



UNIVERSIDAD DE CORDOBA
FACULTAD DE VETERINARIA



DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL
UNIDAD DE REPRODUCCIÓN Y OBSTETRICIA

TESIS DOCTORAL

*Estudio del efecto de la congelación-descongelación
sobre los parámetros morfométricos del espermatozoide
de macho cabrío*

Manuel Hidalgo Prieto
Córdoba, 2004



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE VETERINARIA



DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL
UNIDAD DE REPRODUCCIÓN Y OBSTETRICIA

*“ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN
SOBRE LOS PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS DEL ESPERMATOZOIDE DE
MACHO CABRÍO”*

**Memoria presentada por el
Licenciado D. Manuel Hidalgo Prieto
para optar al grado de Doctor en
Veterinaria.**

Córdoba, 2004.

**UNIDAD DE REPRODUCCIÓN Y OBSTETRICIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

**D^a. INMACULADA RODRÍGUEZ ARTILES, D. CARLOS C. PÉREZ MARÍN Y
D. JESÚS M. DORADO MARTÍN, DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL Y
PROFESORES DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL DE
LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA.**

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada: “**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN SOBRE LOS PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS DEL ESPERMATOZOIDE DE MACHO CABRÍO**”, de la que es autor el Licenciado en Veterinaria **D. Manuel Hidalgo Prieto**, que ha sido realizada en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Córdoba, bajo nuestra dirección y asesoramiento, se considera finalizada y puede ser presentada para su mantenimiento y defensa pública ante el Tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos en Córdoba a 2 de febrero de 2004.

Inmaculada Rodríguez Artiles.

Carlos C. Pérez Marín

Jesús M. Dorado Martín.

Este trabajo ha sido desarrollado bajo el disfrute de una beca de Formación de Personal Investigador “Acciones MIT-F2” del programa PACTI del Plan Nacional de I+D

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, mi agradecimiento más sincero a la Doctora Inmaculada Rodríguez Artilles, por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo. Por su apoyo, confianza y formación científica recibida durante todos estos años, por el privilegio de poder realizar este trabajo bajo su dirección.

Al Doctor Carlos C. Pérez Marín, por su contribución en la dirección de este trabajo. Por su valiosa ayuda y apoyo incondicional en las no pocas dificultades que han surgido a lo largo de su desarrollo.

Al Doctor Jesús M. Dorado Martín, con el que he tenido oportunidad de compartir todos estos años de trabajo. Por su labor en la dirección y su ayuda y aliento en los momentos difíciles, pero sobre todo por ofrecerme su amistad.

Al Doctor José Sanz Parejo, por las valiosas enseñanzas y estímulo recibidos. Por su confianza y apoyo para iniciarme en la investigación.

A D. José Antonio Bellver Gascón, director de Microptic SL, por su inestimable colaboración en todo lo referente al SCA[®], y al Doctor Carles Soler Vázquez, prof. titular de la Universidad de Valencia, por su ayuda para ampliar conocimientos científicos en el análisis de imagen y estudio estadístico.

Al Doctor Manuel Sánchez Rodríguez, presidente de ACRIFLOR, por poner a disposición los animales necesarios para desarrollar este trabajo y a Luis, Pablo y Antonio, empleados del CIDG, por su valiosa colaboración en el trabajo de campo.

A mis compañeros de Departamento durante todos estos años, por su inestimable y continua colaboración.

A la hora de la presentación de esta Tesis vaya de nuevo mi agradecimiento más sincero a mis directores, por su apoyo no sólo científico sino humano, lo que siempre resulta muy de agradecer.

A la memoria de mi Padre

A mi Familia

A Dori

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	25
II.	OBJETIVOS.....	29
III.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	33
1.	EL ESPERMATOZOIDE.....	35
2.	PRODUCCIÓN Y MADURACIÓN ESPERMÁTICA	43
2.1.	Espermatogénesis	43
2.2.	Maduración del espermatozoide en el epidídimo	45
2.3.	Capacitación espermática: reacción acrosómica.....	48
3.	FACTORES QUE AFECTAN A LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DEL ESPERMA: ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA.....	49
4.	VALORACIÓN DE LA CALIDAD DEL ESPERMA.....	54
4.1.	Volumen y Concentración	55
4.2.	Movimiento	56
4.3.	Morfología	58
4.4.	Acrosoma.....	58
5.	ANÁLISIS MORFOMÉTRICO	60
6.	CONGELACIÓN DE ESPERMA	63
6.1.	Consideraciones generales	63
6.2.	Alteraciones del espermatozoide durante los procesos de congelación y descongelación.....	64
6.3.	Método de congelación-descongelación	67
6.4.	Valoración del esperma congelado-descongelado.....	80
IV.	MATERIAL Y MÉTODOS	83
1.	MATERIAL	85
1.1.	Animales	85
1.2.	Instalaciones.....	86
1.3.	Recogida y valoración de esperma.....	86

1.4.	Análisis Morfométrico.....	87
1.5.	Congelación-Descongelación	88
1.6.	Banco de esperma	90
1.7.	Análisis de los datos.....	90
2.	MÉTODOS.....	91
2.1.	Selección de los donantes de esperma.....	91
2.2.	Recogida de esperma.....	91
2.3.	Valoración del esperma.....	92
2.4.	Selección del método de análisis morfométrico y obtención de valores morfométricos medios del espermatozoide	96
2.5.	Influencia de la estación y factores climáticos sobre los parámetros morfométricos del espermatozoide	101
2.6.	Estudio del efecto de la congelación-descongelación sobre los parámetros morfométricos del espermatozoide.	102
2.7.	Estudio estadístico de los datos	107
V.	RESULTADOS	109
1.	RESULTADOS DE LA SELECCIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS MORFOMÉTRICO Y OBTENCIÓN DE VALORES MORFOMÉTRICOS MEDIOS DEL ESPERMATOZOIDE	111
1.1.	Resultados de las experiencias realizadas para seleccionar el método de análisis morfométrico	111
1.2.	Valores morfométricos medios del espermatozoide	116
2.	RESULTADOS DE LA INFLUENCIA DE LA ESTACIÓN Y FACTORES CLIMÁTICOS SOBRE LOS PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS DEL ESPERMATOZOIDE	118
2.1.	Parámetros morfométricos para el tamaño de la cabeza.....	119
2.2.	Parámetros morfométricos para la forma de la cabeza.....	131
2.3.	Parámetros seminales.....	134
2.4.	Correlación entre los parámetros espermáticos estudiados	149

3.	RESULTADOS DEL ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN SOBRE LOS PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS DEL ESPERMATOZOIDE.....	151
3.1.	Parámetros morfométricos para el tamaño de la cabeza.....	152
3.2.	Parámetros morfométricos para la forma de la cabeza.....	164
3.3.	Parámetros seminales.....	167
3.4.	Correlación entre los parámetros morfométricos y seminales a la descongelación.....	174
VI.	DISCUSIÓN	177
1.	SELECCIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS MORFOMÉTRICO Y OBTENCIÓN DE VALORES MORFOMÉTRICOS MEDIOS DEL ESPERMATOZOIDE.....	179
2.	INFLUENCIA DE LA ESTACIÓN Y FACTORES CLIMÁTICOS SOBRE LOS PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS DEL ESPERMATOZOIDE	184
3.	ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN SOBRE LOS PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS DEL ESPERMATOZOIDE.....	191
VII.	CONCLUSIONES.....	205
VIII.	RESUMEN.....	209
IX.	SUMMARY	213
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	217
XI.	ABREVIATURAS.....	245
XII.	ANEXO	249

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Temperatura ambiental media, máxima y mínima, pluviometría y horas de luz según la estación del año.	85
Tabla 2.	Características seminales medias de los 4 eyaculados recogidos en cada macho.	111
Tabla 3.	Porcentaje de espermatozoides correctamente analizados (n=5507) para cada animal con las tinciones Diff-Quik (DQ), Hemacolor (HC) y Hematoxilina de Harris (HH).	112
Tabla 4.	Comparación de los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides de los 4 animales, teñidos con Diff-Quik, entre los diferentes grupos de tamaño de la muestra.	113
Tabla 5.	Coefficiente de variación (CV) para cada parámetro morfométrico con las tinciones Diff-Quik (DQ), Hemacolor (HC) y Hematoxilina de Harris (HH).	114
Tabla 6.	Parámetros morfométricos medios para el tamaño y forma de la cabeza de los espermatozoides de los 4 animales teñidos con Diff-Quik.	116
Tabla 7.	Coefficiente de variación (CV) intraindividuo e interindividuo para las células teñidas con Diff-Quik.	118
Tabla 8.	Longitud de la cabeza de los espermatozoides durante las distintas estaciones del año para ambos machos.	120
Tabla 9.	Anchura de la cabeza de los espermatozoides durante las distintas estaciones del año para ambos machos.	123
Tabla 10.	Área de la cabeza de los espermatozoides durante las distintas estaciones del año para ambos machos.	126
Tabla 11.	Perímetro de la cabeza de los espermatozoides durante las distintas estaciones del año para ambos machos.	129
Tabla 12.	Elipticidad de la cabeza de los espermatozoides durante las distintas estaciones del año para ambos machos.	132

Tabla 13 . Volumen medio eyaculado (VE) durante las distintas estaciones del año para ambos machos	135
Tabla 14. Concentración espermática media en cada estación del año para ambos machos	138
Tabla 15. Movimiento total (MT) y movimiento rápido progresivo (MRP) medios en cada estación del año para ambos machos.	140
Tabla 16. Morfología espermática en cada estación del año para ambos machos. ...	143
Tabla 17. Integridad del acrosoma en cada estación del año para ambos machos. ...	147
Tabla 18. Índices de correlación entre los parámetros morfométricos y seminales estudiados y entre estos y los factores individuo (macho), estación, mes, fotoperiodo y temperatura.	150
Tabla 19. Respuesta de la longitud de la cabeza a la congelación-descongelación (valores medios e individuales).	153
Tabla 20. Respuesta de la longitud de la cabeza a la congelación-descongelación con los diluyentes Tris y Lácteo (valores medios e individuales).	153
Tabla 21. Respuesta de la longitud de la cabeza a la congelación-descongelación con los diluyentes Tris y Lácteo en los eyaculados clasificados como “aptos” y “no aptos” para congelar.	154
Tabla 22. Respuesta de la longitud de la cabeza a la congelación-descongelación en los eyaculados con dosis para los diluyentes Tris y Lácteo “aptas” y “no aptas” al test de longevidad del movimiento.	154
Tabla 23. Respuesta de la anchura de la cabeza a la congelación-descongelación (valores medios e individuales).	156
Tabla 24. Respuesta de la anchura de la cabeza a la congelación-descongelación con los diluyentes Tris y Lácteo (valores medios e individuales).	156
Tabla 25. Respuesta de la anchura de la cabeza a la congelación-descongelación con los diluyentes Tris y Lácteo en los eyaculados clasificados como “aptos” y “no aptos” para congelar.	157
Tabla 26. Respuesta de la anchura de la cabeza a la congelación-descongelación en los eyaculados con dosis para los diluyentes Tris y Lácteo “aptas” y “no aptas” al test de longevidad del movimiento.	157

Índice

Tabla 27. Respuesta del área de la cabeza a la congelación-descongelación (valores medios e individuales).	159
Tabla 28. Respuesta del área de la cabeza a la congelación-descongelación con los diluyentes Tris y Lácteo (valores medios e individuales).	159
Tabla 29. Respuesta del área de la cabeza a la congelación-descongelación con los diluyentes Tris y Lácteo en los eyaculados clasificados como “aptos” y “no aptos” para congelar.	160
Tabla 30. Respuesta del área de la cabeza a la congelación-descongelación en los eyaculados con dosis para los diluyentes Tris y Lácteo “aptas” y “no aptas” al test de longevidad del movimiento.	161
Tabla 31. Respuesta del perímetro de la cabeza a la congelación-descongelación (valores medios e individuales).	162
Tabla 32. Respuesta del perímetro de la cabeza a la congelación-descongelación con los diluyentes Tris y Lácteo (valores medios e individuales).	163
Tabla 33. Respuesta del perímetro de la cabeza a la congelación-descongelación con los diluyentes Tris y Lácteo en los eyaculados clasificados como “aptos” y “no aptos” para congelar.	163
Tabla 34. Respuesta del perímetro de la cabeza a la congelación-descongelación en los eyaculados con dosis para los diluyentes Tris y Lácteo “aptas” y “no aptas” al test de longevidad del movimiento.	164
Tabla 35. Respuesta de la elipticidad de la cabeza a la congelación-descongelación (valores medios e individuales).	165
Tabla 36. Respuesta de la elipticidad de la cabeza a la congelación-descongelación con los diluyentes Tris y Lácteo (valores medios e individuales).	166
Tabla 37. Respuesta de la elipticidad de la cabeza a la congelación-descongelación con los diluyentes Tris y Lácteo en los eyaculados clasificados como “aptos” y “no aptos” para congelar.	166
Tabla 38. Respuesta de la elipticidad de la cabeza a la congelación-descongelación en los eyaculados con dosis para los diluyentes Tris y Lácteo “aptas” y “no aptas” al test de longevidad del movimiento.	167

Tabla 39. Porcentajes medios e individuales para el movimiento total del esperma precongelado y congelado-descongelado.	168
Tabla 40. Porcentajes medios e individuales para el movimiento rápido progresivo del esperma precongelado y congelado-descongelado.	169
Tabla 41. Porcentajes medios e individuales para morfología del esperma precongelado y congelado-descongelado.	171
Tabla 42. Porcentajes medios e individuales para la integridad del acrosoma del esperma precongelado y congelado-descongelado.	173
Tabla 43. Índices de correlación entre los parámetros morfométricos y seminales a la descongelación.	175

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Diagrama de cajas y bigotes en el que se representan los parámetros morfométricos para el tamaño y forma de la cabeza con los métodos de tinción Diff-Quik (DQ), Hemacolor (HC) y Hematoxilina de Harris (HH).....	115
Gráfico 2. Diagrama de cajas en el que se representan los parámetros morfométricos para el tamaño y forma de la cabeza de los espermatozoides de los 4 machos utilizando la tinción Diff-Quik (DQ).....	117
Gráfico 3. Evolución de la longitud de la cabeza durante los doce meses del período de estudio.....	120
Gráfico 4. Evolución de la longitud de la cabeza de los espermatozoides de ambos machos frente al fotoperiodo.	121
Gráfico 5. Evolución de la longitud de la cabeza de los espermatozoides de ambos machos frente a la temperatura.	121
Gráfico 6. Evolución de la anchura de la cabeza durante los doce meses del período de estudio.....	123
Gráfico 7. Evolución de la anchura de la cabeza de los espermatozoides de ambos machos frente al fotoperiodo.	124

Índice

Gráfico 8. Evolución de la anchura de la cabeza de los espermatozoides de ambos machos frente a la temperatura.....	124
Gráfico 9. Evolución del área de la cabeza durante los doce meses del período de estudio.....	126
Gráfico 10. Evolución del área de la cabeza de los espermatozoides de ambos machos frente al fotoperiodo.	127
Gráfico 11. Evolución del área de la cabeza de los espermatozoides de ambos machos frente a la temperatura.	127
Gráfico 12. Evolución del perímetro de la cabeza durante los doce meses del período de estudio.....	129
Gráfico 13. Evolución del perímetro de la cabeza de los espermatozoides de ambos machos frente al fotoperiodo.	130
Gráfico 14. Evolución del perímetro de la cabeza de los espermatozoides de ambos machos frente a la temperatura.....	130
Gráfico 15. Evolución de la elipticidad de la cabeza durante los doce meses del período de estudio.....	132
Gráfico 16. Evolución de la elipticidad de la cabeza de los espermatozoides de ambos machos frente al fotoperiodo.	133
Gráfico 17. Evolución de la elipticidad de la cabeza de los espermatozoides de ambos machos frente a la temperatura.....	133
Gráfico 18. Evolución del volumen medio eyaculado (VE) e individual para cada macho (VEA; VEB), durante los doce meses del período de estudio.....	135
Gráfico 19. Evolución del volumen medio eyaculado (VE) para ambos machos frente al fotoperiodo.	136
Gráfico 20. Evolución del volumen medio eyaculado para ambos machos frente a la temperatura.	136
Gráfico 21. Evolución de la concentración espermática media durante los doce meses del período de estudio para ambos machos (CA;CB).	138
Gráfico 22. Evolución de la concentración espermática media para ambos machos frente al fotoperiodo.	139

Gráfico 23.Evolución de la concentración espermática media para ambos machos frente a la temperatura.	139
Gráfico 24.Evolución del movimiento total (MT) y rápido progersivo (MRP) medio durante los doce meses del período de estudio para ambos machos (MT A, MRP A; MT B, MRP B).	141
Gráfico 25.Evolución del movimiento total (MT) y movimiento rápido progresivo medio (MRP) para ambos machos frente al fotoperiodo.	142
Gráfico 26.Evolución del movimiento total (MT) y movimiento rápido progresivo medio (MRP) para ambos machos frente a la temperatura.	142
Gráfico 27.Evolución de la morfología espermática media para ambos machos (NA;NB) durante los doce meses del período de estudio.	144
Gráfico 28.Evolución de la morfología espermática media para ambos machos frente al fotoperiodo.	145
Gráfico 29.Evolución de la morfología espermática media para ambos machos frente a la temperatura.	145
Gráfico 30.Evolución de la integridad del acrosoma media e individual para cada macho (IA;IB) durante los doce meses del período de estudio.	147
Gráfico 31.Evolución de la integridad del acrosoma para ambos machos frente al fotoperiodo.	148
Gráfico 32.Evolución de la integridad del acrosoma para ambos machos frente a la temperatura.	148
Gráfico 33.Diagrama de cajas y bigotes en el que se representa la longitud de la cabeza a la precongelación para ambos machos durante el período de estudio. ...	152
Gráfico 34.Diagrama de cajas y bigotes en el que se representa la anchura de la cabeza a la precongelación para ambos machos durante el período de estudio.	155
Gráfico 35.Diagrama de cajas y bigotes en el que se representa el área de la cabeza a la precongelación para ambos machos durante el período de estudio.	158
Gráfico 36.Diagrama de cajas y bigotes en el que se representa el perímetro de la cabeza a la precongelación para ambos machos durante el período de estudio.	161

Gráfico 37. Diagrama de cajas y bigotes en el que se representa la elipticidad de la cabeza a la precongelación para ambos machos durante el período de estudio 165

Gráfico 38. Porcentajes medios e individuales para el movimiento total del espermatozoide precongelado (P) y congelado-descongelado con los diluyentes Tris (T) y Lácteo (L). 169

Gráfico 39. Porcentajes medios e individuales para el movimiento rápido progresivo del espermatozoide precongelado (P) y congelado-descongelado con los diluyentes Tris (T) y Lácteo (L). 170

Gráfico 40. Porcentajes medios e individuales para la morfología del espermatozoide precongelado (P) y congelado-descongelado con los diluyentes Tris (T) y Lácteo (L). 172

Gráfico 41. Porcentajes medios e individuales para la integridad del acrosoma del espermatozoide precongelado (P) y congelado-descongelado con los diluyentes Tris (T) y Lácteo (L). 174

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de las regiones (a) y ultraestructura (b) del espermatozoide de mamífero..... 35

Figura 2. Esquema de la ultraestructura de la cabeza de un espermatozoide de mamífero..... 37

Figura 3. Estructuras del cuello del espermatozoide de mamífero. 40

Figura 4. Estructura del flagelo del espermatozoide de mamífero. 42

Figura 5. Fotografía del equipo utilizado (Sperm Class Analyzer[®], Microptic SL). .. 98

Figura 6. Pantalla de captura del SCA (a) y máscara sobre la imagen digitalizada (b) 99

Figura 7. Esquema de los parámetros morfométricos evaluados. 99

I. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de congelación de esperma vienen desarrollándose desde el principio del siglo XX con el fin de preservar por tiempo indefinido gametos con capacidad fecundante, cuyo uso en programas de espermatización manual permitan acelerar los programas de mejora genética, optimizar el uso de sementales, mejorar la sanidad, homogeneizar las producciones, favorecer los registros genealógicos y el control de reproductores, así como, la conservación de recursos zoogenéticos (BOE nº 279/97). La limitación principal de dichas técnicas radica en los efectos detrimentales que tienen sobre la funcionalidad de los espermatozoides y que ocasionan disminución de la fertilidad, originando, tanto en el macho cabrío como en otras especies animales, un descenso en el movimiento espermático, con desestabilización de la membrana plasmática del espermatozoide y activación de la reacción acrosómica.

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

La introducción de los sistemas automáticos de análisis de la morfometría espermática, entre los que se encuentra el Sperm Class Analyzer[®], intenta solventar este problema. Si bien originalmente se emplearon para el análisis del espermatozoide humano, actualmente se están desarrollando para su uso en las distintas especies animales, para lo cual resulta imprescindible la estandarización de una serie de variables

Introducción

analíticas que intervienen en el proceso del análisis morfométrico, como son, la preparación y tinción de las muestras o el número de espermatozoides a analizar.

Recientemente algunos estudios realizados en bovinos y equinos han demostrado un efecto de la congelación sobre la morfometría de los espermatozoides (Gravance y col., 1995 y 1998; Arruda y col., 2002). En el caso del caprino, y concretamente de la raza Florida, queda pendiente estudiar, entre otros aspectos, el efecto que pueda ocasionar la congelación-descongelación sobre los parámetros morfométricos, ya que la mayoría de los conocimientos reproductivos actuales en esta raza se centran principalmente en la hembra (Dorado y col., 2002c y 2003b). Sobre el macho, si bien existen estudios realizados que reflejan el efecto de la estacionalidad sobre los parámetros reproductivos del mismo, como el tamaño testicular (Dorado y col., 2002a y b; Rodríguez y col., 2003) y producción y calidad del esperma (Hidalgo y col., 2002 y 2003b; Dorado, 2003; Dorado y col., 2003a), no se han desarrollado experiencias que investiguen el efecto de la estacionalidad sobre la morfometría espermática y su posible relación con la producción y calidad del esperma.

La raza Florida (Sánchez y col., 1990), actualmente presenta un censo de 3500 reproductoras y se encuentra registrada en el catálogo oficial de razas de ganado caprino de España (BOE N° 279/97) como raza autóctona española de protección especial (RD1682/1997) en peligro de extinción. Parece, por tanto, adecuado profundizar en el conocimiento del efecto de las técnicas de congelación de esperma, que permitan su adecuada conservación, y facilite los programas de mejora genética y la difusión de un material genético selecto. Para ello la descripción de un protocolo de análisis válido para evaluar las características y efecto de la congelación descongelación sobre los parámetros morfométricos del espermatozoide, podría contribuir al conocimiento del efecto “protector” de los diluyentes y/o protocolos de congelación sobre la capacidad fecundante del espermatozoide en esta raza.

II. OBJETIVOS

Con el presente trabajo pretendemos estudiar los parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide de macho cabrío de raza Florida, y poder aplicar así el análisis automático de la morfometría espermática como método complementario a las pruebas laboratoriales que permiten valorar la respuesta a la congelación del espermatozoide a fin de reducir las limitaciones condicionadas por las características del mismo, que son propias de esta especie y su respuesta a los métodos de diluyococonservación y congelación. Para ello consideramos necesarios los siguientes objetivos específicos:

A) Estandarizar el método de análisis morfométrico para esta especie. Para ello es necesario:

A)1 Seleccionar de entre algunos métodos de tinción y procesado de la muestra, el más adecuado para realizar la valoración morfométrica del espermatozoide, valorando la:

- Influencia del método de tinción en la eficacia del análisis de imagen
- Influencia del número de células a analizar
- Influencia del método de tinción sobre los parámetros morfométricos

A)2 Definir los valores medios de los diferentes parámetros morfométricos.

