	38,8	163,1	144,0	161,0	88,3%	89,4%	98,7%	1,8	2,0		Tipo a	Rápido Progresivo	297,0644882	297,0644882	0	0	49,85909098	11,675957899	
1	21	1	25	41,0	186,4	140,2	168,9	75,2%	83,0%	90,6%	3,5	5,0		Tipo a	Rápido Progresivo	653,3743289	653,3743289	0	0	55,33969398	0,173173757	
1	22	1	25	25	27,9										Tipo d	Estático						
1	23	1	25	36,6	147,8	118,1	139,3	79,9%	84,8%	94,2%	2,7	8,0		Tipo a	Rápido Progresivo	403,1383113	403,1383113	0	0	25,85391081	-4,195126499	
1	24	1	25	25	30,8										Tipo d	Estático						
1	25	1	25	41,7	141,5	113,9	127,9	80,5%	89,1%	90,4%	3,3	11,0		Tipo a	Rápido Progresivo	463,4556246	463,4556246	0	0	35,51415385	-4,045692814	

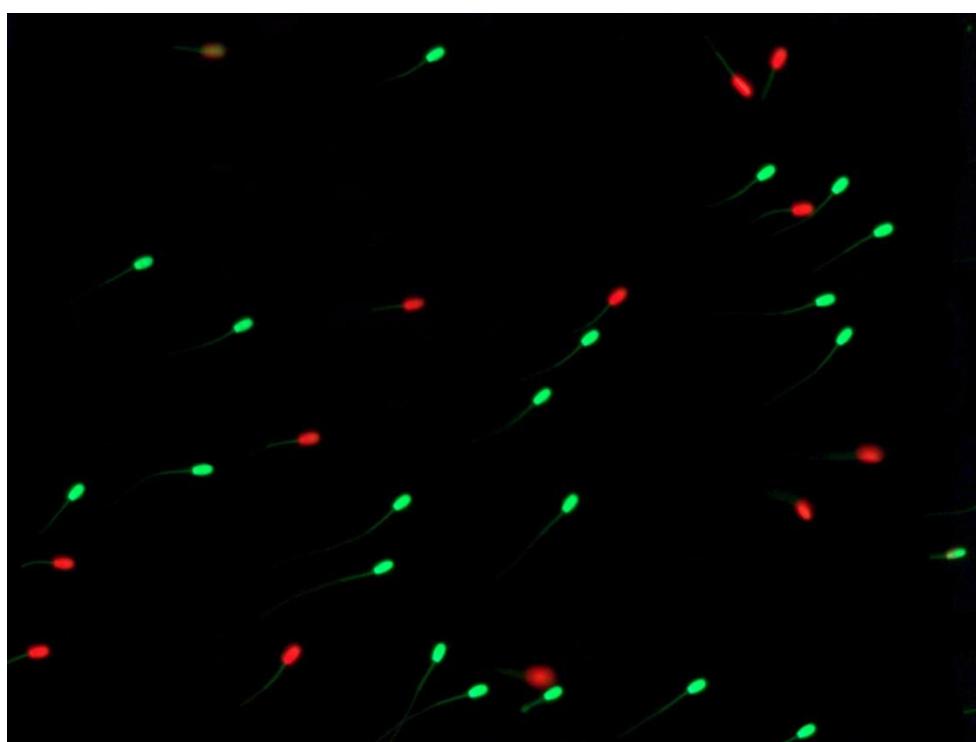
Figura 19. Hoja de datos generada por el sistema CASA.

#### 5.4. EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE MEMBRANA MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y ANÁLISIS DE IMAGEN.

La viabilidad de los espermatozoides (SV) se evaluó mediante el kit DUO-VITAL (Halotech, Madrid, España), en combinación con el software libre Image J para el análisis de las imágenes y un microscopio de fluorescencia permite la discriminación entre vivos y muertos utilizando un marcador de ADN doble fluorescente (naranja de acridina (AO)/ ioduro de propidio (IP)), sin necesidad de tiempo de incubación de la muestra.

Como en el caso anterior se procedió a realizar una dilución de las muestras pero en este caso, en vez de en el mismo diluyente se diluyó a  $50 \times 10^6$  espermatozoides/ml en el diluyente basado en TRIS (Yaniz et al., 2012), inmediatamente antes de la evaluación de la integridad de la membrana plasmática.

Se tomaron 10  $\mu\text{l}$  de la muestra de esperma diluido, se colocó en un portaobjetos, luego se añadieron 1  $\mu\text{l}$  de las soluciones del kit DUO-VITAL, tanto de la solución IP como de la de AO, tras mezclar se cubrió con un cubreobjetos y se observó y fotografió directamente en el microscopio de fluorescencia. Este procedimiento resulta en un marcado selectivo de las células muertas y vivas visualizado inmediatamente en colores rojo y verde, respectivamente.



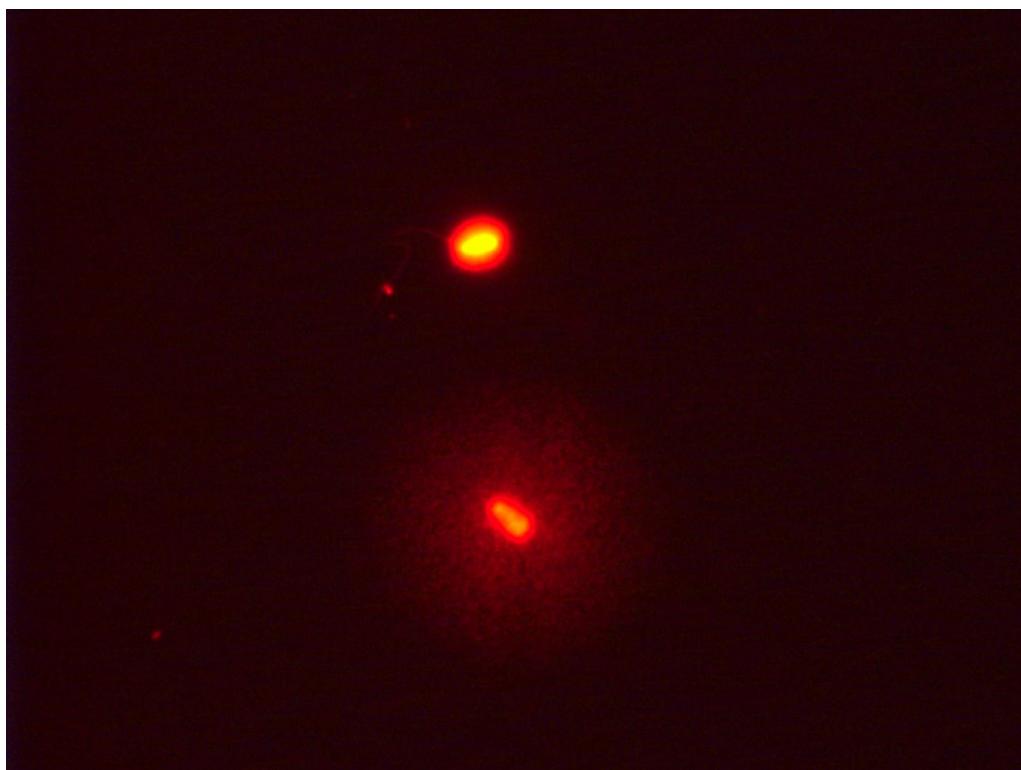
*Figura 20. Imagen de una muestra con espermatozoides marcados mediante fluorescencia bajo un microscopio de epifluorescencia (DM4500B Leica, Alemania), los verdes marcados con naranja de acridina (AO) corresponden con espermatozoides viables, los rojos marcados con ioduro de propido (PI) corresponden con espermatozoides con daño en la membrana.*

Las imágenes digitales de los espermatozoides marcados mediante la fluorescencia se obtuvieron con un microscopio de epifluorescencia (DM4500B Leica, Alemania), bajo un objetivo de 10X, equipado con los juegos de filtros apropiados. Se utilizó el software Jenoptik ProgRes CF CCD (Jenoptik AG, Jena, Alemania), junto con Jenoptik ProgRes Capture Pro de adquisición de imágenes. El CCD se pre-ajustó con un tiempo de disparo de 501 milisegundos. Se tomaron fotografías de al menos 8 campos diferentes para cada muestra. En estas imágenes el número total de espermatozoides, los porcentajes de espermatozoides con la membrana intacta y de espermatozoides con la membrana dañada se determinaron utilizando el software libre ImageJ (versión 1.42), y dos plug-ins creados para este fin. Los datos obtenidos por ImageJ fueron exportados a una tabla excel para su posterior análisis.

### **5.5 ANÁLISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO MEDIANTE EL TEST SCD.**

Para el estudio de la fragmentación del ADN espermático se hizo uso de la tecnología Halomax® de HALOTECH DNA que permite evaluar la fragmentación de ADN espermático en distintas especies animales, concretamente se utilizó el kit para ovino Ovis-Halomax®.

La evaluación de la fragmentación del ADN de los espermatozoides se basa en la respuesta diferencial de la cromatina espermática, con o sin ADN fragmentado, a un tratamiento de depleción proteica. En ausencia de rotura ADN masivas, la eliminación de las proteínas nucleares produce núcleos intensamente teñidos con halos muy pequeños y compactos de bucles de ADN que salen de un núcleo central. Sin embargo, núcleos de espermatozoides que contienen ADN fragmentado muestran un halo de difusión de la cromatina muy grande y ligeramente teñido compuesto por fragmentos de ADN que salen de un núcleo central residual.



*Figura 21. Imagen de una muestra con espermatozoides analizados con el test SCD. El espermatozoide de la parte superior de la imagen no presenta ADN fragmentado y muestra un halo de dispersión pequeño, compacto e intensamente teñido. El espermatozoide de la parte inferior presenta ADN fragmentado y muestra halo de difusión de la cromatina muy grande y ligeramente teñido.*

El kit Ovis-Halomax® viene provisto de portaobjetos especiales recubiertos de agarosa, agarosa de bajo punto de fusión, solución base de lisis, agente reductor y flotadores para la realización de la determinación de la fragmentación de ADN.

El ensayo de la fragmentación del ADN espermático se realizó inmediatamente una vez que la muestra se descongeló después de la criopreservación. Para ello se colocan los criotubos con las muestras a -80°C en hielo hasta la completa descongelación de las muestras.

Cada muestra de semen se diluyó a una concentración de 20 millones de espermatozoides/ml en medio basado en tampón fosfato (PBS). Previamente se fundió la agarosa en el microondas y se colocaron 30 µl en eppendorfs y se dejaron en baño maría a 37°C. Posteriormente se mezcló 15 µl de la muestra diluida en PBS con la agarosa líquida de bajo punto de fusión atemperada a 37° C, de modo que la concentración final de la agarosa fuera del 0,7%. Sobre el portaobjetos de cristal previamente recubierto de una película de agarosa estándar al 0,65%, se depositó una gota de la suspensión de agarosa y espermatozoides, se cubrió con un cubreobjetos de 24x24 mm y se dejó solidificar a 4°C durante 5 minutos hasta formar un hidrogel.

Los cubreobjetos se retiraron cuidadosamente y los portaobjetos se introdujeron en una bandeja con solución de lisis durante 5 minutos a temperatura ambiente para extraer membranas y proteínas, tratando de trabajar siempre con los portaobjetos siempre en posición horizontal. Tras un lavado de 5 minutos en abundante agua destilada, las preparaciones se deshidrataron en baños de etanol al 70, 90 y 100% (v/v) de 2 minutos cada uno y se dejaron secar al aire. Todo este procedimiento se realizó bajo campana extractora. Las preparaciones pueden ser analizadas inmediatamente o almacenarse durante varios meses en una caja cerrada a temperatura ambiente.

Para su observación en microscopía de fluorescencia, las células se tiñeron con GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA) en Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, California, Estados Unidos) y se cubrieron con un cubreobjetos. Una vez teñido se observaron las muestras bajo microscopía de fluorescencia (DM4500B Leica, Alemania) para realizar una valoración del tamaño relativo de los halos producidos. Se realizó un conteo de los espermatozoides que presentan ADN fragmentado frente a los que lo tienen intacto, según lo descrito anteriormente. La discriminación visual directa es muy clara y evidente. Además, los flagelos se preservan, permitiéndose la diferenciación de los espermatozoides de otros tipos celulares presentes en la muestra. Se realizó un conteo de al menos 300 espermatozoides por muestra.

## 5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores obtenidos se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete SPSS, versión 15.0

(SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). La distribución de la normalidad y la homogeneidad de varianza de la puntuación de valor de la mediana para cada grupo fueron verificadas por el test de Kolmogorov-Smirnov y pruebas de Levene, respectivamente. Para las muestras que se distribuyen normalmente, las diferencias en la integridad de la membrana y la movilidad entre los extensores se examinaron mediante análisis de varianza (ANOVA) usando modelos lineales generalizados. Si el valor de F fue significativo, se usó una prueba de Tukey para comparaciones múltiples a posteriori. Para las poblaciones de una distribución normal, se usó la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de la integridad de la membrana y la movilidad entre las muestras, seguido por el test de Mann-Whitney a posteriori de la prueba. El nivel de significación estadística se fijó en  $P < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS.

En la figura 22 se muestra el efecto de los diferentes diluyentes utilizados sobre el porcentaje de espermatozoides móviles. A las 0h no se apreciaron diferencias de movilidad entre diluyentes, mientras que en el resto de tiempos hubo diluyentes con un peor comportamiento, el fosfato y citrato, y otros como la leche y el INRA que se mantuvieron bien hasta las 6h pero cayeron bruscamente a las 24h de incubación. Los tampones del grupo zwiterion (MOPS, TES y HEPES) y el TRIS son los que mejor mantuvieron la movilidad hasta el final de la incubación. El MOPS mantuvo unos valores constantes de movilidad a lo largo de las 24h de estudio, a diferencia de los otros tres del grupo de los mejores que cayeron significativamente de las 6h a las 24.

