



Universidad Zaragoza

PROYECTO- TRABAJO FIN DE CARRERA

**DESARROLLO DE UN MÉTODO DE REFERENCIA
BASADO EN EL MÉTODO ISAS Y ANÁLISIS DE
IMÁGENES PARA LA EVALUACIÓN
MORFOMÉTRICA DEL ACROSOMA DEL
ESPERMATOZOIDE EN LA ESPECIE OVINA.**

AUTOR: **VIRGINIA CASTILLO LALAGUNA**
ENSEÑANZA: **INGENIERÍA TÉCNICA AGRÍCOLA**
DIRECTOR/ES: **JÉSUS YÁNIZ PÉREZ DE ALBÉNIZ**
FECHA: **MAYO 2012**

ÍNDICE GENERAL	Página
1.-Resumen	1
2.-Abstract	2
3.-Introducción	3
4.-Objetivos	5
5.-Revisión Bibliográfica	6
5.1.- El espermatozoide	6
5.1.1.-Estructura de los espermatozoides	6
5.1.1.1.- Cabeza	7
5.1.1.2.-Acrosoma	8
5.1.1.3.-Núcleo	10
5.1.1.4.-Flagelo	12
5.1.1.5.-Anomalías	15
5.1.1.6.-Morfología normal	18
5.1.1.7.-Motilidad de los espermatozoides	19
5.1.1.8.-Metabolismo de los espermatozoides	20
5.2.-Producción y maduración espermática	21
5.2.1.-Espermtogénesis	21
5.2.2.-Maduración del espermatozoide en el epidídimo	23
5.2.3.-Capacitación espermática: reacción acrosómica	25
5.3.-Fisiología del espermatozoide	26
5.4.-Composición del semen	27
5.4.1.-El semen	27
5.4.2.-Plasma seminal.....	27
5.5.-Tecnología de la manipulación.....	28
5.5.1.-Obtención del semen.....	28
5.5.1.1.-Recogida de semen por vagina artificial	29
5.5.1.2.-Recogida de semen por estímulo eléctrico	31
5.5.2.-Factores que afectan a la supervivencia de los espermatozoides.....	31
5.5.3.-Dilución seminal	34
5.6.-Manejo y evaluación de la calidad seminal	35
5.6.1.-Análisis macroscópico	36
5.6.1.1.-Color y olor del semen	36
5.6.1.2.-Volumen y concentración	36
5.6.2.-Análisis microscópico	38
5.6.2.1.-Movilidad espermática	38
5.6.2.2.-Movilidad masal	39
5.6.2.3.-Movilidad individual	39
5.6.2.4.-Morfología espermática	41
5.6.2.5.-Alteraciones morfológicas	42
5.6.2.6.-Morfometría del espermatozoide	44
5.6.2.6.1.-Evaluación morfométrica del acrosoma.....	47
6.-Material y Métodos	50
6.1.-Reactivos	50
6.2.-Recogida, dilución y manipulación del semen	50
6.3.-Preparación de las muestras para la evaluación morfométrica	52
6.4.-CASMA	54
6.5.-Análisis estadístico	55
7.-Resultados	56
8.-Discusión	62
9.-Conclusiones	64
10.-Bibliografía	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

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).....	7
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 & Febiger, 1993) y micrografía electrónica de la región del acrosoma (Figura 2b: modificado de Fawcett, DW. Tratado de Histología. Interamericana McGraw-Hill, 1989)	10
Figura 3. Estructuras del cuello del espermatozoide de mamífero (modificado de McKinnon, AO y Voss, JL. Equine Reproduction. Malvern, PA: Lea & Febiger,1993)	13
Figura 4. Estructura del flagelo del espermatozoide de mamífero (modificado de McKinnon, AO y Voss, JL. Equine Reproduction. Malvern, PA: Lea & Febiger, 1993)	15
Figura 5. Espermatozoides normales y algunas formas anormales de espermatozoides	16
Figura 6: Reacción del acrosoma en el espermatozoide humano. I- Espermatozoide con el acrosoma intacto (no reaccionado). II- Reacción del segmento principal (SP) del acrosoma: fusión de la membrana acrosomal externa (MAE) y la membrana plasmática (MP) en el segmento principal del acrosoma. III- Reacción acrosómica en el segmento ecuatorial (SE). IV- Espermatozoide con reacción acrosómica del segmento principal y ecuatorial. La membrana acrosómica interna se continúa con la membrana plasmática del segmento postecuatorial. (Hafez, 1985)	26
Figura 7. Vagina artificial	30
Figura 8. Operario agachado y tubo recolector erecto	31
Figura 9. Espermatozoides normales y algunas formas anormales. A-Sin acrosoma (forma común). B- Sin apenas acrosoma. C- Con cabeza piriforme cabeza. D- Con cabeza piriforme moderada. E- Con cabeza piriforme leve. F-Con vacuolas. G-Defectos en la membrana. H- Sin flagelo. I- Reflejo distal. J-Parte media rota. K- Parte media severamente doblada. L- Gota proximal. M- Gota distal. N- Teratoride grave. O-Teratoideo moderado. P-Espermatozoide normal (Barth y col., 1989)	43
Figura 10. Parámetros morfométricos medidos en este estudio. Como parámetros primarios se considerarán: área, perímetro, longitud y anchura, como secundarios: elipticidad, rugosidad, elongación y regularidad	45 y 54
Figura 11. Estufa calefactora	51
Figura 12. Dosis de esperma ya diluido (4ml: 1ml semen - 3 ml diluyente)	51

Figura 13. Protocolo seguido para la preparación de las muestras	53
Figura 14. Sistema CASA para el análisis espermático compuesto por un microscopio óptico conectado a una platina atemperada, a una cámara de video y a un software de análisis de imágenes por ordenador	55
Figura 15. Espermatozoides analizados con el objetivo de 40 aumentos con filtro y lavados, teñidos y fijados con distintos tratamientos. a) tinción de SpermBlue b) tinción de Hemacolor c) lavado con agua destilada d) fijación con glutaraldehído 2% e) fijación con metanol 50%	57
Figuras 16. Espermatozoides analizados con el objetivo de 40 aumentos sin filtro y lavados, teñidos y fijados con distintos tratamientos. f) tinción de SpermBlue g) tinción de Hemacolor h) lavado con agua destilada i) fijación con Metanol 50% j) fijación con Glutaraldehído 2%	58
Figura 17. Resultados obtenidos para los parámetros primarios a) anchura, b) longitud, c) perímetro y d) área cabeza. Azul: con filtro; Rojo: sin filtro. Letras mayúsculas A- E: diferencias significativas entre métodos. Letras minúsculas a-b: diferencias significativas entre con o sin filtro	60
Figura 18. Resultados obtenidos para el acrosoma. e) porcentaje de acrosoma y f) área de acrosoma. Azul: con filtro; Rojo: sin filtro Letras mayúsculas A- E: diferencias significativas entre métodos. Letras minúsculas a-b: diferencias significativas entre con o sin filtro	61

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Escala del semen y determinación de la concentración según la apreciación visual ... 37

Tabla 2. Resultados morfométricos de distintos estudios (Gravance y col, 1998, Maroto-Morales y col, 2010, Soler y col, 2005, Buendia y col, 2002, Boersma y col, 2001, Gravance y col, 1999, Gravance y col, 2009, Gravance y col, 1996, Beletti y col, 2005, Gravance y col, 1997, Hidalgo y col, 2006, Marco-Jiménez y col, 2006, Gravance y col, 1995) 46

Tabla 3. Resultados morfométricos de la especie humana (L. Maree y col., 2010, G. van der Horst y col., 2009) 48

Tabla 4. Porcentaje de muerte del espermatozoide antes y después de la reacción acrosómica según el tamaño del acrosoma. Especie humana. (R. Menkveld y col., 2003) 48

Tabla 5. Resultados morfométricos de la especie canina (Núñez-Martínez y col., 2006) 49

Tabla 6. Proporción de espermatozoides correctamente analizados por cada método con y sin filtro y en total 59

AGRADECIMIENTOS

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).

A mi tutor de proyecto, Jesús Yaniz, por ayudarme a hacer este proyecto Fin de Carrera, sin su colaboración y su tiempo no lo hubiera podido terminar.

A la Escuela Politécnica Superior de Huesca por dejarme investigar en el laboratorio de Producción Animal y a todos los técnico de laboratorio por sus ayudas.

A mi hermana Aroa, por apoyarme en todo y estar siempre ahí.

A todos mis amigos, por estar ahí y apoyarme en todo también.

1. RESUMEN

El objetivo general del proyecto fue desarrollar un nuevo método asistido por ordenador para la evaluación morfométrica del acrosoma espermático en morueco. Los eyaculados se obtuvieron mediante vagina artificial de 10 machos adultos de la raza Rasa Aragonesa. Tras la recogida, se descartaron aquellas muestras con una movilidad menor del 70%. De cada muestra se tomaron cinco alícuotas para realizar los diferentes tratamientos: 1) lavado con agua destilada; 2) fijación y tinción con el kit de Hemacolor 3) fijación y tinción con el kit de Spermbblue; 4) fijación con 50% de metanol; y 5) fijación con 2% de glutaraldehído. Cada muestra se analizó por duplicado con el objetivo de 40 aumentos con y sin filtro de contraste de fases. Para cada variante se analizaron 200 espermatozoides. Para la evaluación de los parámetros morfométricos se utilizó el programa ISAS[®], que permite un análisis computerizado individual para cada espermatozoide. La utilización del filtro de contraste de fases, lejos de mejorar la calidad de las imágenes, provocó la aparición de artefactos, con la presencia de halos alrededor de los espermatozoides. Como consecuencia, la captura de las imágenes no fue tan precisa y el filtro modificó los parámetros morfométricos obtenidos, reduciendo las dimensiones de cabeza y acrosoma. Independientemente de la utilización del filtro, los grupos con peores resultados fueron los fijados con glutaraldehído y metanol, por debajo del 90% de espermatozoides correctamente analizados. En el grupo lavado con agua, la captura se situó en torno al 90%, mientras que la tinción de las muestras con Hemacolor o SpermBlue permitió mejorar la proporción de espermatozoides correctamente analizados. En las muestras fijadas con glutaraldehído o metanol se observó claramente la presencia de artefactos, que pudieron contribuir a una menor precisión en la captura. El tratamiento de las muestras tuvo un efecto significativo sobre todas las medidas morfométricas. Para la mayoría de los parámetros morfométricos primarios (área, perímetro, longitud y anchura de la cabeza) la relación entre tratamientos podría definirse de la siguiente manera: GLUT>HM>MET>SB>Lavado. Las únicas excepciones fueron la anchura de la cabeza (para la que el SB fue mayor que el MET) y la longitud, que fue similar entre el SB y el lavado. El tratamiento también tuvo un efecto claro sobre las dimensiones del acrosoma y la proporción de la cabeza ocupada por el mismo. Para el área del acrosoma la relación entre los distintos tratamientos fue muy parecida a la descrita para los parámetros primarios de la cabeza espermática, excepto que la relación entre el Hemacolor y el metanol se invirtió. Cuando estudiamos la proporción de la cabeza del espermatozoide cubierta por el acrosoma, la relación entre tratamientos fue la siguiente: SB>GLUT>MET>Lavado>HM. En conclusión, se ha desarrollado y estandarizado un nuevo método asistido por ordenador que permite por primera vez el estudio simultáneo de la cabeza y el acrosoma espermáticos en morueco.

2. ABSTRACT

The overall project objective was to develop a new method for computer-aided morphometric evaluation of sperm acrosome in ram. The ejaculates were obtained by artificial vagina from 10 male adult Rasa Aragonesa. After collection, samples were discarded those with a mobility less than 70%. From each sample aliquots were taken for five different treatments: 1) washing with distilled water, 2) fixation and staining kit Hemacolor 3) fixation and staining kit Spermbblue, 4) fixation with 50% methanol; and 5) fixed with 2% glutaraldehyde. Each sample was analyzed in duplicate with the aim of 40 times with and without phase contrast filter. For each variant was analyzed 200 sperm. For the evaluation of the parameters used morfométricos ISAS ® program, which allows a single computer analysis for each sperm. The use of phase contrast filter, instead of improving the image quality, caused the appearance of artifacts in the presence of halos around the sperm. As a result, the capture of images was not as precise and filter modified the morphometric parameters obtained by reducing the size of the head and acrosome. Regardless of the use of the filter, the groups worst results were fixed with glutaraldehyde and methanol below 90% spermatozoa correctly analyzed. In the washing with water, the catch was about 90%, while the staining of samples with or Spermbblue Hemacolor improved the proportion of correctly analyzed sperm. In the samples fixed with glutaraldehyde or methanol clearly showed the presence of artifacts, which could contribute to reduced accuracy in the capture. The treatment of the samples had a significant effect on all morphometric measurements. For most primary morphometric parameters (area, perimeter, length and width of the head) the relationship between treatments could be defined as follows: GLUT> HM> MET> SB> Washing. The only exceptions were the width of the head (for which the SB was larger than the TEM) and the length, which was similar between the SB and washing. Treatment also had a clear effect on the dimensions of the acrosome and proportion of the head occupied by it. For the area of the acrosome the relationship between the various treatments was very similar to that described for the primary parameters of the sperm head, except that the ratio between the Hemacolor and methanol was reversed. When we study the proportion of the sperm head covered by the acrosome, the relationship between treatments was as follows: SB> GLUT> MET> Laundry> HM. In conclusion, we have developed and standardized a new computer-assisted method for the first time allows the simultaneous study of the sperm head and acrosome in ram.

3. INTRODUCCIÓN

Las tecnologías reproductivas son herramientas fundamentales en la mejora de la eficiencia reproductiva de las ganaderías, ya que permiten mejorar su rentabilidad. La inseminación artificial (IA) es una de las principales tecnologías reproductivas utilizadas en las explotaciones ganaderas. En relación con la IA, el estudio de la calidad seminal, o espermiograma, se considera una herramienta fundamental para la selección de machos y eyaculados para la reproducción. En este proyecto desarrollaremos nuevos métodos para el estudio morfométrico del espermatozoide que pueden ayudar a mejorar la capacidad de predicción del espermiograma.

Tradicionalmente la valoración de la calidad del esperma incluye la evaluación de una serie de parámetros macro y microscópicos entre los que se incluyen el volumen eyaculado, la movilidad y morfología espermática. Sin embargo, el valor predictivo de estos parámetros clásicos sobre la fertilidad es más bien escaso, por lo que continuamente se están desarrollando nuevos métodos de análisis de la calidad espermática.

La morfología de los espermatozoides ha sido identificada como una característica que puede ser útil en la predicción de la capacidad fecundante. No obstante, la dificultad de conseguir una reproducibilidad satisfactoria tanto intra- como entre técnicos ha hecho difícil su estandarización. Las anomalías en la cabeza del espermatozoide se han asociado con la pérdida embrionaria temprana (DeJarnette y *col.*, 1992), disminución de la fertilidad y de la calidad del embrión, y menor capacidad para unirse al oocito (Kolt y Handel 1987). La relación entre el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y la fertilidad ha sido ampliamente descrito en caballos (Jasko y *col.* 1990), toros (Saake 1970), machos cabríos y moruecos (Chandler y *col.*, 1988) y ciervos (Malo y *col.*, 2005).

La mayoría de los estudios sobre morfometría espermática se han centrado en la cabeza del espermatozoide en conjunto. Solo unos pocos estudios han medido también otras partes del espermatozoide, como el acrosoma en hombre (Soler y *col.*, 2003; Falzone y *col.*, 2010) y perro (Nuñez y *col.*, 2005) y la pieza intermedia (Soler y *col.*, 2003). Estas medidas requieren una distinción clara de los límites y un buen contraste entre los de las diferentes partes del espermatozoide, que es difícil de alcanzar en algunas especies. En otras en cambio se han propuesto diversos métodos de tinción para el estudio de la morfología del acrosoma. Sin embargo, estudios previos en nuestro laboratorio indican que estos colorantes no proporcionan un contraste de grises adecuado para el estudio de la morfometría del acrosoma con los sistemas CASMA en estas especies.

En este estudio nos centramos en el análisis de la cabeza espermática y del acrosoma, que es un pequeño compartimento situado en el extremo apical de la cabeza del espermatozoide que contiene enzimas hidrolíticas y desempeña una función muy importante en el momento de la fecundación ya que gracias a la reacción acrosómica el espermatozoide puede penetrar en el oocito. El acrosoma es esencial para la función

espermática. Para completar el proceso natural de la fecundación, los espermatozoides deben tener movilidad, capacitarse y desarrollar la reacción acrosómica para atravesar la zona pelúcida.

El estudio de la morfometría del acrosoma puede tener una relevancia funcional. (Liu y Baker y *col.*, 1988) y (Menkveld y *col.*, 1996) demostraron que la morfología normal del acrosoma se correlaciona significativamente con la unión del espermatozoide a la zona pelúcida, mientras que (Franken y *col.*, 1997) demostraron que existe una fuerte relación entre la morfología espermática normal y la capacidad de inducir la reacción acrosómica. En la especie humana se ha demostrado que existe una relación entre el tamaño del acrosoma y la funcionalidad, observando que los espermatozoides con acrosomas pequeños tenían más probabilidad de morir y de perder el acrosoma de manera no fisiológica (Menkveld y *col.*, 2003). También en nuestra especie, el porcentaje de espermatozoides con tamaños del acrosoma normal (40–70% del área total de la cabeza), se ha correlacionado con la probabilidad de fecundación (El-Ghobashy y West, 2003). Para una buena fertilidad los tamaños de la cabeza y del acrosoma deben ser normales, lo que se define como célula o espermatozoide morfológicamente “normal”.

El objetivo general de este trabajo fin de carrera fue desarrollar un nuevo método de contraste óptico que permitiese por primera vez la evaluación morfométrica del acrosoma y la cabeza espermáticos en la especie ovina. Para ello se han capturado 20.000 fotos a la cabeza de los espermatozoides de 10 machos diferentes y con distintos tratamientos, de las cuales, 17.845 han sido bien analizadas. Las fotos se capturaron y analizaron utilizando el modulo de morfometría espermática del programa Integrated Semen Analysis System (ISAS[®]).

4. OBJETIVOS

El objetivo general del proyecto fue desarrollar un nuevo método asistido por ordenador para la evaluación morfométrica del acrosoma espermático en morueco. Este objetivo general se ha concretado en los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1: Estudiar la utilidad de diversos protocolos de preparación de las muestras para realizar el estudio morfométrico del acrosoma espermático en morueco utilizando un sistema ASMA.

Objetivo 2: Estudiar el efecto de diferentes factores (secado, fijación, tinción, óptica empleada) sobre los distintos parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide de morueco (% acrosoma, área cabeza, área acrosoma, perímetro, longitud y anchura).

5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Para poder comprender mejor los procedimientos llevados a cabo y los resultados obtenidos en este trabajo Fin de Carrera, se explican los principios morfológicos y fisiológicos en los que se ha basado.

5.1. El espermatozoide

Los espermatozoides son los gametos masculinos que se producen en los túbulos seminíferos de los testículos. 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 cigoto diploide, pero además, durante la meiosis se produce el proceso de entrecruzamiento cromosómico y en consecuencia el intercambio genético, lo que supone un incremento en la diversidad genética.

5.1.1. *Estructura de los espermatozoides*

Cada célula espermática está formada por dos partes principales: cabeza y cola. La cabeza es plana y ovoide y ocupada, en casi su totalidad, por el núcleo. Este está formado por los cromosomas, responsables de portar la información genética paterna. La parte anterior de la cabeza está envuelta por una caperuza especial, llamada acrosoma, portadora de las enzimas necesarias para el proceso de fertilización.

La cola, semejante a un flagelo, es el órgano locomotor de los espermatozoides. El movimiento de la cola es el responsable de la propulsión de los espermatozoides en los líquidos. La cola está conectada a la cabeza mediante un corto cuello, conocido como la región de implantación. En épocas calurosas, o situaciones francamente estresantes, el cuello puede lesionarse con lo que se separa la cabeza de la cola.

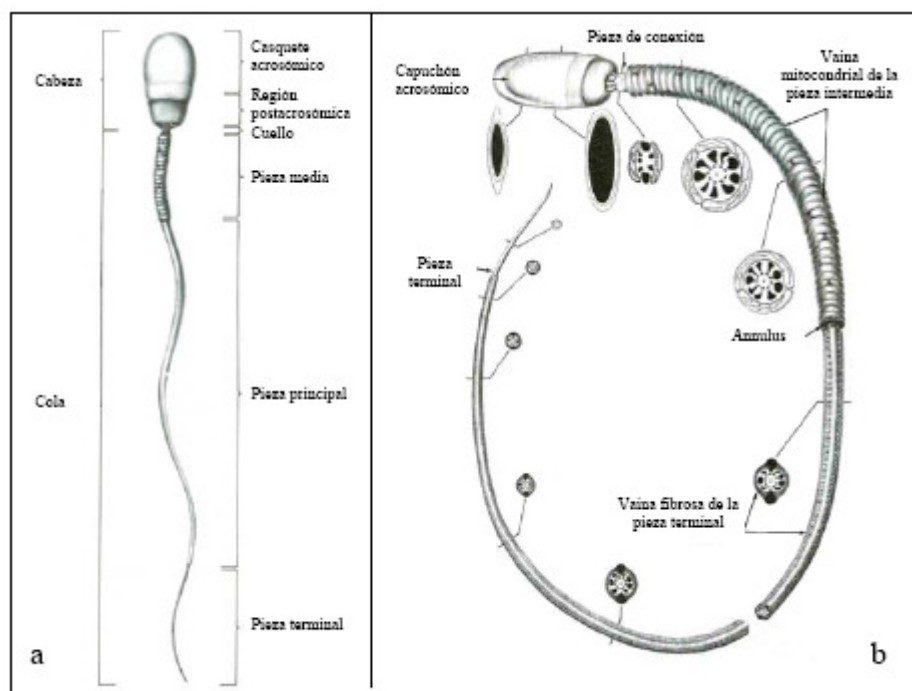


Figura 1. Esquema de las regiones (a) y ultraestructura (b) del espermatozoide de mamífero (Modificado de Fawcett, DW. Tratado de Histología. Interamericana McGraw-Hill, 1989)

5.1.1.1. Cabeza

La cabeza de los espermatozoides de los mamíferos presenta variaciones importantes en su forma entre las diferentes especies. Así, es ovoide y plana en el morueco al igual que en el macho cabrío, toro o verraco; falciforme en ratón, rata y hámster; y algo aplastada y elipsoide en el hombre. El tamaño de la cabeza también difiere de forma considerable entre las diferentes especies (Cummins y Woodall, 1985). Por ejemplo, con el empleo del sistema computerizado Sperm Class Analyzer® y la técnica de la Hematoxilina de Harris, el espermatozoide del caballo midió 5.66 μm de longitud por 2.85 μm de ancho (Hidalgo y *col.*, 2003a) y el de morueco 8.06 μm x 3.66 μm (Hidalgo y *col.*, 2002). En el caso del hombre, la Organización Mundial de la Salud establece las dimensiones de los espermatozoides morfológicamente normales en 5-6 μm de longitud y 2,5-3,5 μm de ancho (WHO, 1999).