B) Valorar la influencia de la estación y factores climáticos (fotoperiodo y temperatura ambiental) sobre los parámetros morfométricos del espermatozoide.

C) Estudiar el efecto de la congelación-descongelación sobre los parámetros morfométricos del espermatozoide.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. EL ESPERMATOZOIDE

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.

1.1. Morfología del espermatozoide

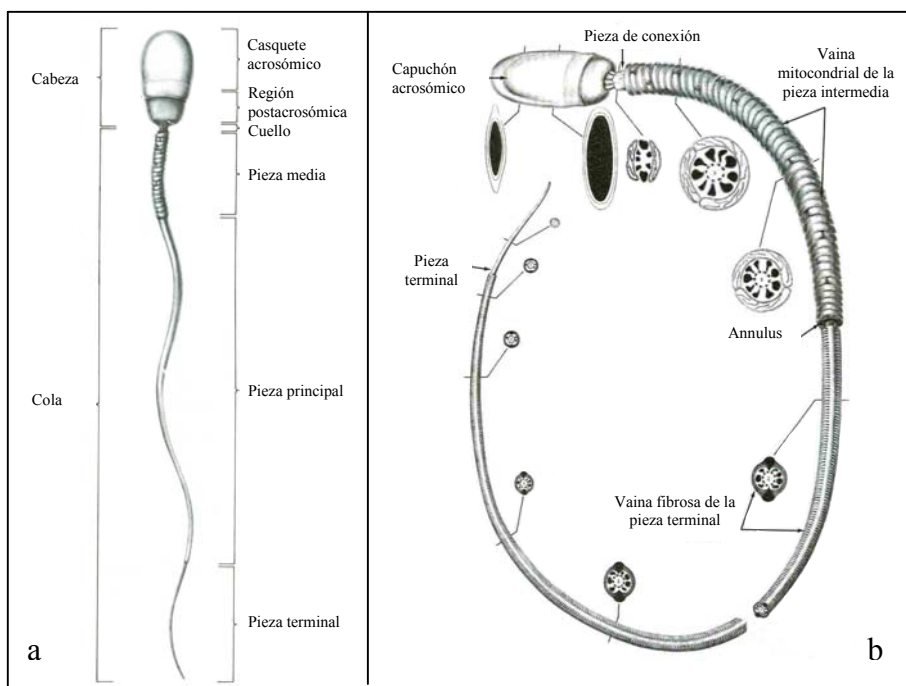


Figura 1. Esquema de las regiones (a) y ultraestructura (b) del espermatozoide de mamífero (Modificado de Fawcett, DW. Tratado de Histología. Interamericana McGraw-Hill, 1989)

Morfológicamente en el espermatozoide se distingue la cabeza, preparada para penetrar el oocito y transmitir la información genética; y el flagelo, provisto de la maquinaria metabólica y de los mecanismos de propulsión para dotar de movimiento al espermatozoide (Figura 1). Ambas estructuras están envueltas externamente por la membrana plasmática.

1.1.a) La cabeza del espermatozoide

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 macho cabrío al igual que en morueco, 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 macho cabrío 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. 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.

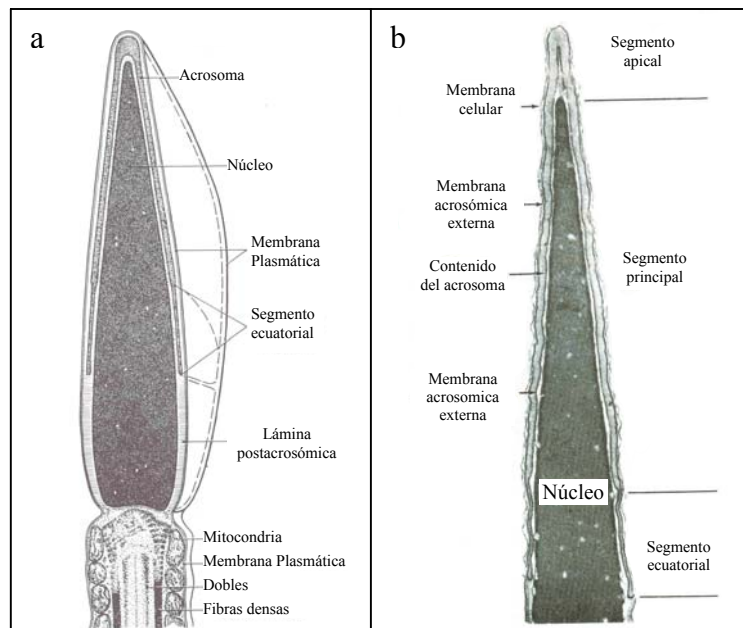


Figura 2. Esquema de la ultraestructura de la cabeza de un espermatozoide de mamífero (Figura 2a: modificado de McKinnon, AO y Voss, JL. Equine Reproduction. Malvern, PA: Lea & Febiger, 1993) y micrografía electrónica de la región del acrosoma (Figura 2b: modificado de Fawcett, DW. Tratado de Histología.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

El núcleo (Figura 2) contiene un número haploide de cromosomas y nucleoproteínas, fundamentalmente protaminas espermáticas, y esta 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 esta 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 esperma 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 esperma 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 esperma 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 esperma 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 toro, 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 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 esta 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

1.1.b) La cola del espermatozoide

El flagelo o cola comprende cuatro regiones principales: el cuello, la pieza intermedia, y los segmentos principal y terminal (Figura 1b).

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.

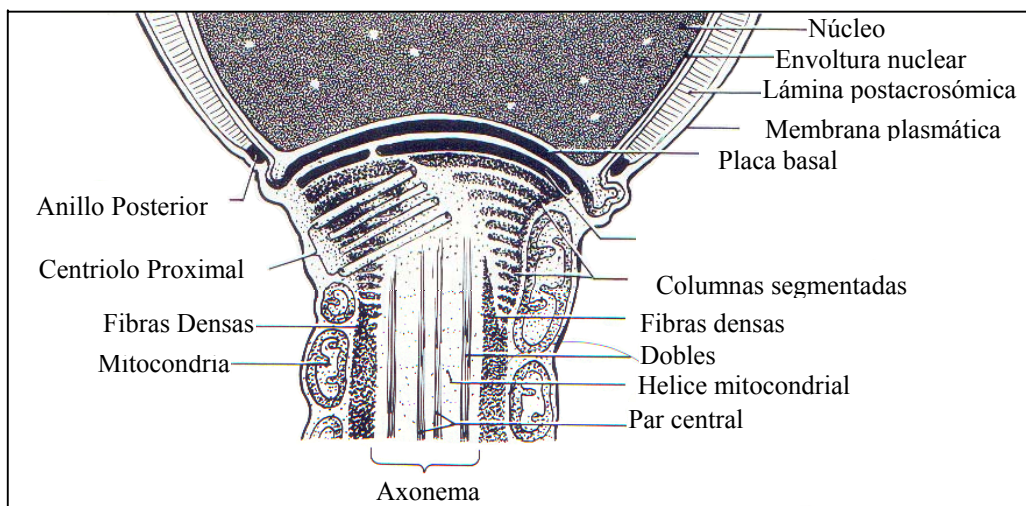


Figura 3. Estructuras del cuello del espermatozoide de mamífero (modificado de McKinnon, AO y Voss, JL. Equine Reproduction. Malvern, PA: Lea & Febiger, 1993)

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).

Revisión Bibliográfica

La pieza terminal es la porción de la cola posterior a la terminación de la vaina fibrosa. Esta contiene únicamente el axonema central cubierto por la membrana plasmática (Figura 4).

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

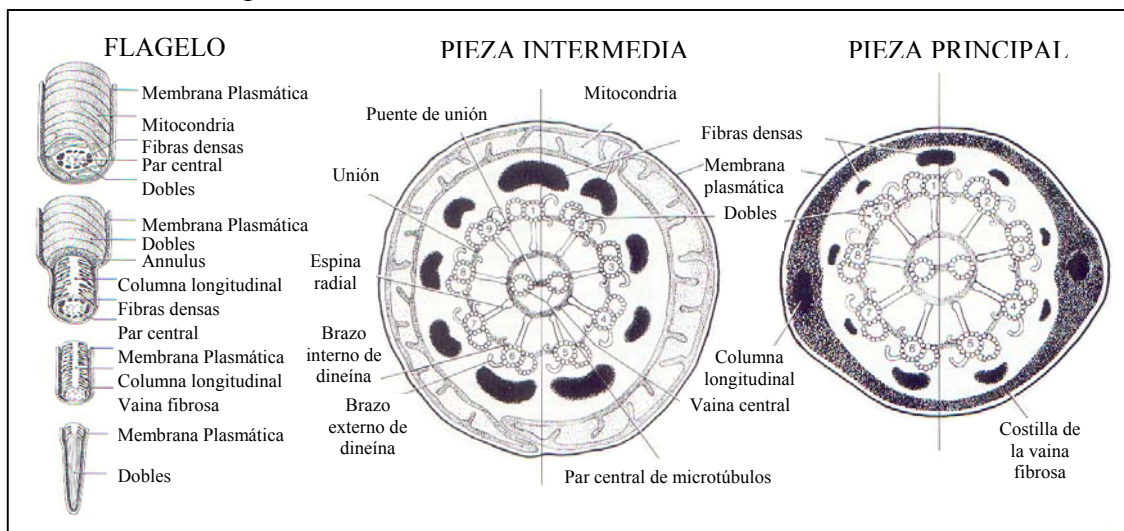


Figura 4. Estructura del flagelo del espermatozoide de mamífero (modificado de McKinnon, AO y Voss, JL. Equine Reproduction. Malvern, PA: Lea & Febiger, 1993).

2. PRODUCCIÓN Y MADURACIÓN ESPERMÁTICA

2.1. Espermatogénesis

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

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

Revisión Bibliográfica

- 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 espermátocitos 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 espermátocitos primarios son los que sufren la *primera división meiótica* o meiosis reduccional. Durante la profase, se replica el ADN, de manera que los espermátocitos 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 espermátocitos secundarios, unidas por puentes intercelulares. *La segunda división meiótica*, o meiosis ecuacional, permite que de cada espermátocito 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.

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 macho cabrío 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, inobilina, 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).

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. 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 heterogeinicidad 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.

3. FACTORES QUE AFECTAN A LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DEL ESPERMA: ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA

La actividad reproductiva de los pequeños rumiantes está influenciada, entre otros, por varios factores estacionales (Pelletier y col., 1988), entre ellos se encuentra el fotoperiodo (Delgadillo y col., 1991; Dorado y col., 2003a; Rodríguez y col., 2003) cuya acción se produce a nivel del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal vía glándula pineal. Esta glándula recibe las variaciones en las horas de luz/día y actúa como mediador transformando los impulsos ópticos de la luz en descargas hormonales de melatonina. Durante los días cortos, la glándula pineal aumenta la síntesis y secreción de melatonina que actuaría a nivel del sistema nervioso central variando la pulsatilidad de la secreción de GnRH en el hipotálamo. Esto supone, en última instancia, un aumento de la secreción de gonadotropinas LH, lo que favorecerá el crecimiento

testicular y la secreción de testosterona. Por el contrario, cuando el fotoperiodo es ascendente, a través del mecanismo anteriormente citado se deprime la secreción de LH y en consecuencia el tamaño testicular y la secreción de testosterona (Pelletier y col., 1988).

Sin embargo, la influencia del fotoperiodo depende a su vez de la localización geográfica, reduciéndose a medida que nos acercamos a los trópicos (Corteel, 1981; Chemineau, 1986). En este sentido, las variaciones en la producción espermática son más o menos marcadas, dependiendo de la latitud en la que se ubican nuestras razas autóctonas (Vázquez y col., 1998). Así, por encima de los 40°, las variaciones estacionales son muy marcadas (Karagiannidis y col., 2000), entre 30°-40° se aprecia mayor producción espermática en verano y otoño (Skalet y col., 1988; Roca y col., 1992b), y en zonas situadas a menos de 30° de latitud sin embargo, las variaciones estacionales en la producción de células espermáticas son muy ligeras (Chemineau, 1986), presentando los machos una calidad seminal aceptable durante todo el año (Roca y col., 1992a y b; Pérez y Mateos, 1996).

En zonas de clima tropical o subtropical, donde las variaciones del fotoperiodo a lo largo del año no son tan marcadas, cobran mayor importancia otros componentes climáticos tales como la temperatura y la humedad relativa (Pérez y Mateos, 1996), y quizás también la disponibilidad de alimento (Walkden-Brown y col., 1994; Pérez y Mateos, 1996), aunque la influencia directa de los mismos sobre los parámetros reproductivos de los pequeños rumiantes ha sido poco estudiado. Parece por tanto que las razas de clima tropical al igual que las autóctonas de la Península Ibérica, muestran una actividad reproductiva constante a lo largo de todo el año (Chemineau, 1986 en Criolla; Cabrera y col., 1998a y b en la Agrupación Caprina Canaria; Dorado y col., 2003a y Rodríguez y col., 2003 en la Florida), respondiendo de forma diferente a aquellas de países europeos de mayores latitudes.

En el ganado caprino también se ha evidenciado que tanto el comportamiento sexual como la calidad seminal varían en función de la edad y raza (Corteel, 1975;

Chemineau, 1986; Roca y col., 1991a; Vázquez y col., 1998), aunque la libido puede estar más condicionada por la estación del año que por la propia edad de los animales (Roca y col., 1991b; Dorado y col., 2003a), pudiéndose observar que el número de montas, así como de cópulas disminuyen durante semanas e incluso meses fuera de la estación reproductiva.

Según Corteel (1977), machos cabríos de raza Alpina en su hábitat natural producen esperma de buena calidad hacia los 6 meses de edad, mientras que en otras razas y en otras latitudes esto ocurre con más edad (Shina y col., 1981 en Jamunapari; Bongso y col., 1982 en Malaya; Skalet y col., 1988; Chakraborty y col., 1989 en Nubiana). Roca y col. (1991a) en Murciano-Granadina, observan una producción espermática de buena calidad a partir de los 8-10 meses de edad, además de comprobar que a partir de dicha edad el incremento de la misma no provoca efecto alguno sobre la calidad seminal.

Para Pérez y Mateos (1996) y Karagiannidis y col. (2000), existen diferencias estadísticamente significativas en las características espermáticas entre razas, tanto cuantitativas (volumen eyaculado, concentración y número de espermatozoides por eyaculado) como cualitativas (porcentaje de espermatozoides móviles, movimiento progresivo y porcentaje de anomalías); y varios autores concluyen que hay variabilidad individual en la producción espermática, existiendo además una interacción entre machos y estación, para los distintos parámetros seminales (Roca y col., 1992b; Pérez y Mateos, 1996; Cabrera y col., 1998a).

Por otro lado, la calidad seminal de los animales domésticos está influenciada, además, por la actividad sexual o la frecuencia de recogida de esperma (Foote, 1978). Jennings y Mcweeney (1976) en morueco, observan que el volumen eyaculado, junto a la concentración y el número total de espermatozoides disminuyen significativamente tras eyaculados consecutivos. De la misma manera se comporta el macho cabrío según refieren varios autores (Ritar y col, 1992 en la raza Angora; Cabrera y col., 1998a en la Asociación Caprina Canaria). En ovino Kaya y col. (2002) detallan una disminución del

movimiento progresivo en los eyaculados de machos sometidos a una intensa actividad sexual.

Según Vázquez y col. (1998), el volumen eyaculado varía en función del individuo, edad y raza. Además, varios autores han apreciado que, junto a otros parámetros espermáticos, como la concentración y el número de espermatozoides móviles por eyaculado, el volumen se ve influenciado más por la madurez sexual adquirida por los machos (Corteel, 1975; Summermatter y Fuschini, 1995) que por el propio efecto de la estación (Cabrera y col., 1998a; Dorado, 2003).

Varios autores coinciden en que al igual que en otros parámetros espermáticos, la concentración muestra un patrón estacional (Cabrera y col., 1998a y b; Karagiannidis y col., 2000; Rodríguez y col., 2003), pero no tan marcado como en el volumen eyaculado. Así, Cabrera y col. (1998a y b) en la Agrupación Caprina Canaria, observan que la concentración espermática muestra un perfil estacional con mínimos en otoño, pero sin llegar a comprometer la viabilidad de los eyaculados, incrementándose durante el invierno y la primavera.

Varios autores señalan que el porcentaje de espermatozoides móviles está influenciado entre otros factores, por la madurez sexual (Corteel, 1975; Summermatter y Fuschini, 1995), estación reproductiva (Corteel, 1975) y porcentaje de morfoanomalías (Karagiannidis y col., 2000; Dorado, 2003; Dorado y col., 2003a); sin embargo, Ritar y col. (1992), Summermatter y Fuschini (1995) y Cabrera y col. (1998a), no apreciaron una influencia significativa del número de eyaculados recolectados.

Conocido es el efecto que la estación del año tiene sobre la calidad espermática, provocando, entre otros, el aumento del porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales (Karagiannidis y col., 2000; Dorado, 2003; Dorado y col., 2003a) y de acrosomas dañados (Dorado, 2003). Estas variaciones estacionales están asociadas a cambios en las horas de luz y variaciones de temperatura (Corteel, 1981),

apreciándose un incremento en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales durante los días largos (Colas, 1980; Dorado y col., 2003a).

Roca y col. (1992a) en Murciano-Granadina, observan un incremento de las formas anormales desde los meses de enero hasta abril, acompañado de un aumento del porcentaje de acrosomas dañados desde enero a junio, coincidiendo con lo descrito por Skalet y col. (1988) y Pérez y Mateos (1996) en machos cabríos raza Nubiana y Verata respectivamente, así como por Colas (1980) y Amir y col. (1986) en moruecos.

Por otro lado, la temperatura ambiente elevada ha sido considerada como un importante factor detrimental de la calidad espermática de los rumiantes, así, en áreas de altas temperaturas generalmente se observa un incremento en la proporción de espermatozoides anormales (Colas, 1980; Corteel, 1981; Dorado, 2003; Dorado y col., 2003a). Sin embargo, en estudios sobre la calidad espermática del macho Murciano-Granadino en la región Mediterránea, se ha observado que la calidad del esperma fue mejor durante la época más calurosa, lo que demuestra que no se encuentra afectada por las altas temperaturas en estas latitudes (Roca y col., 1992a).

En estudios previos, se ha demostrado la existencia de variación estacional en el diámetro testicular del macho cabrío de las razas Murciano-Granadina y Florida, con valores mínimos durante el invierno (Roca y col., 1991b; Dorado y col., 2002a y b; Rodríguez y col., 2003), acompañado de un descenso de la calidad espermática, reflejo no sólo del incremento de las horas de luz sino concomitante al descenso del tamaño testicular. La asociación de la calidad espermática con el diámetro testicular ha sido ya documentado en pequeños rumiantes (Lincoln, 1987).

Varios autores han demostrado que la edad ejerce una ligera influencia sobre la aparición de espermatozoides morfológicamente anormales en el esperma caprino (Skalet y col., 1988; Roca y col., 1992a). Por otra parte, Karagiannidis y col. (2000) concluyen que el porcentaje de espermatozoides anormales está influenciado por la condición del macho y por el tiempo de recogida.

4. VALORACIÓN DE LA CALIDAD DEL ESPERMA

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

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

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

4.1. Volumen y Concentración

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

El volumen se determina en el colector de recogida, graduado en milímetros. Su valor es necesario para calcular el número total de espermatozoides eyaculados. La concentración se puede determinar empleando un hemocitómetro, espectrofotómetro, contador de partículas computerizado o fluorimetría. La técnica del hemocitómetro permite determinar el número de espermatozoides presentes en una cámara de volumen conocido. Su bajo coste hace de este método uno de los más empleados, sin embargo, presenta una variabilidad entre réplicas relativamente elevada, causada por las diluciones previas o la falta de homogeneidad en la distribución de la muestra en la cámara. Más rápido y de fácil uso es el espectrofotómetro, de tipo indirecto, que relaciona el grado de absorción o dispersión de la luz que provocan los espermatozoides de una muestra de esperma con su concentración. Sin embargo, para que este método se muestre preciso requiere una calibración previa mediante una curva determinada por recuento microscópico en cámara, debido a que la transmitancia varía de acuerdo a la concentración espermática pero también depende del tamaño y forma del espermatozoide y del índice de refracción, factores que además son variables entre individuos. Asimismo, pueden realizarse recuentos muy rápidos, aunque a mayor coste, con contadores de partículas (Coulter Counter) o sistemas computerizados de imagen; aunque para que el recuento de partículas sea correcto, los equipos deben 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).

4.2. Movimiento

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

Para salvar el problema de la subjetividad, se empezó a investigar la forma de automatizar el análisis del movimiento espermático mediante sistemas informáticos. Los primeros valores objetivos se obtuvieron con métodos directos como la cine- o video-micrografía (Overstreet y col., 1979), e indirectos como la espectrofotometría o velocímetro láser doppler (Jouannet y col., 1977). Posteriormente, con el desarrollo de la tecnología de digitalización de la imagen de video se incorporaron al mercado los sistemas semiautomáticos (Jago y col., 1986) y automáticos (Davis y Katz, 1989), genéricamente denominados CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis), que actualmente permiten valorar, de forma rápida y fiable la movilidad de los

espermatozoides y algunas de sus características como la velocidad, linealidad o desplazamiento lateral de la cabeza que serían imposibles de cuantificar por observación al microscopio. Los sistemas automáticos están basados en la captura y digitalización sucesiva de imágenes microscópicas, identificando las células espermáticas en la primera de ellas, y analizando su trayectoria a lo largo de la secuencia de imágenes en el tiempo, a partir de la cual se calculan los parámetros que caracterizan el movimiento espermático. Entre estos parámetros cinéticos, hay dos que parecen destacar sobre los demás como principales indicadores del movimiento espermático, que son la velocidad rectilínea (VSL) y el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) (Aitken, 1990); si bien, Anel y col. (1996) trabajando con esperma congelado-descongelado de morueco, observan diferencias significativas en los valores medios de progresividad, linealidad, rectitud y desplazamiento lateral de la cabeza entre el grupo de ovejas gestantes y no gestantes.

Sin embargo, tanto el hardware como el software para la identificación de los espermatozoides y el análisis de las características de su movimiento difieren considerablemente entre los sistemas comercialmente disponibles, de manera que pueden obtenerse resultados diferentes en el análisis de una única muestra de esperma. En cualquier caso, se ha comprobado que la correlación obtenida entre los resultados de diversos sistemas CASA es muy significativa (Davis y col., 1992). Por otro lado, la exactitud de los resultados depende de factores técnicos y biológicos como son: las condiciones en las que se realizan los análisis (temperatura, cámara, etc), tipo de muestra de esperma que se está analizando (especie de procedencia, estado de la muestra -esperma fresco, refrigerado, congelado o capacitado-, concentración de la muestra, diluyente empleado, etc.) y del sistema de análisis (aumentos utilizados, iluminación, calibración del equipo, etc.)

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

4.3. Morfología

La evaluación morfológica clásica, incluida la acrosomal (Saacke, 1984), ha sido utilizada durante años para estimar la calidad del esperma (Uwland, 1984).