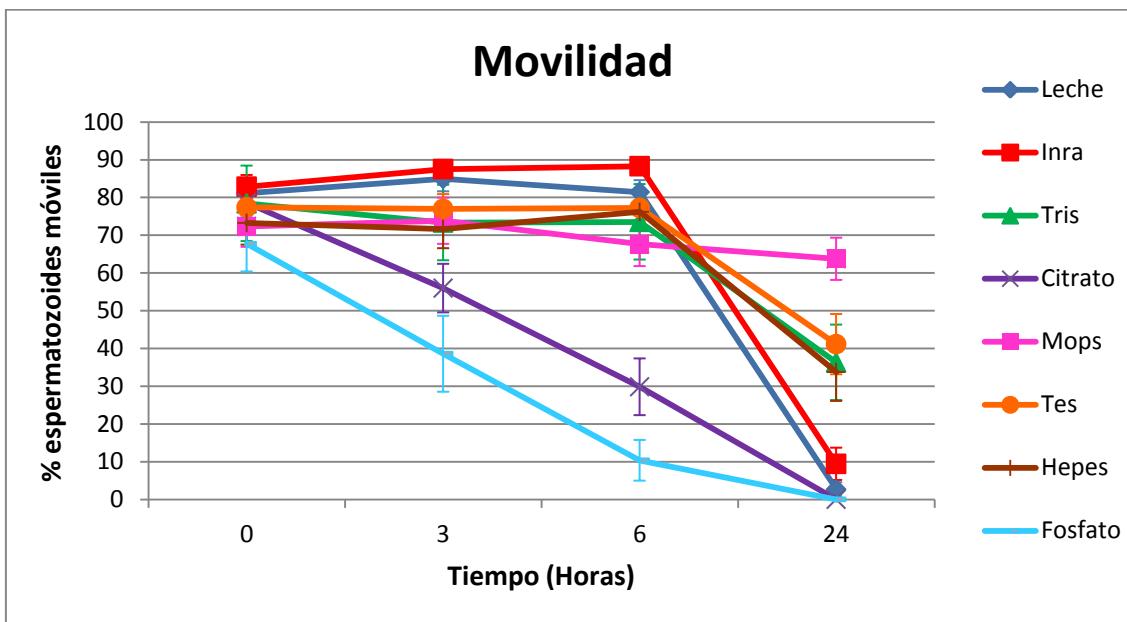


Figura 22. Efecto de los diferentes diluyentes en la movilidad de los espermatozoides de morueco durante la incubación a 37°C hasta las 24 horas.

La figura 23 muestra el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva respecto al total de espermatozoides considerados móviles. A las 0h el grupo citrato presentó menores valores para este parámetro que el resto de los diluyentes, excepto el TRIS. A las 3h y 6h el fosfato, TRIS y citrato presentaron valores de movilidad progresiva significativamente menores que el resto de los diluyentes. A las 24h a estos tres diluyentes con peores resultados se les unió la leche y el INRA, que cayeron bruscamente. Los diluyentes basados en tampones del grupo zwiterion también tuvieron descensos significativos en esta variable a las 24h, salvo el MOPS que se mantuvo constante.

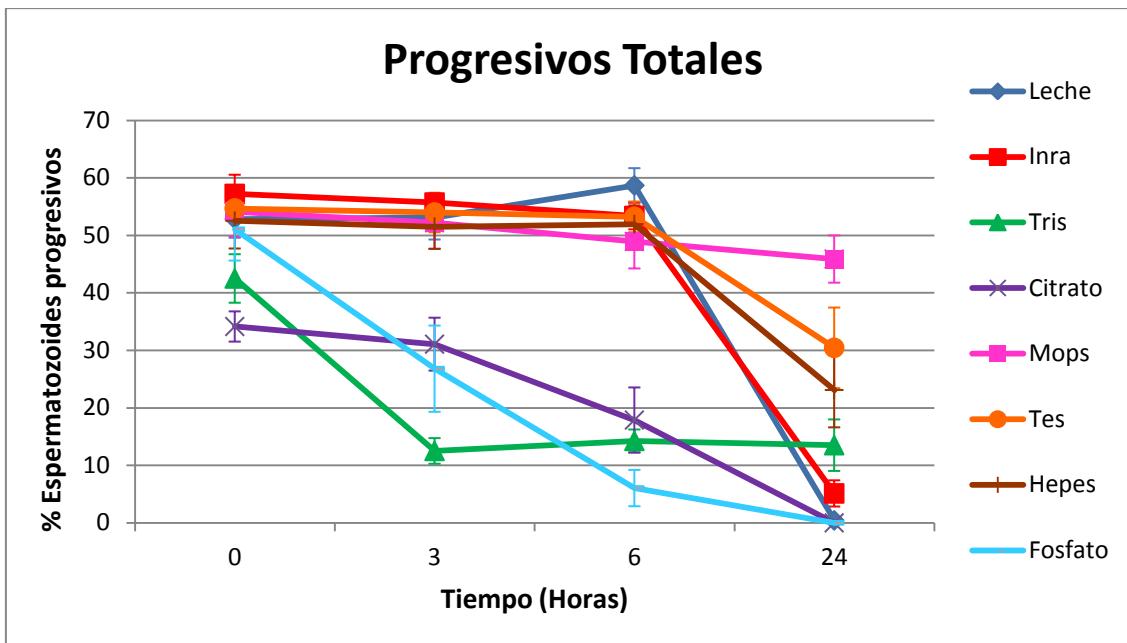


Figura 23. Efecto de los diferentes diluyentes en la cantidad de espermatozoides de morueco con movimiento progresivo durante la incubación hasta las 24 horas.

El efecto del diluyente empleado sobre las variables cinéticas se muestra en la figura 24. En las variables cinéticas (VCL, VSL Y VAP) los diluyentes basados en los compuestos zwiterion junto con el INRA mostraron las mayores velocidades a lo largo del estudio. La leche mantuvo unas altas velocidades hasta las 6h y, como en el caso de los porcentajes de espermatozoides móviles y progresivos, sufrió a las 24h un acusado descenso, a diferencia del INRA que se mantuvo y mostró resultados similares al grupo zwiterion. El TRIS, que presentó valores de VCL similares a los mejores (Fig. 24a) a las 3h sufrió un acusado descenso en de VSL (Fig 24b) y VAP (Fig 24c), con resultados similares al citrato y fosfato a las 6h y leche a las 24 h. Los parámetros cinéticos a las 24h en citrato y fosfato fueron nulos ya que no presentaron espermatozoides móviles.

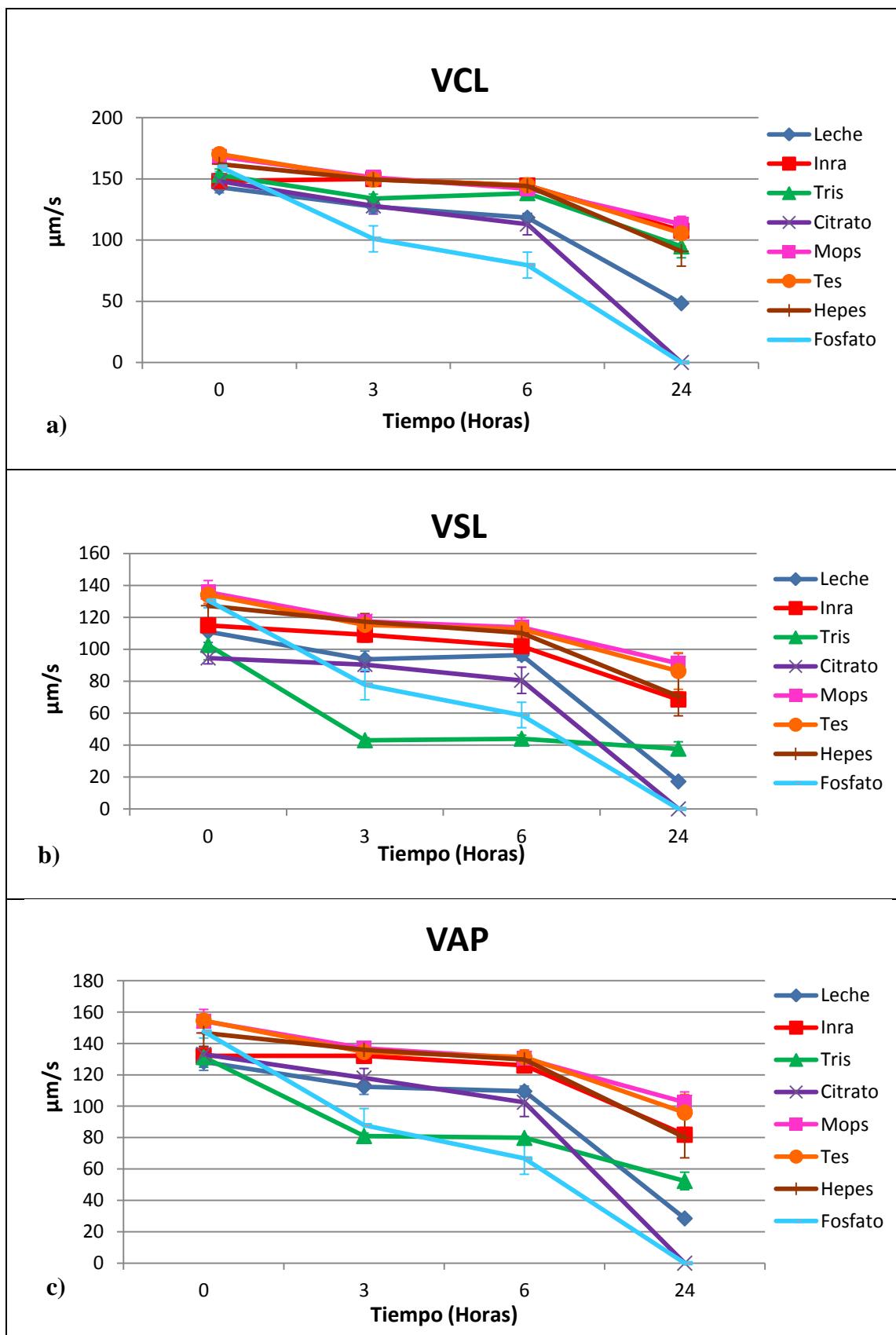


Figura 24. Efecto de los diferentes diluyentes en los espermatozoides de morueco durante la incubación a 37°C hasta las 24 horas en parámetros cinéticos: a) velocidad curvilínea, b) velocidad rectilínea y c) velocidad media.

El efecto del diluyente empleado sobre las variables de calidad de movimiento se muestra en la figura 25. De nuevo los diluyentes formulados con los compuestos zwiterion obtuvieron los mejores resultados y además constantes a lo largo de todo el estudio, salvo para la ALH (Fig. 25d) donde se vio incluso una tendencia a la disminución en la amplitud de batida de la cabeza. A las 3h y 6h el diluyente TRIS fue el que presentó los peores resultados en todos los parámetros de calidad. El resto de diluyentes mostraron valores similares. A las 24h la leche descendió en LIN (Fig. 25a), STR (Fig. 25b) y WOB (Fig. 25c), con la misma tendencia que en los anteriores parámetros, y presentó los peores resultados junto a TRIS. En cambio INRA no presentó diferencias significativas con los diluyentes del grupo zwiterion, salvo en ALH. Así, a las 24h el INRA y el TRIS presentaron la mayor amplitud de batida de la cabeza (Fig. 25d). El grupo Fosfato y Citrato se comportaron bien en todos estos parámetros hasta las 6h, mientras tenían espermatozoides móviles.

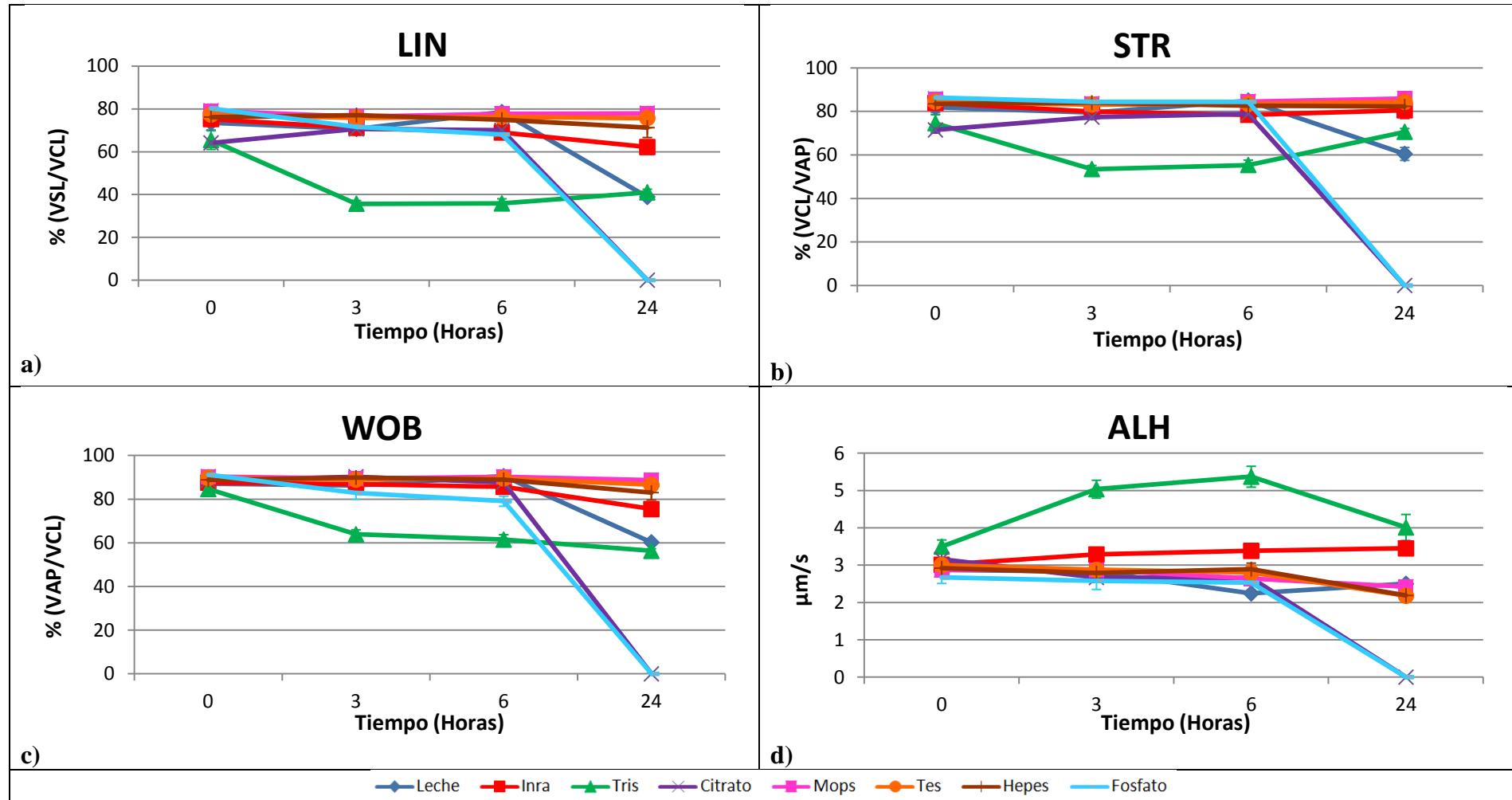


Figura 25. Efecto de los diferentes diluyentes en los espermatozoides de morueco durante la incubación a 37°C hasta las 24 horas en parámetros de calidad de movimiento: a) índice de linealidad, b) índice de rectitud, c) índice de oscilación y d) amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza.