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 misma adaptado estrechamente al contorno de la parte anterior aguda del núcleo del espermatozoide (Figura 2). Su tamaño difiere considerablemente entre los mamíferos, variando notablemente su

prolongación sobre el borde anterior del núcleo, donde adopta formas que son características de cada especie.

5.1.1.2. Acrosoma

En el acrosoma se pueden diferenciar tres regiones: la porción más proximal que queda por encima del núcleo se denomina segmento apical; la porción principal, que continúa distalmente, se llama segmento principal; y la región caudal, en la que se produce un abrupto estrechamiento con una ligera condensación de su contenido, recibe el nombre de segmento ecuatorial. El acrosoma se compone de una membrana externa, que limita con la cara interna de la membrana plasmática, y una membrana interna próxima a la cara externa de la membrana nuclear. Entre ambas se forma un saco que contiene diversas enzimas hidrolíticas incluyendo, entre otras, proacrosina, hialuronidasas, esterases e hidrolasas. El contenido acrosomal se libera al exterior en un proceso denominado reacción acrosómica necesario para la fecundación del oocito.

La capacitación espermática (reacción acrosómica) es un fenómeno fisiológico importante e imprescindible para la fertilización 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 la reacción acrosómica 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, varios autores han obtenido 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 extensiones teñidas bajo iluminación en campo claro (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 con 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 citometría de flujo y fluorocromos específicos como son diacetato de carboxifluorosceína, yoduro de propidio (PI), pisum sativum agglutinin lectin (PSA), Hoechst 33258, SYBR-14 y RCA entre otros, son lectinas tóxicas que permiten evaluar de forma precisa las alteraciones acrosómicas del espermatozoide, gracias a la coloración de un color u otro de la membrana externa acrosómica dependiendo de si esta dañada (permeable) o no (impermeable) (Ericsson y *col.*, 1990).

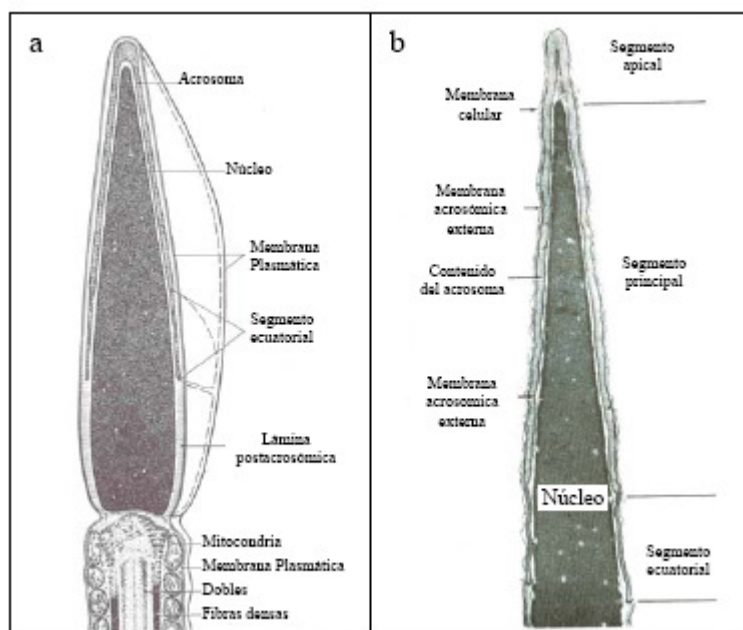


Figura 2. Esquema de la ultraestructura de la cabeza de un espermatozoide de mamífero (Figura 2a: modificado de McKinnon, AO y Voss, JL. Equine Reproduction. Malvern, PA: Lea & Febiger, 1993) y micrografía electrónica de la región del acrosoma (Figura 2b: modificado de Fawcett, DW. Tratado de Histología.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

5.1.1.3. Núcleo

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.

Durante la espermiogénesis, se produce una condensación progresiva de la cromatina que está asociada a modificaciones químicas en el ADN y proteínas nucleares, con una sustitución de las histonas por protaminas, proteínas pequeñas ricas en cisteína. Durante el tránsito epididimario se estabiliza este mecanismo de condensación con el incremento de puentes disulfuro a partir de los grupos tiol de los residuos de cisteína. La condensación de la cromatina disminuye el volumen del núcleo facilitando así la movilidad del espermatozoide y es fundamental para proteger el material genético del gameto masculino durante su exposición a ambientes agresivos como pueda ser la elevada acidez del tracto reproductor femenino.

Cuando se ha producido la penetración del ovocito, el espermatozoide debe descondensar su cromatina para formar el pronúcleo masculino, reduciendo, como requisito, las uniones disulfuro del núcleo espermático.

La capacidad fecundante del espermatozoide dependerá, entre otros factores, de la adecuada sucesión de estos tres eventos: condensación de la cromatina durante la espermatogénesis, estabilización durante la maduración espermática y descondensación dentro del ovocito para su fecundación. Cualquier daño del núcleo, dada su inercia metabólica sería imposible de reparar, lo que llevaría a una caída de la fertilidad (Sakkas *y col.*, 1995).

Royere *y col.* (1988), sugirieron que los procesos de congelación-descongelación del espermatozoide podrían provocar una alteración en la cromatina espermática, que se vería sometida a un estado de “sobrecondensación”, lo cual podría retrasar la descondensación del gameto masculino durante la fertilización y explicar así algunos casos de mortalidad embrionaria temprana cuando se emplea espermatozoide congelado-descongelado. (Pasteur *y col.*, 1991), en estudios realizados antes y después de la fertilización, demostraron la importancia de la condensación y descondensación de la cromatina, de manera que la estabilidad de esta puede revelar la fertilidad del macho en base a la correlación existente entre la alteración en la condensación de la cromatina y el grado de fertilidad. De acuerdo con esto, estos autores sugirieron que el espermatozoide congelado-descongelado y supuestamente “desestabilizado” puede dificultar la transcripción del genoma y ocasionar la muerte prematura del cigoto, lo que podría explicar las bajas tasas de concepción obtenidas en la espermatización manual con dosis de espermatozoide congelado frente a eyaculados diluyoservados en “fresco”; o a las obtenidas en la fecundación “in vitro” con espermatozoides crioconservados.

Gravance *y col.* (1998), observaron un efecto de la congelación-descongelación sobre las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides de morueco, y plantearon la posibilidad de que las diferencias morfométricas observadas pudieran estar relacionadas con una sobrecondensación de la cromatina espermática, sugiriendo, de ser así, la posibilidad de emplear el análisis morfométrico para la detección de anomalías nucleares ocasionadas por dichos procesos.

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. Aunque se desconoce su composición química y funcionalidad, se piensa que es una estructura importante ya que, justamente es la que se fusiona primero con la membrana del oocito en el momento de la fecundación (Fawcett, 1989). En el borde caudal de la lámina postacrosómica, la membrana plasmática está firmemente unida a la envoltura nuclear a lo largo de una línea llamada anillo posterior que rodea caudalmente la cabeza del espermatozoide. La envoltura nuclear carece de poros, a

excepción de un pliegue que se extiende en la zona posterior del núcleo, próximo al anillo posterior, donde estos son abundantes. Se interpreta este receso como una porción sobrante de la envoltura nuclear que resulta de la disminución del volumen del núcleo durante la condensación de la cromatina en la espermiogénesis. La envoltura nuclear que se extiende por detrás del núcleo de nuevo esta desprovista de poros y con sus membranas estrechamente aplicadas una a otra. En esta zona, reviste la fosa de implantación, lugar donde el flagelo se une a la cabeza.

5.1.1.4. Flagelo

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

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 estriadas 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.

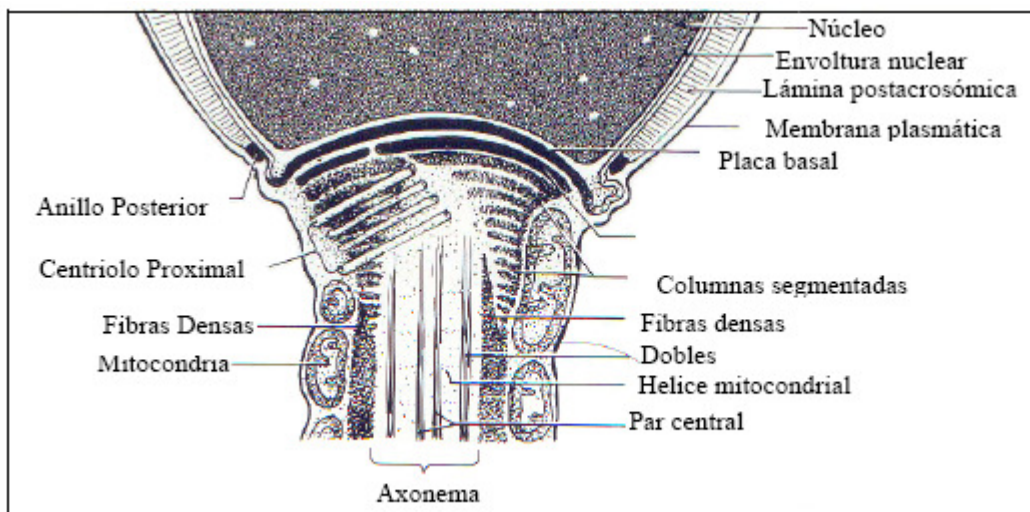


Figura 3. Estructuras del cuello del espermatozoide de mamífero (modificado de McKinnon, AO y Voss, JL. Equine Reproduction. Malvern, PA: Lea & Febiger, 1993)

En la pieza intermedia (Figura 4), continuación del cuello, se dispone como eje del flagelo el axonema, formado por dos microtúbulos centrales rodeados de 9 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, debido a su composición de proteínas ricas en cisteína, que presentan grupos sulfhidrilo (-SH) lo que da lugar a la formación de puentes disulfuro (-S-S-) durante la maduración espermática y que podrían conferir propiedades elásticas y facilitar así la propagación del movimiento ondulatorio a través del flagelo (Soler y col., 1994).

La pieza intermedia se caracteriza por presentar bajo la membrana plasmática, una vaina de mitocondrias orientadas circularmente y dispuestas helicoidalmente. Esta organización estructural es común en todos los espermatozoides de mamíferos, sin embargo el número de giros que presenta la espiral varía, según las especies, desde unas quince vueltas en los primates hasta unas trescientas en algunos roedores. 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 se 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. Esta vaina presenta dos engrosamientos longitudinales prominentes o columnas que discurren a lo largo de lo que se piensa que es la superficie dorsal y ventral de la pieza principal. Las fibras densas 3 y 8 que rodean al axonema terminan a continuación del anillo de la pieza intermedia, de manera que este queda rodeado por 7 fibras, y los dos huecos dejados por estas son ocupados por las columnas de la vaina. Las columnas longitudinales están conectadas a cada lado por unas estructuras circunferenciales denominadas costillas de la vaina fibrosa. El plano que pasa por ambas columnas longitudinales coincide con el que pasa por el centro de los dos microtúbulos centrales, quedando dividido asimétricamente el flagelo en dos compartimentos, uno que tiene cuatro fibras densas y otro con tres. Esta 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. Externamente a la cabeza y flagelo se dispone la membrana plasmática (Figuras 2 a 4 y 6), que responde al modelo de mosaico fluido (Singer y Nicholson, 1972), compuesta por proteínas integradas en una bicapa de fosfolípidos. En su composición química, además presenta moléculas de colesterol, que juegan un papel determinante como sustancias moduladoras de la fluidez de membrana. Los ácidos grasos y los glicolípidos son poco abundantes. En las membranas espermáticas de mamíferos, la cantidad de proteínas es casi la misma que la de lípidos totales. Una característica única de la membrana plasmática espermática del espermatozoide es la presencia de dominios, regiones perfectamente definidas en las que varía su composición y función. En los mamíferos los principales dominios se encuentran en la cabeza, en la región acrosomal y en la región postacrosomal (parte posterior de la cabeza y pieza conectiva). La región acrosomal (parte anterior de la cabeza), a su vez se subdivide en tres dominios para los segmentos apical, principal y ecuatorial. Los segmentos apical y principal juntos suelen referirse como “capuchón acrosomal”.

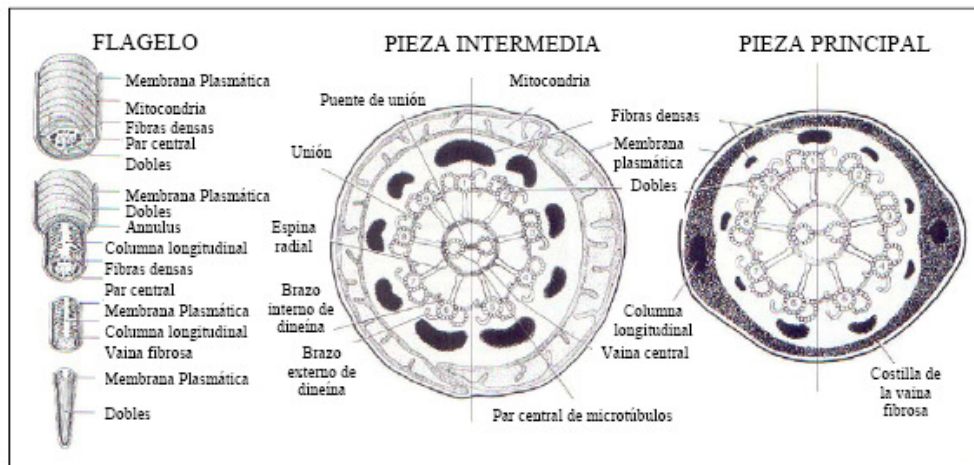


Figura 4. Estructura del flagelo del espermatozoide de mamífero (modificado de McKinnon, AO y Voss, JL. Equine Reproduction. Malvern, PA: Lea & Febiger, 1993).

5.1.1.5. Anomalías

Se han descrito por diversos investigadores una amplia variedad de anomalías morfológicas del espermatozoide. En general, cualquier desviación morfológica de la estructura normal del espermatozoide se ha considerado como anormal o anomalía espermática. Dichas aberraciones se llevaron por Williams y Savage (1925, 1927) y por Lagerlöf (1934) como una ayuda valiosa para confirmar el potencial de fertilidad de los moruecos.

El interés hacia ellas se extendió pronto a las investigaciones con otras especies, en verracos, toros, caballos sementales y hombres.

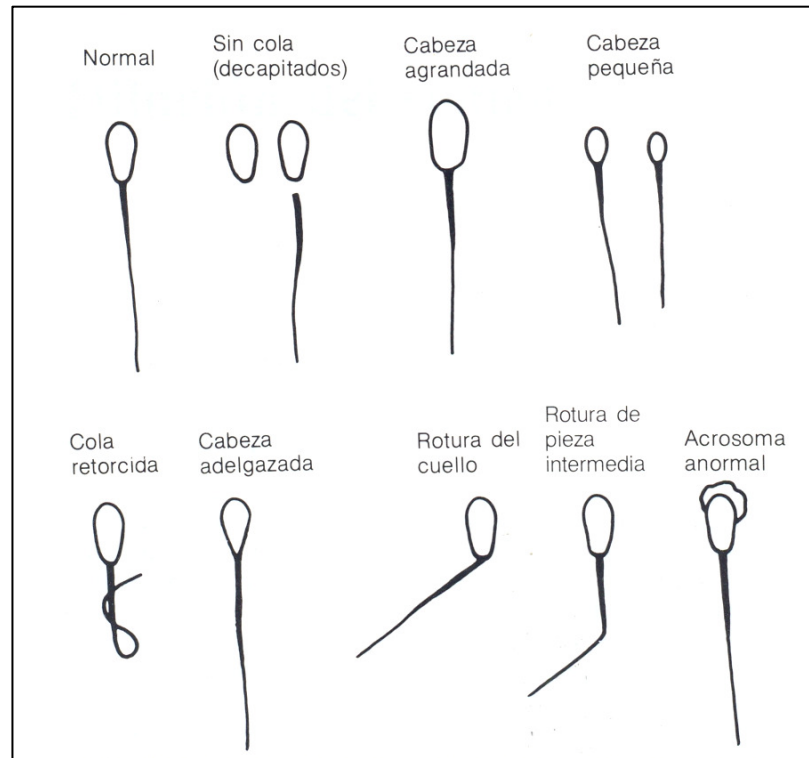


Figura 5. Espermatozoides normales y algunas formas anormales de espermatozoides.

No hay una evidencia experimental clara de relación entre los caracteres morfológicos específicos y la fertilidad. Se debe probablemente, de manera parcial, al grado en que se presentan las células anormales junto con células espermáticas morfológicamente normales y móviles en cantidades adecuadas para una fertilidad “normal”. Sin embargo, se ha asociado una frecuencia elevada de espermatozoides anormales con una fertilidad reducida. Los exámenes morfológicos periódicos del espermatozoide de moruecos aislados son útiles para apreciar las desviaciones de la normalidad que pueden producirse por muy diversas razones.

Se ha señalado que la frecuencia de espermatozoides anormales aumenta con las temperaturas extremas tales como la exposición experimental al calor, el aislamiento experimental del escroto y las estaciones calurosas o por la aplicación experimental de frío directamente a los testículos, congelación del escroto y la exposición a los efectos combinados del frío y del viento. Algunas enfermedades, que incluyen la infección de los órganos reproductores, la hipoplasia testicular congénita, la degeneración testicular adquirida y la disfunción del epidídimo, se hallan también relacionadas con una alta frecuencia de células anormales.

Se han observado pequeños incrementos en la frecuencia de células espermáticas anormales a medida que los moruecos envejecen. Mediante congelación, se han inducido en los espermatozoides del morueco y de otras especies defectos ultraestructurales y en la cápsula acrosómica.

Una serie de investigadores, entre los que se hallan Williams y Savage (1925), Lagerlöf (1934), Blom (1950) y Mercier y Salisbury (1947), señalaron la importancia de las anomalías primarias de las células espermáticas que parecen consecuencia de una alteración de la espermatogénesis. Las formas de células espermáticas alteradas, que se originan probablemente después de que los espermatozoides abandonen los testículos, se han clasificado como anomalías secundarias. Más recientemente, Blom (1972) ha sugerido una nueva clasificación en defectos mayores y menores de los espermatozoides:

Principales defectos de los espermatozoides

Subdesarrollados
Formas dobles
Defecto espermatozoides nudosos
Defecto espermatozoides decapitados (Guernsey)
Defecto diadema (“formación bolsa”)
Cabeza piriforme
Estrechamiento en base
Contorno anormal
Cabezas anormales pequeñas
Cabezas anormales libres
Defecto de sacacorchos
Otros defectos pieza intermedia
Gotitas proximales
Defecto de pseudos gotita
Colas fuertemente dobladas o arrolladas.

Defectos secundarios de los espermatozoides

Cabezas estrechas
Cabezas pequeñas, normales
Cabezas gigantes y cortas y anchas
Cabezas libres (normales)
Caperuza acrosómicas desprendidas (tinta china)
Implantación abaxial
Gotitas distales
Cola sencillamente doblada o arrollada
Cola arrollada terminalmente
Otros. Formaciones en medusa; células espermiogénicas, gigantes, prepuciales, leucocitos, eritrocitos.

Los defectos mayores se ha demostrado están relacionados con alteraciones de la fertilidad o con un estado anormal del testículo-epidídimo. Ambas se combinan con una alteración total. Los defectos menores parecen ser menos importantes y no suelen coincidir. Serían interesantes únicamente cuando un defecto menor sobrepasa el 10 o el 15%.

Desgraciadamente, no es siempre fácil distinguir entre las células espermáticas anormales formadas durante la espermatogénesis y las causadas por técnicas inadecuadas de manipulación del semen. Se precisa para tal diferenciación experiencia en la manipulación del semen, en las técnicas de tinción y en el examen del esperma.

5.1.1.6. Morfología normal de la célula espermática y subfertilidad

Los moruecos pueden en ocasiones ser subfértiles y sin embargo tener espermatozoides de morfología normal. También pueden reducir la fertilidad del macho algunos otros defectos de los espermatozoides, tales como la aneuploidía, el contenido anormal de genes o alteraciones estructurales.

En estudios citogénéticos de moruecos con espermatozoides morfológicamente normales, se han señalado la traslocación cromosómica o la inversión como causas de la disminución de la fertilidad.