El eyaculado de macho cabrío se caracteriza por presentar un bajo porcentaje de morfoanomalías (5-15%) (Roca y col., 1992a y b). Por diversos trabajos es conocida la correlación entre el porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales y la fertilidad de los animales domésticos (Voss y col., 1981; Sekoni y Gustafsson, 1987), incluido el ganado caprino (Chandler y col., 1988). En este sentido, Evans y Maxwell (1987) determinan que aquellos eyaculados de pequeños rumiantes que presenten entre un 15-20% de células espermáticas anormales mantendrán su capacidad fertilizante intacta.

Entre las morfoanomalías asociadas con fertilidad reducida, se encuentran las cabezas anormales, espermatozoides decapitados, anomalías de la pieza intermedia y colas dobladas o enrolladas en espiral, así como determinadas anomalías heredables (Dresdner y Katz, 1981).

La morfología espermática se valora tradicionalmente mediante observación visual al microscopio de extensiones de muestras de esperma teñidas con diferentes técnicas. Entre los métodos de tinción más empleados se incluye la Eosina-Nigrosina (Colas, 1980), Trypan azul y Giemsa (Kusunoki y col., 1988), Papanicolau (Hafez, 1987) y Spermac (Oettle, 1986). Sin embargo estos métodos de valoración condicionan la interpretación de los resultados (apdo. 5, pag. 60).

4.4. Acrosoma

La capacitación 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 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 espermatozoide (Benoff y col., 1993; Bielsa y col., 1994). Asimismo, son varios los autores que obtienen una alta correlación entre el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro y la fertilidad (Saacke y White, 1972; Juneja y col., 1989).

La evaluación de la integridad acrosómica puede realizarse mediante fijación de las células y observación con microscopía de contraste de fases (Söderquist y col., 1997), con extensiones teñidas bajo iluminación normal (Varner y col., 1987; Vázquez y col., 1992), o con microscopía de interferencia y fluorescencia (Johnson y col., 1996).

En las preparaciones sin teñir, lo más frecuente es fijar las células en glutaraldehído (Saacke y Marshall, 1968) o soluciones salinas formoladas (Memon y Ott, 1981), realizando la lectura bajo contraste de fases.

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

La bibliografía actual muestra, que en los últimos años, se han desarrollado numerosas técnicas que se fundamentan en el empleo de sustancias fluorescentes y en la

capacidad de las membranas espermáticas para permitir o no el paso de las mismas dependiendo de su estado funcional; describiéndose técnicas de tinción simple o dobles; así como, fluorocromos (diacetato de carboxifluorosceína, yoduro de propidio (PI), pisum sativum agglutinin lectin (PSA), Hoechst 33342, SYBR-14, entre otros) para determinar la viabilidad de la célula espermática (Graham y col., 1990; Johnson y col., 1996). Otra técnica similar a las descritas es la del colorante del ADN H33258, sustancia fluorescente que no penetra en aquellas células espermáticas cuya membrana esté intacta, haciéndolo, sin embargo, en las que su membrana esté dañada (Cross y col., 1986), uniéndose al ADN y presentando por tanto estos espermatozoides una mayor fluorescencia.

Actualmente, el empleo de fluorocromos específicos y citometría de flujo permite evaluar de forma precisa las alteraciones acrosómicas del espermatozoide (Ericsson y col., 1990).

5. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

La valoración de la calidad del esperma mediante las técnicas convencionales esta condicionada, fundamentalmente, por la subjetividad del análisis. Algunos parámetros, como la morfología espermática, son especialmente susceptibles al error humano, a pesar de lo cual se siguen evaluando en la mayoría de los laboratorios, por observación visual al microscopio. Las morfoanomalías han demostrado ser un importante indicador de descensos en la fertilidad en diversas especies (Voss y col., 1981; Sekoni y Gustafsson, 1987; Chandler y col., 1988), pero su elevado grado de subjetividad e imprecisión ha condicionado enormemente su capacidad como predictor de la misma. Las variables inherentes a este tipo de análisis ha condicionado la repetitividad de los resultados; así la evaluación subjetiva y sesgada de los técnicos y las diferentes clasificaciones morfológicas ha provocado una gran variabilidad en los resultados dentro y entre laboratorios. Zaini y col. (1985) observaron diferencias en los resultados de la valoración de una misma muestra que oscilaron entre un 40% y un 60

%, y para Ayodeji y Baker (1986) entre un 20% y un 80%. Davis y col. (1992) observaron que para la mayoría de los laboratorios, los coeficientes de variación medios para el análisis visual se incluían en un rango de un 30% a un 60%, quedando así demostrada la baja repetitividad de estos análisis (Jequier y Ukombe, 1983; Ombelet y col., 1997; Backer y Clarke, 1987; Cooper y col., 1999). La variabilidad e imprecisión de los resultados de los métodos subjetivos dificulta su interpretación y hace necesario la introducción de análisis objetivos y precisos, que permitan reducir las diferencias intra e interobservadores, con los que se consigan resultados fiables y reproducibles entre laboratorios.

Con esta finalidad se desarrollan los primeros sistemas semi-automáticos para el análisis por imagen de la morfología espermática (Jagoe y col., 1986; Moruzzi y col., 1988) hasta la llegada, en la década de los 90, de los actuales sistemas para el análisis automático de la morfología espermática, que reciben las denominaciones de sistemas ASMA (Automatic Semen Morphology Analysis) o CASMA (Computer Automatic Semen Morphology Analysis). Esta tecnología, validada originalmente para el espermatozoides humano (Davis y col., 1992; Kruger y col., 1993; de Monserrat y col., 1995), progresivamente se ha ido adaptando a algunas especies animales (Gravance y col., 1996; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001; Sancho y col., 1998). De forma general, estos sistemas se componen de un microscopio, que a través de una cámara incorporada, transmite imágenes procedentes de extensiones de muestras de espermatozoides previamente teñidas, hacia una tarjeta capturadora ubicada en la computadora. La imagen microscópica digitalizada es procesada por el software de análisis, informando de forma individualizada, a cerca de las características morfométricas de los espermatozoides capturados (Hidalgo y col., 2002). A diferencia de la variabilidad inherente al análisis subjetivo, esta tecnología ha permitido cuantificar de forma precisa y repetible las características morfométricas de la cabeza de los espermatozoides (Davis y col., 1992). Marnet y col. (2000) compararon el método convencional con el computerizado observando que la variabilidad existente en el análisis morfológico entre observadores, incluso dentro del mismo laboratorio, era superior para el método convencional frente al computerizado.

Sin embargo, la eficacia de estos sistemas depende de la estandarización en cada especie de una serie de variables analíticas que intervienen en el análisis, (Davis y Gravance, 1993; Gravance y col.,1995; Gago y col., 1998; Hidalgo y col., 2002), y que afectan tanto a la preparación de la muestra (lavado, fijación y tinción) y captura de imágenes con microscopio bajo condiciones adecuadas de iluminación, como al análisis de las mismas. Además de las variaciones propias debidas al proceso de valoración, se deben añadir los errores causados por el análisis de un número insuficiente de espermatozoides no representativo de la muestra, o a las causadas por las posibles diferencias existentes entre diferentes sistemas ASMA.

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

El análisis morfométrico también se ha empleado para valorar el efecto de la congelación-descongelación sobre las dimensiones espermáticas (Gravance y col., 1995 y 1998), llegándose a postular que las diferencias morfométricas observadas puedan servir como indicadores de la capacidad para congelar de individuos o de eyaculados concretos.

El estudio de la caracterización de las diferentes formas espermáticas y su relación con la fertilidad es una de las posibilidades que actualmente ofrece el análisis morfométrico. Las nuevas tecnologías de análisis por imagen permiten estudiar de forma individualizada las características de los espermatozoides, lo que ha permitido vislumbrar la heterogeneidad celular existente tanto entre los eyaculados de mamíferos como entre sus individuos. Esta variabilidad puede ser debida a la presencia de subpoblaciones espermáticas morfológicamente diferentes, en eyaculados o individuos, y que quizás también difieran en su capacidad fecundante. El análisis automático de la

morfología espermática se está empleando en la actualidad para identificar y caracterizar estos grupos celulares en las diferentes especies animales (Thurston y col., 2001; Buendía y col., 2002).

6. CONGELACIÓN DE ESPERMA

6.1. Consideraciones generales

La congelación de espermatozoides en nitrógeno líquido a -196°C , es un método de conservación esencial para el desarrollo e instauración de programas de espermatización manual (EM) en el ganado caprino, ya que, preserva las características espermáticas por tiempo indefinido, y su aplicación mediante EM incrementa el rendimiento reproductivo de los machos, además de mantener y difundir el material genético previamente seleccionado. Sin embargo, los procesos de congelación-descongelación provocan alteraciones ultraestructurales, bioquímicas y funcionales en los espermatozoides (Parks y Graham, 1992), que resultan en una disminución de las tasas de concepción cuando se comparan con las obtenidas con espermatozoides refrigerados o diluidoconservados (Memon y Ott, 1981; Chauhan y Anand, 1990), aunque con estos últimos se reduce la viabilidad espermática solamente a algunas horas.

El grado de susceptibilidad al daño producido durante el proceso de congelación-descongelación, depende de la combinación de varios factores (Watson, 1995 y 2000) entre los que destacamos la especie animal (Aguado y col., 1998; Sanz y col., 1999), raza (Cochran y col., 1985; Karatzas y col., 1997) e incluso el propio individuo (Ritar y Salamon, 1991; Garde, 1993), a causa de las diferencias existentes en las características de los lípidos integrantes de las membranas celulares.

6.2. Alteraciones del espermatozoide durante los procesos de congelación y descongelación

La causa primaria del daño celular que se produce durante la congelación-descongelación es la alteración de la membrana plasmática debido a acción de fenómenos térmicos, mecánicos, químicos y osmóticos. Estas alteraciones se atribuyen fundamentalmente a la deshidratación celular que produce la congelación y a la formación de cristales de hielo intracelulares originados a partir del agua de constitución durante la fase del cambio de estado y que son los responsables de los daños irreversibles a nivel de la membrana plasmática cuando se invierte el proceso durante la descongelación (Weitze y Petzoldt, 1992). Ambos fenómenos están íntimamente relacionados y sus efectos son difíciles de separar (Parks y Graham, 1992).

Como bien es conocido, la deshidratación celular y concentración de solutos así como la formación de cristales intracelulares, son procesos dependientes de la tasa de enfriamiento. Cuando una suspensión celular desciende por debajo del punto de congelación, se forma hielo en el espacio extracelular de manera que la membrana plasmática actúa a modo de barrera impidiendo la entrada de los cristales de hielo en el medio intracelular, manteniendo así la célula el agua de su interior en estado líquido. Por su parte, el hielo exterior libera sales hacia el interior de la célula elevando la concentración de solutos, lo que crea una tendencia del agua intracelular a salir al medio externo a favor de gradiente osmótico con la subsiguiente deshidratación celular (Watson, 1990).

Para las células espermáticas, la tasa óptima de descenso de la temperatura oscila entre 10-100°C/min, ya que velocidades superiores o inferiores provocan una disminución de la supervivencia (Rodríguez y col., 1975). En este sentido, la supervivencia espermática en función de la tasa de enfriamiento parece estar relacionada con la capacidad del agua para abandonar la célula, es decir de la permeabilidad de la membrana plasmática para el agua. Si la velocidad de enfriamiento es demasiado baja, la deshidratación progresiva de la célula hace que el agua

intracelular superenfriada salga hacia el medio extracelular congelándose, quedando la célula expuesta a una elevada concentración de solutos que disminuye su viabilidad por el denominado efecto solución (Barrio, 1996). A medida que avanza la cristalización en el medio extracelular, los espermatozoides quedan atrapados entre los cristales de hielo en canales de solución sin congelar. Si el descenso de temperatura es lo suficientemente lento como para permitir el paso de agua a través de la membrana, estos canales líquidos con las células atrapadas en su interior permanecerán a temperaturas inferiores al punto de congelación del agua. Para Parks y Graham (1992), estas condiciones provocan daño celular por varias razones; en primer lugar, cuando se elimina más del 90% del agua, la membrana plasmática puede sufrir alteraciones ultraestructurales como consecuencia de la deshidratación osmótica y no por la formación de cristales intracelulares, lo que tiene como consecuencia una permeabilidad no selectiva de la membrana; en segundo lugar, si los canales de solución sin congelar son demasiado pequeños para albergar a las células, estas pueden sufrir alteraciones por deformación.

Cuando la velocidad de enfriamiento es excesivamente alta, el agua no puede abandonar la célula con la suficiente rapidez de manera que se congela produciéndose hielo intracelular en forma de cristales, que producirán daño y muerte celular, aunque en este caso, la supervivencia de la célula está condicionada a la cantidad y tamaño de los cristales, ya que microcristales en pequeña proporción no necesariamente son incompatibles con la supervivencia celular (Amann y Pickett, 1987).

Además de estos daños por enfriamiento, la velocidad de descongelación es también de gran importancia y está relacionada con la formación de cristales. Las rampas de congelación y descongelación son las responsables de la formación cristales, de forma que un control estricto y parejo sobre ellas ayudaría a reducir al mínimo el daño celular. Por ejemplo, la descongelación rápida de células congeladas lentamente en presencia de un crioprotector penetrante, puede provocar la incapacidad de este para salir de la célula con la suficiente rapidez como para mantener el equilibrio osmótico, lo que produciría un hinchamiento de la célula por la entrada de agua. Por otro lado, una

descongelación lenta permite la recrystalización durante el proceso con efectos nocivos para la célula (Watson, 1990).

Según Mazur (1985), los principales daños por enfriamiento de las membranas espermáticas durante el proceso de congelación y descongelación, se producen entre temperaturas de entre -15°C y -60°C , y no durante el almacenamiento en nitrógeno líquido.

La bajada rápida de la temperatura o “choque frío”, además de alteraciones en la membrana plasmática, se manifiesta por el aumento de la solubilidad de los gases (oxígeno doble y anhídrido carbónico triple) y de la viscosidad de los coloides, así como, por la salida de ciertas sustancias intracelulares de importancia vital, que pasan al medio exterior (enzimas, lipoproteínas, ATP, potasio, fosfolípidos, etc).

Diversos estudios morfológicos han revelado que una de las estructuras más afectadas por el choque por frío es la membrana acrosomal. Barrios y col. (1998) mediante el empleo de la microscopía electrónica de barrido, observan que el daño ejercido por el choque-térmico en espermatozoides ovinos, consiste en una desestructuración de las membranas plasmática y acrosomal, que provoca un estallido y reciclamiento vesicular en gran parte de los componentes de la membrana. Chauhan y col. (1994), mediante microscopía electrónica, describen los cambios sufridos en la ultraestructura del espermatozoide durante el proceso de congelación-descongelación, consistiendo en una protusión del capuchón cefálico, colas partidas, hinchamiento del acrosoma y pérdida del contenido acrosomal. Esto último supone la liberación de varias enzimas específicas (Salisbury y col., 1978) entre las que destacamos la acrosina y la hialuronidasa de gran importancia en el proceso de la fertilización (McRorie y Williams., 1974) y que sirven de indicadores de la alteración del acrosoma durante el procesado y congelación del esperma (Foulkes y Watson, 1995), informando a cerca de la calidad del mismo.

Coincidiendo con estos cambios morfológicos, los espermatozoides sufren alteraciones bioquímicas considerables. Según Chauhan y col. (1994), existe una correlación positiva entre el daño acrosomal y la liberación de enzimas intracelulares como la fosfatasa ácida y alcalina, las transaminasas (GOT y GPT) y la láctico deshidrogenasa, responsables de un descenso de la actividad metabólica del espermatozoide. Según Watson y col. (1981), estos cambios bioquímicos se acompañan además de una disminución en el metabolismo de los carbohidratos, con una reducción rápida de los niveles de ATP que no se resintetiza, así como con una liberación de lípidos consecuencia de la fragmentación de las membranas. Estas alteraciones bioquímicas fundamentan algunas pruebas enzimáticas que tienen como objetivo determinar la presencia de estas enzimas intracelulares en el plasma seminal como marcadores del daño celular producido en el espermatozoide durante el proceso de congelación-descongelación (Singh y col., 1992)

Por añadidura a los efectos directos letales sobre la célula espermática sometida a congelación-descongelación, los métodos convencionales de valoración pueden informar a cerca de la criosupervivencia espermática cuando sus resultados se comparan con los eyaculados en fresco. Por ejemplo, el movimiento espermático es menor, de peor calidad y se mantiene durante menos tiempo en el esperma congelado-descongelado que en el fresco, indicando una alteración de las membranas durante el proceso (Dorado, 2003). Asimismo, se están empleando métodos complementarios como la citometría de flujo, para determinar mediante sustancias específicas (Lyso Tracker Green DND-26) los acrosomas intactos (Graham y col., 1990; Johnson y col., 1996). Algunos estudios han propuesto que los procesos de congelación-descongelación podrían provocar una alteración de la cromatina espermática (Royere y col., 1988).

6.3. Método de congelación-descongelación

Desde los primeros intentos para congelar el esperma de macho cabrío realizados por Smith y Polge (1950) y Baker (1957), en los que los índices de fertilidad

eran muy bajos y por tanto poco prácticos, se ha desarrollado diversos estudios para mejorar los métodos de congelación con el fin de aumentar la viabilidad del espermatozoides.

6.3.a) Diluyentes empleados en la congelación-descongelación del espermatozoides caprino

Muy pocos espermatozoides sobreviven al proceso de congelación-descongelación en ausencia de soluciones diluyentes conservadoras adecuadas que incorporen agentes crioprotectores. En 1982 Graham y col. señalan, entre las características que debe proporcionar un buen diluyente, tener la capacidad de mantener una adecuada presión osmótica y equilibrio electrolítico, poseer compuestos con propiedades quelantes y proporcionar un pK de 7 dado la baja capacidad tampón del plasma seminal.

La dilución del espermatozoides caprino se ha venido realizando con diversos diluyentes a base de leche descremada reconstituida (Corteel, 1974; Dorado, 2003) y con combinaciones de Tris-yema de huevo-glucosa (Ritar y Salamon, 1982; Dorado, 2003), dextrosa-ácido cítrico (Chandler, 1988) o ácido cítrico-yema de huevo (Memon y Ott., 1981). El diluyente universal Tris-ácido cítrico-fructosa ha proporcionado óptimos resultados desde su utilización por Ritar y Salamon (1982). Varios trabajos han demostrado que los compuestos amínicos (Tes, Bes, Hepes y Pipes) son los que cumplen en su mayor parte con la lista de aportaciones ideales en la protección espermática, manteniendo un pH constante además de permitir la inclusión posterior de crioprotectores no penetrantes como la yema de huevo a distintas proporciones (Dunner y Vázquez, 1991; Pintado, 1991; Dorado, 2003).

Deka y Rao (1987) en un estudio comparativo entre diluyentes comúnmente empleados en la congelación de espermatozoides caprino, observan un mayor grado de congelabilidad para el diluyente Tris-yema de huevo-glicerol con respecto al resto de diluyentes (leche desnatada, citrato-yema de huevo, rafinosa-yema de huevo-glicerol), así como, un mayor movimiento espermático e integridad de acrosoma a la descongelación. Resultados similares obtienen Chauhan y Anand (1990) estudiando las características espermáticas a la descongelación en tres diluyentes diferentes (Tris-yema

de huevo, Citrato-glucosa-yema de huevo y leche desnatada-yema de huevo), Pintado y col. (1991) en cinco (Citrato- yema de huevo, diluyente de Cornell, leche descremada, Tris-ácido cítrico-glucosa y Tris-ácido cítrico-fructosa), Tuli y Holtz (1992) en cuatro (Tris-ácido cítrico, Tes-Tris, Tes-hidróxido de sodio y Bes-hidróxido de sodio) y Pérez y Mateos (1995) en tres diluyentes (Tris-yema de huevo, Leche y Yema de huevo-Leche). En cuanto al espermatozoides refrigerados Dunner (1991a y b) empleando dieciséis diluyentes diferentes con espermatozoides de machos Murciano-Granadinos, obtiene resultados de movimiento e integridad de acrosoma significativamente superiores para las combinaciones de Tris, sobre todo Tris-Tes y Tris-Pipes. Dorado (2003) comparando los diluyentes Tris y Lácteo, obtiene a la descongelación mejores porcentajes para movimiento total y rápido progresivo con Tris e integridad del acrosoma con Lácteo.

6.3.b) Adición de crioprotectores a los diluyentes del espermatozoides caprino

Aunque en la bibliografía se recogen gran variedad de agentes crioprotectores que se pueden emplear en la congelación, como el glicerol, el DMSO, el 1,2-propanodiol y el etilenglicol; azúcares como la glucosa, fructosa, sacarosa, rafinosa y la lactosa; y proteínas y lipoproteínas como la yema de huevo o suero sanguíneo, el glicerol ha venido empleándose de forma casi exclusiva en la conservación del espermatozoides caprino desde su descubrimiento por Polge y col. (1949).

Para Singh y col. (1995), el glicerol sólo o en combinación con la lactosa obtiene mejores resultados de movimiento progresivo, integridad de acrosoma y porcentaje de espermatozoides vivos a la descongelación que el DMSO. Resultados similares obtuvieron Molinía y col. (1994) en estudios realizados sobre la incorporación de crioprotectores penetrantes en los diluyentes de congelación de espermatozoides ovino.

El DMSO penetra de forma rápida a través de la membrana plasmática del espermatozoide, ejerciendo su acción crioprotectora, no obstante en morueco se ha observado un efecto tóxico durante el proceso de refrigeración, disminuyendo la viabilidad del espermatozoides a la descongelación (Jones, 1965). Sin embargo, el glicerol

aunque no se conoce completamente su efecto crioprotector durante el proceso de refrigeración y congelación-descongelación, penetra a menor concentración equilibrando la presión osmótica e interfiriendo en el incremento de solutos para impedir la nucleación y la formación de cristales de hielo (Meryman, 1966). Recientemente se ha descubierto, que el glicerol forma además fuertes uniones con los fosfolípidos de la membrana plasmática del espermatozoide, durante el proceso de congelación (Anchordoguy y col., 1987) e interacciona con ella, uniéndose a proteínas y glicoproteínas (Armitage, 1986), lo que le confiere la mejor efectividad como crioprotector (Molinia y col., 1994).

Bien es conocido que el efecto crioprotector del glicerol depende de su concentración (Colas, 1975); sin embargo, la literatura no coincide en la proporción de glicerol a añadir con el fin de obtener los mejores resultados de viabilidad espermática a la descongelación. Generalmente, se ha venido incorporando al diluyente a proporciones que varían entre un 4 y 7% (Corteel, 1974; Chauhan y Anand, 1990) sólo o en combinación con DMSO al 1% (Singh y col., 1995). Drobniš y col. (1982) observan que la proporción de glicerol más beneficiosa entre 0%, 4% y 7% es el 7%. En cambio Salamon y Ritar (1982) aprecian que el 4% obtiene mejores resultados que el 2.5% y que 5.5%. Deka y Rao (1986) obtienen que el 4.6% de glicerol favorece a la integridad del acrosoma y el 6% al movimiento espermático. Pérez y Mateos (1995) observan una interacción entre la cantidad de glicerol y la composición del diluyente, alcanzándose los mejores resultados cuando emplean el 4% en el diluyente Tris-yema de huevo y el 8% en el yema de huevo-leche.