La figura 26 muestra el efecto de los diferentes diluyentes sobre el porcentaje de espermatozoides con la membrana intacta (viables). A las 3 y 6h, las muestras diluidas en fosfato fueron las que obtuvieron la menor proporción de espermatozoides viables, mostrando diferencias significativas con la leche, el diluyente que obtuvo los valores más altos. A las 6h, el citrato también fue significativamente menor que la leche, mientras que en el resto de diluyentes las diferencias no alcanzaron la significación al presentar valores intermedios. Los diluyentes que mostraron mayores descensos de viabilidad entre las 6 y las 24h fueron la leche, el INRA y el fosfato. Estos dos últimos grupos se distanciaron claramente del resto a las 24h de incubación, con resultados muy inferiores de viabilidad, mientras que las muestras diluidas en leche no se diferenciaron del resto de grupos en ese tiempo. Los diluyentes del grupo zwiterion y el TRIS mantuvieron valores constantes de espermatozoides viables hasta las 6h, mostrando un descenso entre las 6 y 24h aunque menos intenso que en el resto de diluyentes.

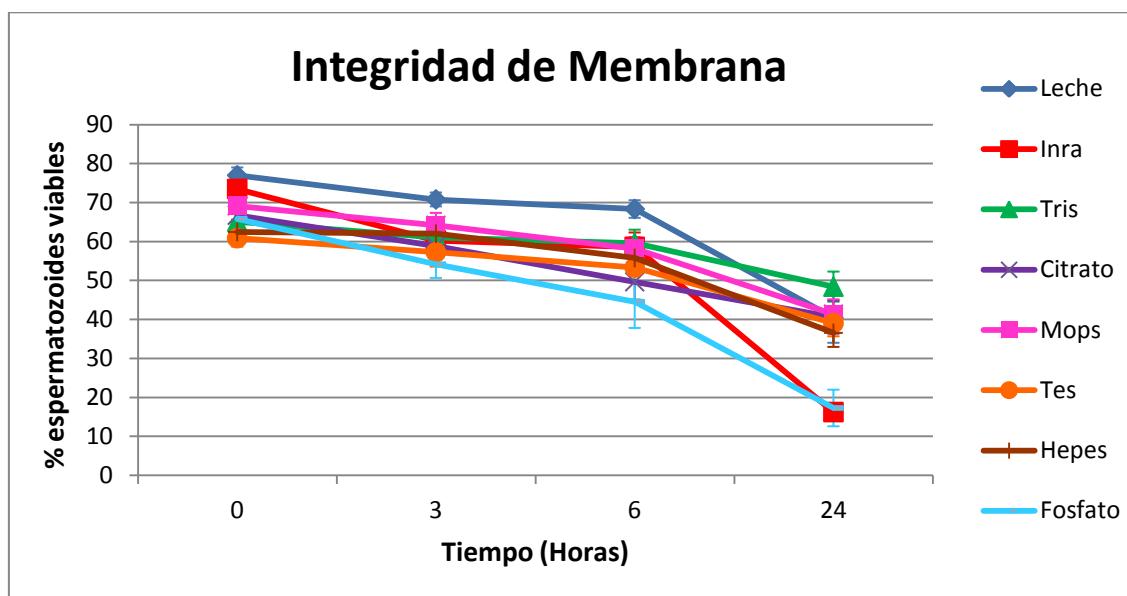
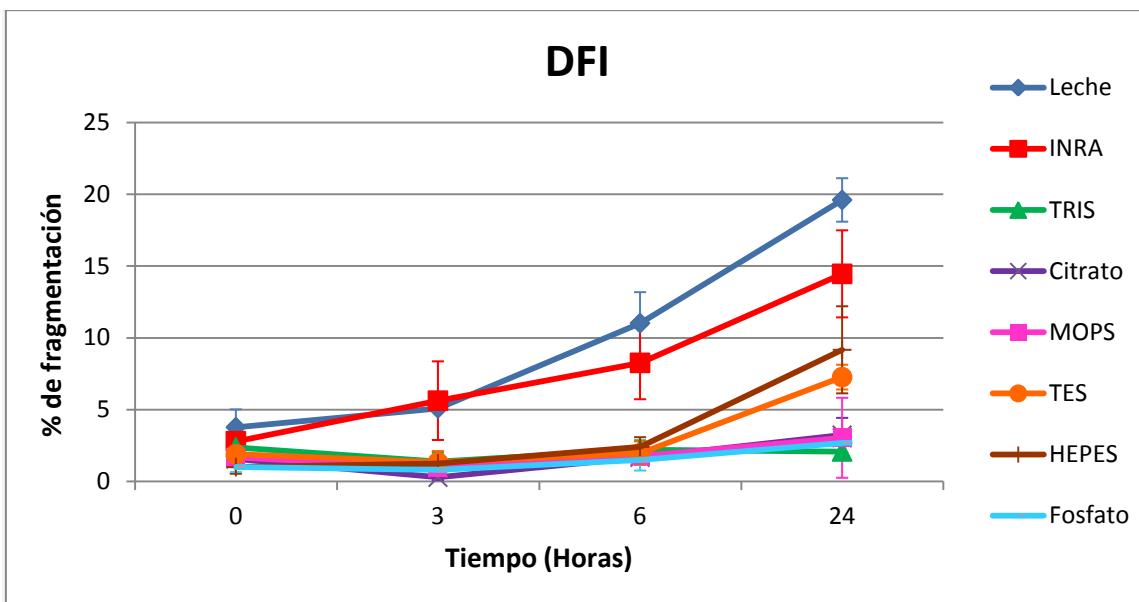


Figura 26. Efecto de los diferentes diluyentes en los espermatozoides de morueco durante la incubación hasta las 24 horas en el porcentaje de espermatozoides viables en referencia a la integridad de la membrana de los mismos.

En figura 27 se muestra la dinámica de fragmentación del ADN espermático (expresada como un índice de fragmentación o DFI) durante la incubación a 37°C. A las 0 y 3h no se observaron diferencias significativas de fragmentación entre los diferentes diluyentes. A las 6h la fragmentación del ADN espermático fue mayor en el semen diluido en leche (11% de media) que en los diluyentes de formulación simple basados en los diferentes tampones (citrato, fosfato, HEPES, MOPS, TES, y TRIS). Todos los diluyentes mantuvieron valores constantes de fragmentación a lo largo del tiempo de estudio salvo la leche y el INRA, en los que se apreció un aumento significativo entre las 3 y las 24h, por lo que mostraron los mayores índices de fragmentación al final del estudio, aunque el INRA no mostrara diferencias significativas con TES y HEPES.



En la figura 28 se muestra la variación del pH en los diferentes diluyentes a lo largo de la incubación a 37°C. A las 0 h la leche presentó valores algo inferiores al resto, aunque las diferencias no fueron significativas. A las 3h la leche presentó un pH significativamente más bajo que el resto de diluyentes. En el INRA se observó un descenso claro del pH a las 6 y 24h de incubación, de manera que obtuvo valores similares a la leche e inferiores a algunos de los diluyentes a las 6h (MOPS y Fosfato) y a todos los a las 24h. A las 24h todos los diluyentes disminuyeron su pH a excepción del fosfato que mantuvo el pH constante durante las 24h de estudio.

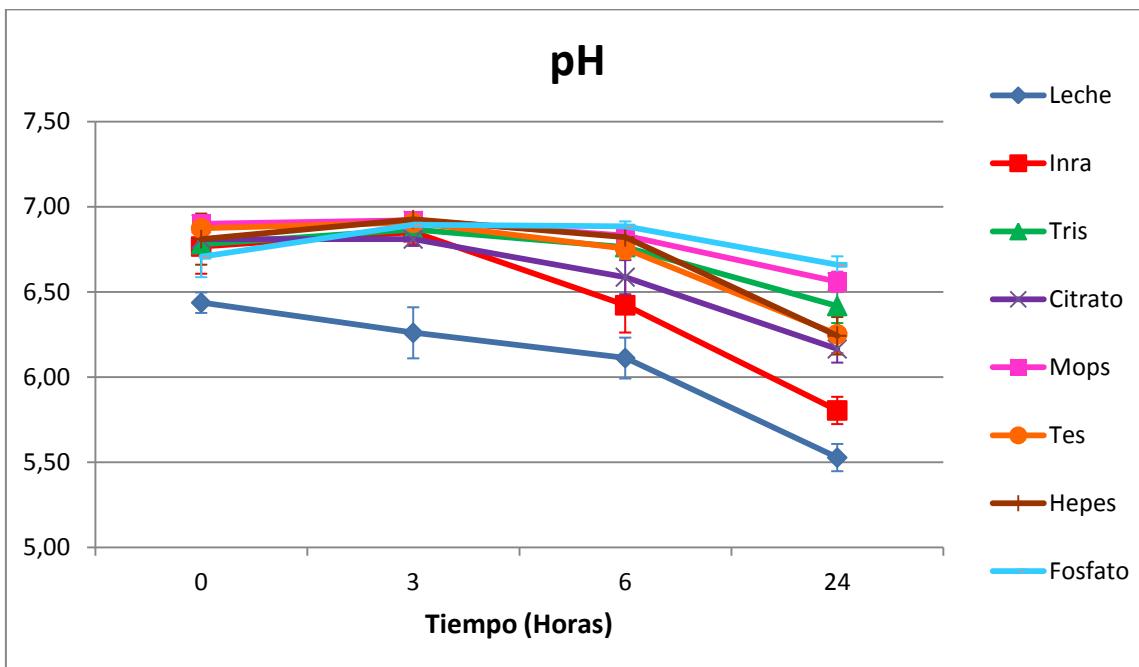


Figura 28. Variación del pH en los diferentes diluyentes de semen de morueco durante la incubación hasta las 24 horas.

## 7. DISCUSIÓN.

En este estudio hemos comparado el efecto sobre la conservación del semen de morueco de diferentes diluyentes, desde los más simples y con una capacidad tamponante limitada, tales como el citrato y el fosfato, hasta los tampones orgánicos más complejos y no permeables (TES, HEPES, MOPS, TRIS) que pueden controlar el pH en un rango más amplio y no son dependientes de la temperatura (TES, MOPS y HEPES), además de dos diluyentes de composición compleja, la leche y el INRA96. Los resultados muestran que los diluyentes complejos, leche e INRA mostraron una elevada proporción de espermatozoides móviles y viables hasta las 6h, aunque a las 24h se observó un descenso muy brusco en estos parámetros, asociado a una disminución en el pH. El mantenimiento del pH del medio en el que se suspenden los espermatozoides es un aspecto crucial en la conservación de semen. El pH del semen de ovino recién eyaculado es de alrededor de 6,7-6,8 (Moore y col., 1940; Bar-Sagie y col., 1981). Durante el almacenamiento, los espermatozoides y las bacterias contaminantes producen metabolitos que pueden reducir el pH del medio. El pH interno de los espermatozoides está directamente relacionado con el pH del medio (Gatti y col. 1993; Jones y Bavister 2000) y se correlaciona con la movilidad de los espermatozoides (Jones y Bavister 2000). Cuando se reduce el pH, tanto en el metabolismo de los espermatozoides como la movilidad se reduce (Gadea, 2003). El metabolito principal responsable de la disminución en el pH es el ácido láctico producido por el metabolismo glucolítico de los espermatozoides y, por consiguiente, se ha utilizado como un indicador de la calidad del semen (Rigau y col., 1996). La adición de agentes tampón en el diluyente ayuda a controlar el pH del medio, pero hay una importante variación en el rango de amortiguación y la capacidad de estas moléculas, y muchos sistemas tampón tienen un impacto sobre los sistemas biológicos, las actividades de la enzima, los sustratos o los cofactores (Perrin y Dempsey, 1974). Una solución tampón ideal para diluyentes espermatozoides debe tener una alta capacidad de amortiguación en el rango de pH donde los espermatozoides son funcionales y ser independiente de la temperatura, neutro y no tóxico a las células, y no reaccionar con otros componentes del diluyente. Estos dos diluyentes complejos, leche e INRA, fueron los que también presentaron un mayor grado de fragmentación del ADN espermático a partir de las 6h. Esta mayor fragmentación puede asociarse también al descenso observado en el pH.

La leche desnatada, un complejo biológico variable, es el principal diluyente utilizado para preservar el semen de ovino a 15°C para IA en numerosos países, incluido España. El éxito de este diluyente ha sido atribuido a su fracción proteica que puede actuar como un amortiguador frente a los cambios de pH y como agente quelante en contra de cualquier metal pesado presente. También puede proteger parcialmente los espermatozoides durante la reducción de la temperatura de almacenamiento. La leche de vaca ha sido preferible a la leche de otras especies. El INRA96 es un diluyente semi-sintético que incorpora elementos de la leche y citrato en su composición. Los resultados obtenidos en este estudio desaconsejan la utilización de diluyentes basados en leche, como la propia leche y el INRA, para la conservación del semen de morueco durante largos períodos, ya que presentan una reducida capacidad tamponante, produciéndose un descenso notable de pH que afecta a la mayoría de parámetros de calidad seminal. Sin embargo, estos diluyentes pueden funcionar bien cuando el semen se conserva durante breves intervalos de tiempo, como habitualmente se realiza en ovino.