Henricson y Backström (1964) observaron la duración de la metafase y de la anafase de la primera y segunda divisiones meióticas durante la espermatogénesis y hallaron que variaba significativamente en moruecos subfértiles y estériles comparados con moruecos de fertilidad normal. Supusieron por ello, que una causa de infertilidad podría descansar en un aparato de división defectuoso y que la distribución alterada

de los cromosomas podría dar lugar a un contenido anormal de los genes. Ambas anomalías del espermatozoide podrían producir la muerte del cigoto.

En los estudios iniciales, se pensó que las diferencias cuantitativas del contenido en DNA de los espermatozoides podrían explicar las diferencias en la fertilidad de moruecos con células espermáticas morfológicamente normales. Estudios posteriores, utilizando otros métodos de análisis, revelaron que, excepto para el espermatozoide diploide, no hay diferencias en el contenido en DNA de los espermatozoides de los moruecos fétiles o infértiles o entre las células morfológicamente normales y anormales. Estos datos y los de Bouters *y col.* (1967) hacen suponer que las conclusiones contradictorias en relación con el contenido en DNA de los espermatozoides y de la capacidad de fertilización se debían a los diferentes métodos cuantitativos de determinación del DNA.

Los núcleos diploides, que pueden identificarse visualmente, tienen aproximadamente el doble de cromatina que se encuentra en los núcleos de los espermatozoides normales; sin embargo, esta anomalía es bastante rara.

Gledhill (1970) ha sugerido que los defectos fisicoquímicos del núcleo de los espermatozoides pueden causar fertilidad reducida. La desoxirribonucleo-proteína (DNP) bioquímicamente inmadura se hallaba asociada con la infertilidad en un morueco con espermatozoides morfológicamente normales. Este defecto puede ser debido a un fallo en la unión de la proteína nuclear al DNA y puede deberse a la condensación de la cromatina durante la espermatogénesis. La condensación nuclear incompleta, que da lugar a cromatina anormal, se halla relacionada con la formación de un aspecto granular atípico de la cromatina nuclear en las cabezas de los espermatozoides de los moruecos infértiles y con cabezas de espermatozoides de forma anormal en el semen de los moruecos fétiles e infértiles. Sin embargo, el DNA en las cabezas de espermatozoides de forma anormal tenía una sensibilidad a la desnaturalización térmica similar al de los espermatozoides de cabezas normales.

El estudio del cariotipo podría ser un método valioso para la identificación de animales con anomalías cromosómicas. Tales hallazgos podrían ser especialmente importantes en relación con moruecos de centros de inseminación artificial.

5.1.2. Motilidad de los espermatozoides

Un hecho característico de los espermatozoides, que a la vez es prerequisite para la fertilización, es su motilidad, con lo que la determinación de ésta nos puede proporcionar un medio, relativamente sencillo, para conocer la calidad de semen.

Los espermatozoides pueden tener los siguientes tipos de movimientos:

Movimiento progresivo hacia adelante

Movimiento circular o rotatorio

Movimiento oscilatorio o convulsivo sin progreso ni cambio de posición

Estos movimientos solo pueden ser visualizados mediante microscopía, bajo cubre-objetos. Para la inseminación sólo se deben usar muestras de semen que presenten altas proporciones de espermatozoides con motilidad progresiva. La velocidad de movimiento hacia delante de un espermatozoide, suspendido en plasma seminal, es de 5-15mm por minuto (promedio 7mm/min).

La velocidad y tipo de movimiento de los espermatozoides puede variar según un gran número de factores: métodos de recogida del semen, factores ambientales, manejo del semen después de recogido, intervalo entre la recogida y la valoración y variaciones individuales del propio semental.

Cuando se observa, al microscopio con pocos aumentos, una gota de semen, se pueden ver las ondas de movimientos, que son debidas a los movimientos de los espermatozoides en diferentes direcciones. La presencia y velocidad de tales ondas se puede utilizar como criterio adecuado de valoración, bajo condiciones de campo. La onda de movimiento sólo se puede observar en las especies que poseen una alta concentración espermática en el semen, como es el caso de los óvidos y cápridos.

En el semen normal los espermatozoides tienen cargas eléctricas negativas, con lo que se repelen entre sí. Si los espermatozoides pierden la carga negativa tienden a agruparse. Este fenómeno recibe el nombre de aglutinación y puede ser debido a un aumento de la acidez del medio, presencia de iones metálicos, bacterias u otras impurezas, o a la presencia de aglutininas (formadas después de la inmunización), originadas en el animal.

5.1.3. Metabolismo de los espermatozoides

La energía necesaria para mantener la motilidad y viabilidad de los espermatozoides procede de los azúcares, especialmente de la fructosa, presentes en el plasma seminal. La glucosa que también es metabolizada por los espermatozoides, a menudo, se utiliza como componente de los diluyentes. Cuando los azúcares son metabolizados por los espermatozoides se produce dióxido de carbono, agua y algo de ácido láctico.

El dióxido de carbono (CO₂) en alta concentración tiene el efecto de inhibir la motilidad de los espermatozoides y puede ser utilizado como un medio de conservación del semen a corto plazo. El semen sin diluir incubado durante largos períodos de tiempo puede acumular dióxido de carbono en cantidad suficiente para inhibir la motilidad de los espermatozoides. En estos casos, se puede recuperar la motilidad diluyendo el semen con diluyente fresco, con lo que también se diluye el CO₂. Sin embargo, si se acumula ácido láctico metabólico en el semen, el pH puede descender y puede reducir, irreversiblemente, la viabilidad de los espermatozoides. Consecuentemente el semen se debe utilizar lo más fresco posible.

5.2. Producción y maduración espermática

5.2.1. *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 y col., 2000). Este proceso requiere la intervención de la testosterona secretada por las células de Leydig bajo el estímulo de la LH (Hormona Luteinizante), y de la FSH (Hormona Folículo Estimulante), que actúan a nivel de los túbulos seminíferos uniéndose a los receptores específicos de las células de Sertoli, que a su vez sintetizan una proteína fijadora de andrógenos (Jegou y Legac-Jegou, 1978) que mantiene la concentración de testosterona en epitelio de los túbulos seminíferos para poder completar el proceso. Las células de Sertoli presentan otras funciones como la de fagocitar los residuos resultantes del proceso espermatogénico así como eliminar las células germinales degeneradas. La espermatogénesis se puede dividir en tres fases: espermatocitogénesis (mitosis), meiosis y espermiogénesis.

En la primera fase, de división celular, las espermatogonias confinadas en el espacio basal, dejado por las células de Sertoli en el epitelio seminífero, entran en mitosis mediante mecanismos locales de regulación. Las espermatogonias más primitivas (tipo A), proliferan por división mitótica para perpetuarse a sí mismas y dar a la vez origen a varias generaciones sucesivas de espermatogonias (A2, A3, A4, In, B), cada una de las cuales está un poco más diferenciada que la precedente. La división de la última generación de espermatogonias (tipo B) da lugar a los espermatocitos primarios.

Durante la meiosis, se produce la diferenciación celular originándose a partir de una célula diploide 4 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. Los espermatozoides son liberados del epitelio al lumen tubular, desde donde son transportados vía rete testis y vasos eferentes al epidídimo. De las 4 fases, en la primera o fase de Golgi, el aparato de Golgi forma unas vesículas proacrosómicas que se van fundiendo hasta originar una única vesícula acrosomal. En la segunda o fase del capuchón, la vesícula acrosomal aumenta su superficie de contacto con la envoltura nuclear, desplazándose sobre el polo del núcleo llegando a cubrir por último toda la superficie hemisférica anterior en forma de capuchón. En la tercera fase o fase acrosómica, se produce una redistribución de la sustancia que se va extendiendo gradualmente en una delgada capa dentro de la membrana que constituye el acrosoma.

El núcleo sufre una serie de cambios volviéndose elíptico y se desplaza hacia la periferia de la espermátida, a la vez que sufre una condensación progresiva de su cromática asociada a modificaciones químicas del ADN y sustitución de las proteínas nucleares (histonas por protaminas). En el citoplasma, los microtúbulos se asocian formando una vaina cilíndrica temporal denominada manguito en cuyo interior se encuentra el cuerpo cromatoide, que por condensación dará lugar al anillo. En la última fase o fase de maduración, las espermátidas alargadas se transforman en las células que se liberarán a la luz del túbulo seminífero. El núcleo y acrosoma adquieren la forma característica de la especie. En esta fase se forma la vaina fibrosa y las nueve fibras densas que recubren al axonema. El anillo se desplaza distalmente desde su posición adyacente al núcleo hasta llegar al punto de separación de la pieza media con la pieza principal de la cola. Las mitocondrias se unen y forman la vaina helicoidal. La formación del cuerpo residual completa la maduración final de las espermátidas. La liberación de las espermátidas como espermatozoides a la luz de los túbulos seminíferos, en un proceso denominado espermiación.

5.2.2. *Maduración del espermatozoide en el epidídimo*

Una vez concluida la espermiogénesis, 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 que se produce con mayor constancia durante la maduración espermática en el epidídimo es, en la mayoría de las especies, la migración de la gota citoplasmática de proximal a distal y su posterior eliminación del flagelo. En estudios recientes, el análisis morfométrico asistido por ordenador ha revelado cambios en el tamaño y la forma de los espermatozoides durante el tránsito epididimario (Soler y col., 2000). La morfología del núcleo no cambia drásticamente pero si se incrementa la estabilidad de la cromatina espermática, como resultado del aumento progresivo de puentes disulfuro (-S-S-) entre las protaminas del ADN ricas en cisteínas (Yanagimachi, 1988 y 1994). Los cambios de forma y estructura del acrosoma son poco marcados en la mayoría de las especies, a excepción del cobaya o la chinchilla, donde si son mucho más evidentes (Bellvé y O'Brien., 1983). Algunos componentes de la cola del espermatozoide también se estabilizan mediante puentes disulfuro, lo que puede condicionar las características del movimiento del espermatozoide maduro (Glover y col., 1990).

Durante su paso por el epidídimo, los espermatozoides también sufren cambios bioquímicos, que aunque afectan a todos sus compartimentos (acrosoma, núcleo y componentes del flagelo), las mayores modificaciones se centran en la membrana plasmática (Yanagimachi, 1988). El hecho de que la osmolaridad y composición química del fluido secretado por el epidídimo sea diferente en sus distintas partes justifica los cambios producidos en la membrana plasmática del espermatozoide durante su tránsito, ya que su exposición al fluido es directa (Yanagimachi, 1994). La acción de sustancias secretadas por el epitelio epididimario como proteínas, carnitina, ácido sálico o iones inorgánicos, entre otros, modifica la cubierta glicoproteica, de manera que la adsorción de estas sustancias a la superficie de la célula, sobre todo de las glicoproteínas, podría adquirir importancia en la interacción entre los gametos en el momento de la fecundación (Bains y col., 1993).

Además de los cambios en las glicoproteínas de la membrana plasmática, la cantidad y composición de los lípidos de la membrana espermática varía durante el paso a través del epidídimo, de manera que en el caso del morueco, el descenso de los lípidos totales se ve acompañado de una pérdida relativa de los ácidos grasos saturados unidos a fosfolípidos (16:0), así como, de un aumento del cociente

colesterol: fosfolípidos que prácticamente se duplica. Los espermatozoides testiculares del morueco poseen ratios de polinsaturados: saturados de 0,9 mientras que en los espermatozoides eyaculados la ratio es del orden de 2,5 o mayor, lo cual está relacionado con su menor resistencia al choque frío (Watson, 1981). El cambio en la composición en fosfolípidos y ácidos grasos contribuye a la característica organización en dominios de los lípidos de la membrana de los espermatozoides maduros. Por su parte el colesterol actúa modulando la fluidez de la bicapa lipídica y su estabilidad a través de la interacción estérica con los fosfolípidos de membrana.

La cinética de los espermatozoides también se modifica durante su tránsito epididimario. Los espermatozoides de testículo de mamífero en solución tamponada son inmóviles o presentan un movimiento vibrátil débil, mientras que los de la cabeza del epidídimo muestran una amplia gama de movimientos circulares que se van haciendo rectilíneos a medida que estos alcanzan las regiones distales. Durante el tránsito epididimal, los espermatozoides por tanto adquieren el potencial de movilidad, ya que este lo demuestran cuando son diluidos en una solución tamponada y no en su ambiente nativo en el que son inmóviles. En el caso del morueco, únicamente los espermatozoides de la región distal y del eyaculado muestran una mayor movilidad, lo que les permite penetrar ovocitos de hámster (Williams y *col.*, 1991). Además el patrón de movilidad de los espermatozoides maduros e inmaduros es diferente, así el flagelo de los espermatozoides inmaduros tiene mayor amplitud de batida que el de los maduros, quizás por la mayor rigidez de la membrana celular de éstos, consecuencia del aumento de los puentes disulfuro de la superficie nuclear y flagelar durante dicho tránsito (Glover y *col.*, 1990).

Por otro lado, Amann y *col.* (1982) observaron que la cantidad de AMPc en los espermatozoides maduros de bovinos de la cola del epidídimo era un 40% más elevada que la de los inmaduros de la cabeza, atribuyendo la transición del patrón de movimiento circular a progresivo a un aumento intracelular del AMPc y acompañado de la exposición a las secreciones epididimales. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la adquisición y transformación de la movilidad de los espermatozoides epididimarios no son bien conocidos, si bien han sido propuestos algunos factores reguladores en la activación del axonema, entre otros, la carnitina, AMPc, glicoproteínas epididimarias y albúmina, inmovilina, factor inhibidor de la movilidad espermática, cambios en la composición lipídica de la membrana y diversas condiciones ambientales (Turner y Giles, 1982; Baas y *col.*, 1983; Hermo y *col.*, 1994; Jeulin y Lewin, 1996; Leclerc y Goupil, 2002).

5.2.3. Capacitación espermática: reacción acrosómica

Como parte del proceso de capacitación espermática que inician los espermatozoides en el aparato reproductor masculino, donde adquieren madurez y capacidad de movimiento, 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), siendo ambos sucesos imprescindibles para la fertilización (Martínez y col., 1989). La capacitación también se ha definido como los cambios que proporcionan al espermatozoide la capacidad de sufrir la reacción acrosómica (Bedford, 1970), ya que en los mamíferos, a diferencia de otros grupos como los invertebrados, los espermatozoides necesitan capacitarse primero para poder experimentar a continuación dicha reacción. Las experiencias que condujeron a este concepto fueron efectuadas por Chang en 1951, observando que los espermatozoides de conejo depositados en el oviducto justo después de la ovulación penetraban una baja proporción de oocitos en comparación con los mantenidos previamente durante 5 horas en el útero de otra hembra (Martínez y col., 1989).

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, quedando la membrana acrosomal interna como la región externa de la zona anterior de la cabeza del espermatozoide (Figura 6). Este fenómeno se detiene en las membranas del segmento ecuatorial, que no participan para asegurar la continuidad de la superficie de la cabeza.

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. Así, el fluido folicular o el “cumulus ooforus” pueden estimular la reacción acrosómica, ya que “in vivo”, en la mayoría de las ocasiones, esta se produce en las inmediaciones del oocito, si bien la acción de estos factores no resulta esencial para desencadenar el proceso. Además, sustancias presentes en el fluido oviductal como albúmina o el calcio han provocado la reacción acrosómica en condiciones in vitro. En cualquier caso, la heterogeneidad del momento en que se produce la reacción acrosómica en los espermatozoides de mamíferos, tanto “in vivo” como “in vitro”, resulta en una respuesta escalonada que tiene como estrategia aumentar las posibilidades de fertilización, lo que quizás pueda reflejar diferencias individuales.

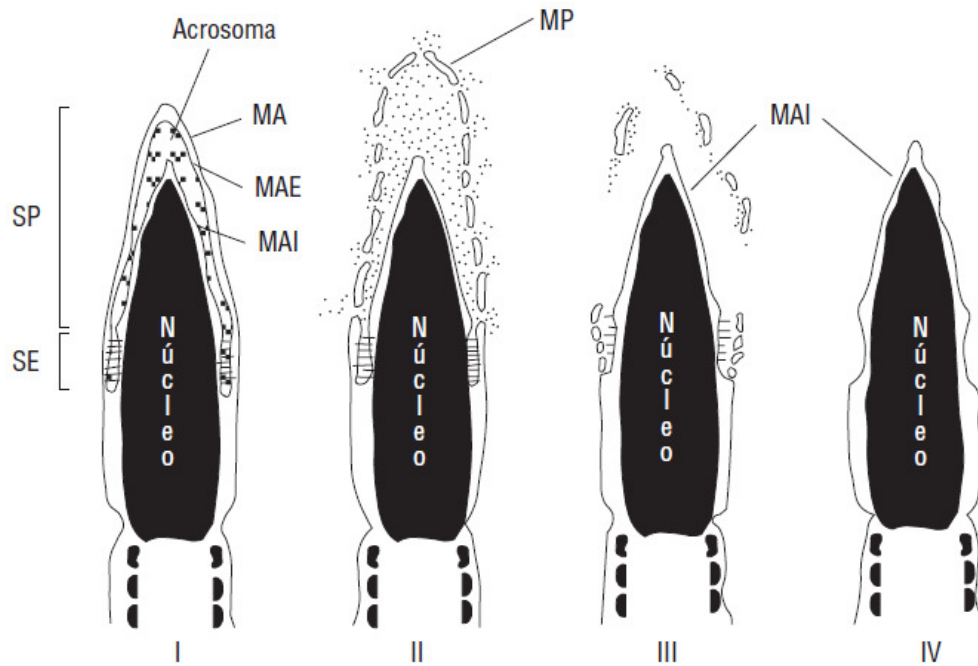


Figura 6: Reacción del acrosoma en el espermatozoide humano. I- Espermatozoide con el acrosoma intacto (no reaccionado). II- Reacción del segmento principal (SP) del acrosoma: fusión de la membrana acrosomal externa (MAE) y la membrana plasmática (MP) en el segmento principal del acrosoma. III- Reacción acrosómica en el segmento ecuatorial (SE). IV- Espermatozoide con reacción acrosómica del segmento principal y ecuatorial. La membrana acrosómica interna se continúa con la membrana plasmática del segmento postecuatorial. (Hafez, 1985).

5.3. Fisiología del espermatozoide

Las funciones del espermatozoide son:

- 1) Aportar la dotación paterna de cromosomas.
- 2) Iniciar la división celular del óvulo.

El logro de estos objetivos se realiza en varias fases:

- a) Inseminación: 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.

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 fertilización, que es la fusión entre un óvulo y un espermatozoide, resultando en una célula denominada embrión o cigoto.

5.4. Composición del semen

5.4.1. *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, que se forma durante la eyaculación, se conoce como plasma seminal.

5.4.2. *Plasma seminal*

Se trata de mezcla de líquidos secretados por las glándulas vesiculares, los epidídimos, conductos deferentes y otras glándulas sexuales accesorias. El testículo no contribuye casi nada a la formación del plasma seminal. Este plasma tiene tres funciones principales:

- 1) actúa como vehículo para los espermatozoides, transportándolos desde el sistema reproductor del macho, durante la eyaculación.
- 2) sirve de activador a los espermatozoides, previamente no móviles
- 3) proporciona un medio rico en nutrientes, tamponado, que colabora en mantener la supervivencia de los espermatozoides después de depositarse éstos en el aparato genital de la hembra.

El plasma seminal de los moruecos es un líquido opaco o claro, aunque el semen puede ser de color blanco o cremoso debido a su alta concentración en espermatozoides.

El principal componente del plasma seminal es el agua (75%), aunque también aparecen sustancias orgánicas e inorgánicas que sirven de protectores y nutrientes de los espermatozoides, normalmente es un líquido isotónico y neutro.

Al contrario que otros cuerpos fluidos, la presión osmótica del semen se mantiene más por los componentes orgánicos que por los iones inorgánicos, aunque existen cantidades considerables de sodio, potasio y cloro. Las principales sustancias orgánicas presentes en el semen de morueco son fructuosa, sorbitol, inositol, ácido cítrico, glicerilfosforilcolina, fosfolípidos, prostaglandinas y proteínas. La fructosa es el azúcar más fácilmente metabolizable y proporciona la mayor fuente de energía a los espermatozoides del semen.

El pH del plasma seminal se mantiene muy próximo a 7.0 por un complejo sistema amortiguador. El plasma seminal tamponado protege a los espermatozoides de los cambios bruscos de pH que deteriorarían la supervivencia de las células espermáticas.

5.5. Tecnología de la manipulación espermática

5.5.1. *Obtención del semen*

Existen dos métodos para recoger el semen, denominados como el de vagina artificial y el de la estimulación eléctrica. Es preferido el primero de los citados dada su rapidez y limpieza, no es estresante para el semental y proporciona un semen recolectado de mejor calidad. Por el sistema de la vagina artificial se puede recoger semen, varias veces al día. La estimulación eléctrica se debe usar cuando se precise recoger semen de un macho que no es posible entrenarlo a la vagina artificial; tiene, este método, el inconveniente de producir malestar en el macho, no se pueden hacer frecuentes recogidas de semen, que, por otra parte, se contamina fácilmente, con orina, durante la recogida. El semen obtenido, por este método, presenta mayor volumen, pero menor concentración, que cuando se obtiene por vagina artificial. Sin embargo, la estimulación eléctrica es útil para testar la fertilidad de gran número de machos, incluyéndose los moruecos de recelas intervenidos quirúrgicamente.

La recogida del semen es el almacenamiento de los espermatozoides del animal a la salida de su aparato reproductor, salida que es provocada con métodos no naturales. 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.