Por otro lado, Singh y col. (1995) concluyen que la lactosa en combinación con el glicerol tiene un mayor efecto crioprotector que el glicerol sólo, y esta actividad aumenta conforme incrementamos la concentración de lactosa, como se ha demostrado en el toro (Krishnamoorthy, 1981). La lactosa realiza su efecto crioprotector manteniendo la osmolaridad del diluyente (Salisbury y col., 1978) y permite disminuir la proporción de glicerol hasta el 5%, sin producir ningún efecto negativo sobre el movimiento espermático a la descongelación (Krishnamoorthy, 1981).

Por todo esto, probablemente el nivel óptimo de glicerol dependa de varios factores entre los que destacan la composición del diluyente y la cantidad de otros crioprotectores presentes en el mismo (Pérez y Mateos, 1995).

Existe gran controversia en cuanto al método de glicerolización a emplear en la congelación del esperma caprino, si bien en la mayoría de los trabajos se demuestra que la adición en un solo paso y de forma gradual del glicerol a temperaturas de laboratorio a +37°C, mejora la calidad del esperma congelado-descongelado (Salamon y Ritar, 1982). Resultados similares se han descrito en morueco (Lightfoot y Salamon, 1969); sin embargo, Colas (1975) en morueco, obtiene mejores resultados de movimiento a la descongelación cuando la glicerolización la realiza a +4°C. En caprino Deka y Rao (1986) aprecian mayores porcentajes de movimiento a la descongelación cuando la glicerolización se realiza a +5°C.

6.3.c) Adición de antibióticos a las soluciones diluyoconservadoras

La adición de antibióticos se ha convertido en un hecho rutinario ya que se consigue controlar el crecimiento de la flora bacteriana en el eyaculado, si bien no existen muchos trabajos sobre el efecto de los antibióticos en el esperma caprino. Aunque en principio la acción de estas sustancias fue considerada beneficiosa para el esperma, pueden ejercer un cierto efecto espermicida (Ahmad, 1987) o alterar alguna de los parámetros espermáticos, sobre todo los relacionados con el movimiento (Jasko y col., 1993). En el toro, Ahmad (1987), entre otros, concluye que la mayoría de los antibióticos pueden ser utilizados sin problemas para el control del crecimiento bacteriano, si bien encuentra algunas diferencias en función del tipo de diluyente empleado. Ericsson y col. (1990) en toro, tampoco aprecian que la adición de antibióticos altere de forma significativa la viabilidad de los espermatozoides, no apareciendo efectos adversos sobre la calidad el esperma congelado-descongelado. Asimismo, Anel y col. (1998) comprueban que la adición de ciertos antibióticos en el diluyente de congelación del esperma ovino, no tiene efectos adversos sobre las

características seminales (movimiento e integridad de acrosoma y de membrana plasmática) del esperma congelado-descongelado.

6.3.d) Papel de la yema de huevo en la congelación del esperma caprino

Phillips y Lardy (1940) fueron los primeros autores en describir, el efecto protector que la yema de huevo tiene, sobre la membrana espermática y acrosoma del espermatozoide frente al “choque frío”, siendo todavía un constituyente habitual de los diluyentes usados en la congelación del esperma en esta especie. La yema de huevo posee una fracción de lipoproteínas de baja densidad, concretamente de fosfolípidos, que se ha demostrado tiene un efecto crioprotector del espermatozoide durante el proceso de refrigeración y congelación-descongelación. El mecanismo por el cual estos fosfolípidos protegen la membrana espermática no es del todo conocido, aunque se cree que pueden prevenir la pérdida de fosfolípidos que la misma sufre durante el choque frío.

Sin embargo, se sabe que la congelación del esperma caprino, empleando diluyentes que contengan yema de huevo, es complicada debido a la presencia de una fosfolipasa A (egg yolk coagulating enzyme, EYCE) en el plasma seminal (Roy, 1957), producida por las glándulas de Cowper y que cataliza la hidrólisis, en presencia de Ca^{+2} , de las lecitinas de la yema de huevo produciendo ácidos grasos y lisolecitinas con efecto tóxico directo sobre los espermatozoides (Roy, 1957; Corteel, 1980; Pellicer y Combarous, 1994), ejerciendo un efecto desfavorable sobre la fertilidad del esperma (Roy, 1957; Ritar y Salamon, 1982).

Por todo esto, en la congelación del esperma caprino, el porcentaje de yema de huevo empleado en las soluciones diluyoconservadoras, normalmente es menor al utilizado en la congelación de esperma de toro o morueco. Así, Memon y col. (1985), indican una drástica disminución de la viabilidad espermática, cuando el esperma no centrifugado se diluye en soluciones que contienen un 11% de yema de huevo; y según Ritar y Salamon (1982 y 1991), las concentraciones de yema de huevo superiores al

1.5% provocan un efecto depresivo sobre la viabilidad del espermatozoides no centrifugado, originando una coagulación del medio y muerte celular tras 2 horas de incubación a +37°C. Sin embargo, Dunner (1993) no aprecia este descenso en la viabilidad del espermatozoides cuando emplea diluyentes con una concentración de yema de huevo del 3% y 12%; Pérez y Mateos (1995) obtienen mejores resultados a la descongelación cuando emplean concentraciones de 9% y 12%; y Gracia y col. (1998) en machos de la Agrupación Caprina Canaria, obtienen una mayor calidad del espermatozoides congelado-descongelado a medida que el diluyente incorporaba mayor proporción de yema de huevo (12%). Roca y col. (1997) consideran que la razón de estas divergencias entre autores pudiera deberse a diferencias en la concentración de EYCE entre razas, aunque hasta la fecha éstas no se han demostrado, pero si se ha sugerido la presencia de diferencias bajo la influencia de la estación y entre individuos (Ritar y Salamon, 1982 y 1991). Asimismo, Iritani y Nishikawa (1961) indican que el plasma seminal del toro, morueco, cerdo y conejo no contienen la enzima EYCE. Por otra parte, la hidrólisis de las lecitinas de la yema de huevo depende, entre otros, de la disponibilidad de calcio (Roy, 1957), pH, temperatura y de la concentración de plasma seminal (Iritani y Nishikawa, 1961).

6.3.e) Efecto de la separación del plasma seminal sobre el grado de congelabilidad del espermatozoides caprino

De forma específica, en el eyaculado de macho cabrío el plasma seminal es responsable de un efecto desfavorable, sobre el grado de congelabilidad del espermatozoides (Roy, 1957; Corteel, 1974). Para Ritar y Salamon (1982), la separación del plasma seminal, mediante centrifugación, muestra un efecto positivo sobre la viabilidad del espermatozoides caprino congelado-descongelado.

El efecto tóxico que la hidrólisis de la yema de huevo tiene sobre los espermatozoides, puede ser reducido mediante la separación del plasma seminal por centrifugación previa dilución del espermatozoides (Corteel, 1974), mejorando así la viabilidad de las células espermáticas tras el proceso de congelación-descongelación (Corteel,

1974; Ritar y Salamon, 1982; Memon y col., 1985; Dorado, 2003), o en su defecto, tendremos que disminuir la concentración de yema de huevo presente en el diluyente (Ritar y Salamon, 1982 y 1991) o emplear altas diluciones de esperma (Chauhan y Anand, 1990).

Varios autores observan que el esperma centrifugado puede preservarse a bajas temperaturas tras diluirlo en soluciones Tris que contengan altas concentraciones de yema de huevo (Ritar y Salamon, 1982; Chauhan y Anand, 1990; Corteel, 1974; Dorado, 2003). Pellicer-Rubio y Combarous (1998), utilizando diluyentes a base de leche, verifican también que el plasma seminal ejerce una acción negativa en el proceso de congelación y aconsejan su eliminación mediante centrifugación; eliminación que Ritar y Salamon (1982) realizan con el esperma fresco, dentro y fuera de la estación reproductiva (Corteel, 1974 y 1977; Nunes y col., 1982; Ritar y Salamon, 1982). Así, varios autores indican separar el plasma seminal por centrifugación previa dilución, con el fin de evitar el efecto detrimental que tienen sobre el movimiento espermático, integridad de acrosoma y respiración (Nunes y col., 1982; Memon y col., 1985). No obstante, los efectos de la centrifugación son diferentes dependiendo de la intensidad del lavado (Ritar y Salamon, 1982) y del diluyente utilizado (Ritar y Salamon, 1991). Entre las ventajas inherentes se ha demostrado que la centrifugación conlleva la pérdida según autores del 6% (Ritar y Salamon, 1982), 10% (Corteel, 1974; Dunner y Vázquez, 1991) y 15% (Leboeuf, 1992) de las células espermáticas.

Mateos y Pérez (1994) opinan que el efecto de la centrifugación depende del diluyente que se emplee. Existen trabajos en los que se utilizan diluyentes que contienen compuestos amínicos, y que aún no encontrando diferencias significativas, los valores medios obtenidos con esperma centrifugado, proporcionan cifras de viabilidad *in vitro* más bajas que cuando no había sido centrifugado (Chauhan y Anand, 1990; Tuli y Holtz, 1992; Vázquez y col., 1998; Azerêdo y col., 2001). Maxwell y col. (1997) mediante citometría de flujo, observaron que la ausencia del plasma seminal induce un incremento del porcentaje de células con membranas dañadas. Sin embargo, Azerêdo y

col. (2001) utilizando fluorocromos para la valoración de la integridad del acrosoma, no observa diferencias significativas entre el esperma centrifugado y sin centrifugar.

Sin embargo, Mateos y Pérez (1994) trabajando con esperma diluyoconservado en Tris-yema de huevo (3%), observan que el centrifugado del mismo proporciona una mejor viabilidad a la descongelación en cuanto a porcentaje de espermatozoides móviles y calidad de movimiento, mostrando resultados similares en cuanto a porcentaje de acrosomas dañados e inferior porcentaje de formas anormales. Sin embargo, Memon y col. (1985) empleando tres soluciones diluyoconservadoras diferentes, no encuentran efecto del diluyente sobre el proceso de centrifugación.

También se conocen las variaciones en la eficacia de la separación del plasma seminal en función de la concentración espermática de la muestra. En este sentido, Corteel (1990) determinó para las razas Alpina y Saanen, que debemos aplicar solución de lavado hasta obtener una concentración espermática de 200-400 x 10⁶ spz/ml. Ritar y Salamon (1982) en Angora, observan una mayor tasa de viabilidad en esperma congelado-descongelado con diluyente Tris-yema de huevo al 12%, realizando un doble centrifugado con solución de lavado al 1:10 y 1:20.

Algunos autores aprecian que el esperma caprino no centrifugado puede también ser diluyoconservado a +5°C en diluyente Tris con un 1.5-2% de yema de huevo (Ritar y Salamon, 1982 y 1991 en Angora; Roca y col., 1997 en Murciano-Granadina). Azerêdo y col. (2001) en 3 machos Saanen, observan que el proceso de centrifugación causa un descenso del movimiento tras la refrigeración y congelación-descongelación, coincidiendo con lo descrito por otros autores (Chauhan y Anand, 1990). El plasma seminal fuera de la estación reproductiva y bajo determinadas condiciones climáticas es capaz de estimular el movimiento (Corteel, 1992).

Otros investigadores por el contrario tienen como objetivo eliminar la fase de centrifugación del esperma caprino para separar el plasma seminal, o por lo menos simplificar el proceso de congelación a través de la identificación y neutralización del

factor enzimático presente en las secreciones de las glándulas bulbouretrales, o a través del desarrollo de medios sintéticos o semi-sintéticos capaces de preservar la fertilidad espermática. Por otro lado, otros autores señalan el efecto positivo de la adición a los diluyentes de esperma, de otras sustancias menos comunes como el agua de coco (Salles y Nunes, 1993), saliva o extractos vegetales (García y Ruttle, 1987), diferentes sustancias con efecto tampón (Tuli y Holtz, 1992; Dunner, 1993) o preparados de lípidos purificados (Graham y Foote, 1987).

La adición de sustancias tensoactivas al diluyente de congelación ha demostrado ejercer un efecto beneficioso sobre el movimiento espermático y la integridad del acrosoma en la congelación rutinaria de esperma en porcino y equino (Martin y col., 1978; Cochran y col., 1984). Hoy por hoy, el mecanismo de acción de los detergentes no se conocen con total exactitud pero el efecto beneficioso que tienen sobre el movimiento espermático e integridad de acrosoma, se relaciona con la concentración de yema de huevo existente en el diluyente (Graham y col., 1972).

6.3.f) Proceso de equilibrado

Una vez diluido el esperma es necesario permitir que éste se estabilice, de modo que los espermatozoides estén bien protegidos durante el proceso de congelación-descongelación. El efecto que la duración del periodo de equilibrado, tiene sobre la congelabilidad del esperma caprino, ha sido poco estudiado (Salamon y Ritar, 1982). Existen pautas de congelación del esperma caprino que no utilizan este periodo de equilibrado (Corteel, 1974), a pesar de constituir una etapa de gran importancia en la congelación del esperma en otras especies.

Durante el equilibrado se produce un descenso de la temperatura del esperma desde los +20-30°C hasta +5°C, el cual debe realizarse a velocidad uniforme. Chauhan y Anand (1990) observan una mayor viabilidad del esperma tras realizar un período de equilibrado de 3 horas a +5°C; sin embargo, Pérez y Mateos (1995) aprecian que un período de equilibrado de 2 horas a +5°C mejora de forma considerable los porcentajes

de espermatozoides móviles y formas normales a la descongelación, así como la calidad del movimiento y el porcentaje de acrosomas dañados, aunque este último en menor grado.

Para Mareco y Arosteguy (1994), este periodo varía entre 2-6 horas, obteniendo mejores resultados de viabilidad a la descongelación cuando el periodo de equilibrado se extiende a 3-4 horas. Asimismo, Vázquez y col. (1998) en las razas Murciano-Granadina, Malagueña, Verata y del Guadarrama, observan que el proceso de equilibrado a +5°C, empleando diluyente Tris, no debe de sobrepasar las 4 horas ya que se produce un descenso considerable de la viabilidad espermática. No obstante, Dorado (2003) en la raza Florida, no apreció un efecto detrimental de la viabilidad espermática tras un proceso de equilibrado a +5°C durante 5 horas, empleando diluyentes de Tris y Leche.

6.3.g) Método de envasado

Existe escasa bibliografía sobre el envasado del esperma caprino congelado-descongelado, sin embargo si hay algunos estudios en morueco (Maxwell y col., 1995), que obtienen los mejores resultados de fertilidad con el esperma envasado en pellets; aunque la demanda de mercado hace que otros tipos de envases tomen hoy por hoy una mayor importancia, como las pajuelas francesas selladas de 0.25 y 0.5 ml con alcohol de polivinilo o por ultrasonidos.

Existen distintas opiniones en lo que se refiere a la influencia del material del envase, sobre la viabilidad del esperma congelado-descongelado. En varios estudios comparativos entre pajuelas y pellets, unos autores obtienen mejores resultados de viabilidad y fertilidad con las pajuelas, mientras que otros los obtienen con los pellets. Para Hunton y col. (1987) no existen diferencias estadísticamente significativas en la fertilidad obtenida entre el esperma congelado-descongelado en pellets o en pajuelas, tras la espermatización intrauterina vía laparoscópica. Para Maxwell y col. (1995) los índices de fertilidad del esperma congelado-descongelado en pellets son superiores a los

obtenidos en pajuelas y además concluyen que los resultados de congelabilidad y movimiento a la descongelación del envasado en pajuelas de 0.5 ml son superiores a los obtenidos en las de 0.25 ml.

6.3.h) Proceso de congelación

El proceso de congelación expone a las células espermáticas a una pérdida de agua y a un incremento de la concentración de solutos intra y extracelulares, de lo que deriva la búsqueda de una velocidad óptima de congelación, para prevenir la formación de cristales intracelulares y minimizar el tiempo de exposición a la concentración de solutos. No obstante, la disminución de la temperatura debe realizarse de forma más o menos lenta, con el fin de mantener las características de las proteínas del plasma seminal que interaccionarán con las del núcleo espermático (García y col., 1993).

En la bibliografía encontramos discrepancias entre autores, en lo que respecta al tiempo de exposición a vapores de nitrógeno líquido, así como, la distancia de separación entre las pajuelas y la superficie del líquido. Por otro lado, el comienzo de la producción de cristales de hielo y el patrón de congelación del esperma depende del tamaño del envase (pajuelas de 0.5 ml que en 0.25 ml) y del tipo de soporte de las pajuelas (Ritar y col., 1990).

Además, los espermatozoides son muy sensibles a la exposición prolongada a vapores de nitrógeno líquido, mejorando su supervivencia cuando se colocan a 4 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido durante 30 segundos o más (Corteel, 1974; Ritar y col., 1990). Para Ritar y col. (1990), la viabilidad espermática se ve seriamente afectada en aquellas pajuelas colocadas sobre vapores de nitrógeno líquido por un período inferior a 10 segundos. Tuli y Holtz (1992), observan mejor viabilidad espermática cuando colocan las pajuelas a una distancia de 2 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido durante 8-9 minutos. Para Vázquez y col. (1998), la congelación en vapores de nitrógeno líquido debe de realizarse durante al menos 10 minutos.

Maxwell y col. (1995), obtienen un mayor porcentaje de movimiento y viabilidad espermática a la descongelación, cuando las pajuelas de 0.25 y 0.5 ml son colocadas a 6 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido.

6.3.i) Proceso de descongelación

El proceso de descongelación, es tan importante como la fase de refrigeración y congelación, en cuanto al impacto que tiene sobre la viabilidad del espermatozoide (Mazur, 1985). Las variaciones en la temperatura de congelación y descongelación influyen inevitablemente en la proporción de espermatozoides móviles, provocando además cambios estructurales, bioquímicos y funcionales en la célula espermática.

Según Salamon y Maxwell (1995a) la mayoría de los investigadores utilizan temperaturas entre los 38-42°C para descongelar esperma envasado en minipajuelas. Sin embargo, otros autores realizan la descongelación a temperaturas de 70-75°C (Aamdal y Andersen, 1968; Grotte y col., 1992).

Aamdal y Amdersen (1968) obtienen una mayor recuperación de las células espermáticas cuando se descongelan sumergidas en agua a +35°C, frente a la descongelación en agua fría a +5°C o a temperatura ambiente a +20°C. Según Rodríguez y col. (1975), el movimiento espermático a la descongelación aumenta significativamente cuando se realiza la descongelación en agua a +55°C durante 8 segundos frente a la descongelación en agua a +5°C durante 3 minutos.

Rugg y col. (1977) observaron una mayor recuperación de las células espermáticas tras descongelar en un baño maría con agua atemperada a +75°C durante 7 segundos en relación a la descongelación a +35°C durante 12 segundos y a +3°C durante 2 minutos. Hube y Uribe (1980) en toro, concluyen que la descongelación del esperma en agua a +40°C durante 10 segundos proporciona una mayor recuperación espermática, en cuanto a porcentajes de integridad de acrosoma y movimiento espermático que en

agua a +17°C durante 20 segundos, agua de hielo a +5°C durante 2 minutos y a temperatura ambiente a +21°C durante 6 minutos.

Söderquist y col. (1997) observan que la descongelación de pajuelas a +70°C durante 5 segundos, presenta mayores porcentajes de acrosomas intactos cuando se compara con una descongelación a +35°C durante 12 segundos. En la misma línea, Vázquez y col. (1998) en nuestras razas autóctonas, concluyen que la descongelación del espermatozoide debe realizarse de forma rápida al baño maría a +60°C durante 6 segundos, dejándola a continuación a temperatura ambiente para que adquiera, de forma suave los últimos grados de recuperación del cambio de estado.

Todo esto indica, que una descongelación rápida a temperaturas elevadas provocará una mejor recuperación espermática con un menor daño celular, por pasar más rápidamente la temperatura crítica (-60°C a -15°C) donde se producirá el mayor daño sobre el espermatozoide.

6.4. Valoración del espermatozoide congelado-descongelado

6.4.a) Movimiento a la descongelación

La estimación del movimiento espermático inicial, junto al movimiento tras un período de incubación después de la descongelación a diferentes temperaturas y tiempos, han sido comúnmente utilizadas como pruebas de viabilidad espermática (Saacke y White, 1972; Rodríguez y col., 2001).

Para Garde (1993) el test de endósmosis celular, junto al movimiento individual tras la incubación del espermatozoide durante 1 hora a +39°C, son los parámetros espermáticos que ofrecen mayor información y más fiable acerca del poder fecundante del espermatozoide congelado-descongelado.

Sin embargo otros autores indican que existe una mayor correlación de la prueba de longevidad, con la fertilidad potencial del esperma congelado-descongelado, si ésta se realiza inmediatamente después de la descongelación (Saacke y col., 1980), ya que el propio periodo de incubación eleva esta correlación con la fertilidad (Saacke y White, 1972; Fiser y col., 1991).

Según Fiser y col. (1991), el mantenimiento del movimiento espermático tras un período de incubación, refleja la probabilidad del esperma de permanecer viable en el aparato genital de la hembra. No obstante, el movimiento espermático decrece conforme aumenta el tiempo y temperatura de incubación (Fiser y col., 1991; Valcárcel y col., 1994; Bag y col., 2002a y b).

Por otra parte, la viabilidad del esperma congelado-descongelado depende, entre otros factores, de la temperatura inicial de congelación, que a su vez tiene un efecto significativo sobre el movimiento y velocidad espermática registrada a la descongelación (Bag y col., 2002a y b).

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. Animales

Esta experiencia se ha realizado sobre un rebaño de ganado caprino de raza Florida, localizado en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo Ganadero (CIDG) de la Diputación Provincial de Córdoba, ubicado a 3 Km. de distancia del Campus Universitario de Rabanales de la Universidad de Córdoba, donde se encuentra el laboratorio de la Unidad de Reproducción y Obstetricia del Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Este rebaño pertenece a la Asociación Española de Criadores de Ganado Caprino de Raza Florida (ACRIFLOR), y fue cedido para el desarrollo de este estudio que abarco una duración total de 12 meses consecutivos.

La localización geográfica de los animales se corresponde con el sur de la península ibérica (37°53'N-4°46'W; altitud 110m), donde el clima es tipo mediterráneo, con un índice de precipitaciones de 1034 l/m². Las temperaturas diarias registradas durante la experiencia oscilaron entre los 44°C de agosto como máxima y los 0°C de noviembre como mínima. Las horas de luz diarias oscilaron entre las 9:39:6 y las 14:40:06 horas luz en diciembre y junio respectivamente (observaciones recogidas por el Instituto Nacional de Meteorología) (Tabla 1).

Tabla 1. Temperatura ambiental media, máxima y mínima, pluviometría y horas de luz según la estación del año.

	TEMPERATURA (°C)			PLUVIOMETRÍA (l/m ²)	HORAS LUZ
	Media	Mínima	Máxima		
Primavera	22,84	13,93	31,76	48	13:58:09
Verano	28,04	20,52	35,56	23	13:25:59
Otoño	13,45	7,42	19,48	566	10:13:03
Invierno	12,73	7,09	18,38	397	10:56:51

* media de la temperatura mínima diaria registrada a las 7.39 ± 0.13 h.

** media de la temperatura máxima diaria registrada a las 17.49 ± 0.09 h.

1.1.a) Muestras de esperma

Se utilizaron muestras procedentes de 4 donantes de esperma, de entre 22 y 23 meses de edad, incluidos en el patrón racial Florida.