Los tampones pertenecientes al grupo zwitterion (MOPS, HEPES, TES) fueron los que obtuvieron mejores resultados de velocidad a partir de las 3h. También se situaron entre los mejores diluyentes en la proporción de espermatozoides móviles, progresivos, viables y no fragmentados, manteniendo una mejor movilidad total que el resto de los diluyentes hasta las 24h, junto con el TRIS, y un mayor porcentaje de espermatozoides progresivos a las 24h. Estos resultados son coincidentes con un trabajo previo de nuestro grupo (Yániz y col., 2011), en el que se evaluó el efecto del sistema tampón sobre la conservación del semen de morueco a 15°C. A pesar de utilizar temperaturas diferentes, el presente estudio confirma los resultados obtenidos en el anterior, ya que los diluyentes basados en tampones pertenecientes al grupo de los zwitterion (TES, MOPS y HEPES) obtuvieron muy buenos resultados en la mayoría de parámetros de movilidad e integridad de membrana. En el presente trabajo se pretendía emular las condiciones del aparato genital de la hembra y acelerar los procesos de degradación espermática para estudiar la dinámica de fragmentación del ADN espermático utilizando diferentes diluyentes. Por ello se incubaron las muestras a 37°C, siguiendo una metodología descrita con anterioridad por otros autores (Gosálvez y col, 2006 y 2008).

A pesar del interés potencial de los compuestos zwitteriónicos en la conservación del semen en refrigeración o congelación en ovino, relativamente pocos estudios han evaluado sus efectos sobre la calidad del esperma durante el almacenamiento (Upreti y col., 1991; Maxwell y Salomon, 1993). En el estudio de Molinia y col. (1994), en diluyentes para la conservación en congelación, los diluyentes que contenían tampones zwitterion ofrecieron mejores resultados de movilidad, viabilidad e integridad de acrosomas tras la descongelación en ovino, que los que contienen sistemas tampón basados en el TRIS-citrato. Un año después, Upreti y col. (1995), publicaron que el MOPS era mejor que el HEPES para la movilidad espermática durante la incubación a 38 ° C, y que una concentración de HEPES a partir de 40 mM disminuían los valores de la movilidad del esperma durante la incubación a 38 ° C, mientras que estos efectos no se observaron con MOPS hasta concentraciones de 150 mM. En el presente estudio, sin embargo, las diferencias de movilidad fueron poco relevantes entre los diferentes agentes tamponantes zwitteriónicos evaluados, a pesar de que el HEPES se incluyó a una concentración varias veces superior a 40 mM. Aunque en el presente estudio los resultados que se obtuvieron con HEPES fueron aceptables, el uso de este tampón debe ser cuidadosamente evaluado ya que puede estimular a las células para que produzcan agentes oxidantes (Bowman y col., 1985), y cuando los medios que contienen HEPES están expuestos a la luz, producen peróxido de hidrógeno citotóxico (Zigler y col., 1985; Lepe-Zúñiga y col. 1987). Varios autores han descrito los efectos adversos del HEPES sobre varios tipos de células, como los macrófagos (Brune, 1980), condrocitos (Poole y col., 1982), fibroblastos (Verderey y col., 1981), los ovocitos (Morgia y col, 2006) y embriones (Mahadevan y col, 1986; Keskintepe y Brackett, 1996). En nuestro estudio, las condiciones de trabajo con reducida exposición a la luz de los diluyentes pudieron contribuir a que el diluyente basado en HEPES obtuviese buenos resultados.

El diluyente basado en el TRIS obtuvo buenos resultados de movilidad total, velocidad curvilínea y fragmentación hasta las 24h. Sin embargo este diluyente presentó los peores índices de calidad de movimiento, al presentar la mayoría de los espermatozoides trayectorias circulares. Los resultados obtenidos en relación al TRIS son también coincidentes con los descritos previamente por nuestro grupo para semen conservado en refrigeración (Yániz y col., 2011). Los resultados de este estudio

refuerzan la idea de que TRIS puede estar contraindicado para su uso en las formulaciones de los diluyentes de esperma en ovino (Yániz y col, 2011). El diluyente basado en TRIS causa modificaciones drásticas en los parámetros cinéticos de los espermatozoides, que se caracterizan por un aumento del ALH, y una disminución en la VSL y LIN. Cambios similares se han descrito en la hiperactivación de los espermatozoides durante la capacitación (Mortimer y Maxwell, 1999). Un espermatozoide de morueco puede ser considerado en hiperactivación cuando  $VCL > 250.0 \mu\text{m s}^{-1}$ ,  $VSL < 100.0 \mu\text{m s}^{-1}$ ,  $LIN < 30\%$ , and  $ALH_{max} \geq 9.0 \mu\text{m}$ . (Mortimer y Maxwell, 1999). En promedio, estos requisitos no fueron alcanzados en las muestras diluidas en Tris durante el almacenamiento, pero este tampón induce cambios en la movilidad de los espermatozoides que recuerdan a las observadas durante el proceso de hiperactivación.

Inicialmente se publicó que concentraciones de TRIS entre 10 y 50 mM no tenían ningún efecto sobre la movilidad y el metabolismo de los espermatozoides de ovino. Posteriormente, concentraciones más altas de Tris resultaron ser ventajosas en diluyentes para el almacenamiento refrigerado, y en la actualidad, los medios basados en TRIS son ampliamente recomendados para el semen ovino refrigerado (Salomon y Maxwell, 2000). Sin embargo, la elección de un tampón para una aplicación particular debe basarse en sus propiedades de pH óptimo y propiedades biológicas en lugar de su uso histórico. En este sentido, y de acuerdo con Upreti y col., 1995, pensamos que la elección de Tris como diluyente de semen no es lo ideal porque: 1) el pKa de Tris es de 8,1, lo que significa que su capacidad de amortiguación a pH inferior a 7,5 es pobre; 2) sus grupos amino alifáticos son químicamente reactivos, por lo que no es apto para ser utilizado con los sistemas celulares porque es tóxico para muchas células de mamíferos (Good y col., 1966); 3) el TRIS interacciona con iones metálicos (Hanlon y col. 1966), e interfiere en la absorción de calcio en las vesículas de membrana y las células (Alonso y col., 1979; Kwan y Daniel, 1981; Upreti y col., 1995); 4) el tampón TRIS inhibe las enzimas respiratorias en las mitocondrias, aunque esto podría ser reversible (Hayashi y col., 1981), y 5) el pH de una solución basada en TRIS depende de la temperatura. La capacidad de amortiguación depende de la concentración y la proximidad del pH en relación con el pKa del báfer. En concentraciones más bajas de báfer y en valores de pH fuera del pKa, el sistema tampón es más susceptible a los cambios de pH (Chuy y Bell, 2006). Las altas concentraciones de Tris incorporado en los diluyentes de semen pueden tener la ventaja de una mayor capacidad de amortiguación alrededor de pH 7,0, pero las otras desventajas pueden adquirir una mayor relevancia.

Los diluyentes basados en citrato y fosfato fueron los que obtuvieron peores resultados de movilidad a partir de las 3h de incubación, mientras que la fragmentación de ADN espermático fue muy baja en ambos diluyentes hasta las 24h. El fosfato también fue el diluyente con resultados más bajos de integridad de membrana a las 6h y, junto con el INRA, a las 24h de incubación. En un estudio anterior de nuestro grupo (Yániz y col, 2011), el tampón fosfato fue el que peor conservó la proporción de espermatozoides móviles y progresivos y la integridad de membrana durante la conservación a 15°C. Los diluyentes basados en fosfatos se desarrollaron antes de 1940 para la preservación de semen de toro y morueco, y han sido reemplazados por diluyentes basados en citrato, y diluyentes orgánicos que contienen como TRIS (Salomon y Maxwell, 2000). En la actualidad, citrato y TRIS son los sistemas tampón más frecuentes en la composición de los diluyentes semi-sintéticos para el almacenamiento de semen ovino en refrigeración. (Evans y Maxwell, 1987, Maxwell y

Salomon, 1993; Salomon y Maxwell, 2000; López y col., 1999; Martí y col., 2003; López-Sáez y col., 2000; Paulenz y col., 2002; Paulenz y col., 2003; Yániz y col, 2008). Los efectos del citrato en los espermatozoides pueden ser difíciles de predecir, porque es un sustrato mitocondrial y un quelante con elevada afinidad para los cationes divalentes (Kamp y col., 2007). El citrato por lo tanto podría apoyar la producción de ATP mitocondrial y/o atenuar los efectos de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , o iones de metales tóxicos. La alta concentración de citrato puede inhibir la fosfofructoquinasa, probablemente el elemento más importante del control glucolítico en el esperma (Travis y col. 2001, Jones y Connor 2004, Kamp y col., 2007). A pesar de la que la permeabilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides al citrato es poco clara, el hecho de que las concentraciones extra- e intracelulares están relacionadas con las concentraciones de citrato y que los espermatozoides pierdan citrato intracelular cuando se encuentran en medios de baja concentración en citrato indicaría que el citrato puede ser permeable (Kamp y col. 2007). Por último, el ácido cítrico / citrato de sodio es un sistema de amortiguación simple con una capacidad de amortiguación limitada (Gadea, 2003).

Los estudios realizados sobre distintas especies de animales, en lo que se refiere a la fragmentación del ADN en muestras de semen, indican que el valor diagnóstico de este parámetro no se debería obviar (Agarwal y Allamaneni, 2004). Sin embargo, y probablemente debido al bajo número de trabajos realizados en este campo, existen versiones contradictorias sobre la importancia absoluta del parámetro en sí mismo o el peso relativo que se le debe otorgar al confrontarlo con los datos tradicionales que se analizan en un espermograma normal. Si bien algunos autores consideran la fragmentación del ADN como un marcador independiente de los valores estándar dentro de un espermograma (Zini y col., 2001; Evenson y col., 2002), otros establecen correlaciones entre diversos parámetros de calidad seminal y los índices de fragmentación (Sun y col., 1997; Giwercman col., 2003; Sills y col., 2004) e incluso entre la fragmentación y la capacidad de fertilización de los individuos (Evenson y col., 1994; Didion y col., 1999).

Los resultados de un estudio de Pérez-Llano y col. (2005) indicaron que el DFI es un parámetro independiente del resto de las características seminales controladas de forma rutinaria. Esto significa que un espermatozoide con movilidad, acrosoma y morfología normales, es decir aparentemente normal, puede tener el ADN fragmentado y, como consecuencia, presentar problemas en la fertilización. Por tanto, el DFI se debería evaluar para ser conjugado con el resto de parámetros y, de esta forma, tomar una decisión sobre la utilidad del eyaculado.

La Fragmentación del ADN espermático puede ser retrasada o incluso abolida mediante el uso de diluyentes espermáticos (Pérez-Llano y col., 2006). En este estudio de se evaluaron muestras de esperma de verraco diluido en diluyente comercial ACROMAX. (BPV, SL, Madrid, España) y de semen sin diluir, almacenados a 15°C durante 21 días. Se demostró que los parámetros de movilidad y calidad del movimiento disminuyen más rápidamente en las muestras de semen no diluido entre el día 0 y 7, en comparación con las muestras de semen diluido que se mantuvieron con una alta calidad hasta el día 11. La principal conclusión de este estudio fue que algunos medios para diluir esperma pueden retrasar parcialmente o evitar la fragmentación del ADN espermático. El hecho de que la fragmentación del ADN de los espermatozoides depende de la estrategia de conservación utilizada y que no era constante, planteaba

preguntas interesantes acerca de la mejor manera de preservar las muestras de semen y el tiempo óptimo para utilizarlo. El semen diluido se protegió tanto contra los efectos del envejecimiento *in vitro* como contra de los mecanismos que conducen a la fragmentación del ADN espermático. En el presente estudió se trató de esclarecer cuales podrían ser los diluyentes más adecuados en semen ovino para frenar la fragmentación. Para ello se estudió la dinámica de fragmentación durante la incubación a 37°C hasta las 24h y se observó que la fragmentación permanece constante a lo largo del periodo de estudio en las diferentes muestras diluidas, salvo en los diluyentes INRA96 y leche, donde la fragmentación se disparaba ya a las 6h de incubación.

Según Boe-Hansen y col (2005) al aumentar el tiempo de almacenamiento de semen se reduce la integridad del ADN espermático y esto puede ser detectado en las primeras 24 horas en condiciones experimentales. Se han realizado numerosos trabajos en diferentes especies en los que se incubaron las muestras a 37°C, en un intento de emular las condiciones biológicas que experimentan los espermatozoides durante el transporte en el tracto femenino tras la inseminación artificial (López-Fernandez y col., 2007 y 2008; Pérez-Llano y col., 2010; Gosálvez y col, 2006; etc.). La presencia de sus propias especies reactivas del oxígeno (ROS) podría desempeñar un papel importante en la inducción de daño de la membrana, que a su vez, puede afectar a la integridad del ADN. Además, la liberación de enzimas proteolíticas activas como las contenidas en el acrosoma, así como la presencia de nucleasas activas de los que participan en el proceso de apoptosis puede dar lugar a daños en el ADN.

En conclusión, los resultados de este trabajo indican que los diluyentes basados en tampones del grupo zwiterion son los que obtuvieron mejores resultados globales de movilidad, integridad de membrana, viabilidad espermática y fragmentación del ADN hasta las 24h de incubación a 37°C. Los diluyentes basados en la leche o sus componentes presentaron un aumento claro de la fragmentación del ADN espermático a partir de las 6h de incubación, asociado un menor pH del medio. El TRIS provocó una alteración de las variables relacionadas con la calidad del movimiento, y el citrato y fosfato presentaron unos malos resultados de movilidad durante la incubación. Sin embargo, estos tres últimos diluyentes presentaron porcentajes reducidos de fragmentación del ADN espermático.

## 8. CONCLUSIONES.

De los resultados obtenidos en el estudio del efecto de diferentes diluyentes durante la incubación de semen ovino a 37°C que han sido expuestos en este documento, se pueden extraer las conclusiones que se enumeran a continuación.