5.5.1.1. Recogida de semen por vagina artificial

La vagina artificial es una imitación de la vagina de la oveja, que proporciona el estímulo térmico (temperatura) y mecánico (presión) para la erección del pene del macho y que son, igualmente, necesarios para producir la eyaculación. La vagina artificial utilizada para mardanos es similar a la usada para los toros. Consiste de una caperuza externa (de 20 x 5.5 cm) fabricada con goma fuerte, plástico u otro material sintético que tenga buenas propiedades aislantes, y un conducto interno fabricado de goma o material sintético apropiado (Figura 7).

El tamaño de la vagina artificial está en relación con la longitud del pene. El conducto interno suele tener unos 2-3 cm más que la caperuza externa con el fin de poderse plegar sobre ésta, sujetándolo con sendas bandas de goma, para formar una especie de depósito estanco para el agua. El conducto, por otra parte, debe ser ligeramente elástico y montarse sobre la caperuza de tal forma que se forme un tubo de superficie lisa, sin arrugas. En todo momento habrá que asegurarse que la tubuladura interna esté en buen estado y no tenga fisuras.

La vagina deberá estar limpia, seca y estéril; una misma vagina, sin limpiar, no se debe utilizar para distintas recogidas de semen. Después de cada uso se debe lavar, enjuagar con agua destilada y secarla profundamente; si se pasa, por el interior, una delgada película de alcohol al 70%, en agua destilada, se secará, luego, mejor. A continuación se llena la mitad del depósito con agua a 48-50°, a través del tampón colocado en el lateral y con ayuda de un embudo o jeringa de 100 ml (el calor del agua contribuirá a evaporar el alcohol). Si se llena demasiado de agua, se saldrá, cuando se deje la vagina en posición vertical. Evitar, en todo momento, que el agua penetre en el tubo interno ya que puede ser la causa de mortandad de los espermatozoides. Uno de los extremos del conducto interno se debe lubricar ligeramente con vaselina, en una extensión de no más de 3 cm, utilizando una varilla de plástico o vidrio. En el otro extremo se debe colocar el tubo de vidrio estéril y calibrado, para recoger el semen, insertándolo 1,5-2,0 cm. Mientras se coloca el tubo se debe insuflar aire, por el extremo abierto, y luego se cierra, todo ello con el fin de que el tubo quede perfectamente acoplado. La insuflación debe ser de tal magnitud que ejerza presión pero que permita una fácil penetración del pene.

La temperatura de la vagina artificial, inmediatamente antes de recoger el semen, deberá ser de 42-45°C, lo que se puede controlar mediante la inserción de un termómetro limpio. Si la vagina se encuentra demasiado fría, se debe rellenar con agua más caliente, que la que se utilizó con anterioridad. Con el fin de evitar el shock por frío, de los espermatozoides, los vidrios de recogida se deben calentar a 30-37°C. En los climas fríos, donde sea difícil mantener la temperatura de la vagina a 42-45°C, puede calentarse, durante un corto tiempo, en una estufa de cultivo a 37°C antes de añadir el agua. Sin embargo, la exposición prolongada, a estas temperaturas, producirá cierto deterioro del tubo interior.

El semen se debe recoger en un ambiente libre de polvo. Antes de la recogida de semen, se debe limpiar, cuidadosamente, el prepucio del macho, para evitar cualquier contaminación de aquél.

La hembra maniquí se debe sujetar a lo que se llama potro. El operario, en posición de agachado o en cuclillas, se coloca en el lado derecho y coloca la vagina artificial en el flanco de ese lado, sujetándolo con la mano derecha, de tal forma que el extremo abierto quede mirando hacia el macho y abajo, con un ángulo de unos 45°. La espita de la vagina artificial debe dirigirse hacia abajo, para evitar su contacto con el macho. El tubo recolector debe mantenerse firme y caliente sujetándolo, parcialmente, con la mano (Figura 8).

Cuando el semental se monte, el pene erecto se debe dirigir al extremo abierto de la vagina artificial. Es importante que la vagina se aplique lo más pronto posible después que el semental se haya montado. El pene se debe dirigir hacia la parte superior de la vagina y ésta se retirará en el momento que el macho desmonte. Los movimientos vigorosos hacia arriba y hacia adelante significan que se ha producido la eyaculación. Se debe dejar que el macho retire el pene de la vagina antes de intentar retirar ésta. Inmediatamente después de la recogida la vagina artificial se cambia de posición, quedando el tubo de vidrio en la parte inferior, a la vez que se sujeta éste con la mano. Se quita la presión al abrir la espita, teniendo la precaución de que no salpique agua cerca del tubo de recogida de semen. Luego se quita el polvo, se etiqueta, se tapa y se coloca en un baño a 30°C.

La frecuencia con la que se puede coleccionar el semen depende de la edad, de la condición, ya que hay machos que eyaculan muy rápidamente y otros que son más retardados, y del temperamento del animal. Los moruecos pueden montar y eyacular 10-15 veces o más, al día. Con tal frecuencia, el volumen y concentración del semen (y consecuentemente el número de espermatozoides por eyaculado) disminuye con los sucesivos eyaculados. Sin embargo, un régimen de 3-5 recogidas diarias, durante períodos de 4-5 días, separados por 2-3 días de descanso, no reducirá sensiblemente la cantidad y calidad del semen.



Figura 7. Vagina artificial



Figura 8. Operario agachado y tubo recolector erecto.

5.5.1.2. Recogida de semen por estímulo eléctrico

Existen diferentes tipos de estimuladores eléctricos, los más corrientes son los que tienen un electrodo bipolar para el recto.

Existen variaciones según el método de recogida, especie, estado fisiológico del macho, raza, edad, tamaño corporal, alimentación y régimen sexual al que se le somete al macho. (Derivaux, 1982; Memon y *col.*, 1981; Pérez, 1996).

5.5.2. Factores que afectan a la supervivencia de los espermatozoides

El semen, que a la hora de la recogida, puede ser de buena calidad se deteriora con facilidad. El semen del carnero y del macho cabrío es muy sensible a los cambios ambientales y a otras circunstancias, por lo que es aconsejable el tomar medidas precautorias cuando se manejan muestras de semen. Los factores que pueden afectar a la supervivencia de los espermatozoides son los siguientes:

TEMPERATURA: La temperatura del semen en el momento de la eyaculación, es próxima a la del cuerpo (37,5°). La exposición del semen a temperaturas superiores a la indicada aumenta el ritmo metabólico, se agotan las reservas de energía y decrece

la vida media del espermatozoide. Temperaturas superiores a los 45°C matan a los espermatozoides.

La disminución de la temperatura reduce el metabolismo de los espermatozoides, pero una bajada súbita de la temperatura, particularmente por debajo de 10°C, producirá una pérdida irreversible de su viabilidad. La motilidad no se recupera al calentar de nuevo el semen, con lo que de esa forma se pierde definitivamente la capacidad fecundante de aquel semen. Este fenómeno se llama *shock de frío* y puede suceder como consecuencia de una exposición accidental al aire frío o al utilizar material de vidrio frío a la hora de recolectar el semen o al visionarlo al microscopio. También se pondrá especial cuidado, cuando se diluya el semen, de que el diluyente esté a la misma temperatura que esté el semen.

El enfriamiento lento del semen 2-5°C no es fatal. La reducción del metabolismo, a esta temperatura, contribuye a prolongar la viabilidad de los espermatozoides. Al calentar de nuevo las muestras se restaura la motilidad y los espermatozoides permanecen fértiles.

LUZ: La luz solar directa es muy perjudicial para el semen. Una exposición corta a la luz solar puede reducir la viabilidad de los espermatozoides y si esa exposición se prolonga a 30-40 minutos pueden morir. Consecuentemente, es aconsejable evitar la exposición directa del semen a la luz solar con lo que las operaciones de recogida y manejo del semen se deben hacer en interiores y lejos de los rayos de luz que puedan penetrar por las ventanas. Asimismo, es conveniente evitar exposiciones del semen a la luz fluorescente intensa o a la radiación ultravioleta.

CONTACTO CON METAL: El contacto con metal, de cualquier tipo, es peligroso para los espermatozoides; por esta razón, sólo se debe utilizar material de vidrio o equipos de materiales sintéticos inertes cuando se trate de recoger, diluir, conservar, incluso, practicar la inseminación

CONTACTO CON AGUA: El agua reduce la presión osmótica del plasma seminal con lo que puede matar a los espermatozoides. Por tanto, el agua se comporta como un peligroso agente espermicida, con lo que nunca deberá ponerse en contacto el semen con el agua. Antes de usarlo, todo el material, incluida la vagina artificial y los tubos colectores de semen, deberá secarse con esmero. Se pondrá especial atención cuando se deje el semen en el baño de agua, para que no salpique nada de agua al semen. Se recomienda el uso del agua bidestilada con agentes pirógenos. El agua de uso corriente es muy dañina (residuos minerales).

IMPUREZAS Y BACTERIAS: Las bacterias, el polvo, los pelos, la orina y otros contaminantes que puedan estar contenidos en el semen reducirán, e incluso matarán, la viabilidad de los espermatozoides. La contaminación del semen ocurre con más frecuencia durante la recogida y puede evitarse mediante lavado, a fondo, del prepucio del macho antes de manejarlo. Después de recogido el semen se protegerá

de los contaminantes del aire cubriéndolo con una hoja de papel de aluminio o un vidrio de reloj. Se debe poner especial cuidado de proteger al semen contra las moscas y otros insectos. Los sprays antiparasitarios o antisépticos no se deben utilizar cerca de donde esté el semen ya que son muy peligrosos para los espermatozoides y pueden persistir mucho tiempo en el ambiente. La proliferación de microbios en el semen se puede controlar por la adición de antibióticos al diluyente.

DESINFECTANTES: Los desinfectantes y antisépticos son muy peligrosos para los espermatozoides, por lo que se evitará su uso. Para esterilizar el material se puede utilizar alcohol al 70%, en agua, si bien deberá secarse cuidadosamente antes de usarlo. Para el material de vidrio se debe utilizar la esterilización mediante calor seco

EXPOSICIÓN PROLONGADA AL AIRE: El oxígeno del aire incrementa, notablemente, la actividad metabólica de los espermatozoides con lo que se acumula ácido láctico en el semen. Ese ácido puede reducir el pH del semen por debajo de óptimo, esto es pH 7.0, con lo que la viabilidad de los espermatozoides se reducirá notablemente. El semen, una vez recogido, deberá usarse, de inmediato, ya sea para la inseminación o la conservación.

CAPACIDAD TAMPONANTE DEL DILUYENTE: El medio que se utilice para diluir el semen debe tener suficiente capacidad amortiguadora para mantener el pH óptimo. Las desviaciones del pH, bien sea hacia la alcalinidad (por encima de 7.0) o la acidez (por debajo de 7.0), disminuirán la viabilidad de los espermatozoides. Los diluyentes de semen, más recomendados, contienen tampones; esto es, sustancias capaces de mantener el medio cercano al pH óptimo de los espermatozoides.

PRESIÓN OSMÓTICA DEL DILUYENTE: Los componentes (solutos) disueltos en el medio y que rodeen al espermatozoide pueden ejercer cierta presión sobre la membrana celular. Este fenómeno se conoce como presión osmótica y aumenta según la concentración de solutos en el medio. Los medios en los que la concentración de solutos es equivalente a la del interior de la célula se dice que son isotónicos. Los medios que tienen concentraciones más bajas de solutos son hipotónicos y los que tienen más solutos son hipertónicos. Tanto los hipo como los hipertónicos son peligrosos para los espermatozoides; sólo hay un estrecho margen de tonicidad sobre el que puede variar el diluyente sin que se afecten los espermatozoides. En efecto, éstos permanecen más móviles en medios isotónicos.

5.5.3. Dilución seminal

El semen recogido deberemos diluirlo y conservarlo hasta su procesamiento 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. 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 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,..., que dañasen directamente al espermatozoide (en este caso se ha utilizado como diluyente leche de vaca UHT a la que se le han añadido antibióticos).
- Que el medio permita la esterilización fácil de los utensilios.
- Que el medio sea fácil de preparar, rápido y que sea económico.

Los medios más comúnmente utilizados son:

- 1) Yema de huevo. Si lleva elementos fosfatados, mejor, pues esto alargara la vida del espermatozoide. La lecitina protege contra los cambios bruscos de temperatura.
- 2) Leches naturales (diluyente utilizado en este estudio) o en polvo.
- 3) Glicerol, en caso de congelar, que ayudara a conservar al espermatozoide, pues la congelación sería amorfa, no cristalina, lo cual dañaría al espermatozoide.

Normalmente pueden usarse en el diluyente ciertas sales como permanganato potásico. Conviene así poner el diluyente a la temperatura del esperma a la hora de añadirlo para no tener un shock térmico en el espermatozoide. Cada aplicación se hará de forma lenta sobre el esperma, para que la mezcla con el diluyente sea perfecta.

5.6. Manejo y evaluación de la calidad seminal

El análisis del semen tiene por objeto valorar la calidad de un eyaculado, y la funcionalidad del macho como reproductor. Actualmente, existen múltiples técnicas de laboratorio para la determinación de la calidad seminal, no siendo aconsejable la utilización de un solo análisis para valorar la viabilidad del semen (Hafez, 1987; Maxwell y Evas, 1990; Boixo, 1994).

El método definitivo en la valoración de la capacidad fecundante del semen es el nacimiento de un nuevo individuo. Sin embargo, el tiempo y dinero requerido para ello hacen que los ensayos de fertilidad en campo mediante la cubrición de hembras no sean frecuentemente utilizados, tratando de desarrollar métodos alternativos “in vitro” que se correlacionen con la fertilidad.

La necesidad de utilización de diferentes técnicas en la valoración de la calidad de un eyaculado se debe a la falta de existencia de una sola prueba que determine su fecundidad, debido en gran parte, a que el espermatozoide es una célula altamente especializada y con una función biológica compleja, influenciada por multitud de factores externos “in vitro” (tratamientos seguidos en el laboratorio para su capacitación, conservación, ...) o “in vivo” (cambios en el medio a lo largo de su paso por el tracto reproductor de la hembra). El volumen promedio del eyaculado del carnero es de 1 ml (0,7 ml a 3 ml) y su concentración varía entre 2.000 y 6.000 millones de espermatozoides/ml.

El estudio seminal requiere:

- Un examen macroscópico: aspecto, olor, viscosidad, volumen y pH. Estos parámetros son importantes, y sus anomalías deben comunicarse, independientemente de la calidad de otros parámetros seminales.

- Un examen microscópico: concentración espermática, porcentaje de células móviles y con movilidad progresiva, porcentaje de espermatozoides con morfología normal, aglutinación y presencia de otros elementos celulares, considerándose como parámetros básicos e imprescindibles en la valoración de la fertilidad natural del macho. Una vez fijados estos parámetros, debemos establecer qué límites son los que vamos a aceptar como normales.

5.6.1. *Análisis macroscópico*

5.6.1.1. **Color y olor del semen**

El color del semen es el primer factor que se valora y se debe hacer en el mismo tubo de recogida, inmediatamente de obtenido. El semen de morueco normalmente es de color blanco lechoso o crema pálido, dicha coloración, producida por la presencia de riboflavinas en el plasma seminal (Mendoza y *col.*, 1989), está sujeta a variaciones raciales e individuales. La presencia de sangre dará al semen una coloración rosácea y puede ser debido a lesiones del pene durante la recogida. Las coloraciones gris o parda son indicadoras de contaminación o alguna clase de infección en el sistema reproductor. Si hay presencia de orina, existirá un olor característico además de que la coloración será menos intensa. Esto es una posibilidad, bastante corriente, cuando se obtiene semen por electroeyaculación.

5.6.1.2. **Volumen y concentración**

Cuando la recogida se hace con vagina artificial el promedio de volumen de eyaculado, para carneros, es de 1.0 ml. La concentración espermática es elevada, el semen de morueco contiene 3.5-6.0 mil millones ($3.5-6.0 \times 10^9$ espermatozoides/ml) (Evans y Maxwell, 1994). Este último es un importante parámetro 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 2.5×10^9 espermatozoides/ml (Evans y Maxwell, 1987, Dorado, 2003). El Volumen y la concentración no varían solo entre distintas especies sino dentro de las mismas. Independientemente de variaciones individuales existen otros factores como la edad, las condiciones climáticas, el estado nutricional y la frecuencia de las eyaculaciones que afectan, notablemente, a la cantidad y calidad del semen.

El volumen se determina en el colector de recogida, graduado en milímetros o, con más seguridad utilizando una pipeta calibrada. Su valor es necesario para calcular el número total de espermatozoides eyaculados. La concentración se puede determinar empleando un hemocitómetro, espectrofotómetro, colorímetro y 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, es lento pero más seguro; 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 en cambio el colorímetro, que está basado en la cantidad de luz que deja pasar la muestra líquida, para el semen de carnero diluido, a concentración estándar, la cantidad de luz transmitida a través de la muestra, varía inversamente con el número de espermatozoides en la misma.

Igualmente, 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 de estar correctamente calibrados. Una técnica en desarrollo consiste en valorar la concentración mediante fluorimetría. 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, 1996).

Y también se puede determinar la concentración mediante la apreciación visual aplicando la siguiente escala (tabla 1), es un método rápido aunque con un margen de error amplio.

Puntaje	Consistencia	Cant.Espermat./cm ³
5	Espeso-cremoso	5.000.000.000
4	Creoso	4.000.000.000
3	Creoso liviano	3.000.000.000
2	Lechoso	2.000.000.000
1	Nuboso	700.000.000
1	Aguachento	Insignificante

Tabla 1. Escala del semen y determinación de la concentración según la apreciación visual.

5.6.2. *Análisis microscópico*

5.6.2.1. **Movilidad espermática**

La movilidad espermática es otro parámetro fundamental para valorar la calidad del eyaculado. Esta depende de factores intrínsecos como son la estructura del flagelo y la actividad enzimática de la dineína, así como de factores extrínsecos como por ejemplo la composición bioquímica del medio extracelular en que se encuentra el espermatozoide.

La fuente inmediata de energía para la movilidad es la hidrólisis de adenosín trifosfato (ATP) catalizada por una dineína-ATPasa responsable del deslizamiento entre microtúbulos adyacentes del axonema (Gibbons y Rowe, 1965; Gibbons, 1996). Las estructuras específicas del axonema, tales como las uniones entre los microtúbulos, y la presencia de fibras densas crean resistencia al deslizamiento, induciendo fuerzas que provocan la curvatura flagelar (Amelar y *col.*, 1980; Dacheux y *col.*, 1990).

El ATP puede ser generado a partir de la transformación de azúcares (principalmente fructosa y glucosa) a lactato mediante la ruta metabólica de la glucólisis, así como por la fosforilación oxidativa en las mitocondrias. Cambios en las concentraciones citoplasmáticas de ATP, adenosín difosfato (ADP) y AMP pueden modular la respuesta de la glucólisis y fosforilación oxidativa para satisfacer la demanda energética. Aproximadamente entre un 35% y 60% de la energía total disponible a partir de la hidrólisis del ATP es empleada en el movimiento del flagelo (Ford y Rees, 1990).

El término “movilidad” incluye dos conceptos diferentes, la “movilidad lineal activa” y el “porcentaje total de espermatozoides dotados de movimiento”. Los espermatozoides muestran diferentes patrones de movimiento adaptados a sus necesidades funcionales. Así, los espermatozoides del eyaculado, dentro del plasma seminal muestran unas trayectorias lineales que son las que fisiológicamente mostrarían al penetrar en el moco cervical. Cuando el espermatozoide abandona el plasma seminal e inicia su ascenso por el tracto reproductor femenino, sus características de movilidad cambian. Con la capacitación, aumenta la longitud de la onda flagelar, originándose trayectorias que muestran con mayor desplazamiento lateral de la cabeza (Mack y *col.*, 1988; Robertson y *col.*, 1988), llegando un momento en que la amplitud de la onda comienza a hacerse asimétrica, dando lugar a un movimiento no progresivo y vigoroso conocido como “hiperactivación”. Este movimiento le proporciona al espermatozoide la fuerza necesaria para que pueda atravesar la zona pélcida del ovocito (Burkman, 1984).

Las limitaciones intrínsecas al proceso de evaluación de la movilidad en el microscopio óptico implican una considerable variabilidad, lo que hace que se

resienta la objetividad de dicha estima. Son numerosos los espermatozoides que atraviesan el campo óptico con diferentes patrones de movilidad. La subjetividad del observador puede distorsionar el resultado del análisis.

En todo caso, los métodos seguidos para la valoración subjetiva de la movilidad espermática son sencillos, determinándose en portaobjetos o cámara de Makler.

Los espermatozoides móviles se clasifican en cuatro categorías según la OMS:

Grado a: velocidad alta con trayectoria rectilínea.

Grado b: velocidad media con trayectoria poco o nada rectilínea.

Grado c: movilidad no progresiva.

Grado d: espermatozoides inmóviles.

La movilidad espermática puede verse alterada por diversos factores exógenos: método de recogida del eyaculado y tiempo de transporte, temperaturas extremas, pérdida de alguna fracción de muestra e infecciones (Núñez-Calonge y *col.*, 1998)

5.6.2.2. Movilidad masal

Esta prueba valora la formación y progresión de ondas producidas por el desplazamiento de los espermatozoides. La onda de movimiento sólo puede ser observada en especies de alta concentración espermática, como es el caso de pequeños rumiantes (Carbonero, 1954; Maxwell y Evans, 1990).

La valoración de la movilidad masal se realiza mediante microscopia óptica a 10 x sobre una gota de semen puro colocada sobre un portaobjetos atemperado a +3PC. La clasificación varía en función de la escala utilizada: de 0 a 5 (Maxwell y Evans, 1990); 0 a ++ (Pérez y *col.*, 1986)

5.6.2.3. Movilidad individual

La movilidad individual es una de las pruebas que con mayor frecuencia se utilizan para evaluar la calidad seminal y en algunas especies parece estar correlacionada con la capacidad fecundante del espermatozoide (Maxwell y Evans, 1990; Pomerol y Arrondo, 1994).