1.2. Instalaciones.

Los animales se encontraban ubicados en las dependencias del CIDG diseñadas para la cría y producción láctea, en régimen intensivo, en las que los machos estaban separados de las hembras; y se encontraban estabulados en un corral de 80 m² (10m x 8m), separado 18m de las instalaciones de las hembras, y contiguo a un pequeño corral de recogida de esperma de 21 m² (7m x 3m).

El laboratorio de la Unidad de Reproducción y Obstetricia, de 40 m², se ubica en las instalaciones del Hospital Clínico Veterinario S.L. de la Universidad de Córdoba, adscritas al Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria, en el Campus de Rabanales a 7 Km. de Córdoba.

1.3. Recogida y valoración de esperma

- Vagina artificial para ovino y caprino, ajustable con válvula. Minitüb.
- Termómetro para vagina artificial de mercurio, hasta +100° C. Minitüb.
- Colectores de vidrio graduados de 4 ml. Minitüb.
- Caja de Porex o isotérmica con tapa para el transporte de esperma a 37° C
- Lubricante no espermicida estéril, tubo de 156 gr, Priority Care[®].
- Solución Dulbecco's buffer di-fosfato (DPBS) con 25 mg/l. de Sulfato de Kanamicina y 1 x 20 ml. de albúmina al 0.4% w/v. (Emcare[®]).
- Diluyente Merck I[®] sin antibiótico. Minitüb.
- Cámara de contaje Neubauer (Brand).

- Cámara de recuento Makler (Sefi-Medical Instruments Ltd).
- Cubreobjetos para cámara de recuento (Menzel-glaser).
- Pipeta mezcladora de hematíes. Blanbrand.
- pHmetro Denver Instrument mod. Basic.
- Fotómetro Spermacue para la medición de la densidad del espermatozoide. Minitüb.
- Tinción para morfología y acrosoma (Spermac[®], Minitüb).

1.4. Análisis Morfométrico

- Portaobjetos de borde recto y biselado para extensiones.
- Cubreobjetos 22x60 cm.
- Tinción Giemsa Ultrarápido Diff-Quik[®]. Dade Behring, Suiza.
- Tinción rápida para frotis sanguíneos Hemacolor[®]. Merck Cat. no. 11661. Alemania.
- Colorante Hematoxilina de Harris, componente 1a del método papanicolau. Merck. Cat. no. 9253, Alemania.
- Medio de montaje para preparaciones Eukitt[®]. (Kindler & co, Alemania)
- Módulo de morfología de sistema automatizado para análisis de espermatozoide Sperm Class Analyzer[®] (SCA), Microptic S.L. (España), que incluye los siguientes componentes:
 - Unidad de control: Ordenador Intel Pentium MMX, procesador de 200MHZ.
 - Tarjeta digitalizadora PIP 1042-B
 - Microscopio óptico Olympus mod. BH2-Sc, con contraste de fases de Olympus. Provisto de ocular de 10x/20 L aumentos, objetivos de 4, 10, 20, 40 y 100 y Filtro verde If 550 de Olympus.
 - Cámara de televisión en blanco y negro Sony mod ccd-iris, incorporada al microscopio óptico.
 - Monitor principal mod Sony Multiscan 200 SX
 - Monitor auxiliar de alta resolución Mitsubishi mod no. EUM-1491A
 - Software de análisis de morfología espermática (versión 99).

1.5. Congelación-Descongelación

1.5.a) Procesado y refrigeración del esperma.

- Agitador eléctrico Heidolph mod. Reax 2.000.
- Estufa Pselecta mod.205, ajustadas a +37° C.
- Platina térmica Pselecta mod. Plactronic, ajustadas a +37° C.
- Placa atemperada para microscopio mod. f01.
- Cámara de televisión en color Sony mod ccd-iris, ssc-c350p, incorporada al microscopio óptico.
- Monitor auxiliar en color Sony mod. Trinitron kx-14cp1, de 13”.
- Microscopio óptico Leitz mod. Dialux 20 ed. Provisto de ocular de 10x/18 aumentos y objetivos de 4, 10, 40 y 100.
- Modulo de movimiento del sistema de análisis automatizado de esperma Sperm Class Analyzer[®], (SCA), versión 5.1, Microptic S.L.
- Micropipeta Autoclave Nichipet 0.5-10 µl.
- Micropipeta Eppendorf Reference 10-100 µl.
- Micropipeta Eppendorf Reference 50-250 µl.
- Centrífuga Jouan mod. br4i. rcf=1.118 r n2.Con rotor s40 (max. load 2.00 Kg. y max. rpm 4300).
- Equitainer[®], recipiente para transportar esperma diluidoconservado a +5° C. Minitüb.

1.5.b) Diluyentes

- Agua para análisis -ACS Panreac[®].
- Diluyente Triladyl[®] a base de agua bidestilada, ácido cítrico, fructosa, tampón Tris, glicerol y una concentración final de 15 mg de Tilosina, 25 mg de Gentamicina, 15 mg de Lincomicina y 30 mg de Espectinomicina para 100 ml. Minitüb.

- Yema de Huevo de gallina fresco y filtro para yema de huevo, estéril, forma embudo. Minitüb.
- Monohidrato de lactosa 11gr/l, tubo pasta 30 gr, Equex-Stm[®], Minitüb.
- Diluyente Lácteo con un 20% de yema de huevo y 4 % de glicerol. Gent[®], Minitüb
- Diluyente Tris Biladyl A[®], sin Glicerol compuesto por agua bidestilada, ácido cítrico, fructosa, tampón Tris (Tris-[hidroximetil-aminometano], y una concentración final de 100 µg. de Tilosina, 500 µg. de Gentamicina, 300 µg de Lincomicina y 600 µg. de Espectinomicina para 0.02 ml. Minitüb.
- Ab- Cocktail[®] para Biladyl y Triladyl LL. Minitüb.

1.5.c) Envasado

- Equipo combinado de soldadura por ultrasonido pgh 420, Branson Ultrasonidos.
- Equipo automático de envasado y sellado de pajuelas francesas de 0.5 y 0.25 cc con bomba de vacío, sellado por ultrasonidos y control electrónico Phillip mp 133, Minitüb.
- Bomba de vacío de baja densidad, 30-60 Hg, con válvula ajustable y manómetro. Minitüb.
- Impresora automática mt-65/133 az, con barra antiestática, Minitüb.
- Pajuela mediana francesa (pack 2.500 uni.) 0.5 cc. Minitüb.
- Alcohol polivinílico.(CH₂CHOH x 40-46 centipoises hidrolizado 87-89%) Dr. Theodor Schuchardt. Gmb & Co.
- Tubo para inyectores de 0.25 y 0.5 cc, largo 450 mm, con punta rectangular. Minitüb.
- Empaquetaduras para tobera envasadora y aspiradora para pajuelas francesas 0.25 y 0.5 cc, Minitüb.

1.5.d) Congelación

- Caja isotérmica con tapa, medidas interiores 745x345x250 mm. Minitüb.
- Chasis para pajuelas de 0.5 cc, capacidad para 36 pajuelas. Minitüb.
- Rampa de congelación horizontal para 100 pajuelas de 0.5 cc. Minitüb.
- Pinza para manipulación de pajuelas de 0.5 cc inv.

1.5.e) Descongelación

- Pinza para manipulación de pajuelas de 0.5 cc inv.
- Caja isotérmica con tapa, medidas interiores 745x345x250 mm. Minitüb.
- Tijeras Mayo 165 mm. Stainless.
- Termómetro de mercurio, hasta +100° C. Minitüb.

1.6. Banco de esperma

- Bombona de almacenamiento MVE xc 33/22. Telstar.
- Nitrógeno líquido. Air Liquide.

1.7. Análisis de los datos

- Ordenador Personal Intel® Pentium IV, con procesador Athlon 1.7 Ghz.
- Impresora Hewlett Packard modelo LaserJet 6L.
- Procesador de textos Microsoft Word, versión 2000.
- Hoja de cálculo Microsoft Excel, versión 2000.
- Programa para diseño de presentaciones y diapositivas Microsoft PowerPoint, versión 2000.
- Paquete de análisis estadístico Spss para Windows, versión 8.0.

2. MÉTODOS

2.1. Selección de los donantes de esperma

Se utilizó un lote inicial de 4 machos, con edades comprendidas entre los 22 y 23 meses de edad, que a partir de los 8 meses habían sido entrenados para la recogida de esperma en vagina artificial. Los sementales se sometieron a un ritmo de recogida de 2 saltos/semana, valorando el comportamiento sexual, así como, las características seminales de los eyaculados recogidos (Ficha 1, pag. 251), que se destinaron a realizar las pruebas preliminares necesarias para estandarizar el método de análisis morfométrico. Un segundo grupo de 2 animales, fue elegido entre los 4 machos, para la creación de un banco de esperma.

2.2. Recogida de esperma

Todas las muestras de esperma se recogieron utilizando una vagina artificial para pequeños rumiantes. La vagina se compone de un cuerpo de caucho, una camisa de látex y una válvula. Una vez montada, la cámara interior de la vagina era atemperada con agua a 40-42°C, regulando su presión insuflando aire a través de la válvula. En un extremo de la vagina, mediante un adaptador de látex, se fijaba el colector, de cristal y graduado en milímetros, protegido de la luz directa y de la temperatura exterior por una funda opaca termoaislante. El otro extremo, entrada de la vagina, se lubricaba con gel no espermicida estéril.

Las recogidas de esperma se realizaron en un corral destinado únicamente a tal efecto, aislando en la medida de lo posible a los animales de los estímulos externos y utilizando como soporte una hembra en celo para aportar al macho el estímulo sexual apropiado. Los machos se introducían en la zona de recogida, en la que previamente se encontraba la hembra inmovilizada por un operario. Tras mantenerlo primero unos

minutos en contacto visual delante de la hembra, a unos 2-3 metros de distancia, y a continuación en contacto directo (olfateo de la vulva, cara, etc.), al observarse una ligera erección se les permitía el salto y se le servía la vagina, permitiendo que el macho introdujera el pene en la misma hasta que concluían los movimientos pélvicos y golpe de riñón, que de forma característica acompaña a la eyaculación, retirando entonces la vagina a la vez que desmontaban. Durante la secuencia de cada recogida se registraba el comportamiento sexual (libido, erección, tiempo transcurrido al primer salto, etc.) y grado de interés por la hembra.

A continuación, el esperma recolectado era transportado desde las instalaciones donde se ubicaban los animales hasta las dependencias del laboratorio de la Unidad de Reproducción y Obstetricia, entre los 5 y 10 minutos siguientes a la recogida (aproximadamente a unos 3 Km. de distancia), tiempo en el cual estaba protegido de la acción de la luz directa y de los cambios de temperatura, manteniéndolo a 37°C.

Todo el material necesario para la recogida de esperma era limpiado cuidadosamente y enjuagado con abundante agua bidestilada para una próxima recogida.

2.3. Valoración del esperma

Como complemento al análisis morfométrico, en todos los eyaculados en fresco así como en las dosis descongeladas, se evaluaron los siguientes parámetros seminales:

2.3.a) Examen Macroscópico

Se realizó sobre el esperma fresco. Como parámetro cuantitativo se registró el volumen eyaculado, medido en ml a través de la escala graduada del colector. Se comprobó que las características organolépticas del eyaculado recogido (color, olor, densidad, etc.) eran fisiológicamente adecuadas para la especie

2.3.b) Valoración del movimiento

b)1 Esperma fresco:

- Diluyentes

Solución Dulbecco's buffer di-fosfato (DPBS):

Presentación: envase de 1 l preparado para su utilización.

Conservación y almacenamiento: se mantiene refrigerada a +5° C durante 6 meses.

- Método de valoración del movimiento:

Todas las valoraciones se realizaron empleando el modulo de movimiento del sistema automático de análisis de esperma Sperm Class Analyzer[®] (SCA). Para ello, una alícuota de esperma puro es diluída en DPBS, atemperado a 37°C, hasta alcanzar una concentración de 50×10^6 spz/ml. Tras 5 minutos de incubación en estufa, una gota de la dilución es depositada en el interior de una cámara Mackler ubicada sobre una platina calentable regulada a 37°C, observándose en microscopio provisto de platina térmica y objetivo de 10x y contraste de fase de 20x. El microscopio se encuentra comunicado con el SCA, capturando a través del software del modulo de movimiento espermático 3 series de campos microscópicos diferentes en cada una, de un total de dos gotas de la dilución. Tras analizar las imágenes capturadas, el sistema calcula automáticamente el porcentaje de espermatozoides con movimiento total y movimiento rápido progresivo, definido como el porcentaje de espermatozoides móviles que poseen una velocidad lineal $> 60\mu\text{m/s}$. Todos los datos son recogidos en una hoja de cálculo para su posterior estudio estadístico.

b)2 Esperma descongelado

- Diluyentes

Merck I[®]:

Presentación: polvo deshidratado para diluir en 1 l. de agua bidestilada.

Método de preparación: según el protocolo comercializado.

Conservación y almacenamiento: se almacena congelado en alícuotas de 20 ml a -18°C durante un período máximo de 6 meses.

- Test de longevidad del movimiento

El contenido de las dosis descongeladas se diluía en la solución Merck I, a razón de 1 ml por minuto, hasta conseguir una concentración aproximada de 40-50 x 10⁶ spz/ ml. Tras una hora de incubación en estufa a 37°C, dos gotas de la dilución eran analizadas mediante el SCA, según el método descrito en el apdo. 2.3)b1 (pag. 93)

2.3.c) Valoración de la concentración

La concentración de los eyaculados fue calculada utilizando la técnica del hemocitómetro. Se utilizó una pipeta mezcladora de hematíes para diluir el esperma puro al 1/200 en formalina al 10%. Tras homogeneizar la dilución y desprejar la primeras gotas de la pipeta, se llena por capilaridad el interior de una cámara de recuento celular (Neubaüer). Tras dejar sedimentar la cámara durante 3 minutos en posición horizontal, se cuentan con un microscopio óptico y objetivo de 40x, aquellas cabezas localizadas en el interior de las cuatro cuadrículas situadas en las esquinas de la cámara. La fórmula aplicada para el cálculo de la concentración (C), expresando el resultado en espermatozoides / ml fue:

$$C = M \times 400 \times 10 \times 200 \times 10$$

M = media de espermatozoides contados

400= superficie de cuadrado (1/400 mm²)

10= altura entre la cámara y el cubre (1/10mm)

200= factor de dilución

10= conversión de mm³ a ml

2.3.d) Valoración de la morfología

d)1 Esperma fresco

Utilizando una gota de 10µl de la dilución preparada para la valoración del movimiento (apdo. 2.3)b1, pag. 93), tras 5 minutos en estufa a 37°C, se realizó una extensión con un portaobjetos de extremos biselados sobre un porta situado sobre la superficie de una placa térmica regulada a la misma temperatura de la dilución. La extensión se dejó secar al aire y se tiñó siguiendo el protocolo comercial Diff-Quik[®]. Un total de entre 100 y 200 células se evaluaron por preparación, registrando en porcentaje las formas normales y las anomalías según la clasificación de Saacke (1970) (Ficha 2, pag. 252).

d)2 Dosis descongeladas

Se preparó una extensión siguiendo el método descrito en el apdo. d)1, utilizando una gota de 10 µl de la dilución para la valoración de la longevidad del movimiento, tras una hora de incubación. La preparación se dejó secar al aire y se tiñó con Diff-Quik[®]. Un total de entre 100 y 200 células se evaluaron por muestra, registrando el porcentaje de formas normales y entre las anormales el tipo de alteración presente en cada dosis a la descongelación (Ficha 2, pag. 252).

2.3.e) Valoración del acrosoma

e)1 Esperma fresco

Utilizando una gota de 10µl de la dilución preparada para la valoración del movimiento (apdo. 2.3.b)1, pag. 93), se realizó una extensión que se secó al aire para teñirla con el protocolo de la tinción comercial Spermac[®] (Oettle, 1986). Un total de entre 100 y 200 células se evaluaron por preparación, utilizando objetivo 100x de inmersión, registrando el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro, activado o desnudo (pérdida del capuchón cefálico) (Ficha 2, pag. 252).

e)2 Dosis descongeladas

Se preparó una extensión utilizando una gota de 10 µl de la dilución para la valoración de la longevidad del movimiento, tras una hora de incubación. La preparación se dejó secar al aire y se tiñó con Spermac[®]. Un total de entre 100 y 200 células se evaluaron por muestra, registrando el porcentaje de espermatozoides íntegros, activados o desnudos (Ficha 2, pag. 252).

2.4. Selección del método de análisis morfométrico y obtención de valores morfométricos medios del espermatozoide

Se emplearon muestras de esperma procedentes de 4 donantes, recogiendo un total de 16 eyaculados, 4 por cada macho.

2.4.a) Metodología general

a)1 Preparación de las muestras

Cada eyaculado fue recogido y valorado según la metodología descrita en los apartados de recogida (apdo. 2.2, pag. 91) y valoración de esperma (apdo. 2.3, pag. 92).

De la dilución del espermatozoide elaborada para realizar el análisis de motilidad (apdo. 2.3.b)1, pag. 93), se extendió una gota de 10 μ l en un portaobjetos y se dejó secar al aire.

a)2 Método de tinción.

De cada eyaculado se realizaron tres extensiones, que tras ser identificadas, siguieron cada una de ellas uno de los tres siguientes protocolos de tinción propuestos: Diff-Quik (DQ), Hemacolor (HC), y Hematoxilina de Harris (HH). El primer y segundo método, siguieron las instrucciones del kit comercial aumentando los tiempos propuestos en cada paso hasta 1 y 2 min respectivamente. En el tercer método, las preparaciones se tiñeron depositando la extensión en el interior de la tinción durante 40 min.

Una vez teñidas, todas las preparaciones fueron selladas de forma permanente utilizando un cubreobjetos y como medio de montaje se utilizó Eukitt.

a)3 Descripción del equipo

El análisis morfométrico se realizó con el módulo de morfología del Sperm Class Analyzer[®] (SCA), sistema automático de análisis de espermatozoides (Figura 5). Este módulo permite valorar morfométricamente, entre otros, la cabeza de los espermatozoides. El equipo se compone de un microscopio (Olympus BH-2; Tokio, Japón) equipado con un objetivo de 60x y un ocular de 3.3x, sobre el que se encuentra montada una cámara de video (Sony CCD-IRIS SSC-M370CE), que recoge la imagen microscópica y la trasmite al SCA. El sistema computerizado SCA, se compone de un monitor auxiliar de alta resolución (Mitsubishi EUM-1491A), en el que se proyecta la imagen microscópica recogida por la videocámara, y un PC (Pentium MMX 200Mhz) equipado con tarjeta digitalizadora (PIP 1042-B), monitor (Sony Multiscan 200 SX) y software de análisis de espermatozoides (versión 99). La resolución de las imágenes fue de 0.15 μ m y 0.11 μ m por píxel en el eje horizontal y vertical, respectivamente.

Material y Métodos

Antes de capturar las imágenes, la fuente de luz del microscopio se centraba y siempre se utilizó un filtro verde (If 550 Olympus, Tokio, Japón), para aumentar el contraste de las mismas.

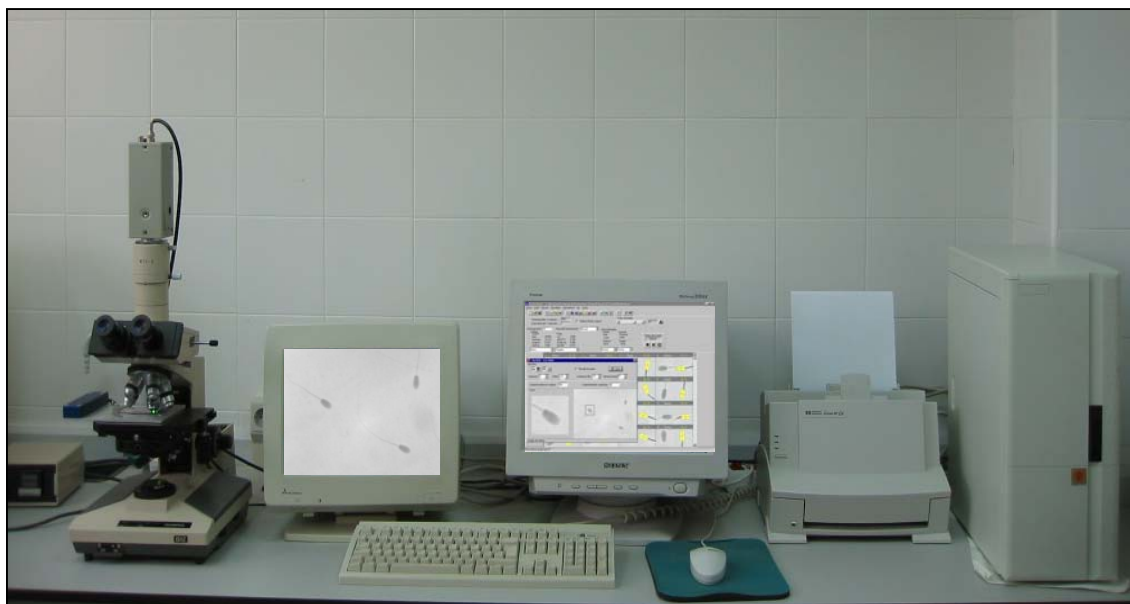


Figura 5. Fotografía del equipo utilizado (Sperm Class Analyzer[®], Microptic SL).

a)4 Captura y análisis de las imágenes

Un mínimo de 100 espermatozoides por preparación se capturaron al azar en diferentes campos, con objetivo de 60x, utilizando una ventana de captura en el software de 100 x 100 píxeles, en la que se encuadraba la cabeza y parte de la pieza intermedia, evitando aquellos espermatozoides que estaban superpuestos sobre otros, o que presentaban interferencias en sus límites por la inclusión de partículas (Figura 6a). La segmentación de las células digitalizadas se realiza automáticamente con un valor prefijado por el factor de análisis dentro de un rango de niveles de gris. El software genera una máscara que se ajusta a la imagen original, delimitando la célula y diferenciando dentro de ella cabeza y pieza intermedia (Figura 6b). Si la máscara no se ajustaba correctamente a la silueta de la imagen microscópica, esta podía ser corregida modificando el factor de análisis. Las células incorrectamente analizadas eran eliminadas.

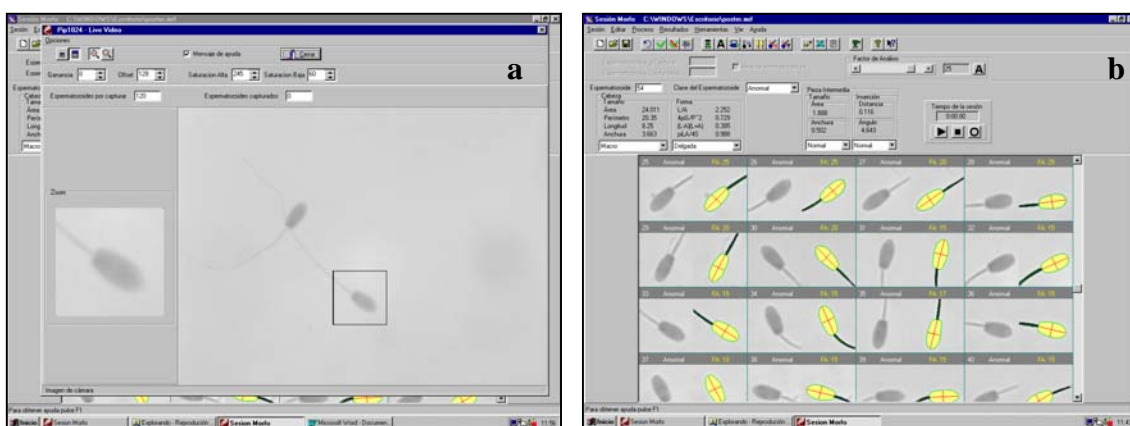


Figura 6. Pantalla de captura del SCA(a) y máscara sobre la imagen digitalizada(b)

Con la información de los límites de los espermatozoides, se calcularon automáticamente 5 parámetros morfométricos para la cabeza de los mismos (Figura 7), 4 para el tamaño: Longitud y Anchura (en μm , el diámetro mayor y menor respectivamente y que necesariamente no tienen que ser ortogonales), Área (como la suma de las áreas pixel contenidas dentro de los límites) y Perímetro (como la suma de los límites externos) y 1 para la forma, calculado a partir de los anteriores: Elipticidad ($\text{Longitud}/\text{Anchura}$).