1. Los diluyentes basados en tampones del grupo zwiterion (MOPS, HEPES, TES) fueron los que obtuvieron mejores resultados globales de movilidad, integridad de membrana, viabilidad espermática y fragmentación del ADN hasta las 24h de incubación a 37°C.
2. El diluyente basado en TRIS provocó una alteración de las variables relacionadas con la calidad del movimiento durante la incubación a 37°C que se caracterizaron por un aumento de la ALH, y una disminución en la VSL y LIN. Por lo tanto, los resultados de este estudio refuerzan la idea de que TRIS puede estar contraindicado para su uso en las formulaciones de los diluyentes de semen en ovino.
3. Los diluyentes basados en citrato y fosfato fueron los que obtuvieron peores resultados de movilidad a partir de las 3h de incubación, mientras que la fragmentación de ADN espermático fue muy baja en ambos diluyentes hasta las 24h. El fosfato también fue el diluyente con resultados más bajos de integridad de membrana a las 6h y, junto con el INRA, a las 24h de incubación.
4. Los diluyentes basados en la leche o sus componentes (leche e INRA) presentaron un aumento claro de la fragmentación del ADN espermático a partir de las 6h de incubación, asociado a un menor pH del medio.
5. Los resultados obtenidos en este estudio desaconsejan la utilización de la leche desnatada o el INRA96 para la conservación del semen de morueco durante largos períodos ya que presentan una capacidad tamponante limitada, lo que se asocia a un descenso de los parámetros de calidad seminal a las 24h de incubación. Sin embargo, estos diluyentes pueden funcionar bien cuando el semen se conserva durante breves intervalos de tiempo, como habitualmente se realiza en ovino.

## 9. AGRADECIMIENTOS.

En este apartado quisiera agradecer a todas las personas e instituciones que me han ayudado durante la realización de este trabajo de fin de carrera. Especialmente:

A Jesús Yániz por su continua dedicación y dirección durante el desarrollo de este trabajo.

A Inmaculada Palacín por su disposición a ayudarme con cualquier problema surgido a lo largo de la realización del trabajo.

A mi familia y a mi novia por apoyarme y animarme durante todo el desarrollo de mi formación académica.

Se agradece al CITA (DGA), ATPSYRA (DGA) y UPRA-Grupo Pastores por su ayuda en la obtención de las dosis seminales utilizadas en este trabajo.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (proyectos IPT- 010000-2010-33 y AGL2011-30353-C02-01).

## 10. BIBLIOGRAFÍA.

AALBERS J.G., JOHNSON L.A., AALBERTS-SMIT E.A., RADEMAKER J.H.M., (1985). ATP content of fresh and frozen-thawed boar semen and its relationship to sperm concentration and fertility. En: Deep Freezing of Boar Semen. Johnson, L.A., Larsson, K., ed. Swedish Univ. Agric. Sci., Uppsala. pp. 259-264.

AGARWAL, A., ALLAMANENI, SSR. (2004): The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. *Minerva Ginecol*, 56(3): 235-45

AGARWAL, A., SALEH, R. A. Y BEDAIWY, M. A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility* 79, 829-43.

AITKEN, R. Y KRAUSZ, C. (2001). Oxidative stress, DNA damage and the y chromosome. *Reproduction* 122, 497-506.

AITKEN, R. J., BAKER, M. A. Y SAWYER, D. (2003). Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reproductive Biomedicine Online* 7, 65-70.

AITKEN, R. J., GORDON, E., HARKISS, D., TWIGG, J. P., MILNE, P., JENNINGS, Z. Y IRVINE, D. S. (1998). Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biology of Reproduction* 59, 1037-46.

AITKEN, R.J., WEST, K.M. (1990) Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *International Journal of Andrology*, 13:433-51.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. Y WALTER, P. (2007). *Molecular Biology of the Cell*: Garland Science.

AMANN RP, HAMMERSTEDT RH. (1993). In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl.*; 14: 397 -406

AMORIM, EAM; GRAHAM, JK; MEYERS, M; SPIZZIRI, B (2008) Delivering cholestanol or desmosterol to bull sperm membranes improves cryosurvival. CSIRO Publishing,

ANEL, E. (1999). Automatización en la contrastación espermática. En: II Congreso Ibérico de Reproducción Animal (Ponencias y Comunicaciones). P. García Herradón, L. A. Quintela Arias y J.J. Becerra González (Eds.), pp. 292-296. Ed. Herradón-QuintelaBecerra, Lugo

AOKI, V. W., LIU, L., JONES, K. P., HATASAKA, H. H., GIBSON, M., PETERSON, C. M. Y CARRELL, D. T. (2006). Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertility and Sterility* 86, 1408-15.

- ARAVINDAN GR, BJORDAHL J, JOST LK, EVENSON DP (1997). Susceptibility of human sperm to *in situ* DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp Cell Res.*; 236(1):231-237.
- BAARENDS, W. M., VAN DER LAAN, R. Y GROOTEGOED, J. A. (2000). Specific aspects of the ubiquitin system in spermatogenesis. *Journal of Endocrinological Investigation* 23, 597-604.
- BABA, T.; AZUMA, S.; KASHIWABARA, S.; TOYODA, Y. (1994) Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J. Biol. Chem.* 269:31845-31849
- BAK, A. L., ZEUTHEN, J. Y CRICK, F. H. (1977). Higher-order structure of human mitotic chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 1595-9.
- BALHORN, R. (1982). A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *The Journal of Cell Biology* 93, 298-305.
- BALHORN, R., CORZETT, M., MAZRIMAS, J. Y WATKINS, B. (1991). Identification of bull protamine disulfides. *Biochemistry* 30, 175-81.
- BALHORN, R., WESTON, S., THOMAS, C. Y WYROBEK, A. J. (1984). DNA packaging in mouse spermatids. Synthesis of protamine variants and four transition proteins. *Experimental Cell Research* 150, 298-308.
- BAR-SAGIE,D.; MAYEVSKY, A.; BARTOOV, B. (1981) A fluorometric-reflectometric technique for simultaneous measurement of pH and motility in ram semen. *Arch Androl.* 7(1):27-33
- BEDFORD, J.M. Y CALVIN, H. I. (1974). Changes in S-S cross linked structure of the sperm tail during epididymal maturation with comparative observations in submammalian species. *Journal of Experimental Zoology* 187, 181-204.
- BEDFORD, J. M. Y CALVIN, H. I. (1974). The occurrence and possible functional significance of -SS-crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *Journal of Experimental Zoology* 188, 137-55.
- BELLVE, A. R., ANDERSON, E. Y HANLEY BOWDOIN, L. (1975). Synthesis and amino acid composition of basic proteins in mammalian sperm nuclei. *Dev Biol* 47, 349-65.
- BENCHABIB, M., LORNAGE, J., MAZOYER, C., LEJEUNE, H., SALLE, B. Y FRANCOIS GUERIN, J. (2007). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive- technology outcome. *Fertility and Sterility* 87, 93-100.
- BENOFF S, HURLEY I, COOPER GW, MANDEL FS, HERSHLAG A, SCOLL GM, ROSENFELD L. (1993) Fertilization potential *in vitro* is correlated with head-specific

mannose-ligand receptor expression, acrosome status and membrane cholesterol content. *Hum Reprod* 8:2155-2166.

BIELSA, M.A., ANDOLZ, P., GRIS, J.M. (1994) Which semen parameters have a predictive value for pregnancy in infertile couples? *Hum. Reprod.*, 9, 1887-1890.

BILLIG, H., CHUN, S., EISENHAUER, K. Y HSUEH, A. (1996). Gonadal cell apoptosis: hormoneregulated cell demise. *Human Reproduction Update* 2, 103-17.

BOISSONNEAULT, G. (2002). Chromatin remodeling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair. *FEBS Letters* 514, 111-4.

BOIXO, J.C. (1994). Valoración laboratorial de la calidad seminal. Correlación con la fertilidad. 7<sup>a</sup> Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, Murcia, España, 61-69.

BOYERS SP, DAVIS RO, KATZ DF (1989). Automated semen analysis. *Curr Probl Obstet Gynecol Fertil.*; 12:167-200.

BOWMAN, C.M.; BERGER, E.M.; BUTLER, E.N.; TOTH, K.M.; REPINE, J.E (1985). HEPES may stimulate cultured endothelial cells to make growth-retarding oxygen metabolites. *In Vitro Cell Dev Biol*;21:140 -2

BRAUN, R. E. (2001). Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nature Genetics* 28, 10-2.

BREWER, L., CORZETT, M., LAU, E. Y. Y BALHORN, R. (2003). Dynamics of protamine 1 binding to single DNA molecules. *Journal of Biological Chemistry* 278, 42403-8.

BREWER, L. R., CORZETT, M. Y BALHORN, R. (1999). Protamine-induced condensation and decondensation of the same DNA molecule. *Science* 286, 120-3.

BRINKWORTH, M. H. (2000). Paternal transmission of genetic damage: findings in animals and humans. *International Journal of Andrology* 23, 123-35.

BUONGIORNO-NARDELLI, M., MICHELI, G., CARRI, M. T. Y MARILLEY, M. (1982). A relationship between replicon size and supercoiled loop domains in the eukaryotic genome. *Nature* 298, 100-2.

BUTLER, W.J. & ROBERTS, T.K. (1975) Effects of some phosphatidyl compounds on boar spermatozoa following cold shock of slow cooling./. *Reprod. Fert.* 43, 183-187.

CAIZA DE LA CUEVA FI, PUJOL MR, RIGAU T, BONET S, MIRÓ J, BRIZ M, RODRIGUEZ-GILL JE. (1997). Resistance to osmotic stress of horse spermatozoa: The role of ionic pumps and their relationship to cryopreservation success. *Theriogenology*, 48, 947-968

CALAMERA, JC, BRUGO OLMEDO S, QUIROS MC, Y NICHOLSON RF. (1991). Morfología espermática. Su relación con el ATP y la Acrosina espermáticos y con el

test de penetración en ovocitos de hamster. Revista iberoamericana de Fertilidad. v VII N 6, p 35.

CALVIN, H. I. (1976). Comparative analysis of the nuclear basic proteins in rat, human, guinea pig, mouse and rabbit spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta* 434, 377-89.

CARON, N., VEILLEUX, S. Y BOISSONNEAULT, G. (2001). Stimulation of DNA repair by the spermatid TP1 protein. *Molecular Reproduction and Development* 58, 437-43.

CARON, N., VEILLEUX, S., CHABOT, M. Y BOISSONNEAULT, G. (2001). *Andrology in the 21st Century*.Montreal: Medimond.

CEBRÍAN-PÉREZ, J.A., MUIÑO-BLANCO, T., PEREZ-PE, R., CASAO, A. (2010). Manejo del semen e Inseminación Artificial. In: *Manejo reproductivo en ganado ovino*, Abecia, J.A, Forcada, F, pp. 111.

CHANDLER, J.E., PAINTER, C.L., ADKISON, R.W., MEMON, M.A., HOYT, P.G. (1988) Semen quality characteristics of dairy goats. *J Dairy Sci*, 71(6):1638-46.

CHEMINEAU, P., COGNIE, Y., GUERIN, Y., ORGEUR, P., VALLET, J.C. (1991). Training manual on artificial insemination in sheep and goats. Food and agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 222.

CHEN, H. Y., SUN, J. M., ZHANG, Y., DAVIE, J. R. Y MEISTRICH, M. L. (1998). Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. *Journal of Biological Chemistry* 273, 13165-9.

CHEW, S. L., BAGINSKY, L. Y EPERON, I. C. (2000). An exonic splicing silencer in the testes-specific DNA ligase III beta exon. *Nucleic Acids Research* 28, 402-10.

CHOHAN, K. R., GRIFFIN, J. T., LAFROMBOISE, M., DE JONGE, C. J. Y CARRELL, D. T. (2006). Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of Andrology* 27, 53-9.

CHUY, S.; BELL, L.N. (2006) Buffer pH and pKa values as affected by added glycerol and sucrose. *Food Research International* 39 342–348

CIERESZKO, A., DABROWSKI, K., LIN, F., DOROSHOV, S.I., (1994). Identification of trypsin-like activity in sturgeon spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 268, 486– 491

COELINGH, J. P., MONFOORT, C. H., ROZIJN, T. H., LEUVEN, J. A., SCHIPHOF, R., STEYN-PARVE, E. P., BRAUNITZER, G., SCHRANK, B. Y RUHFUS, A. (1972). The complete amino acid sequence of the basic nuclear protein of bull spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta* 285, 1-14.

COELINGH, J. P., ROZIJN, T. H. Y MONFOORT, C. H. (1969). Isolation and partial characterization of a basic protein from bovine sperm heads. *Biochimica et Biophysica Acta* 188, 353-6.

COLAS, G.; TRYER, M.; GUERIN, Y.; AGUER, D. (1980). Fertilizing ability of ram sperm stored in a liquid state during 24 hours. Proceedings of the 9th International Congress on Animal Reproduction and A.I. Madrid, III;; p. 315.

COLENBRANDER, B., GADELLA, B. M., AND STOUT, T.A.E., (2003). The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reprod. Dom. Anim.* 38:305-311.

COLLINS, A.M., WILLIAMS, V., EVANS, J.D. (2004). Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 13, 141-146

COOK, P. R., BRAZELL, I. A. Y JOST, E. (1976). Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *Journal of Cell Science* 22, 303-24.

COOPER, T.G. (1986). The epididymis, sperm maturation and fertilisation. Springer Verlag, Heidelberg.

COOPER TG (1996). Epididymis and sperm function. *Andrologia.*;28(suppl1):57-59

CRABO, B.G.; ZIMMERMAN, K.J.; MOORE, R.; THORNBURGH, F.H. (1976) Movement of sodium and potassium into ejaculated boar spermatozoa suspended in seminal plasma and a biological salt solutions. *Bioch. Biophys. Acta.* 144:875-885

CROSS, N.L., P. MORALES, J.W. OVER, F.W. HANSON (1986). Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm, *Gamete Res.* 15: 213-226.

DADOUNE, J. P. (2003). Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microscopy Research and Technique* 61, 56-75.

DARZYNKIEWICZ, Z., TRAGANOS, F., SHARPLESS, T. Y MELAMED, M. R. (1975). Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry. *Experimental Cell Research* 90, 411-28.

DAVIS, R.O., ROTHMANN, S. AND OVERSTREET, J. (1992) Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicentre studies. *Fertil. Steril.*, 57,648-653.

DAVIS, R.O., SIEMERS, R.J., (1995). Derivation and reliability of kinematics measures of sperm motion. *Reprod. Fertil Dev.* 7, 857-869.

DEIBEL, F.C., SMITH, J.E. JR, CRABO, B.G., GRAHAM, E.F., (1976). Evaluation of six assays of sperm quality by means of their accuracy, precision and sensitivity in separating known induced levels of damage. In: Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insemin. Cracow. pp. 888-891

DE LUCIA, F., FARAOONE-MENNELLA, M. R., D'ERME, M., QUESADA, P., CAIAFA, P. Y FARINA, B. (1994). Histone-induced condensation of rat testis chromatin: testis-specific H1t versus somatic H1 variants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 198, 32-9.