La movilidad espermática se valora rutinariamente de manera subjetiva mediante un microscopio óptico (a 10x ó 20x) sobre una gota de semen diluido en una solución isosmótica, determinando el porcentaje de espermatozoides móviles y su calidad de movimiento (Maxwell y Evans, 1990). La utilización de métodos fotográficos y sistemas computerizados han relegado a un segundo plano la valoración subjetiva por parte de los técnicos. Los actuales sistemas de análisis de imagen asistidos por

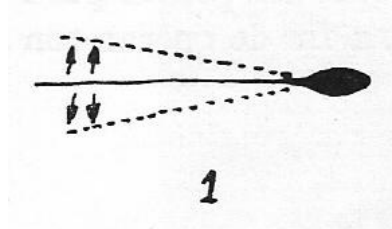
ordenador ó sistemas CASAS (Computer-Assisted- Sperm-Analysis) son capaces de determinar, de manera objetiva, toda una serie de parámetros de velocidad y angularidad, que colaboran en el establecimiento de un grado de calidad de movimiento (Ginsburg y *col.*, 1988; Burkman, 1995; Nula y *col.*, 1996).

El movimiento desarrollado por los espermatozoides es característico de especie y del estado fisiológico en que se encuentre (movimiento tras la eyaculación, dilución, refrigeración, congelación, hiperactivación, ...) (Ginsburg y *col.*, 1988; Pérez y *col.*, 1994; Burkman, 1995; Vinader y *col.*, 1996 a), estando sujeto también al efecto ejercido por el método de recogida, factores ambientales, manejo del semen tras su obtención (Maxwell y Evans, 1990).

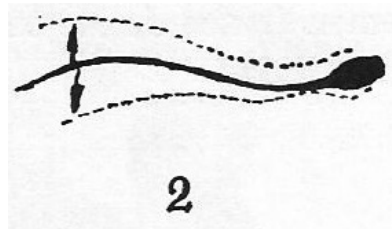
Existen variaciones estacionales relativas a la movilidad de los espermatozoides de ovino, estando relacionadas con la fertilidad (Maxwell y Evans, 1990; Pérez, 1992).

Los podemos clasificar de la siguiente manera:

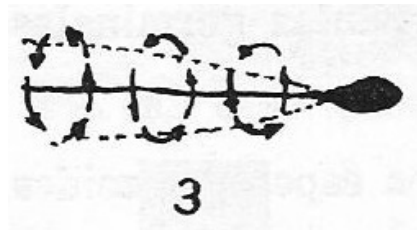
1) Movimiento rectilíneo: Por la energía que poseen los espermatozoides, consiguen la máxima proyección hacia adelante. Este movimiento se observa en un semen de alta viabilidad y elevado índice de fertilidad.



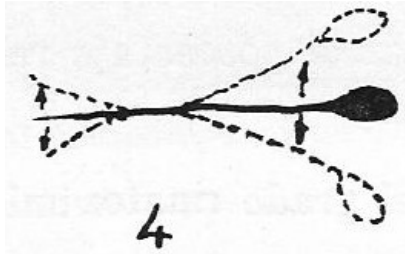
2) Movimiento zigzagueante: el avance hacia delante se efectúa siguiendo un recorrido vacilante, con frecuentes curvas y tanteos a ambos lados.



3) Movimientos circulares: Con velocidad reducida, el espermatozoide describe círculos en forma de espirales, como si hubiese perdido el rumbo de su recorrido.



4) Movimiento oscilatorio: Las células germinales prácticamente no cambian de sitio, pero hacen movimientos reducidos hacia ambos lados. Colean sin avanzar, siendo esta la forma de movimiento que antecede a la inmovilización completa.



Conviene tener presente que el movimiento rectilíneo es fundamental para la fecundación, ya que es el único progresivo. Este movimiento, con las contracciones de los cuernos y oviductos, permite a los espermatozoides llegar en pocos minutos a las trompas uterinas.

5.6.2.4. Morfología espermática

La mayoría de los mamíferos presentan generalmente una población espermática morfológicamente homogénea (Sancho y *col.*, 1998; Gago y *col.*, 1999), pero existe cierta heterogeneidad tanto en un mismo eyaculado (Hartmann y *col.*, 1964) como entre individuos (Menkveld y *col.*, 1990; Soler y *col.*, 2005).

Con posterioridad a esa fecha, se estableció otro criterio de clasificación basado en el aspecto de los espermatozoides encontrados en el moco postcoital (Fredricsson y Sennerstam, 1984), o en la zona superior del canal endocervical (Kruger y *col.*, 1987). Estas muestras presentaban un aspecto homogéneo, en contraste con poblaciones espermáticas heterogéneas encontradas próximas al orificio cervical externo. En varios trabajos, se puso de manifiesto que con la migración de los espermatozoides a través del moco cervical se produce una selección morfológica que conduce a una población espermática relativamente homogénea (Fredricsson y Björk, 1977; Hanson y Overstreet, 1981; Ragni y *col.*, 1985).

El estudio de la morfología se ha visto generalmente afectado por numerosos factores, como son la forma de realizar la extensión y tipo de tinción empleada, la zona del portaobjeto que se lee al microscopio, los criterios que se siguen y la subjetividad del propio observador. La OMS (WHO, 1980) desde que publicó el primer manual basado en el sistema de calificación de MacLeod (1970), ha intentado estandarizar e interpretar la morfología, publicando nuevas versiones del mismo.

Por otro lado, desde 1988 el grupo Tygerberg (Sud-Africa) ha publicado varios estudios utilizando criterios más estrictos que los de la OMS (Kruger y *col.*, 1988).

5.6.2.5. Alteraciones morfológicas

Algunas de las morfoanomalías de los espermatozoides son de origen genético, es el caso de la globozoospermia, patología que impide la formación de las estructuras acrosomales de la cabeza del espermatozoide (Check y *col.*, 1993); y la presencia de espermatozoides acéfalos o con uniones anormales entre la cabeza y el cuello, como consecuencia de alteraciones en la espermiogénesis. Chemes y *col.* (1999) indicaron su posible origen genético por el fenotipo característico de la patología y por su incidencia entre varones de la misma familia. Previamente, otros autores ya habían descrito este tipo de alteración en la especie bovina y en otras especies animales (Bloom y Birch, 1970; Chemes y *col.*, 1987; Baccetti y *col.*, 1989). Baccetti y *col.* (2002) demostraron que la teratozoospermia severa era concomitante con patologías andrológicas tales como el varicocele, criptorquidia e infecciones seminales, y observaron que la mayoría de las alteraciones genéticas estaban relacionadas con problemas de consanguinidad.

Muchas de ellas conllevan esterilidad en los machos y parecen ser debidas a mutaciones autonómicas recesivas: “síndrome de deficiencia de los brazos de dineína” (Edwards y *col.*, 1989; Walter y *col.*, 1990), “síndrome del flagelo atrofiado” (Chemes y *col.*, 1998), “cabeza redonda” (Check y *col.*, 1993), “miniacrosoma” (Baccetti y *col.*, 1991) y “acéfalos” (Chemes y *col.*, 1999). Estas alteraciones afectan a orgánulos del flagelo, a la conexión entre la cabeza y la pieza intermedia, vaina de fibras, túbulos del axonema, fibras accesorias y estructuras acrosomales.

Como consecuencia, los espermatozoides son inmóviles o muestran una movilidad alterada.

En otras ocasiones, las alteraciones morfológicas son consecuencia de distintas situaciones patológicas como la hiperprolactinemia (Laszcynska y *col.*, 1992), así como por el efecto negativo de algunos agentes externos: plomo ambiental (Kaur y Prashad, 1994), 2,4-diclorofenoxacético (Garabrant y Philbert, 2002) y en general, a todos compuestos tóxicos para el sistema reproductor.

Las morfoanomalías se pueden clasificar en diversas categorías:

- Forma o tamaño de la cabeza: grande, pequeña, alargada, redonda, amorfa, vacuolaza, de alfiler y dobles cabezas.
- Defectos del cuello o pieza intermedia: incluye ausencia de flagelos, angulados, gruesos y vacuolados.
- Defectos del flagelo: cortos, múltiples, rotos, angulados, en horquilla y enrollados.

Además se incluyen todas las posibles combinaciones (OMS, 1999). Los espermatozoides morfológicamente anormales, a menudo presentan múltiples defectos. Para informar de este tipo de alteraciones sin priorizar las de la cabeza sobre las de la pieza intermedia, ni éstas sobre las del flagelo, durante los últimos

años se viene empleando el índice de teratozoospermia que se define como: el número de anomalías dividido por el número de espermatozoides anormales. Este índice se utiliza como predictor de la función espermática in vivo e in Vitro.

Un eyaculado de morueco se considera normal cuando el porcentaje de formas anormales es inferior al 15% (Abraham, 1987; Maxwell y Evans, 1990). Existen variaciones en la morfología espermática debido al estrés, factor individual, temperatura, estación del año, etc. (Smith y Sherman, 1994).

Diversos investigadores han descrito una amplia variedad de anomalías morfológicas del espermatozoide (Figura 9). En general, cualquier desviación morfológica de la estructura normal del espermatozoide se ha considerado como anormal o anomalía espermática. Dichas conclusiones confirman el potencial de fertilidad de los moruecos (Williams y Savage, 1925; Lagerlöf, 1934).

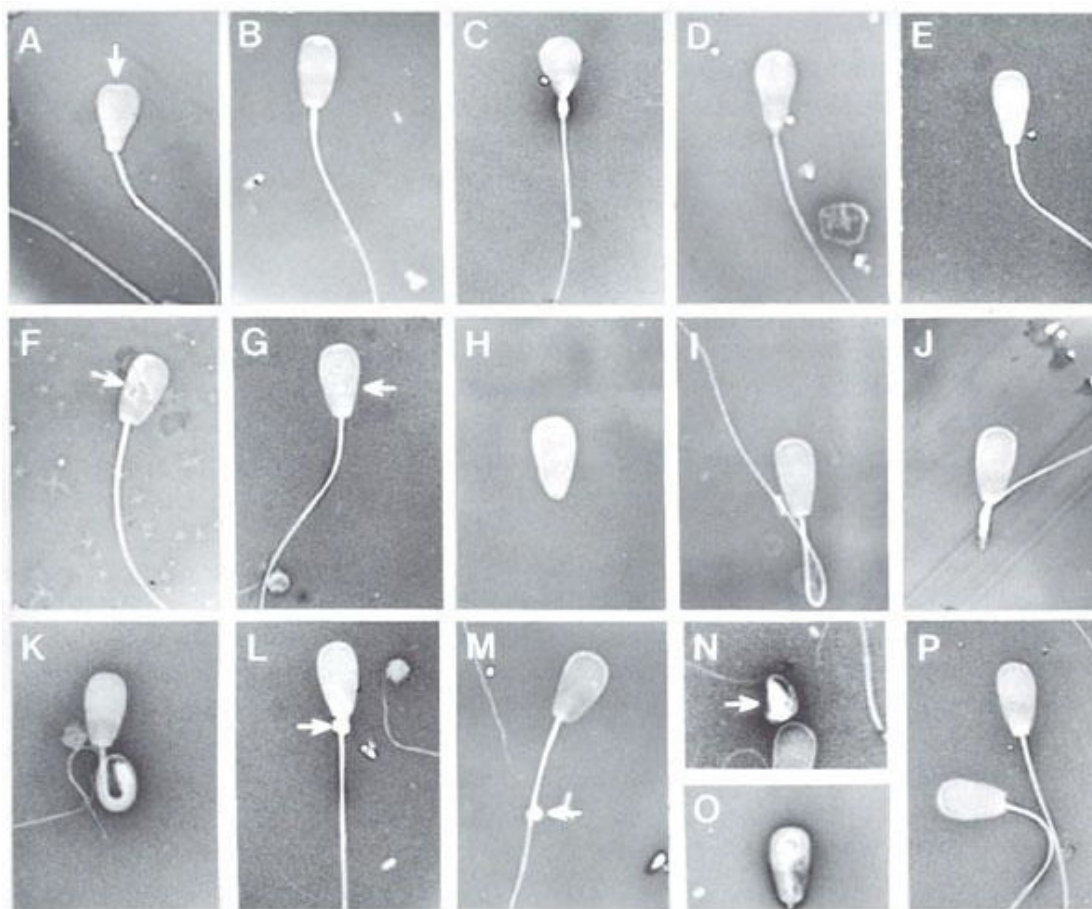


Figura 9. Espermatozoides normales y algunas formas anormales. A-Sin acrosoma (forma común). B- Sin apenas acrosoma. C- Con cabeza piriforme cabeza. D- Con cabeza piriforme moderada. E- Con cabeza piriforme leve. F- Con vacuolas. G-Defectos en la membrana. H- Sin flagelo. I- Reflejo distal. J- Parte media rota. K- Parte media severamente doblada. L- Gota proximal. M- Gota distal. N- Teratoride grave. O-Teratoideo moderado. P-Espermatozoide normal (Barth y col., 1989).

5.6.2.6. Morfometría del espermatozoide

Los primeros analizadores computerizados de morfología espermática (CASMA) aparecieron en el mercado en los años noventa del pasado siglo. Uno de ellos, el Sperm-Class Analyser® (SCA), resultó útil en el análisis morfológico de las muestras de semen humano, tanto de la cabeza como de la pieza intermedia. Los sistemas ASMA analizan de forma objetiva una serie de parámetros morfométricos que pueden ser usados para definir un espermatozoide con morfología “normal” de forma equivalente a como lo haría un técnico especializado. No obstante, la mayor ventaja de estos instrumentos no es la sustitución de los técnicos, sino el hecho de que aportan parámetros métricos objetivos que pueden reflejar de forma mucho más interesante la realidad de la muestra seminal que la valoración subjetiva de lo que consideramos un espermatozoide normal (Katz y *col.*, 1986).

Anteriormente al desarrollo de estos sistemas, la morfología espermática se determinaba mediante la observación al microscopio de las muestras previamente teñidas o fijadas. Un incremento de las anomalías morfológicas de los espermatozoides de un eyaculado está asociado en humanos (Kruger y *col.*, 1988), caballos (Jasko y *col.*, 1990), machos cabríos (Chandler y *col.*, 1988), toros (Saake y *col.*, 1970) y ciervos (Malo y *col.*, 2005) con una disminución de las tasas de fertilidad. Además en los toros, se relaciona con variaciones estacionales de la fertilidad (Sekoni y *col.*, 1987) y con problemas hereditarios de infertilidad (Hafez y *col.*, 1987). La morfología defectuosa de los espermatozoides también se ha asociado con pérdida embrionaria temprana (DeJarnette y *col.*, 1992) y reducida capacidad para encontrar el ovocito (Kolt y *col.*, 1987). Sin embargo, en numerosas ocasiones no se ha encontrado una relación clara entre “normalidad” morfológica de la muestra espermática y fertilidad. Esta falta de relación entre ambos parámetros se ha atribuido a los resultados tan variables que se obtienen de la evaluación subjetiva empleada para la clasificación de la morfología espermática (Davis y *col.*, 1995).

Con objeto de reducir la subjetividad de este tipo de evaluaciones se desarrollaron, como ha quedado referido anteriormente, los sistemas CASMA o ASMA. Estos sistemas han sido aplicados para analizar de manera eficaz la morfometría de la cabeza espermática en hombre y caballo (Davis y *col.*, 1993; Kruger y *col.*, 1996), macho cabrío, conejo, rata, toro y morueco (Gravance y *col.*, 1994, 1995, 1996 y 1998; Sancho y *col.*, 1998) y cerdo (Hirai y *col.*, 2001). Para ello, se han tenido que estandarizar previamente las condiciones de uso de los sistemas para las referidas especies.

Además, en algunas de ellas, como la humana (Kruger y *col.*, 1993), la equina (Casey y *col.*, 1997) y la porcina (Hirai y *col.*, 2001), se han encontrado relaciones significativas entre los valores de las dimensiones espermáticas, determinados por el sistema ASMA y las tasas de fertilidad. Esto ha permitido en estas especies establecer las medidas de los espermatozoides “normales” y “anormales” en base a la

fertilidad de los donantes de los mismos. Por tanto, los sistemas ASMA son capaces de diferenciar las medidas espermáticas normales de los espermatozoides procedentes de machos fértiles, de las procedentes de machos subfértiles o estériles. Esto les ha permitido convertirse en una metodología de evaluación muy interesante de cara a poder predecir la capacidad fecundante in vivo de las dosis seminales.

En el análisis morfométrico, los parámetros que se suelen medir en la cabeza del espermatozoide son el área (μm^2), el perímetro (μm), la anchura (μm), la longitud (μm), porcentaje de acrosoma y área de acrosoma (μm^2). Además, con estas medidas se obtienen otras cuatro medidas derivadas de éstas que también son de interés para este tipo de análisis, y son la elipticidad (L / W), rugosidad ($4\pi A/P^2$), elongación $((L - W) / (L + W))$, y regularidad ($\pi LW / 4A$). Estas medidas están explicadas en la figura 10.

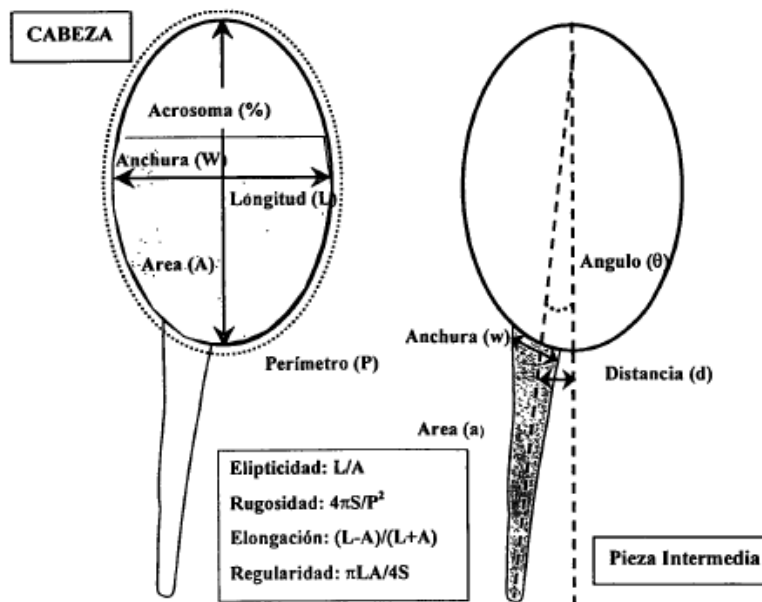


Figura 10. Parámetros morfométricos medidos en este estudio. Como parámetros primarios se considerarán: área, perímetro, longitud y anchura, como secundarios: elipticidad, rugosidad, elongación y regularidad.

A continuación se muestra una recopilación de los resultados morfométricos obtenidos en diversos estudios (Tabla 2), con sus correspondientes tratamientos. Como puede apreciarse, diversos factores pueden condicionar los resultados obtenidos, tales como el método de fijación y tinción, el objetivo empleado, el software, etc.

En los trabajos publicados hasta la fecha existe una gran amplitud en los resultados obtenidos en los diferentes parámetros morfométricos del espermatozoide de morueco y de otras especies.

Especie	Autor	Tinción	AREA (μm ²)	PERIMETRO (μm)	ANCHURA (μm)	LONGITUD (μm)
Morueco	Gravance y col, 1998	MGZIN(HH-RB)	29.050	24.310	4.790	8.060
		HH	28.120	22.080	4.650	7.890
	Maroto-Morales y col, 2010	Hemacolor	35.020	2.680	4.790	8.900
Ciervo	Soler y col, 2005	Hemacolor	32.570	22.830	4.700	8.200
		HH	30.670	22.200	4.510	8.040
		Diff-Quik	28.380	21.110	4.420	7.670
Alpaca	Buendia y col, 2002	Hemacolor	15.950	15.110	3.620	6.100
Toro	Boersma y col, 2001	PAP	35.500	25.100	4.700	9.100
		PAP+	35.000	24.800	4.700	9.000
		FAR	40.200	26.600	5.100	9.600
		HEM	35.100	24.900	4.700	9.100
		SPER	39.300	26.700	5.100	9.900
		MGZIN	34.700	25.200	4.700	9.000
	Gravance y col, 1999	HH+Rbengala	29.450	23.800	4.460	8.720
	Gravance y col, 2009	MGZIN				
		(Fresco)	29.660	23.970	4.550	8.670
		(Descongelado)	29.130	23.120	4.390	8.450
	Gravance y col, 1996	HH/GZINmod(27.300	25.360	4.400	8.650
		HH+rosa bengala)				
	Beletti y col, 2005	Azul toluidina	32.900	22.300	4.600	8.900
Cabra	Gravance y col, 1997	HH				
		(Fresco)	19.670	18.620	3.770	7.000
		(Descongelado)	20.570	18.830	3.870	7.130
	Hidalgo y col, 2006	Diff-Quik	29.020	22.200	4.160	8.470
		Hemacolor	28.310	22.210	4.030	8.380
		HH	25.030	20.620	3.710	8.030
	Marco-Jiménez y col, 2006	Hoescht 333				
		(Fresco)	23.890	20.810	3.480	8.160
		(Refrigerado)	23.590	20.770	3.490	8.010
		(Descongelado)	23.440	20.630	3.420	8.000
	Gravence y col, 1995	HH	22.820	20.150	3.800	7.690

Tabla 2. Resultados morfométricos de distintos estudios.