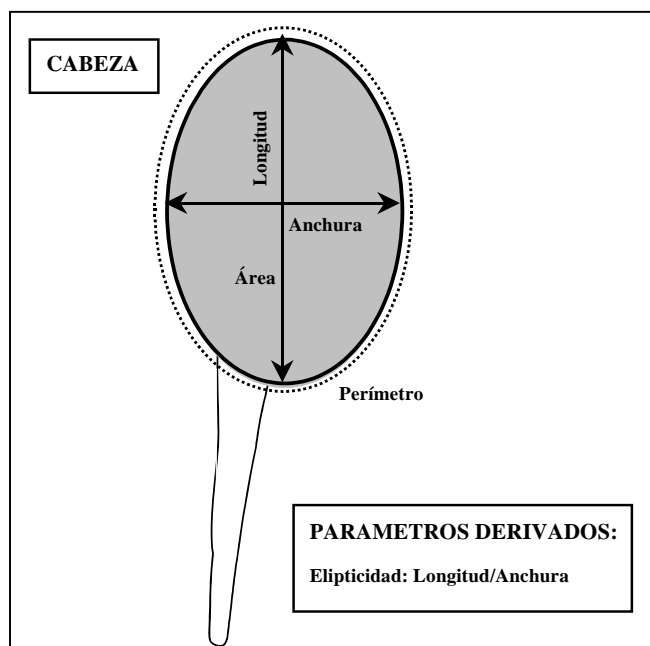


Figura 7. Esquema de los parámetros morfométricos evaluados.

2.4.b) Diseño experimental

Para seleccionar el método de análisis morfométrico, se plantearon tres experiencias que se describen a continuación

b)1 Experiencia 1: Influencia del método de tinción en la eficacia del análisis de imagen

Para determinar el método de tinción idóneo en la captura de los espermatozoides y posterior análisis de las imágenes digitalizadas, se emplearon 16 eyaculados, 4 por cada macho, capturando en las extensiones procesadas con los tres métodos de tinción para cada eyaculado, un total de 6800 espermatozoides. En cada preparación se determinó el porcentaje de espermatozoides que tras ser capturados, fueron correctamente convertidos en imágenes binarias medibles. Para ello, se comprobó visualmente si la máscara elaborada por el SCA se ajustaba a la silueta de la imagen microscópica del espermatozoide, delimitando adecuadamente la cabeza. Si la máscara no se ajustaba a la imagen celular digitalizada, esta podía ser corregida modificando el factor de análisis. Las células incorrectamente analizadas fueron eliminadas. Se calcularon los coeficientes de variación para el porcentaje de espermatozoides correctamente analizados en cada preparación, estableciendo los valores medios para cada método de tinción.

b)2 Experiencia 2: Influencia del número de células a analizar

El objetivo de este ensayo fue determinar el número mínimo de espermatozoides a analizar para caracterizar morfométricamente al conjunto de la población. Para ello empleamos 4 eyaculados, uno por cada macho, analizando en cada uno 200 células utilizando las extensiones teñidas con Diff-Quik (DQ). Se compararon subgrupos celulares de 50, 100, 150, 175 y 200 células, que fueron seleccionados al azar a partir del grupo de 200 células que sirvió de referencia.

b)3 Experiencia 3: Influencia del método de tinción sobre los parámetros morfométricos

Para desarrollar esta experiencia, se emplearon un total de 16 eyaculados, 4 por cada macho. Un mínimo de 100 espermatozoides por preparación fueron analizados con cada uno de los tres métodos de tinción, y se compararon los parámetros morfométricos obtenidos con cada método. Se calcularon los coeficientes de variación para los valores de los parámetro morfométricos obtenidos con cada método de tinción.

2.4.c) Valores morfométricos medios del espermatozoide

Los valores morfométricos medios de la cabeza del espermatozoide se establecieron siguiendo la metodología de análisis morfométrico elegida, valorando un mínimo de 100 espermatozoides en aquellas preparaciones teñidas con Diff-Quik de cada uno de los 16 eyaculados recogidos para los 4 machos. Se analizaron las variaciones individuales en los parámetros morfométricos obtenidos y se calcularon los coeficientes de variación intraindividuales e interindividuales para cada parámetro evaluado.

2.5. Influencia de la estación y factores climáticos sobre los parámetros morfométricos del espermatozoide

Antes de ser congelado, el esperma de los 2 machos seleccionados para el estudio de la congelación-descongelación, cuyo ritmo de recogida y valoración se describe en el apdo. 2.6 (pag. 102), fue evaluado para establecer la influencia de la estación y factores climáticos sobre los parámetros morfométricos y seminales. Las estaciones del año, de acuerdo con la localización geográfica del sur de la península ibérica, abarcaron los siguientes períodos: Invierno: Enero-Marzo; Primavera: Abril-Junio; Verano: Julio-Septiembre; Otoño: Octubre-Diciembre. La temperatura ambiental media diaria se determinó mediante un termómetro de mínima y máxima, ubicado en las instalaciones del CIDG de la Diputación Provincial de Córdoba. El fotoperiodo fue valorado de acuerdo a las directrices del Instituto Nacional de Meteorología.

2.6. Estudio del efecto de la congelación-descongelación sobre los parámetros morfométricos del espermatozoide.

Se utilizaron muestras procedentes de dos donantes de esperma, con 23 y 24 meses de edad al inicio de la experiencia, sometidos ininterrumpidamente durante 12 meses a un ritmo de recogida de 2 saltos/semana.

2.6.a) *Análisis morfométrico a la precongelación*

De cada eyaculado recogido, previamente a la congelación, se preparó una extensión para análisis morfométrico; para lo cual de la dilución preparada para la valoración del movimiento (apdo 2.3.b)1, pag. 93), tras 5 minutos de incubación en estufa a 37°C, se tomó una gota de 10µl que se extendió en un portaobjetos, situado sobre la superficie de una placa térmica, con el extremo de otro de bordes biselados, dejándola secar al aire. El método de tinción seleccionado fue DQ, siguiendo el protocolo descrito en el apdo. 2.4.a)2 (pag. 97). Una vez teñidas, las preparaciones fueron selladas permanentemente con un cubreobjetos utilizando como medio de montaje Eukitt.

2.6.b) *Congelación-descongelación*

Se diseñó un estudio comparativo entre dos diluciones diluyococonservadoras diferentes, que se emplearon utilizando para ambas el mismo método de congelación-descongelación de esperma.

b)1 Medios diluyococonservadores

Se emplearon dos soluciones diluyococonservadoras diferentes, una compuesta por Tris-ácido cítrico-fructosa-glicerol-yema de huevo-sodio dodecil-sulfato (Triladyl[®]); y otra por leche desnatada-glicerol-yema de huevo (Gent[®]):

- Triladyl[®] (Tris)

Método de elaboración: siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Conservación y almacenamiento: En alícuotas de 10ml congelado a -18°C durante 2 meses.

Modo de empleo: Una vez descongeladas las alícuotas a temperatura de laboratorio ($22-23^{\circ}\text{C}$), en el interior de una cámara de flujo laminar se les adiciona:

- 20% de yema de huevo de gallina fresco, previamente liberada de la clara y filtrada en condiciones asépticas.
- 0.6 % de pasta Equex-STM[®] (disuelta previamente por calor a una T^{a} de 40°C)

- Gent[®] (Lácteo)

Conservación y almacenamiento: en alícuotas de 12 ml a -18°C durante 6 meses.

Modo de empleo: Las alícuotas una vez descongeladas a temperatura de laboratorio ($22-23^{\circ}\text{C}$), están preparadas para su uso.

b)2 Método de congelación

- *Centrifugación*

- Diluyentes empleados

Biladyl A[®]

Conservación y almacenamiento: alícuotas de 10 ml congeladas a -18°C durante un máximo de 6 meses.

Modo de empleo: Las alícuotas eran descongeladas a temperatura de laboratorio ($22-23^{\circ}\text{C}$), quedando preparadas para su uso inmediato.

Material y Métodos

- Método de centrifugación

El esperma, una vez transportado al laboratorio es dividido en dos alícuotas que se diluyen en proporción 1:9 con Biladyl A[®] a 37°C y se centrifugan a 1125 x g durante 20 minutos, a temperatura de laboratorio (22-23°C).

- *Dilución y cálculo de las dosis seminales*

Una vez centrifugado el esperma, el sobrenadante es eliminado, y el sedimento se resuspende en la cantidad necesaria de los medios diluyoservadores Tris y Lácteo, que se encuentran a temperatura de laboratorio, para conseguir dosis seminales con 125×10^6 spz con movimiento rápido progresivo en pajuelas de 0.5 ml, añadiendo los diluyentes de forma progresiva a un ritmo de 1ml / minuto.

La fórmula para calcular el nº de dosis que se pueden envasar por eyaculado, teniendo en cuenta los criterios prefijados es :

$$\text{N}^\circ \text{ Dosis} = \frac{\text{Volumen procesado} \times \text{Concentración} \times \% \text{ MRP}}{125 \times 10^6}$$

Para el cálculo de la cantidad de necesaria de cada medio diluyoservador que se añade a las dos alícuotas centrifugadas se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen diluyente (ml)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ Dosis} \times 0.5\text{ml}}{2}$$

- *Equilibrado y Refrigeración*

Una vez añadidos ambos medios diluyoservadores (Tris y Lácteo), y tras un período de adaptación de 10 minutos a temperatura de laboratorio, las dos alícuotas se someten al proceso de refrigeración, para lo cual se introducen en el interior de un contenedor para espermatozoides refrigerados (Equitainer[®]), donde permanecen durante 5 horas a +5°C.

- *Envasado*

Se emplearon pajuelas de plástico de 0.5 cc de diversos colores, previamente identificadas con una máquina de impresión semiautomática (modelo mt-65/133, Minitüb), con un sistema de códigos que representa, de izquierda a derecha el número de crotal del macho (dos cifras), la fecha de congelación (6 cifras) y el diluyente empleado (una letra). Las pajuelas fueron envasadas y selladas por ultrasonidos, utilizando una máquina envasadora selladora (modelo Phillip mp 133, Minitüb) ubicada en el interior de una cámara refrigerada regulada a 5°C (cabina refrigerada con equipo compresor de Minitüb).

- *Vapores de nitrógeno líquido*

Las dosis, colocadas horizontalmente sobre una chasis metálico, se situaron en el interior de una caja isotérmica de porex, rellena de nitrógeno líquido, a una distancia de la superficie de 4-5 cm. Las dosis permanecían en el interior de la caja tapada y sobre los vapores de nitrógeno líquido durante 20 minutos.

- *Almacenamiento*

Una vez pasado el tiempo de congelación en vapores de nitrógeno líquido, las dosis eran transferidas de forma inmediata a tanques de nitrógeno líquido a -196 °C, en posición vertical y clasificadas en su interior en goblets y canisteras.

b)3 Descongelación

Dos dosis de cada eyaculado, para los diluyentes Triladyl (Tris) y Gent (Lácteo), fueron seleccionadas al azar, tras un mínimo de 24 horas de su congelación, y descongeladas por inmersión en bañomaría a 39°C durante 30 segundos. Se valoró el test de longevidad del movimiento (apdo. 2.3.b)2, pag. 94), morfología (apdo. 2.3.d)2, pag. 95) y acrosoma (apdo. 2.3.e)2, pag. 96) y se preparó una extensión para análisis morfométrico (apdo. 2.6.c), pag. 106).

2.6.c) Análisis morfométrico a la descongelación

De cada dosis descongelada, previamente diluida para realizar el test de la longevidad del movimiento (apdo. 2.3.b)2, pag. 94), tras una hora de incubación a 37°C se preparó una extensión para análisis morfométrico; para lo cual una gota de 10µl se extendió en un portaobjetos, situado sobre la superficie de una placa térmica, con el extremo de otro de bordes biselados, dejándola secar al aire. El método de tinción seleccionado fue Diff-Quik (DQ), siguiendo el protocolo descrito en el apdo. 2.4.a)2 (pag. 97). Una vez teñidas, las preparaciones fueron selladas permanentemente con un cubreobjetos utilizando como medio de montaje Eukitt.

2.6.d) Estudio de la respuesta a la congelación-descongelación de los parámetros morfométricos del espermatozoide

Para valorar la respuesta a la congelación-descongelación de los parámetros morfométricos del espermatozoide en función de la capacidad para congelar de los eyaculados recogidos durante la experiencia con cada diluyente, se fijaron dos criterios de selección, el primero a la pre congelación para clasificar a los eyaculados en aptos o no aptos para congelar, y el segundo sobre las dosis descongeladas.

El criterio de selección a la pre congelación considera aptos para congelar a aquellos eyaculados que cumplen, en la valoración seminal previa, los siguientes

requisitos: volumen eyaculado $\geq 0.5\text{ml}$, concentración espermática $\geq 2000 \times 10^6$ spz/ml y normalidad $\geq 70\%$. En cuanto a las dosis descongeladas, se consideran aptas aquellas en las que el porcentaje de espermatozoides con movimiento rápido progresivo tras una hora de incubación a 37°C es $\geq 30\%$.

2.7. Estudio estadístico de los datos

Los cálculos estadísticos consistieron en una comparación de medias entre grupos mediante análisis de la varianza (ANOVA) seguido, cuando las diferencias fueron significativas, por el test HSD de Tukey para comparaciones múltiples; y en la comparación de porcentajes empleando el test Chi-Cuadrado. Las variables independientes fueron individuo, mes, estación del año (primavera: abril-junio; verano: julio-septiembre; otoño: octubre-diciembre; invierno: enero-marzo), fotoperiodo (fotoperiodo ascendente: del 22 de diciembre al 21 de junio; fotoperiodo descendente: del 22 de junio al 21 de diciembre), temperatura ambiental media y diluyente.

Se calculó la correlación bivariada de Pearson entre los parámetros morfométricos, seminales y de dichas variables frente al individuo, mes, estación, fotoperiodo y temperatura ambiental media.

Los resultados se expresan en media \pm desviación típica, los coeficientes de variación ($\text{CV}=\text{desviación típica}/\text{media}$) intraindividuales como el valor medio de los CV mostrados para cada individuo y los interindividuales expresan el CV de los CV intraindividuales.

V. RESULTADOS

1. RESULTADOS DE LA SELECCIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS MORFOMÉTRICO Y OBTENCIÓN DE VALORES MORFOMÉTRICOS MEDIOS DEL ESPERMATOZOIDE

1.1. Resultados de las experiencias realizadas para seleccionar el método de análisis morfométrico

De los 16 eyaculados se obtuvieron los parámetros seminales que se describen en la Tabla 2; el volumen eyaculado osciló entre $0,60 \pm 0,10$ ml y $1,20 \pm 0,47$ ml, movimiento total entre $91,08 \pm 1,65$ % y $96,57 \pm 1,54$ %, movimiento rápido progresivo entre $47,33 \pm 6,82$ % y $62,62 \pm 7,13$ %, concentración espermática entre $4474 \pm 968,59 \times 10^6$ spz/ml y $6070 \pm 789,13 \times 10^6$ spz/ml, formas normales entre $81,74 \pm 5,58$ % y $92,83 \pm 6,18$ % e integridad del acrosoma entre $89,43 \pm 5,36$ % y $93,02 \pm 2,19$ %.

Tabla 2. Características seminales medias de los 4 eyaculados recogidos en cada macho.

Macho	VE (ml)	MT (%)	MRP (%)	C (*)	N (%)	I (%)
1	1,20±0,47	92,33±3,26	47,33±6,82	6070±789,13	82,43±6,76	93,02±2,19
2	0,60±0,10	91,08±1,65	54,64±23,14	3205±1281,89	81,74±5,58	89,43±5,36
3	1,38±0,45	96,57±1,54	57,75±4,23	5299±2289,52	88,06±6,28	92,04±1,61
4	1,08±0,38	95,06±3,50	62,62±7,13	4474±968,59	92,83±6,18	91,85±6,89

VE = Volumen eyaculado; MT = Movimiento total; MRP = Movimiento Rápido Progresivo; C = concentración espermática (* millones de espermatozoides / ml); N = Normalidad; I = Integridad.

Para seleccionar el método de análisis morfométrico con el modulo de morfología del Sperm Class Analyzer[®], de cada eyaculado recogido se realizaron tres extensiones que se tiñeron con los métodos Diff-Quik (DQ), Hemacolor (HC) y Hematoxilina de Harris (HH), y se diseñaron 3 experiencias cuyos resultados se describen a continuación:

Resultados

1.1.a) Influencia del método de tinción en la eficacia del análisis de imagen

Se capturaron un total de 6800 células con los tres métodos de tinción (DQ, HC y HH), de las cuales 5507 se analizaron correctamente. La media en el porcentaje de células correctamente analizadas con los tres métodos fue de un 80,99%, con valores superiores para DQ con un 86,06% seguido de HH con un 85,05% y de HC con 71,85% (Tabla 3). DQ y HH obtuvieron porcentajes estadísticamente iguales aunque significativamente superiores ($p < 0,05$) a los obtenidos por HC. Los coeficientes de variación para el porcentaje de células correctamente capturadas fueron menores para DQ (CV = 8,38 %), seguido de HH (CV = 8,83 %) y HC (CV = 13,00 %).

Tabla 3. Porcentaje de espermatozoides correctamente analizados (n=5507) para cada animal con las tinciones Diff-Quik (DQ), Hemacolor (HC) y Hematoxilina de Harris (HH).

Animal	Método de Tinción		
	(% espermatozoides analizados correctamente)		
	<i>DQ</i>	<i>HC</i>	<i>HH</i>
1	86,83 % (568)	72,04% (426)	80,81% (410)
2	81,81 % (517)	69,70% (405)	85,52% (420)
3	91,72 % (509)	73,67% (412)	88,08% (427)
4	83,87 % (542)	71,98% (408)	85,80% (462)
CV	8,38	13,00	8,83
Media	86,06% (2136) ^a	71,85% (1651) ^b	85,05 % (1720) ^a

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). El número de espermatozoides analizados para cada animal y método de tinción está indicado entre paréntesis. CV= Coeficiente de Variación (%).

1.1.b) Influencia del número de células a analizar

Se compararon estadísticamente la media de los parámetros morfométricos longitud, anchura, área, perímetro y elipticidad de la cabeza de los espermatozoides teñidos con DQ, entre los grupos de 50, 100, 150, 175 y 200 células (Tabla 4). No se encontraron diferencias significativas para los parámetros morfométricos evaluados entre ninguno de los grupos celulares comparados. Se calcularon los coeficientes de variación para cada parámetro morfométrico en cada uno de los grupos celulares (Tabla 4), encontrando que los valores decrecen desde el grupo de 50 células hasta el grupo de 200 células, observando que el descenso es menos acusado a partir del grupo de 100 células.

Tabla 4. Comparación de los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides de los 4 animales, teñidos con Diff-Quik, entre los diferentes grupos de tamaño de la muestra.

<i>Parámetros morfométricos para la cabeza</i>					
<i>Número de espermatozoides</i>	Longitud (μm)	Anchura (μm)	Área (μm^2)	Perímetro (μm)	Elipticidad
50	8,55 (2,79)	4,24 (4,18)	29,85 (4,53)	22,41 (2,35)	2,02 (4,52)
100	8,55 (2,72)	4,26 (3,88)	29,92 (4,29)	22,42 (2,34)	2,01 (4,26)
150	8,55 (2,72)	4,25 (3,73)	29,92 (4,27)	22,43 (2,32)	2,01 (4,04)
175	8,55 (2,74)	4,26 (3,68)	29,92 (4,19)	22,42 (2,30)	2,01 (4,13)
200	8,55 (2,75)	4,26 (3,73)	29,92 (4,19)	22,43 (2,29)	2,01 (4,15)

No se encontraron diferencias significativas entre grupos. Los Coeficientes Variación (%) para cada parámetro están indicados entre paréntesis. Elipticidad= Longitud / Anchura.

Resultados

1.1.c) Influencia del método de tinción sobre los parámetros morfométricos

Los valores para los parámetros morfométricos evaluados con cada uno de los tres métodos de tinción se encuentran representados en el Gráfico 1. Se valoraron un total de 2136 espermatozoides con DQ, 1651 con HC y 1720 con HH, procedentes de las extensiones realizadas de los 16 eyaculados recogidos.