- DEL VALLE I, MENDOZA N, CASAO A, CEBRIÁN-PÉREZ JA, PÉREZ R, MUIÑO-BLANCO T. (2010). Significance of non-conventional parameters in the evaluation of cooling-induced damage to ram spermatozoa diluted in three different media. *Reprod Domest Anim.* Dec;45:260-8.
- DEN DASS N (1992). Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim Reprod Sci.*;28:87–94.
- DIDION, B., C. GRAVES. (1986). In vivo capacitation and acrosome reaction of bovine sperm in estrous and diestrous cows. *J. Anim. Sci.* 62: 1029-1033.
- DIJKWEL, P. A., WENINK, P. W. Y PODDIGHE, J. (1986). Permanent attachment of replication origins to the nuclear matrix in BHK-cells. *Nucleic Acids Research* 14, 3241-9.
- DORADO, J. (2003). Respuesta a la congelación-descongelación del esperma de macho cabrío. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba, 165 pp.
- 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
- EGGERT-KRUSE, W., KOHLER, A., ROHR, G. AND RUNNEBAUM, B. (1993) The pH as an important determinant of sperm–mucus interaction. *Fertil. Steril.*, 59, 617–62
- EID L.N., LORTON S.P., PARRISH J.J. (2001). Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. *Biol Reprod.* 1994;51:1232–1237.
- ENCISO, M., MURIEL, L., FERNÁNDEZ, J. L., GOYANES, V., SEGRELLES, E., MARCOS, M., MONTEJO, J. M., ARDOY, M., PACHECO, A. Y GOSALVEZ, J. (2006). Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatindispersion test. *Journal of Andrology* 27, 106-11.
- ERENPREISS J, HLEVICKA S, RAUDA R. (2002). High impact of male infertility in barren couples in Latvia, 1998–2001. *Proc Latv Acad Sci. Ser B*; 56:48–51
- ERICSSON SA, GARNER DL, JOHNSON LA, REDELMAN D, AHMAD K. (1990b): Flow cytometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa processed using a new antibiotic combination. *Theniogenology* 33:121
- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. (1987) Salomon's artificial insemination of sheep and goats. Sydney: Butterworth Scientific; 194
- EVENSON, D. Y JOST, L. (1994). Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. *Methods in Cell Biology* 42, 159-76.
- EVENSON, D. P., DARZYNKIEWICZ, Z. Y MELAMED, M. R. (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210, 1131-3.

EVENSON, D.P., DARZYNKIEWICZ, Z., AND MELAMED, M.R (1982) Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J. Histochem. Cytochem.*, 30, 279–280.

EVENSON D, LARSON K, JOST L, VIRRO M, DEJONGE C, BRANNIAN J. (2002) Relationship between age of man, sperm DNA fragmentation and infertility. *April 2002, Seattle Washington. American Society of Andrology*

FAWCETT, D. W. Y PHILLIPS, D. M. (1969). The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoon. *Anatomical Record* 165, 153-64.

FELSENFELD, G. (1978). Chromatin. *Nature* 271, 115-22.

FERNÁNDEZ, J. Y GOSÁLVEZ, J. (2002). Application of FISH to detect DNA damage: DNA breakage detection-FISH(DBD-FISH). *Methods in Molecular Biology* 203, 203-216.

FERNÁNDEZ, J. L., VAZQUEZ-GUNDIN, F., DELGADO, A., GOYANES, V. J., RAMIRO-DIAZ, J., DE LA TORRE, J. Y GOSALVEZ, J. (2000). DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutation Research* 453, 77-82.

FERNÁNDEZ, J., MURIEL, L., RIVERO, M., GOYANES, V., VAZQUEZ, R., Y ÁLVAREZ, J. (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of Andrology* 24. 59-66

FERNÁNDEZ, J. L., MURIEL, L., GOYANES, V., SEGRELLES, E., GOSALVEZ, J., ENCISO, M., LAFROMBOISE, M. Y DE JONGE, C. (2005). Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and Sterility* 84, 833-42.

FEUGHELMAN, M., LANGRIDGE, R., SEEDS, W. E., STOKES, A. R., WILSON, H. R., HOOPER, C. W., WILKINS, M. H., BARCLAY, R. K. Y HAMILTON, L. D. (1955). Molecular structure of deoxyribose nucleic acid and nucleoprotein. *Nature* 175, 834-8.

FEY, E. G. Y PENMAN, S. (1988). Nuclear matrix proteins reflect cell type of origin in cultured human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 121-5.

FINCH, J. T. Y KLUG, A. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 1897-901.

FOLCH, J. (2000). Manejo del morueco. XXV Jornadas Científicas SEOC, Producción ovina y caprina, 61-64.

FRANCA, L.R., BECKER-SILVA, S.C. AND CHIARINI-GARCÍA, H. (1999). The length of the cycle of seminiferous epithelium in goats (*Capra hircus*). *Tissue and Cell*,31(3):274-280.

- FRASER, L.R. (1995) Ionic control of sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7:905-925
- FRASER L., GORSZCZARUK K., STRZEZEK J., (2001). Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reprod. Domest. Anim.* 36, 325-329.
- 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
- GADEA J, RUIZ S, COY P, POTO A, PEINADO B, ROMAR R, CAMPOS I, ZUBILLAGA O. (1998). Fecundación in vitro con semen congelado en la especie porcina. *Arch Zootec* 47: 299-304..
- GADEA, J. (2003) Semen extenders used in the artificial insemination of swine. A review. (Spanish Journal of Agricultural Research 1 (2):17-27 )
- GARNER, D.L., CHERYL, A.T., (1999). Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 53, 222-229.
- GARNER, D.L. AND L.A. JOHNSON. (1995). Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction*, 53: 276-284
- GARNER, D.L., L.A. JOHNSON, S. LAKE, N. CHANEY, D. STEPHENSON, D. PINKEL, AND B.L. GLEDHILL. (1983). Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing sperm of domestic animals by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 28:312-21.
- GATTI, J.; CHEVRIER, C.; PAQUINON, M.; DACHEUX, J., (1993): External ionic conditions, internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. *J Reprod Fertil* 98, 439-449.
- GAVRIELI, Y., SHERMAN, Y. Y BEN-SASSON, S.A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology* 119, 493-501.
- GERFEN R.W., WHITE B.R., COTTA M.A., WHEELER M.B., (1994). Comparison of the semen characteristics of Fengjing, Meishan and Yorkshire boars. *Theriogenology* 41, 461-469
- GETZENBERG, R. H., PIENTA, K. J. Y COFFEY, D. S. (1990). The tissue matrix: cell dynamics and hormone action. *Endocrine Reviews* 11, 399-417.
- GILMORE J.A., DU J., TAO J., PETER A.T., CRITSER J.K., (1996). Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *J. Reprod. Fertil.* 107, 87-95
- GIL-GUZMAN, E., OLLERO, M., LOPEZ, M. C., SHARMA, R. K., ALVAREZ, J. G., THOMAS, A. J., JR. Y AGARWAL, A. (2001). Differential production of reactive

oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. Human Reproduction 16, 1922-30.

GIWERCMAN A, RICHTHOFF J, HJØLLUND H, BONDE JP, JEPSON K, FROHM B, SPANO M (2003) Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. Fertil Steril 80:1404-1412

GLOVER, T.D., BARRAT, C.L.R., TYLER, J.P.P. AND HENNESSEY, J.F. (1990). Sperm production and its control, En: Human Male Fertility and Semen Analysis, Academic Press, London.

GORCZYCA, W., TRAGANOS, F., JESIONOWSKA, H. Y DARZYNKIEWICZ, Z. (1993a). Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. Experimental Cell Research 207, 202-5.

GORCZYCA, W., GONG, J. Y DARZYNKIEWICZ, Z. (1993b). Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. Cancer Research 53, 945-951.

GOSÁLVEZ, J.; VÁZQUEZ-HERNÁNDEZ, J.M. ; MAZARIEGOS, V.; GOSÁLBEZ, A. ; ARROYO, F. y LÓPEZ-FERNÁNDEZ (2006). Fragmentación del ADN espermático y pérdida de calidad seminal en el ganado ovino. C. SEOC. Zamora.

GOSÁLVEZ ; CABALLERO, LÓPEZ-FERNÁNDEZB, FERNÁNDEZ Y NÚÑEZ. (2008). Fragmentación del ADN espermático .Revisión.

GOVIN, J., CARON, C., LESTRAT, C., ROUSSEAU, S. Y KHOCHBIN, S. (2004). The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. European Journal of Biochemistry 271, 3459-69.

GRAHAM E.F., PACE M.M., (1967). Some biochemical changes in spermatozoa due to freezing. Cryobiology 4, 75-84

GRAHAM, E.F., SCHMEHL, M.K.H., NELSON, D.S. (1980). Problems with laboratory assays. 8th NAAB Tech. Conf. Reprod. & AI, Milwaukee, USA, 67-70.

GRAHAM, E.F., VAZQUEZ, I.A., SCHMEHL, M.K.L. AND EVENSEN, B.K. (1976). VII th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Kralow, July, 12-16 ILV:896

GRAHAM, J., KUNZE, E. AND HAMMERSTEDT, R. (1990) Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. Biol. Reprod., 43:55-64

GRAHAM JK (1996) Cryopreservation of stallion spermatozoa Reproductive Technology 12 131-14

HAFEZ, E.S.E. (1973) Gamete transport. In Human Reproduction, Conception and Contraception, Ch. 5, pp. 85-118. Eds E. S. E. Hafez & T. N. Evans. Harper & Row, New York

HAFEZ, E.S.E. (1985). Reproducción e inseminación artifical de animales. 7th ed. New York.

HAFEZ, E.S.E. (1987). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Interamerica- na-McGraw-Hill. México.

HAMMITT, D.G.; MARTIN, P.A. (1989) Correlations among assays of porcine semen quality following cryopreservation. *Theriogenology* 32:369-384.

HAMMITT, D.G.; MARTIN, P.A.; CALLANAN, T. (1989) Correlations between heterospermic fertility and assays of porcine seminal quality before and after cryopreservation. *Theriogenology* 32:385-399.

HAYASHI, N; KINEMUCHI, H; KAMIO, (1981). K. Effect of tris (hydroxymethyl) aminomethane on amine oxidase activity in dog brain, liver and serum and in human placenta. *Japan, J. Pharmacol*, 31Pags 737-746.

HIDALGO, M. (2003). Valoración de La calidad del esperma y su correlación con la fertilidad. I Jornadas de Reproducción Equina, Valencia, España.

HOFMANN R, LEHMER A, GURSTER E AND HARTURG R (1992) Adenosine triphosphate and adenosine diphosphate in human semen: correlation with sperm count and motility *Urology International* 48 391—39

HUANG, T. T., KOSOWER, N. S. Y YANAGIMACHI, R. (1984). Localization of thiol and disulfide groups in guinea pig spermatozoa during maturation and capacitation using bimane fluorescent labels. *Biology of Reproduction* 31, 797-809.

HUD, N. V., ALLEN, M. J., DOWNING, K. H., LEE, J. Y BALHORN, R. (1993). Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 193, 1347-54.

IYER SK, DARON HH, AULL JL. (1988) Purification and properties of alkaline phosphatase from boar seminal plasma. *J Reprod Fertil*;82:657–664

JAGOE, J.R., WASHBROOK, N.P., AND HUDSON, E.A. (1986). Morphometry of spermatozoa using semiautomatic image analysis. *J. Clin. Pathol*, 39: 1347-1352.

JASON, L. J., MOORE, S. C., LEWIS, J. D., LINDSEY, G. Y AUSIO, J. (2002). Histone ubiquitination: a tagging tail unfolds? *Bioessays* 24, 166-74.

JENUWEIN, T. Y ALLIS, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-80.

JEYENDRAN RS, VAN DER VEN HH, PEREZ-PELAEZ M, CRABO BG, ZANEVELD LJD. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*, 70:219-228

JEYENDRAN R.S., VAN DER VEN H.H., ROSECRNAS R., PÉREZ-PELAEZ M., AL-HASANI S., ZANEVELD L.J.D. (1989). Chemical constituents of human seminal plasma: Relationship to fertility. *Andrologia* 21, 423-428

JONES, R. (2004). Sperm survival versus degradation in the Mammalian epididymis: a hypothesis. *Biology of Reproduction* 71, 1405-11.

JONES AR y CONNOR DE (2004) Control of glycolysis in mature boar spermatozoa: effect of pH in vitro. *Reproduction, Fertility, and Development*

JONES, J.; BAVISTER, B., (2000). Acidification of intracellular pH in bovine spermatozoa suppresses motility and extends viable life. *J Androl* 21, 616–624.

JOHNSON DE, CONFINO E, JEYENDRAN RS. (1996). Glass wool column filtration versus mini-Percoll gradient for processing poor quality semen samples. *Fertil Steril* 66: 459-62

JI BT, SHU XO, LINET MS, ZHENG W, WACHOLDER S, GAO YT, YING DM AND LIN F (1997) Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers *Journal of the National Cancer Institute* 89 238-24

JUNEJA, R., GUPTA, I., WALI, A. (1990) Verapamil stimulates Ca<sup>2+</sup> Uptake and Ca<sup>2+</sup> ATPase in plasma membrane vesicles of guinea pig spermatozoa. *Contraception*, 41, 419–42

KAMP, G.; SCHMIDT, H.; STYPA, H.; FEIDEN, S.; MAHLING, C.; WEGENER, G. (2007) Regulatory properties of 6-phosphofructokinase and control of glycolysis in boar spermatozoa *Reproduction* 133 29-40

KAWASHIMA, S. Y ANDO, T. (1978). Deoxyribonucleoproteins of herring sperm nuclei. I. Chemical composition. *The Journal of Biochemistry* 83, 1117-23.

KEICHLINE, L. D. Y WASSARMAN, P. M. (1979). Structure of chromatin in sea urchin embryos, sperm, and adult somatic cells. *Biochemistry* 18, 214-9.

KERR, J., WYLLIE, A. Y CURRIE, A. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implication in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26, 239-57.

KESKINTEPE L Y BRACKETT BG. (1996). In vitro developmental competence of in vitro matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol Reprod* 55: 333-339.

KHADAKE, J. R. Y RAO, M. R. (1995). DNA- and chromatin-condensing properties of rat testes H1a and H1t compared to those of rat liver H1bdec; H1t is a poor condenser of chromatin. *Biochemistry* 34, 15792-801.