5.6.2.6.1. *Evaluación morfométrica del acrosoma*

El acrosoma es esencial para la función espermática. Para completar el proceso natural de la fecundación, los espermatozoides deben tener movilidad, capacitarse y desarrollar la reacción acrosómica para atravesar la zona pelúcida. El estudio de la morfometría del acrosoma puede tener una relevancia funcional. Liu y Baker (1988) y Menkveld y *col.* (1996) demostraron que la morfología normal del acrosoma se correlaciona significativamente con la unión del espermatozoide a la zona pelúcida, mientras que Franken y *col.* (1997) demostraron que existe una fuerte relación entre la morfología espermática normal y la capacidad de inducir la reacción acrosómica. En humana se ha demostrado que existe una relación entre el tamaño del acrosoma y la funcionalidad, observando que los espermatozoides con acrosomas pequeños tenían más probabilidad de morir y de perder el acrosoma de manera no fisiológica (Menkveld y *col.*, 2003). También en nuestra especie, el porcentaje de espermatozoides con tamaños del acrosoma normal (40–70% del área total de la cabeza), se ha correlacionado con la probabilidad de fecundación (El-Ghobashy y West, 2003).

La evaluación de la morfometría del acrosoma requiere una tinción diferencial de los espermatozoides, solamente conseguida de manera que permita el análisis morfométrico en algunas especies, como la humana y canina. Una técnica de tinción debe causar el menor cambio a las dimensiones y forma de los espermatozoides; a fin de evaluar de forma fiable las características morfométricas.

Diversas técnicas han sido empleadas en el estudio sobre la morfometría del acrosoma en humano como: SpermBlue®, Papanicolaou, Rapidiff (Menkveld y *col.*, 2003, Maree y *col.*, 2010;), y Multi ZSC (Lampiao y *col.*, 2006). En animales hay algún estudio sobre la morfometría del acrosoma en perro (Nuñez –Martínez y *col.*, 2006). En las tablas 3, 4 y 5 se muestran los resultados morfométricos del acrosoma obtenidos en estos estudios. Sin embargo en otras especies de animales domésticos, como la ovina, no es posible realizar el análisis morfométrico del acrosoma utilizando las técnicas actuales.

Los resultados de estos estudios muestran que el tamaño acrosomal refleja la capacidad funcional del espermatozoide y por lo tanto el potencial de fertilidad. Además, los espermatozoides con acrosomas pequeños son más susceptibles a la muerte celular.

	L. Maree y col., 2010				G. van der Horst y col., 2009
Tratamiento	Papanicolaou	Rapidiff	SpermBlue	Fresco	SpermBlue
N° muestras semen	24	24	24	5	10
Longitud (µm)	4,28±0,27	5,17±0,27	4,73±0,27	4,79±0,26	4,71±0,25
Anchura (µm)	2,65±0,19	3,12±0,21	2,75±0,24	2,82±0,23	2,78±0,23
Área (µm²)	9,26±0,99	12,87±1,19	10,47±1,21	-	10,50±1,11
Perímetro (µm)	11,83±0,69	14,33±0,75	12,99±0,80	-	12,98±0,77
Elipticidad	1,63±0,11	1,68±0,10	1,75±0,13	1,73±0,12	1,72±0,12
Elongación	0,23±0,03	0,25±0,03	0,27±0,03	0,26±0,03	0,26±0,03
Rugosidad	0,83±0,02	0,79±0,02	0,78±0,03	-	0,78±0,02
Regularidad	0,96±0,01	0,98±0,01	0,97±0,02	-	0,98±0,20
% Acrosoma	32,76±7,43	23,73±7,97	46,29±8,63	-	50,67±6,71

Tabla 3. Resultados morfométricos de la especie humana.

Tamaño del acrosoma	Muerte del espermatozoide antes de la reacción acrosómica (%)	Muerte del espermatozoide después de la reacción acrosómica (%)
Pequeño (> 40%)	78,3±13,8	79,1±12,9
Normal (40-70%)	43,5±6,8	43,8±8,1
Grande (< 70%)	40,4±18,1	44,4±16,3

Tabla 4. Porcentaje de muerte del espermatozoide antes y después de la reacción acrosómica según el tamaño del acrosoma. Especie humana. (R. Menkveld y col., 2003).

Parámetros	Resultados	Nº total espermatozoides analizados
Longitud (µm)	5,2-5,7	2359
Anchura (µm)	3,3-3,6	
Área (µm ²)	14,5-16,6	
Perímetro (µm)	15,1-16,5	
Área Acrosoma (%)	50,5-64,1	

Parámetros	Resultados	Nº total espermatozoides analizados
Longitud (µm)	5,2-5,7	2359
Anchura (µm)	3,3-3,6	
Área (µm ²)	14,5-16,6	
Perímetro (µm)	15,1-16,5	
Área Acrosoma (%)	50,5-64,1	

Tabla 5. Resultados morfométricos de la especie canina (Núñez-Martínez y col., 2006).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Reactivos

A menos que se indique lo contrario, todos los productos químicos utilizados se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.), y los diluyentes se prepararon con agua Milli-Q (Millipore Ibérica SA, Barcelona, España).

6.2. Recogida, dilución y manipulación seminal

Los eyaculados se obtuvieron a partir de una vagina artificial, de 10 machos diferentes de raza aragonesa, gracias al Centro Nacional de Selección y Reproducción Animal (**ATP-SYRA**) de Movera (**Zaragoza**), y se procesaron inmediatamente después de la licuefacción. De cada muestra se analizó la concentración, el porcentaje de células con morfología normal y de cada grado de movilidad. Todos los procedimientos con animales se realizaron conforme al Reglamento de Protección Animal Español RD223/1988, que se ajusta al Reglamento de la Unión Europea 86/609. El semen se recogió mediante una vagina artificial de 10 machos adultos Rasa Aragonesa en un tiempo de menos de 30 minutos, estabulados en el un manejo regular de extracciones seminales.

Como paso previo a la recogida del semen, se procedió a atemperar todo el material, que sirvió para recoger los eyaculados de los moruecos para evitar el choque térmico. Este atemperado se realizó mediante el almacenamiento de los materiales en una cámara a 37°C (Figura 11).



Figura 11. Estufa calefactora

Tras la recogida, el semen se diluyó con leche de vaca, (UHT) (0,7% de grasa) y con antibióticos (Penicilina-Streptomicina SIGMA 100x 10 µl/ml) a razón de 1: 3 partes de semen/diluyente, respectivamente (Figura 12). Éste se había sumergido previamente en un baño maría a unos 30 °C para evitar el choque térmico.



Figura 12. Dosis de espermatozoos ya diluido (4ml: 1ml semen - 3 ml diluyente)

Los primeros eyaculados se desecharon para eliminar posibles células muertas e impurezas. Después se recogieron los segundos eyaculados que son los que se analizaron. Tras anotar el volumen de eyaculado e inmediatamente después de haber sido recogida la muestra se procedió a añadirlo al diluyente. Las muestras se conservaron a 15°C en un Equitainer® para su posterior análisis en el laboratorio.

El análisis se realizó en el laboratorio del departamento de Producción Animal de la E.P.S. de Huesca, dentro de las primeras 4 h de almacenamiento. Primero se realizó una evaluación de la movilidad, descartando aquellas muestras por debajo de un 70% para este parámetro. Después se midió la concentración espermática, utilizando un sistema de análisis espermático asistido por ordenador (CASA) (ISAS®, Versión 1.0, PROISER, Valencia, España), tras haber colocado una muestra (5 µl) de semen diluido en una cámara de Burker por duplicado. La concentración final se ajustó hasta los 100 x 10⁶ espermatozoides / ml con una solución de PBS.

6.3. Preparación de las muestras para la evaluación morfométrica

De cada muestra se tomaron cinco alícuotas para realizar los diferentes tratamientos que se describen más adelante y se analizaron cada una de ellas por duplicado, con el objetivo de 40 aumentos con y sin filtro de contraste de fases. Para cada variante se analizaron 200 espermatozoides.

De cada muestra se realizaron 10 frotis. En un portaobjetos se extendieron 5 µl de la muestra de semen diluida y se dejó secar durante 24 horas como mínimo. Cuando los frotis ya estaban secos, se realizaron 5 tratamientos (2 frotis cada uno): 1) simple lavado con agua destilada; 2) tinción con el kit de hemacolor durante dos minutos y medio cada colorante; 3) tinción con Spermblye durante diez minutos en el fijador y quince minutos el segundo ; 4) fijación con 50% de metanol durante tres minutos; y 5) fijación con 2% de glutaraldehído en PBS durante dos minutos. Tras los tratamientos 2 a 5, todas las muestras se lavaron con agua destilada y se dejaron secar al aire. (Figura 13).

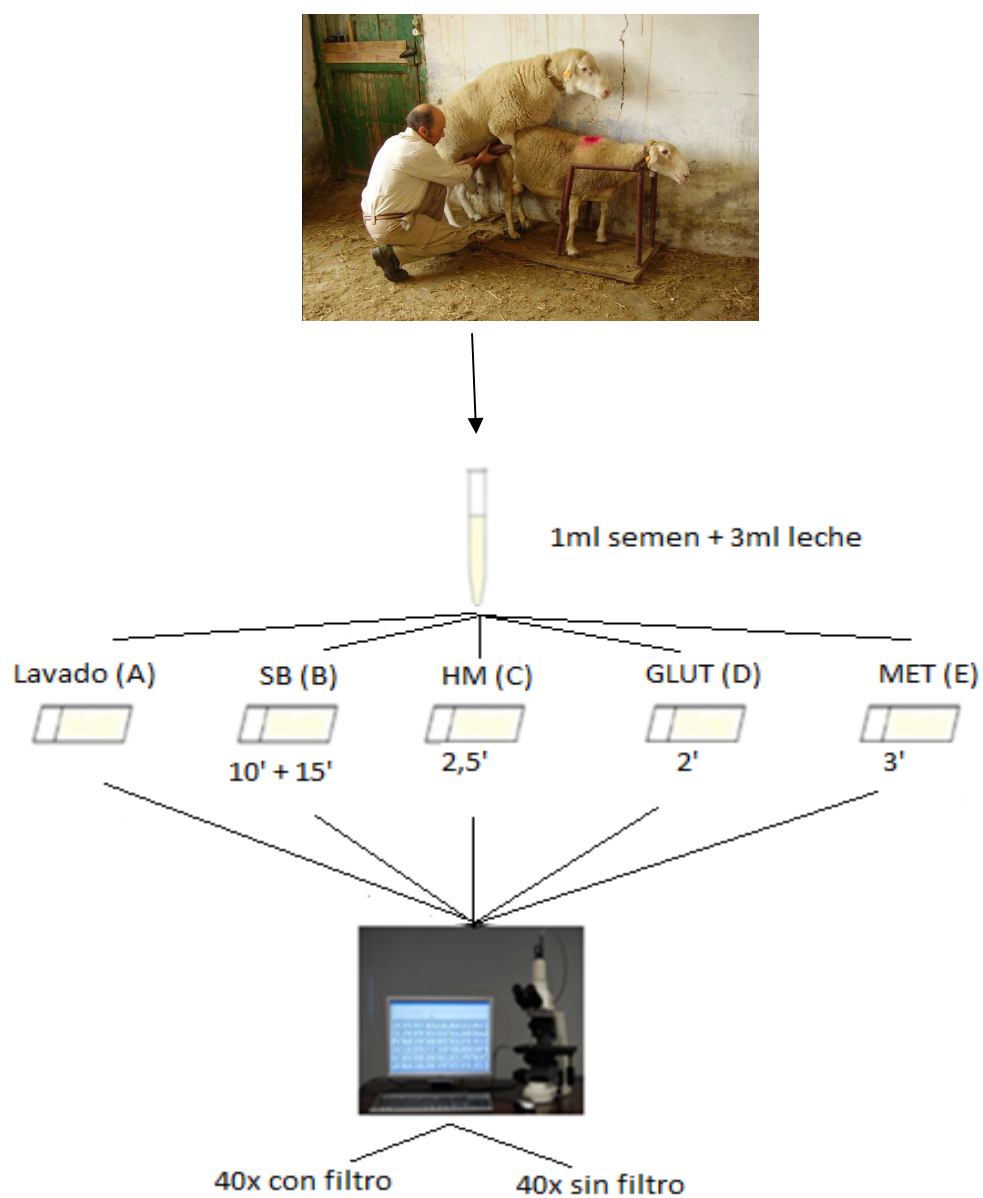


Figura 13. Protocolo seguido para la preparación de las muestras.

6.4. CASMA

Como ya se ha comentado, los frotis se tiñeron, se fijaron y se lavaron y se examinaron con un microscopio Olympus BX40. Todas las muestras se analizaron con el objetivo de 40 aumentos, con y sin filtro el de contraste de fases. La señal de vídeo fue procesada con el Integrated Semen Analysis System (ISAS[®]) (Figura 14) sistema basado en el análisis del esperma (CASMA), que es un estudio seminal, el cual examina informaticamente imágenes de cada espermatozoide. ISAS[®] hace un análisis morfológico en el mismo momento que el de la motilidad. Es una evolución del anterior SCA[®].

De cada muestra, se capturaron 200 espermatozoides y se analizaron con el ISAS[®]. Tras el procesado de las imágenes, se descartó algunas células por una binarización defectuosa. En cada célula se midió 6 parámetros directos (área (μm^2), perímetro (μm), anchura (μm), longitud (μm), porcentaje de la cabeza ocupado por el acrosoma y área del acrosoma (μm^2) además con estas medidas se obtienen otras cuatro medidas derivadas de éstas que también son de interés para este tipo de análisis, y son la elipticidad (L / W), rugosidad ($4\pi A/P^2$), elongación ($(L - W) / (L + W)$), y regularidad ($\pi LW / 4A$). Estas medidas están explicadas en la figura 10.

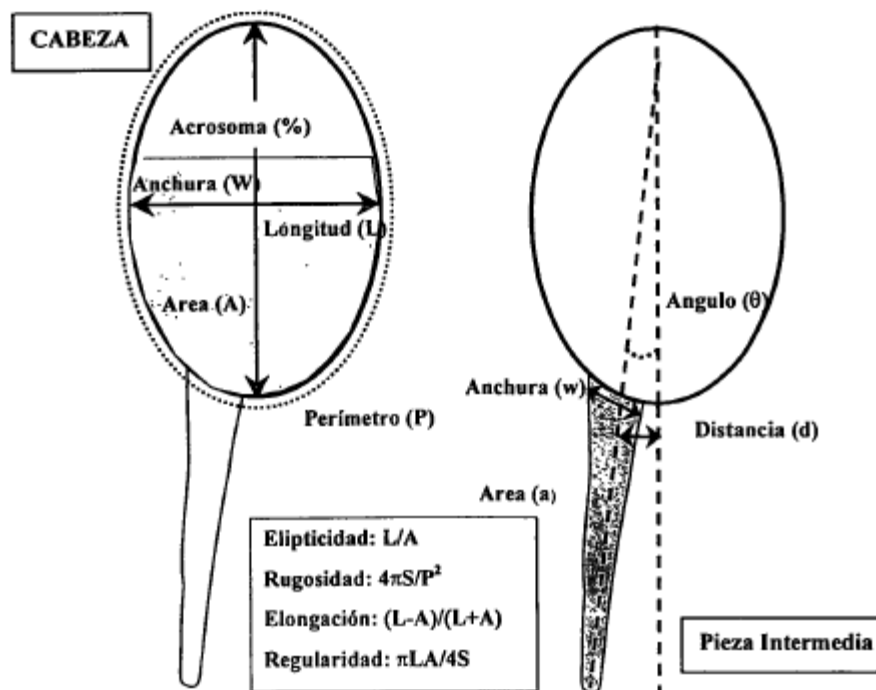


Figura 10. Parámetros morfométricos medidos en este estudio. Como parámetros primarios se considerarán: área, perímetro, longitud y anchura, como secundarios: elipticidad, rugosidad, elongación y regularidad.



Figura 14. Sistema CASA para el análisis espermático compuesto por un microscopio óptico conectado a una platina atemperada, a una cámara de video y a un software de análisis de imágenes por ordenador.

6.5. Análisis estadístico

Los valores obtenidos se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS, versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Las distribuciones de normalidad y homogeneidad de la varianza para cada grupo fueron verificados por la prueba de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Como todos los datos presentaron una distribución normal, se utilizaron siempre pruebas paramétricas. Las diferencias morfométricas de la cabeza del espermatozoide entre tratamientos se examinaron utilizando el análisis de varianza (ANOVA), utilizando modelos lineales generalizados. Si el valor de F fue significativo, una prueba de Tukey se utilizó para las comparaciones múltiples a posteriori entre los diluyentes. El nivel de significación estadística se fijó en $P > 0,05$.

7. **RESULTADOS**

En este proyecto se ha desarrollado con éxito un nuevo sistema para la evaluación morfométrica del acrosoma del espermatozoide en morueco, basado en el sistema ISAS[®]. También se ha estudiado el efecto sobre la morfometría de la cabeza y del acrosoma de distintos tratamientos: dos tinciones (Spermblue(SB) y Hemacolor (HEM)); y de tres tratamientos sin tinción: 50% metanol (MET), 2% glutaraldehído (GLUT) y simple lavado con agua destilada. Por último se han comparado el efecto de la utilización del objetivo de 40X aumentos con y sin filtro de contraste de fases sobre los resultados morfométricos.

Se han capturado y analizado un total de 20.000 cabezas de espermatozoides pertenecientes a los 10 machos (200 espermatozoides por cada macho y por cada tratamiento en este caso 5 (2 tinciones, 2 fijaciones y 1 lavado) y por el objetivo de 40 aumentos con y sin filtro.

La modificación en la óptica del microscopio permitió aumentar el contraste del acrosoma con el resto de la cabeza y su captura con un sistema CASMA comercial, realizando la captura y el análisis del mismo con una alta precisión, incluso en las muestras sin teñir (Figura 15 y 16).

La utilización del filtro de contraste de fases, lejos de mejorar la calidad de las imágenes, provocó la aparición de artefactos, con la presencia de halos alrededor de los espermatozoides. Como consecuencia, la captura de las imágenes no fue tan precisa y el filtro modificó los parámetros morfométricos obtenidos, reduciendo las dimensiones de cabeza y acrosoma (Figuras 15 y 16).

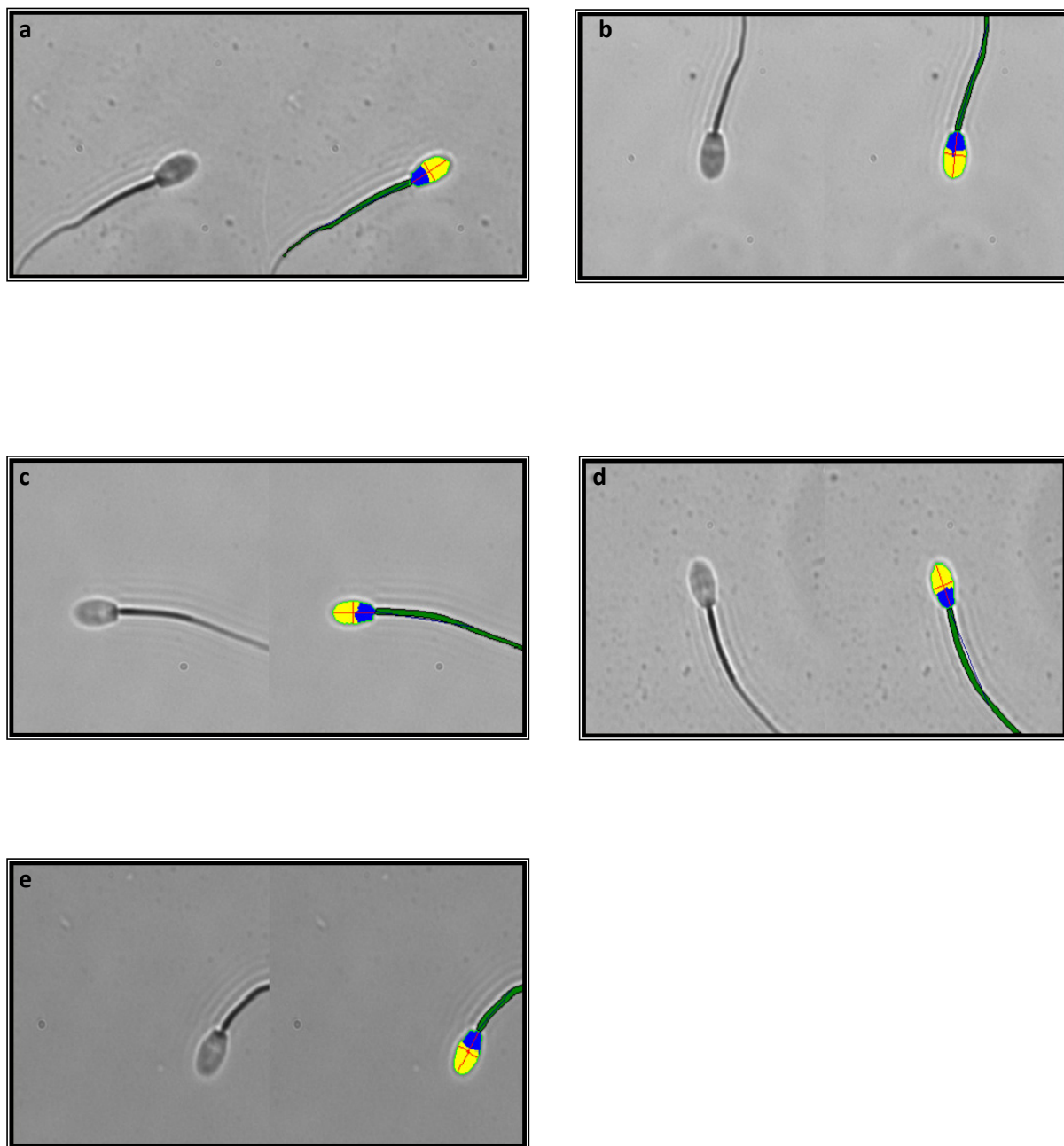
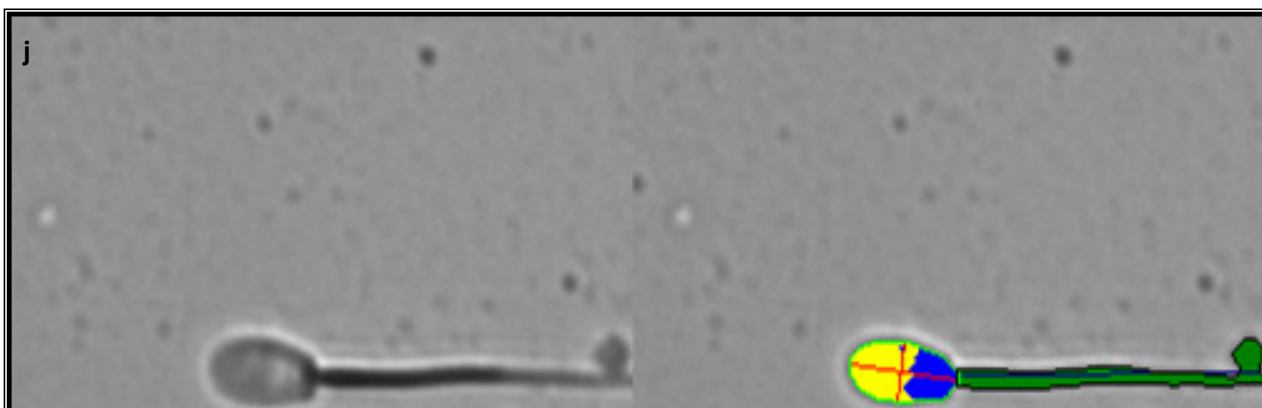
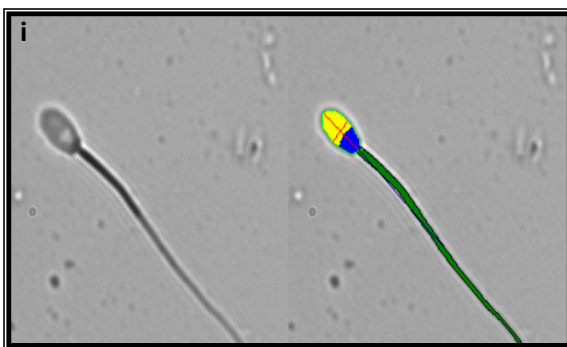
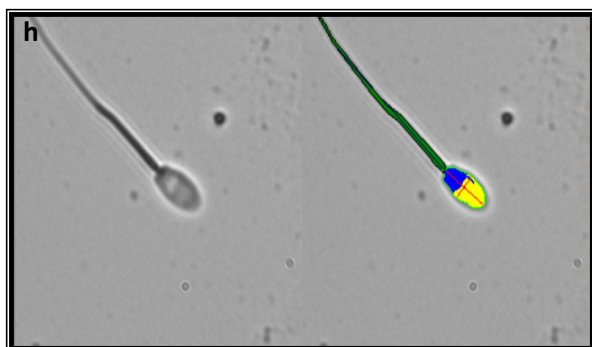