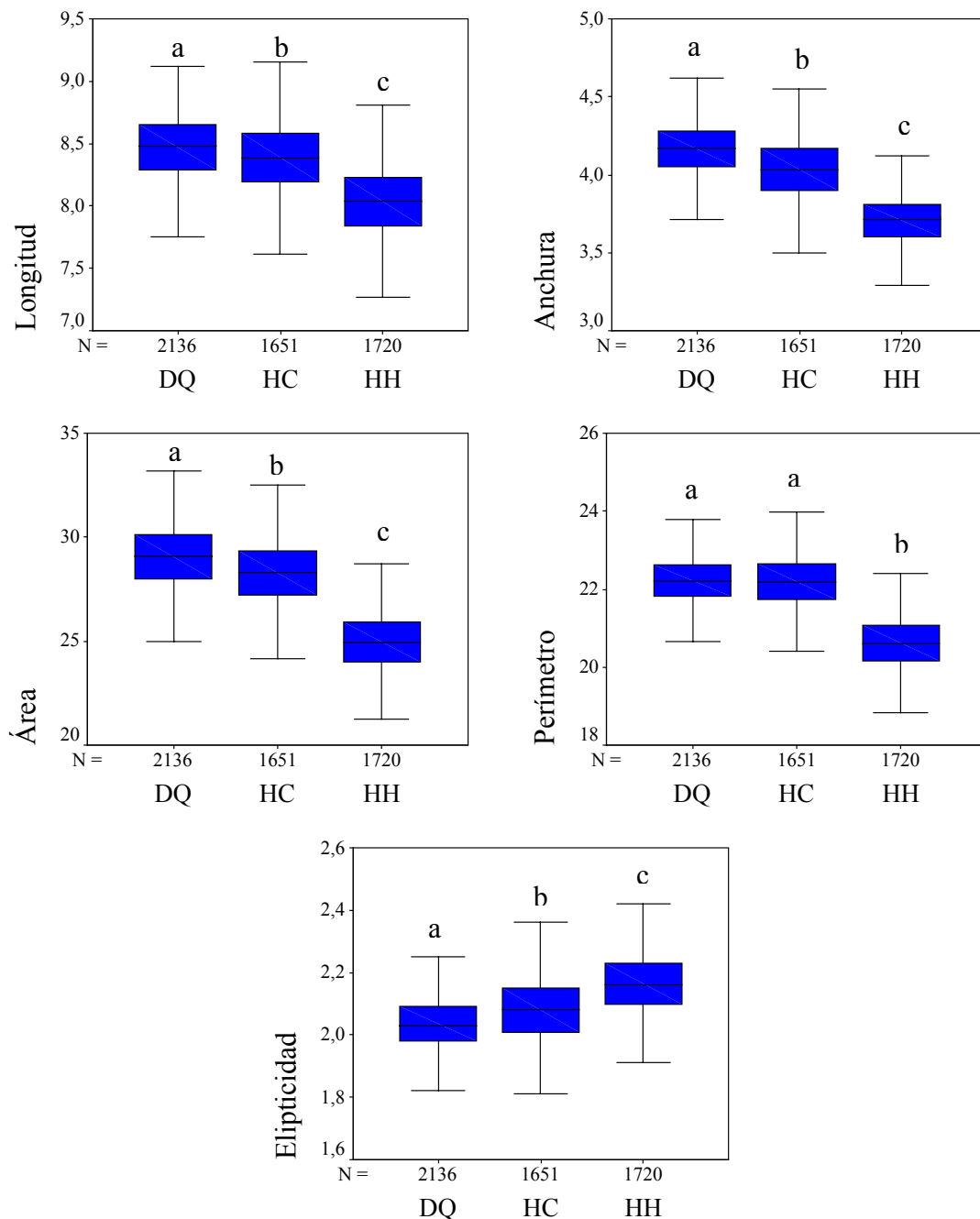
Todos los parámetros morfométricos estuvieron afectados por el método de tinción empleado (Gráfico 1). Así, la tinción DQ obtuvo valores significativamente superiores a HC y esta a su vez a HH ($p < 0,001$) para los parámetros morfométricos longitud ($8,47 \pm 0,27 \mu\text{m}$ vs. $8,38 \pm 0,30 \mu\text{m}$ vs. $8,03 \pm 0,29 \mu\text{m}$) anchura ($4,16 \pm 0,18 \mu\text{m}$ vs. $4,03 \pm 0,19 \mu\text{m}$ vs. $3,71 \pm 0,17 \mu\text{m}$) y área ($29,02 \pm 1,51 \mu\text{m}^2$ vs. $28,31 \pm 1,71 \mu\text{m}^2$ vs. $25,03 \pm 1,48 \mu\text{m}^2$) respectivamente. Para el perímetro, entre DQ y HC no se encontraron diferencias estadísticas, aunque ambos fueron significativamente ($P < 0,001$) superiores a HH ($22,20 \pm 0,60 \mu\text{m}$ y $22,21 \pm 0,71 \mu\text{m}$ vs. $20,62 \pm 0,65 \mu\text{m}$). Para la elipticidad, HH fue significativamente ($P < 0,001$) superior a HC y esta a su vez a DQ ($2,17 \pm 0,10$ vs. $2,08 \pm 0,10$ vs. $2,04 \pm 0,09$).

Se calcularon los coeficientes de variación (CV) para todos los parámetros morfométricos evaluados con las tinciones DQ, HC y HH (Tabla 5). Los coeficientes de variación más bajos para los parámetros morfométricos que definen el tamaño de la cabeza se obtuvieron con DQ oscilando, entre un 2,70 % para el perímetro y un 5,21 % para el área.

Tabla 5. Coeficiente de variación (CV) para cada parámetro morfométrico con las tinciones Diff-Quik (DQ), Hemacolor (HC) y Hematoxilina de Harris (HH).

CV (%)	Longitud	Anchura	Área	Perímetro	Elipticidad
DQ	3,19	4,41	5,21	2,70	4,64
HC	3,60	4,76	6,03	3,21	4,81
HH	3,58	4,45	5,91	3,13	4,55

Gráfico 1. Diagrama de cajas y bigotes en el que se representan los parámetros morfométricos para el tamaño y forma de la cabeza con los métodos de tinción Diff-Quik (DQ), Hemacolor (HC) y Hematoxilina de Harris (HH).



Los límites de cada caja se corresponden con el percentil 25 y 75, y la línea que la divide con la mediana. Los bigotes se extienden desde el percentil 5 al 95 del valor de la media. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,001$).

Resultados

1.2. Valores morfométricos medios del espermatozoide

De acuerdo con los resultados obtenidos en el apdo. 1.1 (pag. 111), para el análisis morfométrico se valoraron un mínimo de 100 espermatozoides por preparación utilizando Diff-Quik como método de tinción. En la tabla 6 se recogen los valores medios obtenidos para cada macho; la longitud media fue $8,47 \pm 0,26 \mu\text{m}$ ($8,41 \pm 0,28 \mu\text{m}$ - $8,58 \pm 0,24 \mu\text{m}$), la anchura $4,16 \pm 0,18 \mu\text{m}$ ($4,09 \pm 0,20 \mu\text{m}$ - $4,22 \pm 0,17 \mu\text{m}$), el área $29,03 \pm 1,43 \mu\text{m}^2$ ($28,50 \pm 1,54 \mu\text{m}^2$ - $29,80 \pm 1,19 \mu\text{m}^2$), el perímetro $22,21 \pm 0,57 \mu\text{m}$ ($22,08 \pm 0,59 \mu\text{m}$ - $22,50 \pm 0,49 \mu\text{m}$) y la elipticidad media observada fue $2,04 \pm 0,09$ ($2,02 \pm 0,09$ - $2,06 \pm 0,10$).

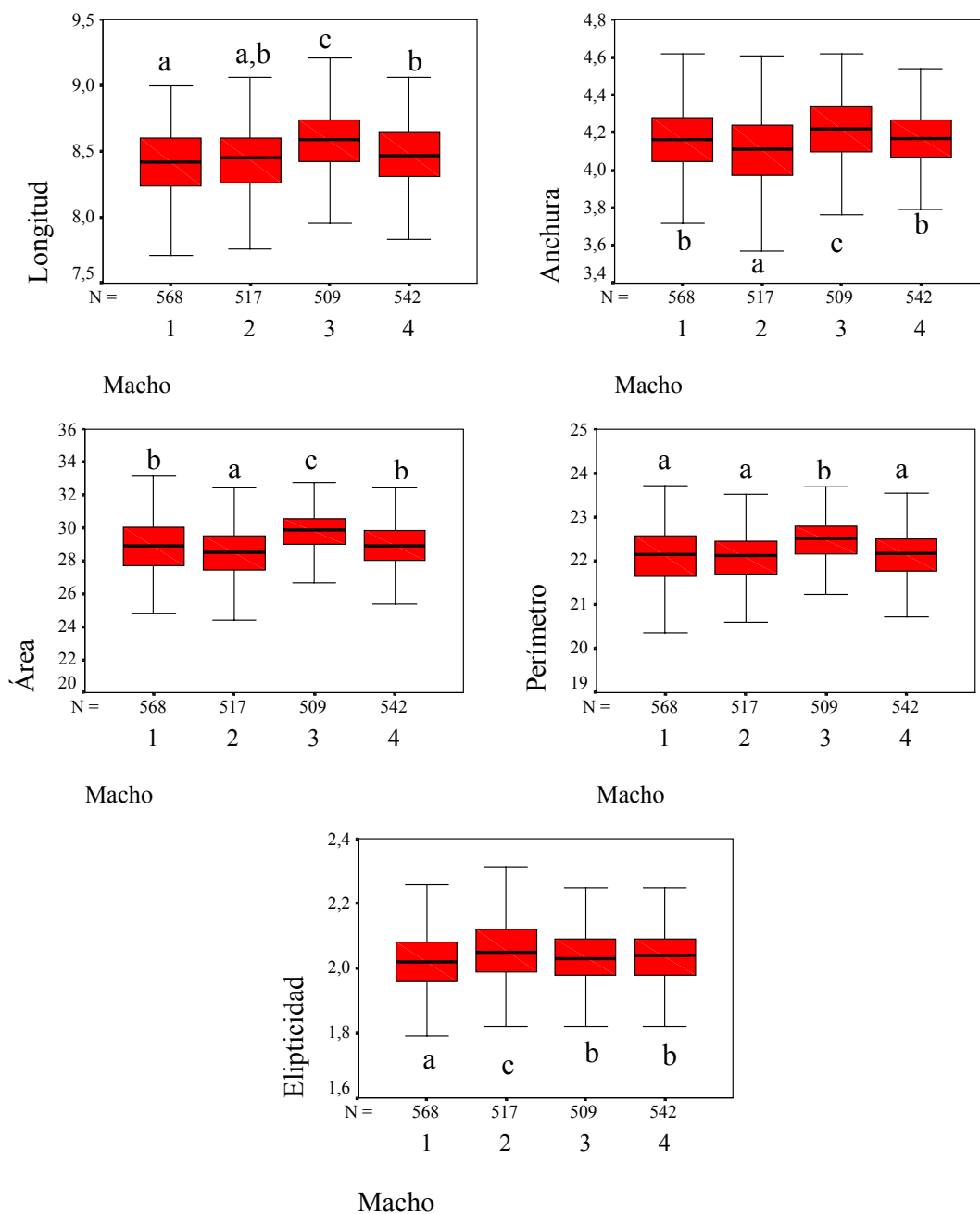
Tabla 6. Parámetros morfométricos medios para el tamaño y forma de la cabeza de los espermatozoides de los 4 animales teñidos con Diff-Quik.

Macho	1	2	3	4	Total
n	568	517	509	542	2136
<i>Parámetros morfométricos</i>					<i>Media</i>
Longitud (μm)	8,41 \pm 0,28	8,42 \pm 0,25	8,58 \pm 0,24	8,46 \pm 0,26	8,47\pm0,26
Anchura (μm)	4,17 \pm 0,19	4,09 \pm 0,20	4,22 \pm 0,17	4,16 \pm 0,16	4,16\pm0,18
Área (μm^2)	28,90 \pm 1,59	28,50 \pm 1,54	29,80 \pm 1,19	28,92 \pm 1,39	29,03\pm1,43
Perímetro (μm)	22,09 \pm 0,64	22,08 \pm 0,59	22,50 \pm 0,49	22,15 \pm 0,57	22,21\pm0,57
Elipticidad	2,02 \pm 0,09	2,06 \pm 0,10	2,04 \pm 0,09	2,04 \pm 0,09	2,04\pm0,09

Los valores representan la media \pm desviación típica. n= número de espermatozoides analizados.
Elipticidad= Longitud / Anchura.

Se compararon estadísticamente los parámetros morfométricos medios de cada macho con la técnica de tinción DQ. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los 4 machos estudiados para todos los parámetros morfométricos evaluados (Gráfico 2).

Gráfico 2. Diagrama de cajas en el que se representan los parámetros morfométricos para el tamaño y forma de la cabeza de los espermatozoides de los 4 machos utilizando la tinción Diff-Quik (DQ).



Los límites de cada caja se corresponden con el percentil 25 y 75, y la línea que la divide con la mediana.

Los bigotes se extienden desde el percentil 5 al 95 del valor de la media. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,001$).

Resultados

Se calcularon los coeficientes de variación (CV) intra e interindividuo para todos los parámetros morfométricos evaluados con la tinción DQ (Tabla 7). Los coeficientes de variación más bajos oscilaron entre un 2,58 % para el perímetro y un 4,93 % para el área, en el caso de los CV intraindividuales. En todos los casos los valores obtenidos para los CV intraindividuales fueron inferiores a los CV interindividuales.

Tabla 7. Coeficiente de variación (CV) intraindividuo e interindividuo para las células teñidas con Diff-Quik.

CV (%)	Longitud	Anchura	Área	Perímetro	Elipticidad
Intra-individuo	3,08	4,28	4,93	2,58	4,59
Inter- individuo	6,84	11,52	13,85	11,52	5,15

2. RESULTADOS DE LA INFLUENCIA DE LA ESTACIÓN Y FACTORES CLIMÁTICOS SOBRE LOS PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS DEL ESPERMATOZOIDE

Durante el año de estudio, se recogieron un total de 76 eyaculados mediante VA, procedentes de dos machos, A y B, valorando los parámetros morfométricos de una población total de 7988 espermatozoides en “fresco” con el método DQ; así como las valoraciones seminales correspondientes a los referidos eyaculados, realizadas inmediatamente tras la recogida.

2.1. Parámetros morfométricos para el tamaño de la cabeza

2.1.a) Longitud de la cabeza

El valor medio para la longitud de la cabeza fue de $8,53 \pm 0,25 \mu\text{m}$, con un mínimo de $6,98 \mu\text{m}$ y un máximo de $9,61 \mu\text{m}$.

Al analizar el efecto de la estación sobre la longitud de la cabeza del espermatozoide, se encontraron variaciones estacionales ($p < 0,001$), de forma que los valores máximos se registraron en otoño ($8,60 \pm 0,24 \mu\text{m}$) y los mínimos en verano ($8,47 \pm 0,24 \mu\text{m}$), mientras que invierno ($8,52 \pm 0,25 \mu\text{m}$) y primavera ($8,51 \pm 0,26 \mu\text{m}$) mostraron valores intermedios (Tabla 8).

La longitud de la cabeza mostró diferencias significativas entre los meses del estudio ($p < 0,001$), con valores máximos en diciembre ($8,64 \pm 0,26 \mu\text{m}$) y mínimos en agosto ($8,43 \pm 0,25 \mu\text{m}$). La longitud, desde su valor mínimo, comienza a ascender en septiembre ($8,50 \pm 0,23 \mu\text{m}$) hasta diciembre, desde donde desciende progresivamente hasta marzo ($8,47 \pm 0,25 \mu\text{m}$) para volver a ascender de nuevo hasta mayo ($8,55 \pm 0,26 \mu\text{m}$) y descender de nuevo hasta septiembre (Gráfico 3).

Al analizar la influencia del fotoperiodo sobre la longitud de la cabeza (Gráfico 4), se encontraron diferencias significativas entre fotoperiodos ($p < 0,001$), con valores medios menores para el ascendente ($8,51 \pm 0,26 \mu\text{m}$) y mayores para el descendente ($8,54 \pm 0,25 \mu\text{m}$). A partir del solsticio de invierno se produce un descenso gradual de la longitud de la cabeza hasta el equinoccio de primavera, a partir del cual asciende de nuevo hasta justo antes del solsticio de verano para descender hasta su valor mínimo próximo al equinoccio de otoño desde donde, por último, asciende hasta el final de la experiencia.

Tabla 8. Longitud de la cabeza de los espermatozoides durante las distintas estaciones del año para ambos machos.

ESTACIÓN	n	LONGITUD (µm)
Primavera	2064	8,51±0,26 ^b
Verano	1937	8,47±0,24 ^a
Otoño	2047	8,60±0,24 ^c
Invierno	1940	8,52±0,25 ^b

Los valores están expresados en media ± desviación típica. Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,001). n= número de espermatozoides analizados.

Gráfico 3. Evolución de la longitud de la cabeza durante los doce meses del período de estudio.

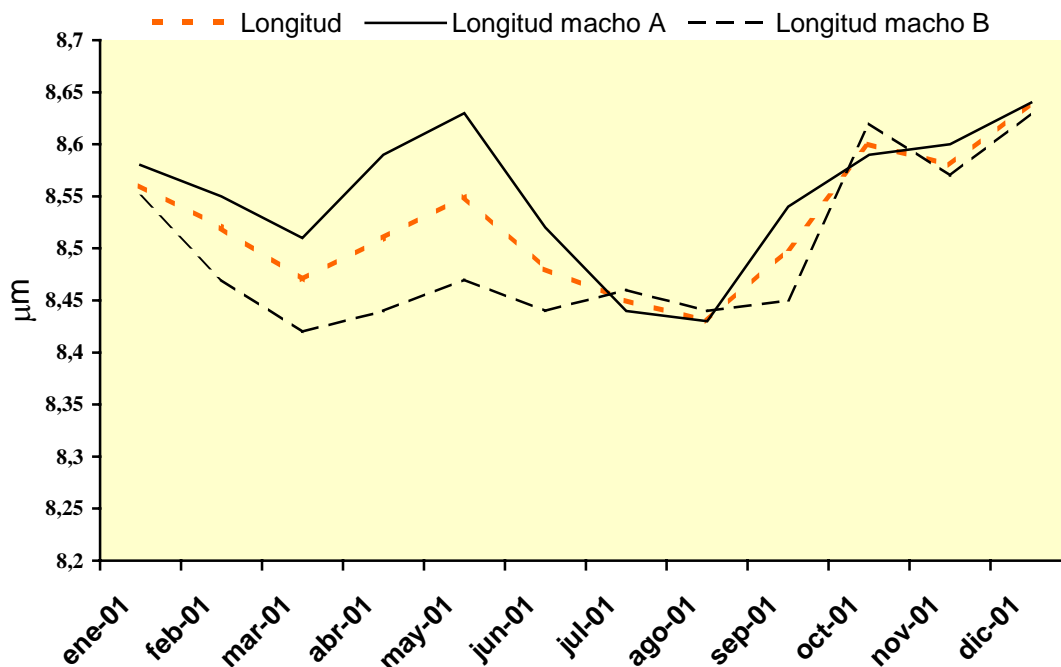
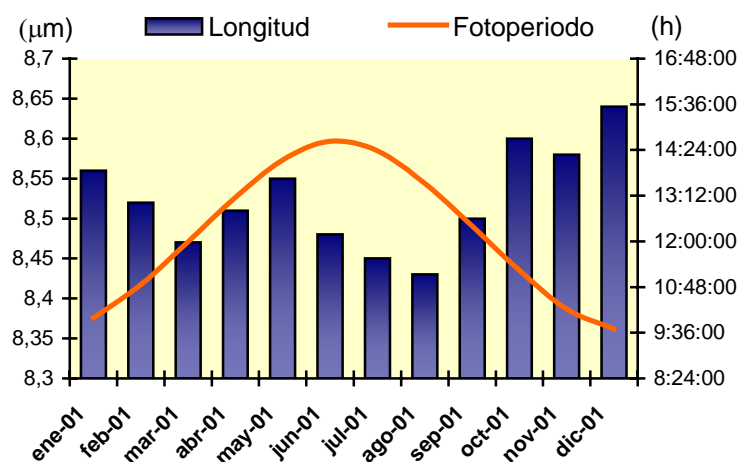
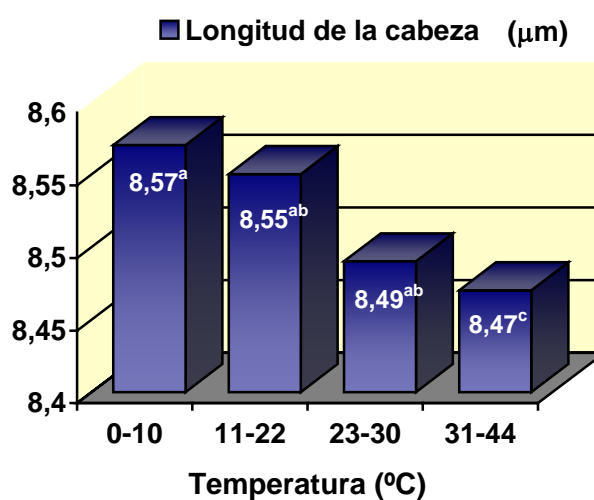


Gráfico 4. Evolución de la longitud de la cabeza de los espermatozoides de ambos machos frente al fotoperiodo.



La temperatura ambiental media influyó significativamente sobre la longitud de la cabeza de los espermatozoides ($p < 0,01$). Al aumentar la temperatura a partir de 31°C , se registró un descenso en los valores de este parámetro, así como con temperaturas iguales o inferiores a 10°C se obtuvieron los valores más altos. Las temperaturas intermedias registraron valores intermedios para la longitud de la cabeza (Gráfico 5).

Gráfico 5. Evolución de la longitud de la cabeza de los espermatozoides de ambos machos frente a la temperatura.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,01$).

2.1.b) Anchura de la cabeza

El valor medio de la anchura de la cabeza fue de $4,10 \pm 0,20 \mu\text{m}$, con un mínimo de $3,28 \mu\text{m}$ y un máximo de $4,72 \mu\text{m}$.

La estación del año influyó significativamente ($p < 0,001$) sobre la anchura de la cabeza (Tabla 9), con valores mínimos en invierno ($3,96 \pm 0,19 \mu\text{m}$) y verano ($4,08 \pm 0,20 \mu\text{m}$) y máximos en otoño ($4,20 \pm 0,17 \mu\text{m}$).

Se encontraron diferencias significativas entre meses ($P < 0,001$), con valores máximos para la anchura en el mes de noviembre ($4,25 \pm 0,15 \mu\text{m}$), desde el que comenzó a decrecer hasta alcanzar el mínimo en marzo ($3,92 \pm 0,19 \mu\text{m}$). A partir de aquí, aumenta hasta junio ($4,16 \pm 0,16 \mu\text{m}$) para decrecer durante los meses de verano ($3,99 \pm 0,19 \mu\text{m}$) y volver a aumentar a partir de septiembre ($4,14 \pm 0,16 \mu\text{m}$) (Gráfico 6).

Al analizar el posible efecto del fotoperiodo sobre la evolución de la anchura de la cabeza de los espermatozoides durante el período de estudio, obtuvimos diferencias significativas entre fotoperiodos (Gráfico 7), con valores menores durante el ascendente ($4,03 \pm 0,20 \mu\text{m}$) y mayores durante el descendente ($4,15 \pm 0,19 \mu\text{m}$). Se observa como a partir del equinoccio de otoño se produce un incremento en los valores para la anchura de la cabeza de los espermatozoides, alcanzando su pico máximo justo antes del solsticio de invierno. Desde este momento se inicia un descenso progresivo de la anchura de la cabeza hasta el equinoccio de primavera desde donde de nuevo, se produce un incremento hasta alcanzar un segundo pico menor en el solsticio de verano, para a partir de aquí descender hasta el equinoccio de otoño.

Tabla 9. Anchura de la cabeza de los espermatozoides durante las distintas estaciones del año para ambos machos.

ESTACIÓN	n	ANCHURA (μm)
Primavera	2064	4,14 \pm 0,17 ^a
Verano	1937	4,08 \pm 0,20 ^b
Otoño	2047	4,20 \pm 0,17 ^c
Invierno	1940	3,96 \pm 0,19 ^d

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,001$). n = número de espermatozoides analizados.

Gráfico 6. Evolución de la anchura de la cabeza durante los doce meses del período de estudio.