KHARCHENKO, E. P. Y NALIVAEVA, N. N. (1979). Analysis of structural characteristics of sperm chromatin in amphibians. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 15, 410-16.

## Bibliografía.

- KHORASANIZADEH, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* 116, 259-72.
- KIERSZENBAUM, A. L. (2001). Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. *Molecular Reproduction and Development* 58, 357-8.
- KISTLER, W. S., KEIM, P. S. Y HEINRIKSON, R. L. (1976). Partial structural analysis of the basic chromosomal protein of rat spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta* 427, 752-7.
- KODAMA, H., YAMAGUCHI, R., FUKUDA, J., KASAI, H. Y TANAKA, T. (1997). Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertility and Sterility* 68, 519-24.
- KRAUSE W., (1995). The significance of computer-assisted semen analysis (CASA) for diagnosis in andrology and fertility prognosis. *Int. J. Androlog.*, 18, 32-35
- KRUGER, T.F., ACOSTA, A.A., SIMMONS, K.F., SWANSON, R.J., MATTA, J.F., OEHNINGER, S.(1988). Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 49(1):112-7.
- KUSUNOKI, H.; KATO, S.; KANDA, S. (1988). Identification of acrosome reacted goat sperm by a trypan blue-giemsa method. *Jpn J Zootech Sci*, 59, 235-240
- KUSONOKI, H., M. SAKAUE, S. KATO, Y S. KANDA. (1989). Induction of the acrosome reactionin ejaculated goat spermatozoa by preincubation in chemically defined medium. *J. Exp. Zool.* 249:322-328
- LEE, H.T.; LIM, J.G.; CHUNG, B.H.; KIM, N.H.; CHUNG, K.S. (1996) Effects of extracellular potassium concentration on acrosome reaction, polyspermy and pronuclear formation during in vitro fertilization in the pig. 13 th Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I.. P8-14.
- LEPE-ZUNIGA, J.L.; ZIGLER ,J.S.; GERY, I. (1987). Toxicity of light-exposed Hepes media. *J. Immunol. Methods* 103 (1): 145
- LEVESQUE, D., VEILLEUX, S., CARON, N. Y BOISSONNEAULT, G. (1998). Architectural DNA-binding properties of the spermatidal transition proteins 1 and 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 252, 602-9.
- LEWIS, L. L. (1911). The vitality of reproductive cells. *Oklahoma Agr. Exp. St. r. Bul.* No. 96, pp. 3-9
- LEWIS, J. D., ABBOTT, D. W. Y AUSIO, J. (2003). A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochemistry and Cell Biology* 81, 131-40.
- LILLEY, D. M. Y PARDON, J. F. (1979). Structure and function of chromatin. *Annual Review of Genetics* 13, 197-233.

## Bibliografía.

- LIU, D.Y.; BAKER, H.W.G. (1988) Relationships between human sperm acrosin, acrosomes, morphology and fertilization in vitro. *Human Reprod.* 5:298-303.
- LOIR, M. Y LANNEAU, M. (1975). An electrophoretic analysis of the basic nuclear proteins of ram spermatids. *Experimental Cell Research* 92, 509-12.
- LOIR, M. Y LANNEAU, M. (1978). Transformation of ram spermatid chromatin. *Experimental Cell Research* 115, 231-43.
- LOPES, S., JURISICOVA, A., SUN, J. G. Y CASPER, R. F. (1998a). Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction* 13, 896-900.
- LOPES, S., SUN, J. G., JURISICOVA, A., MERIANO, J. Y CASPER, R. F. (1998b). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 69, 528-32.
- LOPEZ, A.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., (1999): Sperm viability in ram semen diluted and stored in three different extenders. *Acta Vet.Scand.* 40 1-9.
- LÓPEZ-SÁEZ, A.; ORTIZ, N.; GALLEGOS, L.; GARDE, J.J (2000). Liquid storage (5°C) of ram semen in different diluents. *Arch Androl*;44:155-64.
- MACKEY, Z. B., RAMOS, W., LEVIN, D. S., WALTER, C. A., MCCARREY, J. R. Y TOMKINSON, A. E. (1997). An alternative splicing event which occurs in mouse pachytene spermatocytes generates a form of DNA ligase III with distinct biochemical properties that may function in meiotic recombination. *Molecular and Cellular Biology* 17, 989-98.
- MAHADEVAN, M.M.; FLEETHAM, J.; CHURCH, R.B.; TAYLOR, P.J (1986). Growth of mouse embryos in bicarbonate media buffered by carbon dioxide, HEPES, or phosphate. *J In Vitro Fert Embryo Transf*;3:304-8
- MAIONE, B., PITTOGGI, C., ACHENE, L., LORENZINI, R. Y SPADAFORA, C. (1997). Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA and Cell Biology* 16, 1087-97.
- MALIK, H. S. Y HENIKOFF, S. (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nature Structural Biology* 10, 882-91.
- MANICARDI, G., BIANCHI, P., PANTANO, S., AZZONI, P., BIZZARO, D., BIANCHI, U. Y SAKKAS, D. (1995). Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biology of Reproduction* 52, 864-7.
- MANICARDI, G., TOMBACCO, A., BIZZARO, D., BIANCHI, P., BIANCHI, U. Y SAKKAS, D. (1998). DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison

of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assay. *The Histochemical Journal* 30, 33-9.

MANICARDI GC, BIANCHI PG, PANTANO S, AZZONI P, BIZZARO D, BIANCHI U, SAKKAS D. (1995). Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod.*; 52: 864 –867

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. (1981) Male reproductive function and semen. Ed: Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York

MARCON, L. Y BOISSONNEAULT, G. (2004). Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biology of Reproduction* 70, 910-8.

MARSDEN, M. P. Y LAEMMLI, U. K. (1979). Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell* 17, 849-58.

MARTÍ, J.I.; MARTÍ, E.; CEBRIÁN-PÉREZ, E.; MUIÑO-BLANCO, T. (2003). Survival rate and antioxidant enzyme activity of ram spermatozoa after dilution with different extenders or selection by a dextran swim-up procedure. *Theriogenology*;60:1025–37

MARTÍNEZ, E., RUIZ, S., ROCA, J., Y VÁZQUEZ, J.M. (1989). Fecundación “in vitro” en los animales de granja. Ed: Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Murcia, Murcia.

MARUSHIGE, Y. Y MARUSHIGE, K. (1978). Phosphorylation of sperm histone during spermiogenesis in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta* 518, 440-9.

MAXWELL, W. (1984). Current problems and future potential of artificial insemination programmes. *Reproduction in Sheep* (Lindsay, D. y Pearce, D.) Academy of Science and Australian Wool Corporation:, Camberra. Australia.

MAXWELL, W.M.C.; SALAMON, S. (1993). Liquid storage of ram semen-a review. *Reprod. Fertil. Dev.*;5:613–38

MAYER, J. F., JR., CHANG, T. S. Y ZIRKIN, B. R. (1981). Spermatogenesis in the mouse 2. Amino acid incorporation into basic nucleoproteins of mouse spermatids and spermatozoa. *Biology of Reproduction* 25, 1041-51.

MCGHEE, J. D. Y FELSENFELD, G. (1980). Nucleosome structure. *Annual Review of Biochemistry* 49, 1115-56.

MCPHERSON, S. Y LONGO, F. (1992). Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Molecular Reproduction and Development* 31, 268-79.

- MCPHERSON, S. Y LONGO, F. (1993a). Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. European Journal of Histochemistry 37, 109-28.
- MCPHERSON, S. M. Y LONGO, F. J. (1993b). Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. Developmental Biology 158, 122-30.
- MEISTRICH, M. L., MOHAPATRA, B., SHIRLEY, C. R. Y ZHAO, M. (2003). Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. Chromosoma 111, 483-8.
- MEISTRICH, M. L., TROSTLE-WEIGE, P. K., LIN, R., BHATNAGAR, Y. M. Y ALLIS, C. D. (1992). Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. Molecular Reproduction and Development 31, 170-81.
- MOLE J.R., FITZGERALD J.A. (1990). Comparison of ram sperm interaction with bovine cervical mucus. U.S. Department of Agriculture Agricultural Research Service U.S. Sheep Experiment Station Dubois
- MORTIMER ST (2000) CASA – Practical aspects. J. Androl., 21: 515–524.
- MORTIMER ST (2002) Practical Application of Computer-Aided Sperm Analysis (CASA). In: Proceedings of the 9 th International Symposium on Spermatology. Eds G van der Horst, D Franken, R Bornman, T de Jager and S Dyer. Monduzzi Editore S.p.A., Bologna, Italy, pp 233–238
- MORTIMER ST & MAXWELL WM (1999) Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. Reproduction, Fertility, and Development 11 25– 30.
- MEMON, M.A. Y OTT, R.S. (1981): Methods of semen preservation and artificial insemination in sheep and goats. World Review of Animal Production. 17: 19- 25
- MOLINIA F, EVANS G, QUINTANA P, MAXWELL W. (1994). Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluent on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. Anim Repro Sci 36: 113-122.
- MOORE, B.H.; MAYER,D.T.; MCKENZIE, F. (1940). Factors Influencing Motility and Metabolism in Ram Semen. Journal of animal science., (210-215).
- MORGIA. F., MONICA TORTI, MONICA MONTIGIANI, CLAUDIO PISCITELLI, ANNALISE GIALLONARDO, MAURO SCHIMBERNI, PIERLUIGI GIANNINI, MARCO SBRACIA (2006) *Fertility and Sterility* : Use of a medium buffered with N-hydroxyethylpiperazine-N-ethanesulfonate (HEPES) in intracytoplasmic sperm injection procedures is detrimental to the outcome of in vitro fertilization
- MOUSTAFA, M. H., SHARMA, R. K., THORNTON, J., MASCHA, E., ABDEL-HAFEZ, M. A., THOMAS, A. J., JR. Y AGARWAL, A. (2004). Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. Human Reproduction 19, 129-38.

NAGATA, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental Cell Research* 256, 12-8.

NELSON, W. G., PIENTA, K. J., BARRACK, E. R. Y COFFEY, D. S. (1986). The role of the nuclear matrix in the organization and function of DNA. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* 15, 457-75.

NEWTH M.S., LEVIS D.G., (1999). Change in pH boar semen extenders. 1999 Nebraska Swine Report. 3-6

OETTLÉ, E.E. (1986) Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology. *Vet. Med.* 81, 263-266

OLINS, A. L. Y OLINS, D. E. (1974). Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* 183, 330-2.

OLIVA, R. Y DIXON, G. H. (1991). Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Progress in Nucleic Acid Research & Molecular Biology* 40, 25-94.

OLERO, M., GIL-GUZMAN, E., LOPEZ, M. C., SHARMA, R. K., AGARWAL, A., LARSON, K., EVENSON, D., THOMAS, A. J., JR. Y ALVAREZ, J. G. (2001). Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Human Reproduction* 16, 1912-21.

OSTERMEIER, G.C., SARGEANT, G.A., YANDELL, B.S., EVENSON, D.P., PARRISH, J.J. (2001). Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *J Androl*, 22,:595-603

OSTLING, O. Y JOHANSON, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123, 291-8.

OVERSTREET, J.W., KATZ, D.F., HANSON, F.W. & FONSECA, J.R. (1979) A simple inexpensive method for objective assessment of human sperm movement characteristics. *Fert. Steril.* 31, 162-172

PACE, M.M., SULLIVAN, J.J. , ELLIOTT, F.I., GRAHAM, E.F.; COULTER, G.H. (1981) Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 0'5 ml. french straws. *J. Anim. Sci.* 53: 693-701

PAPOUTSOPPOULOU, S., NIKOLAKAKI, E., CHALEPAKIS, G., KRUFT, V., CHEVAILLIER, P. Y GIANNAKOROS, T. (1999). SR protein-specific kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamine 1. *Nucleic Acids Research* 27, 2972-80.

PARRISH, R.F.; POLAKOSKI, K.L. (1981) Stimulation of proteolytic activity of boar sperm acrosin by divalent metal ions. *J Reprod. Fertil.* 62:417-422.

PAULENZ, H.; SÖDERQUIST, L.; ADNØYC, T.; FOSSEN, O.V.; BERG, K.A. (2003). Efect of milk- and TRIS-based extenders on the fertility of sheep inseminated vaginally once or twice with liquid semen.

PEREZ-LLANO, B., ENCISO, M., GARCIA-CASADO, P., SALA, R. Y GOSALVEZ, J. (2006). Sperm DNA fragmentation in boars is delayed or abolished by using sperm extenders. *Theriogenology* 66, 2137-43.

PERREAULT S.D., AITKEN, R.J., BAKER HW. (2003)Integrating new test of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion. *Adv Exp Med Biol.*; 22(1): 174-9.

PERRIN, D.D.; DEMPSEY, B., (1974). Buffers for pH and Metal Ion Control. In: , Chapman and Hall, London and New York (1974).

POOLE, J.H. ( 1982) Musth and male-male competition in the African elephant. Ph.D. thesis, University of Cambridge.

PIENTA, K. J. Y COFFEY, D. S. (1984). A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome. *Journal of Cell Science*, Suplemento 1, 123-35.

PIVOT-PAJOT, C., CARON, C., GOVIN, J., VION, A., ROUSSEAU, S. Y KHOCHBIN, S. (2003). Acetylationdependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Molecular and Cellular Biology* 23, 5354-65.

POGANY, G. C., CORZETT, M., WESTON, S. Y BALHORN, R. (1981). DNA and protein content of mouse sperm. Implications regarding sperm chromatin structure. *Experimental Cell Research* 136, 127- 36.

PRIGENT, C. Y DIMITROV, S. (2003). Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *Journal of Cell Science* 116, 3677-85.

PUWARAVUTIPANICH, T. Y PANYIM, S. (1975). The nuclear basic proteins of human testes and ejaculated spermatozoa. *Experimental Cell Research* 90, 153-8.

RIGAU, T.; PIEDRAFITA, J.; REVERTER, J.; CANAL, M.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E., (1996). The rate of L-lactate production: a feasible parameter for the fresh diluted boar semen quality analysis. *Anim Reprod Sci* 43, 161-172

RISLEY, M. S., EINHEBER, S. Y BUMCROT, D. A. (1986). Changes in DNA topology during spermatogenesis. *Chromosoma* 94, 217-27.