Figura 15. Espermatozoides analizados con el objetivo de 40 aumentos con filtro y lavados, teñidos y fijados con distintos tratamientos. a) tinción de SpermBlue b) tinción de Hemacolor c) lavado con agua destilada d) fijación con glutaraldehído 2% e) fijación con metanol 50%.



Figuras 16. Espermatozoides analizados con el objetivo de 40 aumentos sin filtro y lavados, teñidos y fijados con distintos tratamientos. f) tinción de SpermBlue g) tinción de Hemacolor h) lavado con agua destilada i) fijación con Metanol 50% j) fijación con Glutaraldehído 2%.

En la siguiente tabla se muestra el número de espermatozoides correctamente analizados para cada tratamiento. Independientemente de la utilización del filtro, los grupos con peores resultados fueron los fijados con glutaraldehído y metanol, por debajo del 90% de espermatozoides correctamente analizados. En el grupo lavado con agua, la captura se situó en torno al 90%, mientras que la tinción de las muestras con Hemacolor o SpermBlue permitió mejorar la proporción de espermatozoides correctamente analizados. En las muestras fijadas con glutaraldehído o metanol se observa claramente la presencia de artefactos (Figura 15 apartado d y e, Figura 16 apartado i y j), que han podido contribuir a una menor precisión en la captura

	Nº ANALIZADOS CON FILTRO	Nº ANALIZADOS SIN FILTRO
LAV	92,15%	89,00%
SB	96,10%	97,45%
HM	97,05%	89,95%
GLUT	78,30%	83,55%
MET	81,30%	87,40%
TOTALES	88,98%	89,47%

Tabla 6. Proporción de espermatozoides correctamente analizados por cada método con y sin filtro y en total.

El tratamiento de las muestras tuvo un efecto significativo sobre todas las medidas morfométricas, tal y como se aprecia en las figuras 17 y 18. Para la mayoría de los parámetros morfométricos primarios (área, perímetro, longitud y anchura de la cabeza) la relación entre tratamientos podría definirse de la siguiente manera: GLUT>HM>MET>SB>Lavado (Figura 17). Las únicas excepciones fueron la anchura de la cabeza (para la que el SB fue mayor que el MET) y la longitud, que fue similar entre el SB y el lavado.

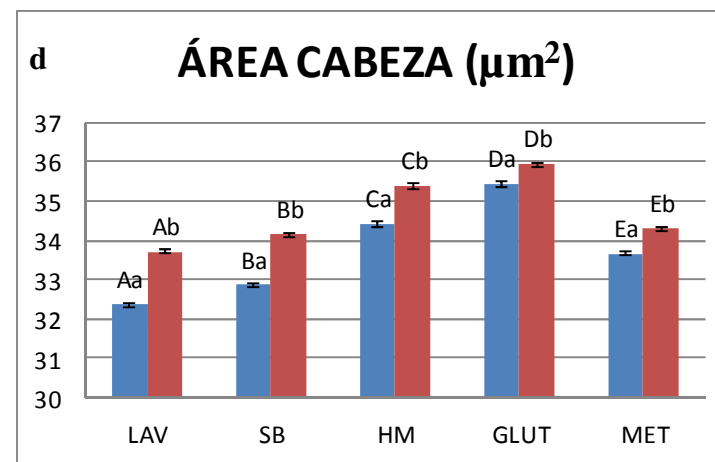
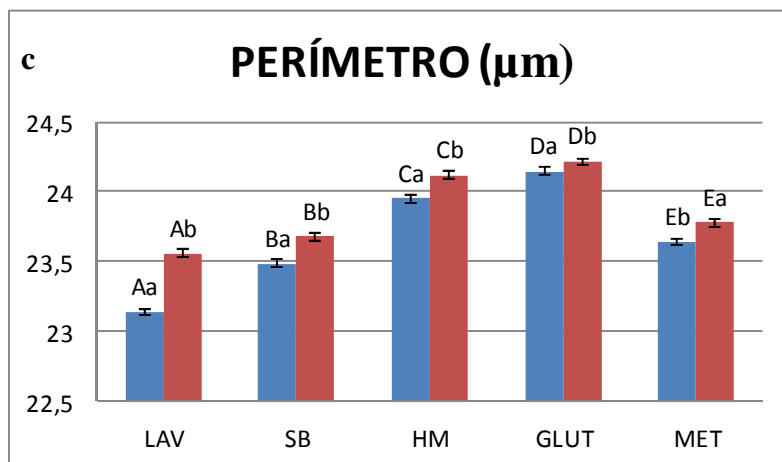
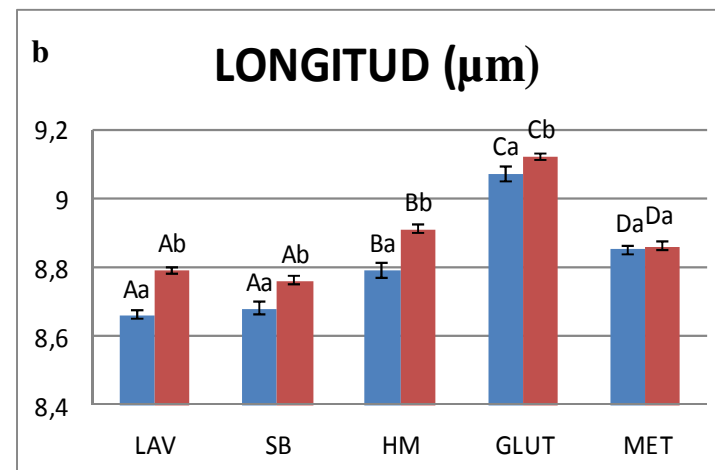
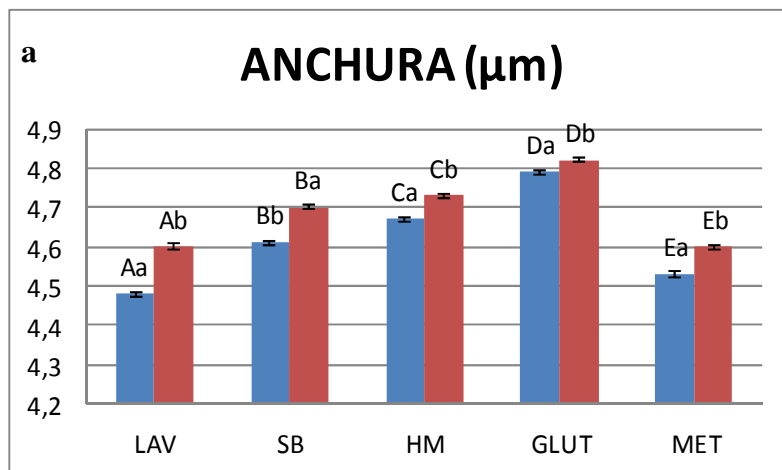


Figura 17. Resultados obtenidos para los parámetros primarios a) anchura, b) longitud, c) perímetro y d) área cabeza.
Azul: con filtro; Rojo: sin filtro.
Letras mayúsculas A- E: diferencias significativas entre métodos. Letras minúsculas a-b: diferencias significativas entre con o sin filtro.

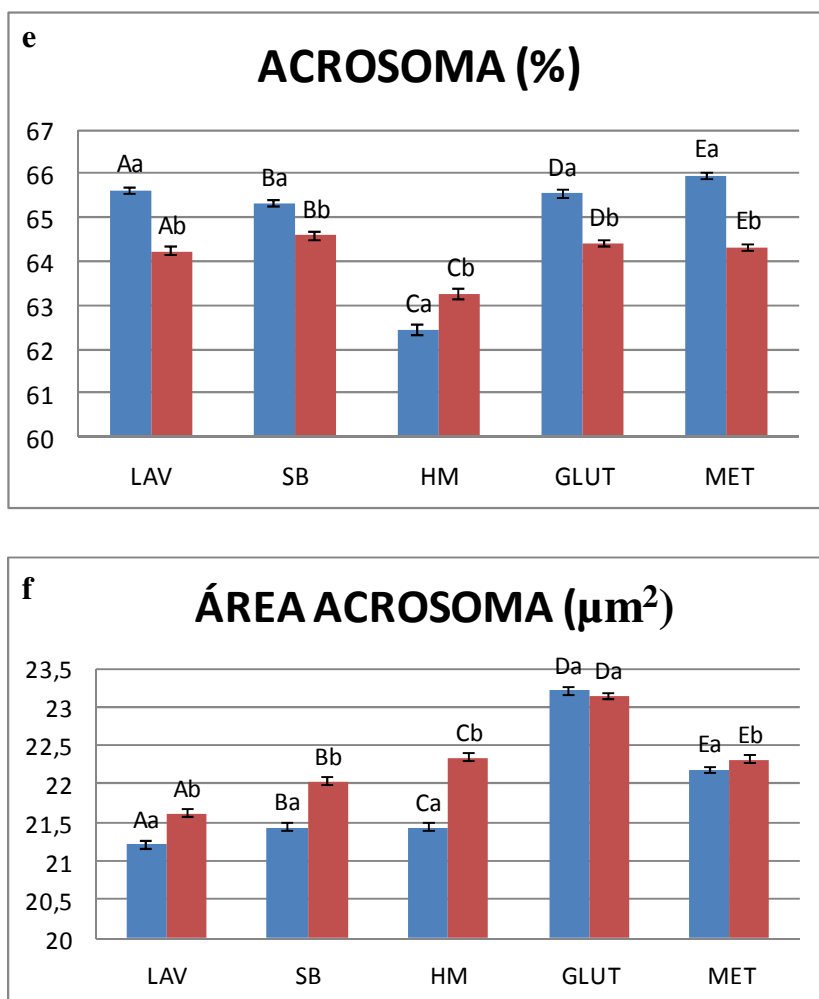


Figura 18. Resultados obtenidos para el acrosoma. e) porcentaje de acrosoma y f) área de acrosoma.

Azul: con filtro; Rojo: sin filtro

Letras mayúsculas A- E: diferencias significativas entre métodos. Letras minúsculas a-b: diferencias significativas entre con o sin filtro.

El tratamiento también tuvo un efecto claro sobre las dimensiones del acrosoma y la proporción de la cabeza ocupada por el mismo (Figura 18). Para el área del acrosoma la relación entre los distintos métodos fue muy parecida a la descrita para los parámetros primarios de la cabeza espermática, excepto que la relación entre el Hemacolor y el metanol se invirtió. Cuando estudiamos la proporción de la cabeza del espermatozoide cubierta por el acrosoma, la relación entre tratamientos fue la siguiente: SB>GLUT>MET>Lavado>HM.

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha desarrollado y estandarizado un nuevo método asistido por ordenador (CASMA) que permite por primera vez el estudio simultáneo de la cabeza y el acrosoma espermáticos en morueco. Los sistemas de análisis de la morfometría espermática asistida por ordenador (CASMA o ASMA, computer assisted sperm morphometry analysis); (Davis y *col.*, 1992; Kruger y *col.*, 1993) se desarrollaron para reducir la subjetividad de la evaluación de la morfología espermática. Se ha demostrado en algunos estudios que existen relaciones entre las dimensiones de la cabeza espermática evaluada mediante sistemas CASMA y la fertilidad en caballos (Casey y *col.*, 1997), toros (Sailer y *col.*, 1996; Ostenmeier y *col.*, 2001) y verracos (Hirai y *col.*, 2001), aunque en otros trabajos esta relación no era tan clara (Gravance y *col.*, 2009; Marco-Jiménez y *col.*, 2006).

Los métodos clásicos de tinción y análisis CASMA solamente han permitido evaluar la morfometría del acrosoma en unas pocas especies, como la humana (Soler y *col.*, 2003; Falzone y *col.*, 2010) y la canina (Nuñez y *col.*, 2005). Estas medidas requieren una distinción clara de los límites y un buen contraste entre los de las diferentes partes del espermatozoide, que es difícil de alcanzar en algunas especies, como la ovina. Sin embargo, el acrosoma es esencial para la función espermática. Para completar el proceso natural de la fecundación, los espermatozoides deben tener movilidad, capacitarse y desarrollar la reacción acrosómica para atravesar la zona pelúcida. Por lo tanto, el estudio de la morfometría del acrosoma puede tener relevancia funcional Liu y Baker (1988) y Menkveld y *col.* (1996) demostraron que la morfología normal del acrosoma se correlaciona significativamente con la unión del espermatozoide a la zona pelúcida, mientras que Franken y *col.* (1997) demostraron que existe una fuerte relación entre la morfología espermática normal y la capacidad de inducir la reacción acrosómica. En la especie humana se ha demostrado que existe una relación entre el tamaño del acrosoma y la funcionalidad, observando que los espermatozoides con acrosomas pequeños tenían más probabilidad de morir y de perder el acrosoma de manera no fisiológica (Menkveld y *col.*, 2003). También en nuestra especie, el porcentaje de espermatozoides con tamaños del acrosoma normal (40–70% del área total de la cabeza), se ha correlacionado con la probabilidad de fecundación (El-Ghobashy y West, 2003).

Para conseguir realizar una evaluación morfométrica del acrosoma espermático en morueco, en este trabajo hemos seguido un doble enfoque. Por un lado se ha modificado la óptica del microscopio buscando aumentar el contraste entre la cabeza y el acrosoma. Por otro lado se han comparado diferentes tratamientos sobre las muestras con el mismo objetivo. De los resultados se concluye que la modificación de la óptica permite capturar el acrosoma con bastante eficiencia en frotis lavados con agua destilada. La fijación con glutaraldehído o metanol empeoró los resultados

de captura, posiblemente debido a la mayor presencia de artefactos, que pudieron contribuir a una menor precisión en la captura. La tinción con Hemacolor y Spermbblue permitió mejorar la proporción de espermatozoides correctamente analizados, por lo que lo óptimo sería combinar la modificación de la óptica del microscopio y uno de estos dos tratamientos.

Los principales limitantes de los sistemas CASMA son que requieren mucho tiempo y que los resultados son variables en función de numerosos factores. Entre los factores de variación tenemos la preparación de las muestras, la fijación y tinción de los espermatozoides, los ajustes del programa informático de análisis, etc. (Davis y Gravance, 1993; Holt y *col.*, 1994; Gravance y Lewis, 1995; Gravance y *col.*, 1995, 1998; Sancho y *col.*, 1998; Boersma y *col.*, 1999, 2001; Verstegen y *col.*, 2002, Hidalgo y *col.*, 2005, Yániz y *col.*, 2012). Para reducir esta variabilidad, se han hecho algunos esfuerzos de estandarización de la metodología en algunas especies (Gravance y *col.*, 1998; García Herreros y *col.*, 2006; Maroto Morales y *col.*, 2009). Al igual que en el resto de medidas morfométricas de la cabeza del espermatozoide, el tratamiento tuvo en el presente trabajo un efecto importante sobre las dimensiones del acrosoma y la proporción de la cabeza ocupada por el mismo.

En conclusión, en este Trabajo Fin de Carrera se ha desarrollado y estandarizado un nuevo método asistido por ordenador que permite por primera vez el estudio simultáneo de la cabeza y el acrosoma espermáticos en morueco. Este método abre nuevas posibilidades para la realización de estudios funcionales, y para la selección de machos y eyaculados en inseminación artificial.

9. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este estudio, expuestos en este documento, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Se ha desarrollado y estandarizado un método, basado en la modificación de la óptica del microscopio y en tratamientos sobre las muestras, que permite por primera vez el estudio de la morfometría de la cabeza y el acrosoma espermáticos en la especie ovina.
2. . La utilización del filtro de contraste de fases, lejos de mejorar la calidad de las imágenes, provocó la aparición de artefactos, con la presencia de halos alrededor de los espermatozoides. Como consecuencia, la captura de las imágenes no fue tan precisa y el filtro modificó los parámetros morfométricos obtenidos, reduciendo las dimensiones de cabeza y acrosoma.
3. Independientemente de la utilización del filtro, los grupos con peores resultados fueron los fijados con glutaraldehído y metanol, por debajo del 90% de espermatozoides correctamente analizados. En el grupo lavado con agua, la captura se situó en torno al 90%, mientras que la tinción de las muestras con Hemacolor o SpermBlue permitió mejorar la proporción de espermatozoides correctamente analizados.
4. El tratamiento de las muestras tuvo un efecto significativo sobre todas las medidas morfométricas. Para la mayoría de los parámetros morfométricos primarios (área, perímetro, longitud y anchura de la cabeza) la relación entre tratamientos podría definirse de la siguiente manera: GLUT>HM>MET>SB>Lavado. Las únicas excepciones fueron la anchura de la cabeza (para la que el SB fue mayor que el MET) y la longitud que fue similar entre el SB y el lavado
5. El tratamiento también tuvo un efecto claro sobre las dimensiones del acrosoma y la proporción de la cabeza ocupada por el mismo. Para el área del acrosoma la relación entre los distintos tratamientos fue muy parecida a la descrita para los parámetros primarios de la cabeza espermática, excepto que la relación entre el Hemacolor y el metanol se invirtió.
6. Cuando estudiamos la proporción de la cabeza del espermatozoide cubierta por el acrosoma, la relación entre tratamientos fue la siguiente: SB>GLUT>MET>Lavado>HM.

10. BIBLIOGRAFÍA

Abraham, A., Agranz, A. (1987). Caprinotecnia, II: 1571-665.

Álvarez, J. (2003). Análisis integrado de morfología y movilidad espermática humana con el uso del sperm class analyzer. Departamento de biología funcional y antropología física. Universidad de Valencia.

Amann, RP., Hay, SR, Hammersted, RH. Yield characteristics, motility and cAMP content of sperm isolated from seven regions of ram epididymis. Biol. Reprod. 27, (1982) 723-733.

Amelar RD, Dubin L, Schoenfeld C. Sperm motility. Fertil Steril. 1980 Sep;34(3):197-215.

Baas, J.W., Molan, P.C. and Shanon, P Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 68, (1983) 275-280.

Baccetti B., Burrini A. G., Collodel G., Magnano A. R., Piomboni P., Renieri T., Sensini C. Morphogenesis of the decapitated and decaudated sperm defect in two brothers. Molecular Reproduction and Development. Volume 23, Issue 2, pages 181–188, June 1989.

Bains, H.K., Pabst, M.A. and Bawa, S.R. Changes in the lecitin binding sites of the testicular, epididymal, vas, and ejaculated spermatozoon surface of dog. Andrologia 25, (1993) 19-24.

Bedford, J.M. Sperm capacitation and fertilization in mammals. Biol. Reprod. 2, (1970) 128-158.

Bellvé, A.R. and O'Brien, D.A The mammalian spermatozoon: structure and temporal assembly. In: Mechanism and control of animal fertilization. Ed JF Hartman. Academic Press,. (1983) 55-137.