ROCA J, MARTÍNEZ E, SÁNCHEZ-VALVERDE MA, VÁZQUEZ JM, RUIZ S. (1992). Seasonal variations of semen quality in male goats. Study of sperm abnormalities. *Theriogenology* 38:115-125.

RODMAN, T. C., LITWIN, S. D., ROMANI, M. Y VIDALI, G. (1979). Life history of mouse sperm protein. Intratesticular stages. *The Journal of Cell Biology* 80, 605-20.

RODRÍGUEZ, I., SANZ, J., ACOSTA, M. (1989). Ficha protocolo para evaluar la fertilidad del caballo. 4<sup>a</sup> Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, León, España.

ROLDAN ERS (1998) Role of phospholipases in sperm activation. *Frontiers in Bioscience* 3, D1109-1119.

RUBES, J., SELEVAN, S. G., EVENSON, D. P., ZUDOVA, D., VOZDOVA, M., ZUDOVA, Z., ROBBINS, W. A. Y PERREAU, S. D. (2005). Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Human Reproduction* 20, 2776-83.

RYBAR, R., FALDIKOVA, L., FALDYNA, M., MACHATKOVA, M. Y RUBES, J. (2004). Bull and boar sperm DNA integrity evaluated by sperm chromatin structure assay in the Czech Republic *Veterinarni Medicina* 49, 1-8.

SAACKE R.G., (1984). Semen quality: Importance of and influencing factors. 10th Tech. Conf. A.I. Reprod. Pp 30-3

SAACKE, R.G. & WHITE, J.M. (1972) Semen quality tests and their relationship to fertility. Proc. 4th Tech. Conf. Artif. Insem. and Reprod., Nati. (U.S.) Ass. Anim. Breeders, Chicago, pp. 22-2

SAACKE, R.G. & MARSHALL, CE. (1968) Observations on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 16, 511-514

SAACKE, R.G.; MARSHALL, C.E.; VINSON, W.E.; O'CONNOR, M.L.; CHANDLER, J.E.; MULLINS, K.J.; AMANN, R.P. (1980) Semen quality heterospermic insemination in cattle. Proc. 9th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 5:75-78.

SAKKAS, D., MANICARDI, G., BIANCHI, P. G., BIZZARO, D. Y BIANCHI, U. (1995). Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. *Biology of Reproduction* 52, 1149-55.

SAKKAS, D., MOFFATT, O., MANICARDI, G. C., MARIETHOZ, E., TAROZZI, N. Y BIZZARO, D. (2002). Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biology of Reproduction* 66, 1061-7.

SALEH, R. A. Y AGARWAL, A. (2002). Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology* 23, 737-52.

SALISBURY, G.W., N.L. VANDERMARK AND J.R. LODGE, (1978), *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*, 2nd ed. W.H. Freeman and Company, San Francisco, Cal., U.S.A., 651.

SALOMON, S. AND W.M.C. MAXWELL. (2000). Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 77-111.

- SAOWAROS, W. Y PANYIM, S. (1979). The formation of disulfide bonds in human protamines during sperm maturation. *Experientia* 35, 191-2.
- SAUTIÈRE, P., MARTINAGE, A., BÉLAICHE, D., ARKHIS, A. Y CHEVAILLIER, P. (1988). Comparison of the amino acid sequences of human protamines HP2 and HP3 and of intermediate basic nuclear proteins HPS1 and HPS2. Structural evidence that HPS1 and HPS2 are pro-protamines. *The Journal of Biological Chemistry* 263, 11059-11062.
- SEKONI, V.O., GUSTAFSSON, B.K., MATHER, E.C. (1987). Influence of wet fixation, staining techniques and storage time on bull sperm morphology. *Nord Vet-Med*, 33: 161-166.
- SERRES C, FENEUX D, JOUANNET P, DAVID G. (1984). Influence of the flagellar wave development and propagation on the human sperm movement in seminal plasma. *Gamete Res.*;9:183-195.
- SHALGI, R., SELIGMAN, J. Y KOSOWER, N. S. (1989). Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane. *Biology of Reproduction* 40, 1037-45.
- SILLS E.S., FRYMAN J., PERLOE M., MICHELS K., TUCKER M. (2004): Chromatin fluorescence characteristic and standard semen analysis parameters: correlations observed in andrology testing among 136 males referred for infertility evaluation. *Obstet. Gynaecol.*, 24, 74-7
- SIMS, R. J., NISHIOKA, K. Y REINBERG, D. (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends in Genetics* 19, 629-39.
- SINGER, SJ; NICHOLSON, GL (1972). «The fluid mosaic model of the structure of cell membranes *Science* 175 (23):720.
- SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE, R. R. Y SCHNEIDER, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184-91.
- SINHA HIKIM, A. P. Y SWERDLOFF, R. S. (1999). Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Reviews of Reproduction* 4, 38-47.
- SMITH, A. Y HAAF, T. (1998). DNA nicks and increased sensitivity of DNA to fluorescence *in situ* end labeling during functional spermiogenesis. *Biotechniques* 25, 496-502.
- SÖDERQUIST, L., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H., HAARD, M. AND LUNDEHEIM, N. (1997). Seasonal variation in sperm morphology in proven Swedish dairy AI bulls. *Reprod. Dom. Anim.*, 32: 263-265
- SÖDERQUIST, L.; LARSSON, K. (1985) Relationship between ATP content and post thaw motility in bull semen. *Acta vet. scand.* 26:308-312.

- SÖDERQUIST, L.; STALHAMMAR, E.M. (1991) Relation between ATP content and motility in bovine spermatozoa with reference to the effects of the bull and the A.I. centre. *Acta vet. scand.* 32:353-359.
- SÖDERQUIST, L.; JANSON, L.; LARSSON, K.; EINARSSON, S. (1991) Sperm morphology and fertility in A.I. *Bulls. J. Vet. Med.* 38:534-543
- SOTOLONGO, B., LINO, E. Y WARD, W. S. (2003). Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biology of Reproduction* 69, 2029-35.
- SOTOLONGO, B. Y WARD, W. S. (2000). DNA loop domain organization: the three-dimensional genomic code. *Journal of Cellular Biochemistry, Suplemento* 35, 23-6.
- SOTOLONGO, B., HUANG, T. T., ISENBERGER, E. Y WARD, W. S. (2005). An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *Journal of Andrology* 26, 272-80.
- SOTOLONGO, B., LINO, E. Y WARD, W. S. (2003). Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biology of Reproduction* 69, 2029-35.
- STALLCUP, O. T. & ROUSSEL, J. D. (1965) Development of the lactic dehydrogenase enzyme system in the testes and epididymis of young dairy bulls. *J. Dairy Sci.* 48, 1511
- STEGER, K., KRONISCH, T., GAVENIS, K., DRABENT, B., DOENECKE, D. Y BERGMANN, M. (1998). Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Molecular Human Reproduction* 4, 939-45.
- STRZEZEK J., SKAWETA R., (1984). Application of chosen biochemical indexes for biological quality of boar semen stored at 15-18 C. 10th Int. Congr. Anim. Reprod., Urbana, IL 2, 67-69.
- SUN JG, JURISICOVA A, CASPER RF (1997) Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 56:602-607
- SWARUP, D.; SEKHON, H. (1976) Correlation of vitamin A and zinc concentration of seminal plasma to fertility to bovine semen. *Nutr. Reprod. Int.* 13:37.
- TALBOT, P. AND CHACON, R.(1981). A triple staining technique for evaluating normal acrosom reactions of human sperm. *J.Exp. Zool.* 215 : 201 .
- TATENO, H., KIMURA, Y. Y YANAGIMACHI, R. (2000). Sonication per se is not as deleterious to sperm chromosomes as previously inferred. *Biology of Reproduction* 63, 341-6.
- THOMAS CA, GARNER DL, DEJARNETTE JM, MARSHALL CE. (1998). Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biology of Reproduction* 58(3): 786-793

TOBITA, T., SUZUKI, H., SOMA, K. Y NAKANO, M. (1983). Differential cleavages of disulfide crosslinks of protamines in boar sperm nuclei. *Biochimica et Biophysica Acta* 748, 461-4.

TOMLINSON, M., MOFFAT, O., MANICARDI, G., BIZZARO, D., AFNAN, M. Y SAKKAS, D. (2001). Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Human Reproduction* 16, 2160-2165.

TRAVIS AJ, MERDIUSHEV T, VARGAS LA. (2001) Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and guinea pig spermatozoa. *Dev Biol*; 240: 599 -610

UPADHAYAYA, M.; HIBBARD, B.M.; WALKER, S.M. (1986) Seminal acid phosphatase in relation to fertility. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 65:49-52

UPRETI, G.C.; OLIVER, J.E.; DUGANZICH, D.M.; MUNDAY, R; SMITH, J.F. (1994). Development of a chemically defined ram semen diluent (RSD-1).

UPRETI, G.C.; OLIVER, J.E.; DUGANZICH, D.M.; MUNDAY, R.; SMITH, J.F. (1995). Development of a chemically defined ram semen diluent (RSD-1). *Anim Reprod Sci*, 37, 143-57

UWLAND, J. (1984) Problems of ovine "in vitro" fertilization. In: Reproduction in sheep, Lindsay, DR and Pearce D.T. (Eds) Cambridge University Press. Cambridge. 310-312.

VARNER DD, WARD CR, STOREY BT, KENNEY RM. (1987). Induction and characterization of acrosome reaction of equine spermatozoa. *Am J Vet Res.* ;48(9):1383-1389

VAUGHN, J. P., DIJKWEL, P. A., MULLENDERS, L. H. Y HAMLIN, J. L. (1990). Replication forks are associated with the nuclear matrix. *Nucleic Acids Research* 18, 1965-9.

VÁZQUEZ JM, MARTÍNEZ E, ROCA J, COY P, RUIZ S. (1992). Use of triple stain technique for simultaneous assessment of vitality and acrosomal status in boar spermatozoa. *Theriogenology* 38:843-852.

VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.; MARTINEZ, P.; ROCA, J. (1997a) Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa and its relation to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology* 47:913-922.

VÁZQUEZ, J.M., MAZARIEGOS, V., SALVADOR, S., GARRIDO, C., DE LA FUENTE, L.F.(2010). El diluyente INRA96 en la inseminación artificial caprina. Ovigen. Centro de selección y mejora genética de ovino y caprino de Castilla y León. XXXV Congreso de la SEOC. Valladolid.

VERSTENGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, p. 149 – 179, 2002

VOGELSTEIN, B., PARDOLL, D. M. Y COFFEY, D. S. (1980). Supercoiled loops and eucaryotic DNA replicaton. *Cell* 22, 79-85.

VOSS, J.L., PICKET, B.W. AND SQUIRES, E.L. (1981). Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. *J. Am. Vet. Med. Assoc*, 178, 287-289.

WABERSKI D., WEITZE K.F., RATH D., SALLMANN H.P., (1989). Effect of bovine semen albumin and zwitterionic buffers on stored liquid boar semen. *Zuchthygiene* 24: 128-133

WABERSKI D., MEDING S., DIRKSEN G., (1994). Fertility of long-term stored boar semen: Influence of extenders (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36, 145-151.

WARD, W. S. (1993). Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biology of Reproduction* 48, 1193-201.

WARD, W. S. Y COFFEY, D. S. (1991). DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biology of Reproduction* 44, 569-74.

WARD, W. S., PARTIN, A. W. Y COFFEY, D. S. (1989). DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma* 98, 153-9.

WEBER RF, DOHLE GR, ROMIJN JC. (2005). Clinical laboratory evaluation of male subfertility. *Adv Clin Chem.*;40:317-364

WENG, S., TAYLOR, S., MORSHEDI, M., SCHUFFNER, A., DURAN, E., BEEBE, S. Y OEHNINGER, S. (2002). Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Molecular Human Reproduction* 8, 984-91.

WHITE IG. (1993)Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev.*;5:639–658

WOUTERS-TYROU, D., MARTINAGE, A., CHEVAILLIER, P. Y SAUTIERE, P. (1998). Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* 80, 117-28.

WU, X. Q. Y HECHT, N. B. (2000). Mouse testis brain ribonucleic acid-binding protein/translin colocalizes with microtubules and is immunoprecipitated with messenger ribonucleic acids encoding myelin basic protein, alpha calmodulin kinase II, and protamines 1 and 2. *Biology of Reproduction* 62, 720-5.

YANAGIDA, K., YANAGIMACHI, R., PERREAULT, S. D. Y KLEINFELD, R. G. (1991). Thermostability of sperm nuclei assessed by microinjection into hamster oocytes. *Biology of Reproduction* 44, 440- 7.

## Bibliografía.

- YANAGIMACHI, R. (1988). Mammalian fertilization. In: The physiology of reproduction. Ed. E Knobil and JD Neill. Raven Press, New York, (1988) 135-185.
- YÁNIZ, J.L.; SANTOLARIA, P.; MARCO-AGUADO, M.A.; LÓPEZ-GATIUS, F. (2008). Use of image analysis to assess the plasma membrane integrity of ram spermatozoa in different diluents.
- YANIZ JL, MATEOS JA, SANTOLARIA P (2011). Zwitterionic buffers preserve ram semen quality more efficiently than TRIS during storage at 15 degrees C. Small Ruminant Research;95: 54-60.
- YANIZ, J. L., M. J.A., AND P. SANTOLARIA. (2012). TRIS buffer improves fluorescence yield of ram spermatozoa when evaluating membrane integrity. Microscopy Research and Technique In press.
- YOSSEFI, S., OSCHRY, Y. Y LEWIN, L. M. (1994). Chromatin condensation in hamster sperm: a flow cytometric investigation. Molecular Reproduction and Development 37, 93-8.
- ZANEVELD, L.J.D. (1976) Sperm enzyme inhibitors as antifertility agents. En: Human semen and fertility regulation in men. Ed: Hafez, E.S.E.. C.V. Mosby Co, St Louis, 570-582
- ZHANG, Y., GRIFFIN, K., MONDAL, N. Y PARVIN, J. D. (2004). Phosphorylation of histone H2A inhibits transcription on chromatin templates. Journal of Biological Chemistry 279, 21866-72.
- ZIGLER, J.S.; LEPE-ZUNIGA, J.L.; VISTICA, B.; GERY, I. (1985). Analysis of the cytotoxic effects of light-exposed HEPES-containing culture medium. In Vitro Cell Dev Biol;21:282-7
- ZINI A, BIELECKI R, PHANG D, ZENZES MT (2001). Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril.*; 75: 674 –677.