Beletti, M.E, da Fotontura, L., Palhares, M. (2005). A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile Bos taurus and Bos indicus bulls in Brazil. Animal Reproduction Science, 85:105-116.

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

Benoff, S. Preliminaries to fertilization: The role of cholesterol during capacitation of human spermatozoa. Human Reproduction. Vol 8, Issue 6, pp 2001-2006 (1993).

Bloom, E. T. and Birch Andersen, A. (1970). Ultrastructure of the decapitated sperm defect in guernsey bulls. J Reprod Fertil, 23; 67-72.

Boersma AA, Braun J, Stolla R. Infuence of random factors and two different staining procedures on computer assisted sperm head morphometry in bulls. Reprod Domest Anim 1999;34:77–82.

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

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

Bouters R, Esnault C, Salisbury GW, Ortavant R. Discrepancies in analyses of deoxyribonucleic acid in rabbit spermatozoa, involving Feulgen staining (Feulgen-DNA) and ultraviolet light absorption (UV-DNA) measurements. *J Reprod Fertil.* 1967 Dec;14(3):355-63.

Brito Leonardo F.C., Albert D. Barth, Sylvie Bilodeau-Goeseels, Paul L. Panich, John P. Kastelic. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology* 60 (2003) 1539–1551

Buendía P.; Soler C.; Paolicchi F.; Gago G.; Urquieta B.; Pérez-Sánchez F.; Bustos-Obregón E. Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm-Class Analyzer® computer-assisted system. *Theriogenology* 57 (2002) 1207-1218.

Burkman RT Jr. The role of oral contraceptives in the treatment of hyperandrogenic disorders. *Am J Med.* 1995 Jan 16;98(1A):130S-136S.

Burkman J. Characterization of Hyperactivated Motility by Human Spermatozoa During Capacitation: Comparison of Fertile and Oligozoospermic Sperm Populations. *Systems Biology in Reproductive Medicine.* 1984, Vol. 13, No. 2-3 , Pages 153-165.

Capistrós Casús S.2009. Efectos de diferentes métodos de conservación y tinción de las muestras sobre los parámetros morfométricos de los espermatozoides de morueco [proyecto de fin de carrera]. Universidad de Zaragoza.

Casey PJ, Gravance CG, Davis RO, Chabot DD, Liu IKM. Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. *Theriogenology* 1997;47:575-82.

Chandler JE, Painter CL, Adkison RW, Memon MA, Hoyt PG. Semen quality characteristics of dairy goats. *J Dairy Sci.* 1988 Jun;71(6):1638-46.

Chang, M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa into the fallopian tubes. *Nature* 168, (1951) 697.

Chemes HE, Brugo S, Zanchetti F, Carrere C, Lavieri JC. Dysplasia of the fibrous sheath: an ultrastructural defect of human spermatozoa associated with sperm immotility and primary sterility. *Fertility and Sterility* [1987, 48(4):664-9].

Cognie Y. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. Rome: FAO, 1991.

- Cooper, T.G. The epididymis, sperm maturation and fertilisation. Springer Verlag, Heidelberg. (1986).
- Cross NL, Morales P. Overstreet 3W, Hanson FW, 1986. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res* 15:2)3-26.
- Cummins, J.M. and Woodall, P.F. On mammalian sperm dimensions. *J. Reprod Fertil*. 75, (1985) 153-175.
- Davis R.O., and Gravance, C.G. Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis. *Fertil. Steril*. 59, (1993) 412-417.
- Davis R.O., Bain, D.E., Siemers, R.J., Thal, D.M., Adrew, J.B., Gravance, C.G. Accuracy and precision of the CellForm-Human automated sperm morphometry system. *Fertil Steril* 58, (1992) 763-769.
- Davis RO, Gravance CG. Automated sperm morphometry analysis (ASMA) in the rabbit. *J Androl* 1995;16:88-93.
- DeJarnette JM, Saacke RG, Bame J, Vogler CJ. Accessory sperm: their importance to fertility and embryo quality, and attempts to alter their numbers in artificially inseminated cattle. *J Anim Sci*. 1992 Feb;70(2):484-91.
- Didion BA, Dobrinsky JR, Giles JR, Graves CN. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res*. 1989;22:52-57.
- Dorado J. (2003). Respuesta a la congelación-descongelación del esperma de macho cabrío. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba, 165 pp.
- Evans G., Maxwell, W.M.C. (1987). Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworth, London, 123pp.
- Evans G., Maxwell, W.M.C. Inseminación artificial de ovejas y cabras. editorial: acribia, 1994.
- Falzone N., Huyser C., Becker P., Leszczynski D., Franken D.R. The effect of pulsed 900-MHz GSM mobile phone radiation on the acrosome reaction, head morphometry and zona binding of human spermatozoa. *International Journal of Andrology*. Volume 34, Issue 1, pages 20-26, February 2011.
- Folch J. Manejo del morueco. XXV Jornadas Científicas SEOC, Producción ovina y caprina, (2000) 61-64.
- Ford W.C.L., Rees Jackie M., Hull M. G. R. Effect of caffeine and of pentoxifylline on the motility and metabolism of human spermatozoa. *J Reprod Fertil* September 1, 1990 90 147-156.
- Franca L.R., Becker-Silva, S.C. and Chiarini-García, H. The length of the cycle of seminiferous epithelium in goats (*Capra hircus*). *Tissue and Cell* 31(3), (1999) 274-280.
- Fredricsson B. and Bjork, g., (1977). Morphology of postcoital spermatozoa in the cervical secretion and its clinical significance. *Fertil steril*, 28: 841-845.

Gago C., Pérez-Sánchez, F., Yeung, C.H., Tablado, L., Cooper, T.G., and Soler, C. (1998). Standardization of sampling and staining methods for the morphometric evaluation of sperm heads in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) using computer-assisted image analysis. *Int. J. Androl*, 21: 169–176.

Garabrant D.H., Philbert M.A. Review of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) Epidemiology and Toxicology. *Critical Reviews in Toxicology*. 2002, Vol. 32, No. 4 , Pages 233-257.

Garcia-Herreros M., Aparicio, I.M., Baron, F.J., Garcia-Marin, L.J., Gil, M.C. (2006). Standardization of sample preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. *Int J Androl*, 29: 553-63.

Ghobashy A., West C.R. The Human Sperm Head: A Key for Successful Fertilization. *Journal of Andrology*, Vol. 24, No. 2, March/April 2003.

Ginsburg KA, Moghissi KS, Abel EL. Computer-assisted human semen analysis. Sampling errors and reproducibility. *J Androl*. 1988 Mar-Apr;9(2):82-90.

Glover T.D., Barrat, C.L.R., Tyler, J.P.P. and Hennessey, J.F. Sperm production and its control, En: *Human Male Fertility and Semen Analysis*, Academic Press, London. (1990).

Gordon Ian. Controlled reproduction in sheep & goats. editorial: CAB INTERNATIONAL, 1997.

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.

Gravance C. G.; Casey M. E.; Casey P. J. Pre-freeze bull sperm head morphometry related to post-thaw fertility. *Animal Reproduction Science* 114 (2009) 81–88.

Gravance C. G.; Champion Z. J.; Casey P. J. Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology* 49 (1998) 1219-1230.

Gravance C. G.; Garner D. L.; Pitt C.; Vishwanath R.; Sax-Gravance S. K.; Casey P. J. Replicate and technician variation associated with computer aided bull sperm head morphometry analysis (ASMA). *International journal of andrology* 22 (1999) 77-82.

Gravance C. G.; Lewis K. M.; Casey P. J. Computer automated sperm head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa. *Theriogenology* 44 (1995) 989-1002.

Gravance C. G.; Vishwanath R.; Pitt C.; Casey P. J. Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. *Theriogenology* 46 (1996) 1205-1215.

Gravance C. G.; White C.; Robertson K. R.; Champion Z. J.; Casey P. J. The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of caprine sperm heads. *Animal Reproduction Science* 49 (1997) 37-43.

Gravance, CG, Vishwanath, R, Pitt, C, Garner, DL and Casey, PJ. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *J. Androl*. 19(6), (1998) 704-709.

Hafez, E.S.E. (1985). *Reproducción e inseminación artificial de animales*. 7th ed. New York.

Hafez, E.S.E. Semen evaluation. In: E.S.E. Hafez (Editor), *Reproduction in Farm Animals*, 5 th edn. Lea & Febiger, Philadelphia, (1987) 455-480.

Hanson Frederick W, Cross Nicholas L., Morales P., Overstreet James W. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Molecular Reproduction and development*. Volume 15, Issue 3, pages 213–226, November 1986.

Hartmann, G. G., Schoenfeld, C. and Copeland, E. (1964). Individualism in the seminal picture of infertile men. *Fertil Steril*, 15: 231-253.

Henricson B, Baeckstroem L. A systematic study of the meiotic divisions in normal and subfertile or sterile boars and bulls. *J Reprod Fertil*. 1964 Feb;7:53-64.

Hidalgo Manuel; Rodríguez Inmaculada; Dorado Jesús. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology* 66 (2006) 996–1003.

Hidalgo, M., Rodriguez I, Dorado J, Sanz J, Soler C. (2005). Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Vet Med*, 50: 24-32.

Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., Pérez, C., Corral, S., Sanz, J. Valoración objetiva de la morfología de la cabeza del espermatozoide del caballo de Pura Raza Bibliografía 60 Española. IV Congreso Ibérico de Reproducción Animal, Las Palmas de Gran Canaria, España, 89. (2003a).

Hirai M, Boersma A, Hoeflich A, Wolf E, Foll J, Aumüller TR, Braun J. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. *J Androl*. 2001 Jan-Feb;22(1):104-10.

Holt, W. V., Watson, P., Curri, M. and Holt, C. (1994). Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of live different systems used in a practical workshop. *Fertil Steril*, 62: 1277-1282.

Jasko DJ, Lein DH, Foote RH. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). *J Am Vet Med Assoc*. 1990 Aug 1;197(3):389-94.

Jegou, B. and Legac-Jegou, F. Androgen-binding protein in the seminal plasma of some mammalian species. *J. Endocr*. 77, (1978) 267-268.

Jeulin, C. and Lewin, L.M. Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Human. Reprod. Update*. 2, (1996).87-102.

Kaur R., Parshad V.R. Effects of dietary selenium on differentiation, morphology and functions of spermatozoa of the house rat, *Rattus rattus* L. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* Volume 309, Issue 1, 1 August 1994, Pages 29–35

Luneja L.R., Toru Kazuoka, Naomi Goto, Tsuneo Yamane, Shoichi Shimizu. Conversion of phosphatidylcholine to phosphatidylserine by various phospholipases D in

the presence of l- or d-serine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. Volume 1003, Issue 3, 28 June 1989, Pages 277–283.

Katz DF, Overstreet JW, Samuels SJ, Niswander PW, Bloom TD, Lewis EL. Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. *J Androl*. 1986 Jul-Aug;7(4):203-10.

Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1988 Jan;49(1):112-7.

Kruger, T.F., Du Toit, T.C., Franken, D.R., Acosta, A.A., Oehninger, S.C., Menkveld, R. and Lombard, C.J. (1993). A new computerized method of reading sperm morphology (strict criteria) is as efficient as technician reading. *Fertil. Steril*, 59: 202–209.

Lampiao F., Strijdom H., Du Plessis S.S. Direct nitric oxide measurement in human spermatozoa: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. *International Journal of Andrology*. Volume 29, Issue 5, pages 564–567, October 2006.

Langerlof, J.L. (1934). Sterility in bulls. *Vet Rec*, 48: 1159-1173.

Leclerc, P. and Goupil, S. Regulation of the human sperm tyrosine kinase c-yes. Activation by cyclic adenosine 3' 5'-monophosphate and inhibition by Ca (2+). *Biol. Reprod*. 67, (2002) 301-307.

Liu D.Y. and Baker H.W.G. Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro. *Reproduction and Fertility*. 1988, 94 71-84.

MacLeod, J., Rosenberg, E. and Paulsen, C. A. (1970). The significance of deviations in human sperm morphology, En: *The Human Testis*, Rosenberg, E. and Paulsen, C. A. Plenum Press, Nex York.

Malo, A.F., Garde, J.J., Soler, A.J., García, A.J., Gomendio, M., Roldán, E.R.S. (2005). Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biol Reprod*, 72:822-829.

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

Maree L.,*, S.S. du Plessis , R. Menkveld, and G. van der Horst. Morphometric dimensions of the human sperm head depend on the staining method used. *Human Reproduction*, Vol.25, No.6 pp. 1369–1382, 2010

Maroto-Morales A.; Ramón M.; García-Álvarez O.; Soler A. J.; Estes M. C.; Martínez-Pastor F.; Pérez-Guzmán M. D.; Garde J. J. Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the Sperm-Class Analyzer. *Theriogenology* (2009).

Martínez, E., Ruiz, S., Roca, J., y Vázquez, J.M. Fecundación “in vitro” en los animales de granja. Ed: Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Murcia, Murcia. (1989).

Maxwell, W.M.C., Landers, A.J., Evans, G. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straw and minitubes. *Theriogenology* 43(7), (1995) 1201- 1210.

Mercier E., Salisbury G.W. Effect of Techniques of Preparing Semen Smears for Staining on The Morphology of Bull Spermatozoa. *Journal of Animal Scienc.* February 1947 vol. 6 no. 1 60-66.

Memon, M.A. and Ott, R.S. Methods of semen preservation and artificial insemination in sheep and goats. *World. Rev. Anim. Prod.* 17(1), (1981) 19-25.

Mendoza, G., White, I.G., Chow, P.(1989). Studies of chemical-components of Angora goat seminal plasma. *Theriogenology*, 32: 455-66.

Menkveld, R., Stander, F.S.H., Kotze, T., Jv. W., Kruger, T.F., and van Zil, J.A. (1990). The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum. Reprod*, 5: 586-592.

Menkveld R., Ph.D., Thinus F Kruger, M.D., Sergio Oehninger, M.D., Daniel R Franken, Ph.D. Relationship between zona pellucida–induced acrosome reaction, sperm morphology, sperm–zona pellucida binding, and in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. Volume 79, Issue 1, January 2003, Pages 49–55.

Núñez-Martínez I, Moran JM, Peña FJ. Do computer-assisted, morphometric-derived sperm characteristics reflect DNA status in canine spermatozoa. *Reprod Domest Anim* , 2005;40:537-43.

Núñez-Martínez I., Moran JM., Peña FJ. A Three-Step Statistical Procedure to Identify Sperm Kinematic Subpopulations in Canine Ejaculates: Changes after Cryopreservation. *Reproductions in Domestic Animals*. Volumen 41, Issue 5, pages 408-415. October 2006.

Ostermeier G. Charles; Sargeant Glen A.; Yandell Brian S.; Evenson Donald P.; Parrish John J. Measurement of bovine sperm nuclear shape using Fourier Harmonic Amplitudes. *J Androl* 22 (2001) 584–594.

Pasteur, M.D.X., Sabido, O., Maubon, I.M.D., Peerin-Cottier, M., Laurent, M.D.J. Quantitative assessment of cromatin stability alteration in human spermatozoa induced by freezing and thawing. A flow cytometric study. *Analytical and Quantitative cytology and Histology* 13, (1991). 383-390.

Pérez F, Soler C, Pertusa J, Núñez J, Núñez A. Morphological and quantitative study of multinucleated bodies appearing in rat seminiferous tubules after bilateral caput epididymectomy. *Int J Fertil*. 1992 Jul-Aug;37(4):237-43.

Perez RA, Langford GM, Eckberg WR, Anderson WA. Contractile proteins (actin, myosin) and tubulin are revealed within DNA-containing nucleocytoplasm in mature spermatozoa of *Libinia emarginata* L. *J Submicrosc Cytol.* 1986 Jul;18(3):471-80.

Perez, B., Mateos, E. Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malagueña breeds. *Small Ruminant Research* 23(1), (1996) 23-28.

Perez, B., Mateos, E. (1994). Influence of photoperiod on the secretion of testosterone as a response to sexual stimulus in male goats. *Theriogenology*, 42: 127-135.

Pomerol, J.M., Arrondo, J.L. (1994). *Práctica andrológica*.

Royere, D, Hamamah, S, Nicolle, JC, Lansac, J. Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: fluorescence acridine orange staining and and fuelgen-ADN cytophotometric studies. (1988). *Gamete Res.* 21, 51-57.

Ragni G†., Viviani S., Santoro A., Bonfante V., Bestetti†O., Bonadonna G. Gonadal toxicity after combination chemotherapy for Hodgkin's disease. Comparative results of MOPP vs ABVD. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology.* Volume 21, Issue 5, May 1985, Pages 601–605

Saacke RG, Marshall CE, 1968. Observations on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil* 16:511-14.

Saake, R.H.(1970). Morphology of sperm and its relationship to fertility. *NAAB Proc 3rd Tech Conf Artif Insem Reprod*, 17-30.

Sailer BL, Jost LK, Evenson DP. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry* 1996;24:167-73.

Sakkas, D., Manicardi, G., Bianchi, P.G., Bizarro D. and Bianchi, U. Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* 52, (1995). 1149-1155.

Sancho M.; Pérez-Sánchez F.; Tablado L. ; Monserrat J. J.; Soler C. Computer assisted morphometric analysis of ram sperm heads: evaluation of different fixative techniques. *Theriogenology* 50 (1998) 27-37.

Sancho, M., Pérez, F., Tablado, L., Soler, C. (1994). Valoración morfológica y morfométrica, mediante el sperm-class analyzer, del semen eyaculado de morueco. VII J. Int. Reprod. Anim., Murcia, España, 131.

Smith M.C., Sherman D.M. *Goat Medicine*.1994.

Singer, S.J. and Nicholson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, (1972) 720-731.

Söderquist L., Madrid-Bury N., Rodriguez-Martinez H. *Theriogenology* Volume 48, Issue 7, November 1997, Pages 1115–1125.

Soler C, de Monserrat JJ, Gutiérrez R, Nuñez J, Nuñez M, Sancho M, Pérez-Sánchez F, Cooper TG. Use of the Sperm-Class Analyser for objective assessment of human sperm morphology. *Int J Androl*. 2003 Oct;26(5):262-70.

Soler C, Pérez-Sánchez F, Schulze H, Bergmann M, Oberpenning F, Yeung C, Cooper TG. Objective evaluation of the morphology of human epididymal sperm heads. *Int J Androl*. 2000 Apr;23(2):77-84.

Soler C.; Gadea B.; Soler A. J.; Fernández-Santos M. R.; Estes M. C.; Núñez J.; Moreira P. N.; Núñez M.; Gutiérrez R.; Sancho M.; Garde J. J. Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red deer sperm morphometry by computerized analysis with ISAS. *Theriogenology* 64 (2005) 1236–1243.

Soler C.; Gaßner P.; Nieschlag E.; Montserrat J. J.; Gutiérrez R.; Sancho M.; Buendía P.; Álvarez J. G.; Behre H. M.; Cooper T. G. Utilización del Integrated Semen Analysis System (ISAS)® para el análisis morfométrico espermático humano y su significado en las técnicas de reproducción asistida. *Rev Int Androl*. 3(3) (2005) 112-119.

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

Talbot P., Chacon R.S. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *Journal of Experimental Zoology*. Volume 215, Issue 2, pages 201–208, February 1981.

Turner, T.T. and Giles, R.D. Sperm motility-inhibiting factor in rat epididymis. *Am. J. Physiol*. 242, (1982) 199-203.

Van der Horst G., Maree L. SpermBlue®: A new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis. December 2009, Vol. 84, No. 6, Pages 299-308.

Varner DD. Ward CR, Storey BT, Kenney RM. 1987. Induction and characterization of acrosome reaction in equine sperm. *Am J Vet Res* 48:1383-89

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.

Vázquez J.M., Roca J., Martinez E., J.M., Coy P. Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area. *Animal Reproduction Science*. Volume 29, Issues 3–4, October 1992, Pages 255–262

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

Vicente Fiel S. 2012. Estudio comparativo de la morfometría del núcleo espermático en artiodáctilos domésticos[proyecto de fin de carrera]. Universidad de Zaragoza.

Vinader, M.L., Cortés, S., Vázquez, (1996). *Parámetros cinéticos para semen caprino en sistemas de análisis de imagen asistida por ordenador*. IV Congreso Fe. Me. S.P.Rum, Murcia, España.,

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

Williams, R.M., Graham, J.K., Hammerstedt, R.H. Determination of the capacity of ram epididymal and ejaculated sperm to undergo the acrosome reaction and penetrate ova. Biol. Reprod. 44(6), (1991) 1080-1091.

Williams WW., Savage A. Observations on the seminal micropathology of bulls. Cornell Vet, 1925.

Williams WW., Savage A. A statistical study of the head length variability of bovine spermatozoa and its application to the determination of fertility. Trans. Roy. Soc. Canada, 1927.

Yanagimachi, R Mammalian fertilization. In: The physiology of reproduction. Second Edition. Ed. E Knobil and JD Neill. Raven Press Ltd, New York, (1994) 189-317.

Yanagimachi, R. Mammalian fertilization. In: The physiology of reproduction. Ed. E Knobil and JD Neill. Raven Press, New York, (1988) 135-185.

Yániz JL, Santolaria P, Marco-Aguado MA, López-Gatius F. Use of image analysis to assess the plasma membrane integrity of ram spermatozoa in different diluents. Theriogenology 2008;70:192-8.

Yániz JL, Marco-Aguado MA, Mateos JA, Santolaria P. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C. Anim Rep Sci 2010;122:142-9.

Yániz JL, Mateos JA, Santolaria P. Zwitterionic buffers preserve ram semen quality more efficiently than TRIS during storage at 15°C. Small Rum Res 2011;95:54-60.