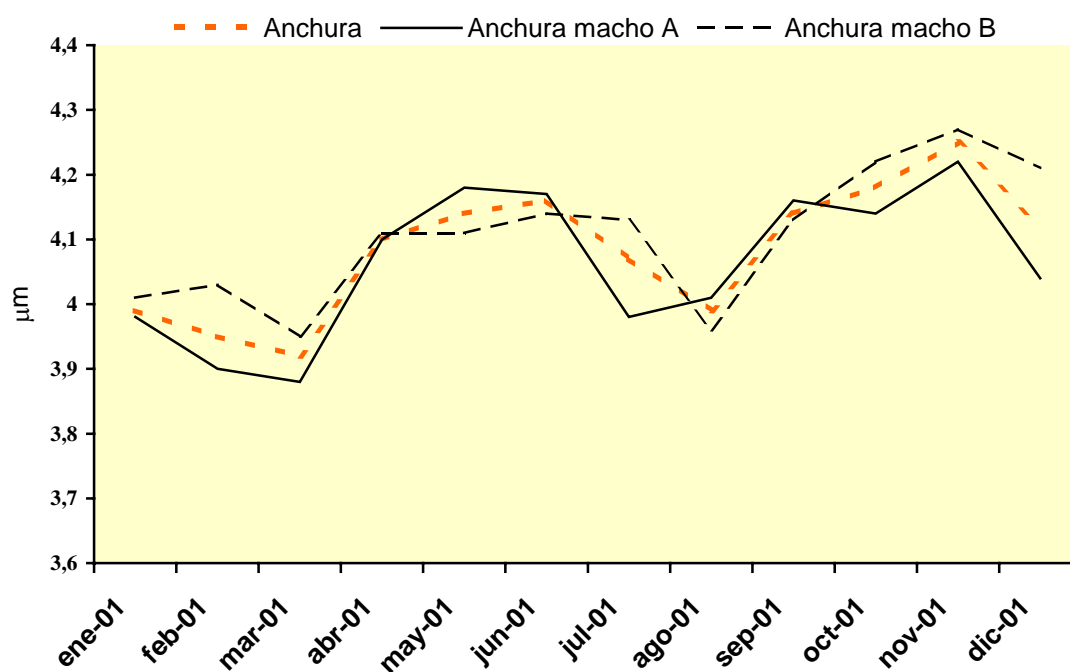
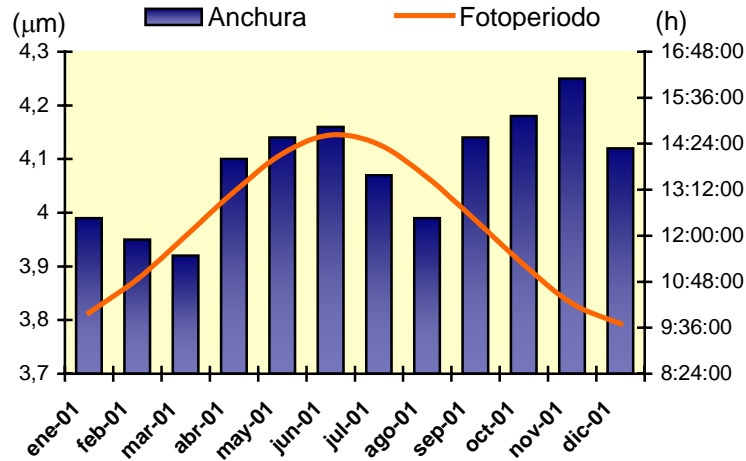
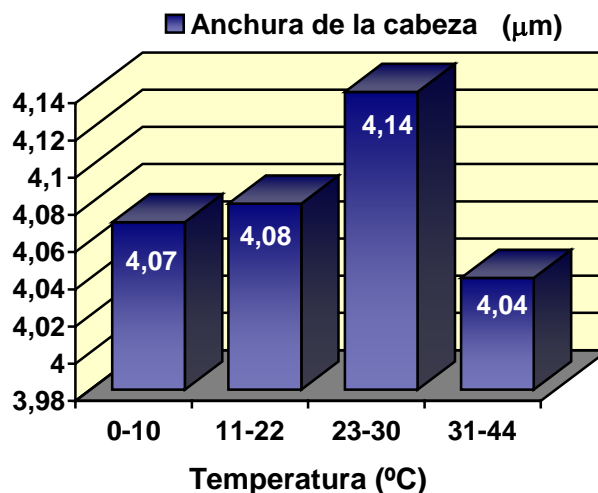


Gráfico 7. Evolución de la anchura de la cabeza de los espermatozoides de ambos machos frente al fotoperiodo.



La temperatura ambiental no influyó significativamente sobre la anchura de la cabeza ($p > 0,05$). Sin embargo los valores más bajos para este parámetro se registraron en las épocas más calurosas ($T^a \geq 31^\circ\text{C}$), aunque esta disminución de la anchura de la cabeza no fue estadísticamente significativa (Gráfico 8).

Gráfico 8. Evolución de la anchura de la cabeza de los espermatozoides de ambos machos frente a la temperatura.



No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$).

2.1.c) Área

El valor medio anual del área de la cabeza fue de $29,06 \pm 1,44 \mu\text{m}^2$, con un valor mínimo de $22,23 \mu\text{m}^2$ y un máximo de $34,63 \mu\text{m}^2$.

El área de la cabeza de los espermatozoides mostró variaciones significativas ($p < 0,001$) según la estación del año (Tabla 10), con valores máximos en otoño ($29,81 \pm 1,20 \mu\text{m}^2$) y mínimos en primavera ($29,13 \pm 1,34 \mu\text{m}^2$).

Al valorar la evolución del área de la cabeza a lo largo del período de estudio (Gráfico 9), se encontraron diferencias significativas entre meses ($p < 0,001$). Los valores mínimos se registraron en agosto ($28,06 \pm 1,32 \mu\text{m}^2$), desde donde comenzó a aumentar hasta alcanzar su valor máximo en noviembre ($29,95 \pm 1,21 \mu\text{m}^2$), para a continuación descender hasta marzo ($28,32 \pm 1,44 \mu\text{m}^2$) desde el que se produjo un segundo pico en abril manteniendo valores elevados hasta mayo ($29,18 \pm 1,37 \mu\text{m}^2$), para finalmente disminuir hasta su valor mínimo de agosto.

El fotoperiodo influyó significativamente ($p < 0,001$) sobre el área de la cabeza de los espermatozoides, con valores medios menores durante el fotoperiodo ascendente ($28,76 \pm 1,44 \mu\text{m}^2$) y mayores durante el fotoperiodo descendente ($29,30 \pm 1,38 \mu\text{m}^2$). Los valores máximos se produjeron justo antes del solsticio de invierno y de verano, a partir de los cuales la anchura descendió hasta sus valores mínimos alrededor del equinoccio de primavera y justo antes del de otoño, desde los que se inició de nuevo el ascenso (Gráfico 10).

La temperatura ambiental media no influyó significativamente sobre el área de la cabeza ($p > 0,05$), si bien en el pico más alto de temperatura fue cuando se registró el valor más bajo para la anchura de la cabeza, aunque esto no fue significativo (Gráfico 11).

Resultados

Tabla 10. Área de la cabeza de los espermatozoides durante las distintas estaciones del año para ambos machos.

ESTACIÓN	n	ÁREA (μm^2)
Primavera	2064	$29,13 \pm 1,34^a$
Verano	1937	$28,68 \pm 1,38^b$
Otoño	2047	$29,81 \pm 1,20^c$
invierno	1940	$28,56 \pm 1,48^d$

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,001$). n = número de espermatozoides analizados.

Gráfico 9. Evolución del área de la cabeza durante los doce meses del período de estudio.

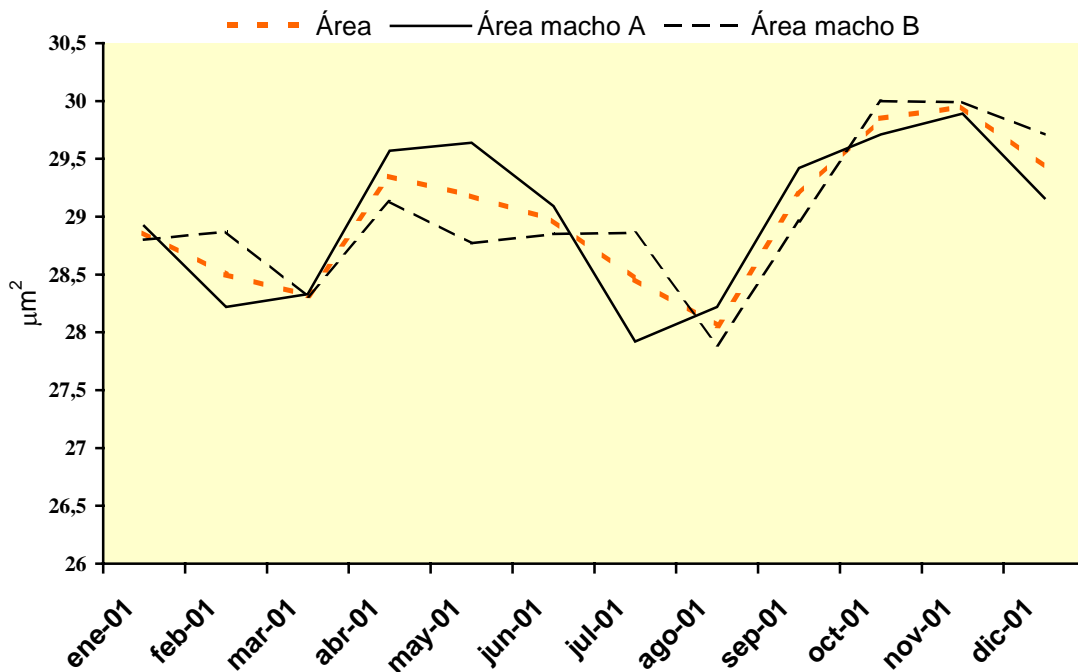


Gráfico 10. Evolución del área de la cabeza de los espermatozoides de ambos machos frente al fotoperiodo.

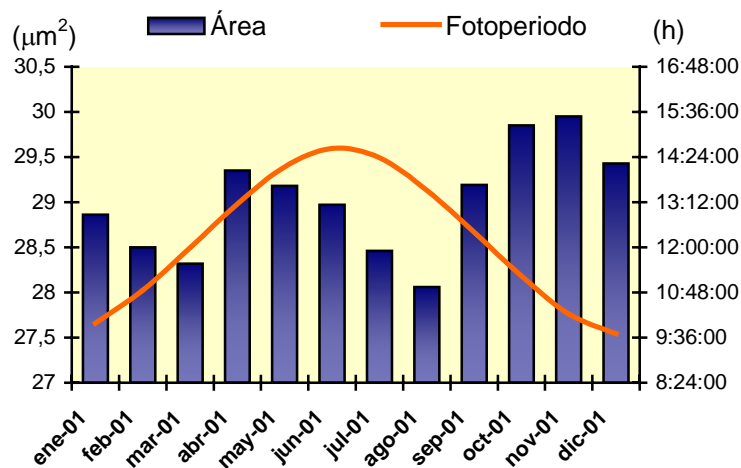
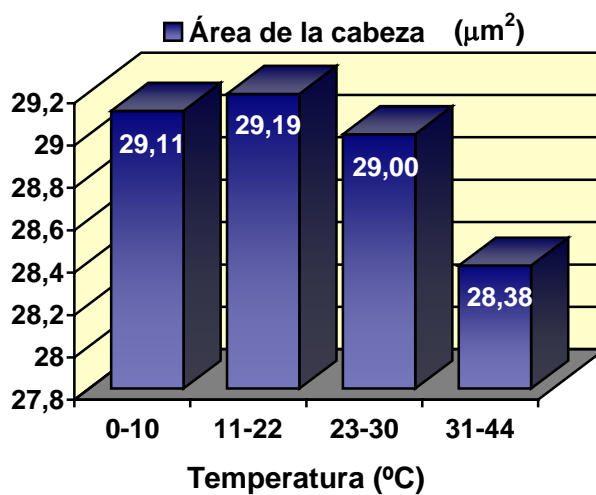


Gráfico 11. Evolución del área de la cabeza de los espermatozoides de ambos machos frente a la temperatura.



No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Resultados

2.1.d) Perímetro

El valor medio anual del perímetro de la cabeza fue de $22,34 \pm 0,57 \mu\text{m}$ con un rango que osciló entre un mínimo de $19,29 \mu\text{m}$ y un máximo de $24,55 \mu\text{m}$.

Al valorar el posible efecto de la estación del año sobre el perímetro de la cabeza de los espermatozoides analizados a lo largo del estudio (Tabla 11), se encontraron diferencias significativas entre estaciones ($p < 0,001$). Se registraron valores máximos en otoño ($22,54 \pm 0,50 \mu\text{m}$), intermedios en invierno ($22,32 \pm 0,59 \mu\text{m}$) y primavera ($22,32 \pm 0,56 \mu\text{m}$) y mínimos en verano ($22,17 \pm 0,55 \mu\text{m}$).

Asimismo, el perímetro de la cabeza sufrió variaciones mensuales, con valores significativamente inferiores ($p < 0,001$) en agosto ($22,07 \pm 0,57 \mu\text{m}$), desde donde se produjo un aumento hasta alcanzar los valores máximos en octubre ($22,56 \pm 0,49 \mu\text{m}$) noviembre ($22,53 \pm 0,51 \mu\text{m}$) y diciembre ($22,54 \pm 0,52 \mu\text{m}$). A partir aquí, el perímetro de la cabeza disminuyó progresivamente hasta marzo ($22,20 \pm 0,59 \mu\text{m}$) donde se produjo de nuevo un aumento hasta mayo ($22,40 \pm 0,58 \mu\text{m}$) para descender finalmente a su valor mínimo en agosto (Gráfico 12).

Al estudiar estadísticamente el posible efecto del fotoperiodo sobre la evolución del perímetro de la cabeza a lo largo del estudio (Gráfico 13), se encontraron diferencias significativas entre fotoperiodos, con valores menores en la población de espermatozoides estudiada durante el fotoperiodo ascendente ($22,32 \pm 0,59 \mu\text{m}$) y mayores durante el descendente ($22,36 \pm 0,55 \mu\text{m}$). El perímetro alcanzó sus valores máximos en los meses anteriores al solsticio de invierno, a partir del cual decreció hasta el equinoccio de primavera para iniciar un segundo incremento con un valor máximo justo antes del solsticio de verano desde el que descendió finalmente hasta su valor mínimo justo antes del equinoccio de otoño.

Tabla 11. Perímetro de la cabeza de los espermatozoides durante las distintas estaciones del año para ambos machos.

ESTACIÓN	n	PERÍMETRO (μm)
Primavera	2064	22,32 \pm 0,56 ^a
Verano	1937	22,17 \pm 0,55 ^b
Otoño	2047	22,54 \pm 0,50 ^c
Invierno	1940	22,32 \pm 0,59 ^a

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,001$). n = número de espermatozoides analizados.

Gráfico 12. Evolución del perímetro de la cabeza durante los doce meses del período de estudio.

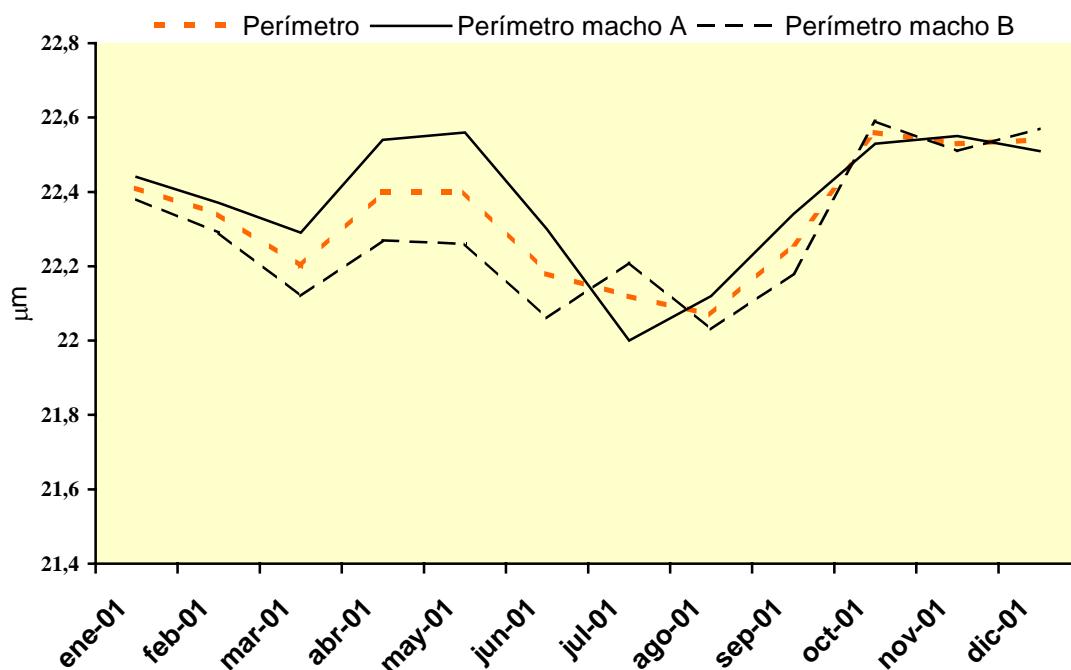
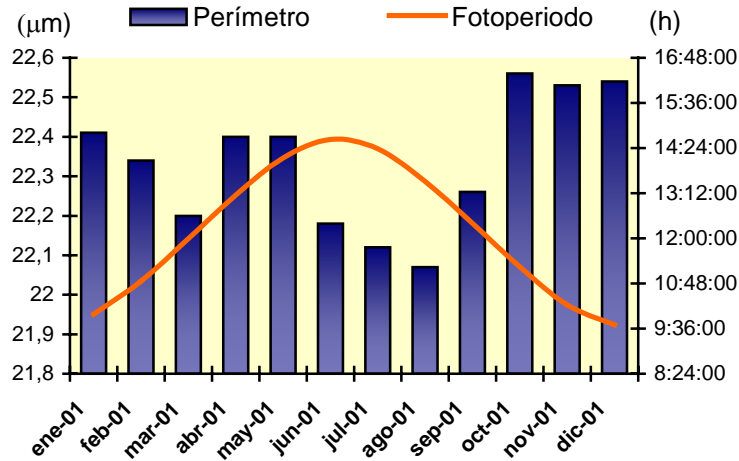
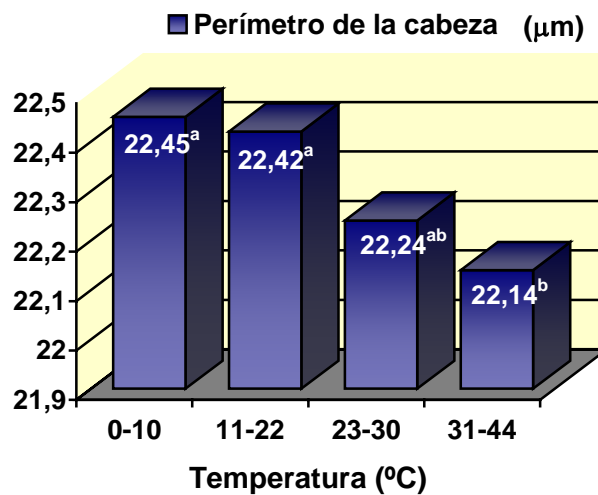


Gráfico 13. Evolución del perímetro de la cabeza de los espermatozoides de ambos machos frente al fotoperiodo.



En la Gráfico 14, se representa la evolución del perímetro de la cabeza frente a la temperatura ambiental media, observando una influencia significativa de esta sobre el perímetro de la cabeza ($p < 0,05$). Se registró un descenso significativo en los valores de este parámetro en las épocas más calurosas ($T^a \geq 31^{\circ}\text{C}$), aumentando significativamente con temperaturas iguales o inferiores a 22°C .

Gráfico 14. Evolución del perímetro de la cabeza de los espermatozoides de ambos machos frente a la temperatura.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

2.2. Parámetros morfométricos para la forma de la cabeza

2.2.a) *Elipticidad*

El valor medio de la elipticidad de la cabeza (Longitud / Anchura) durante el período de estudio fue de $2,09 \pm 0,11$.

Se observaron variaciones estacionales ($p < 0,001$) en la elipticidad de la cabeza (Tabla 12), con valores inferiores y estadísticamente iguales en otoño ($2,05 \pm 0,10$) y primavera ($2,06 \pm 0,09$), intermedios en verano ($2,08 \pm 0,11$) y superiores en invierno ($2,16 \pm 0,11$).

Al analizar la evolución de la elipticidad de la cabeza durante el período de estudio (Gráfico 15), se observaron variaciones mensuales para este parámetro ($p < 0,001$), con valores máximos en marzo ($2,17 \pm 0,11$) desde donde desciende hasta su mínimo en junio ($2,04 \pm 0,09$). En agosto presentó un segundo pico menor ($2,12 \pm 0,11$) para descender hasta septiembre ($2,05 \pm 0,09$) y desde ahí aumentar de nuevo hasta el final del estudio.

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre fotoperiodos (Gráfico 16), con valores medios mayores para la población de espermatozoides analizados durante el ascendente ($2,12 \pm 0,11$) y menores durante el descendente ($2,06 \pm 0,10$).

La temperatura ambiental media influyó significativamente sobre la elipticidad de la cabeza ($p < 0,05$), con valores inferiores para este parámetro entre 23 y 30°C y superiores con temperaturas iguales o menores a 10°C (Gráfico 17).

Resultados

Tabla 12. Elipticidad de la cabeza de los espermatozoides durante las distintas estaciones del año para ambos machos.

ESTACIÓN	n	ELIPTICIDAD
Primavera	2064	2,06±0,09 ^a
Verano	1937	2,08±0,11 ^b
Otoño	2047	2,05±0,10 ^a
Invierno	1940	2,16±0,11 ^c

Los valores están expresados en media ± desviación típica. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,001$). n = número de espermatozoides analizados.

Gráfico 15. Evolución de la elipticidad de la cabeza durante los doce meses del período de estudio.

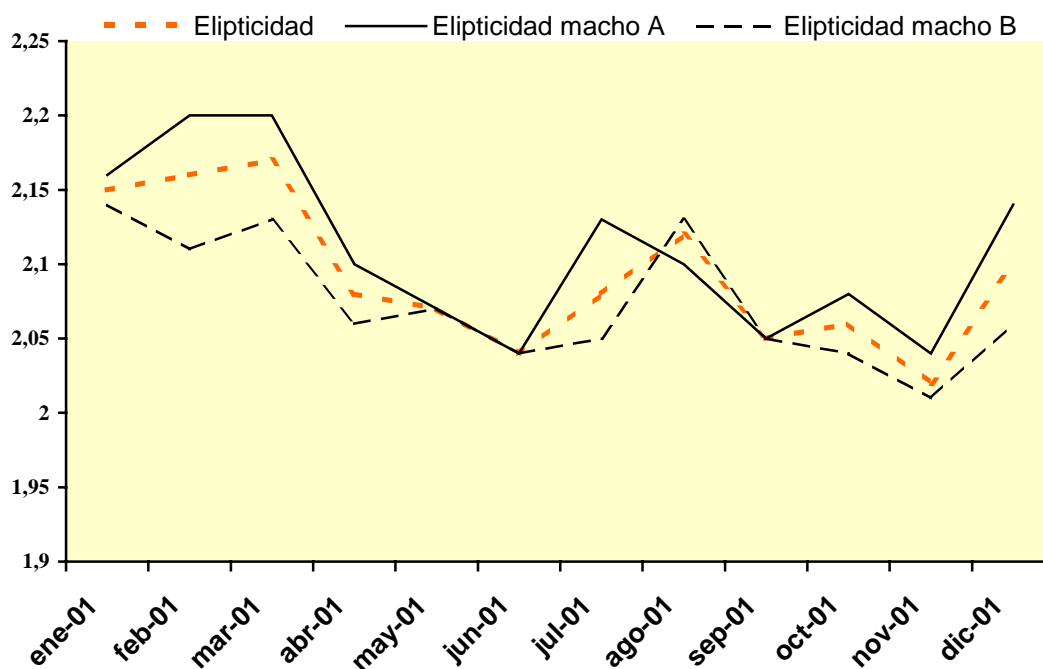


Gráfico 16. Evolución de la elipticidad de la cabeza de los espermatozoides de ambos machos frente al fotoperiodo.

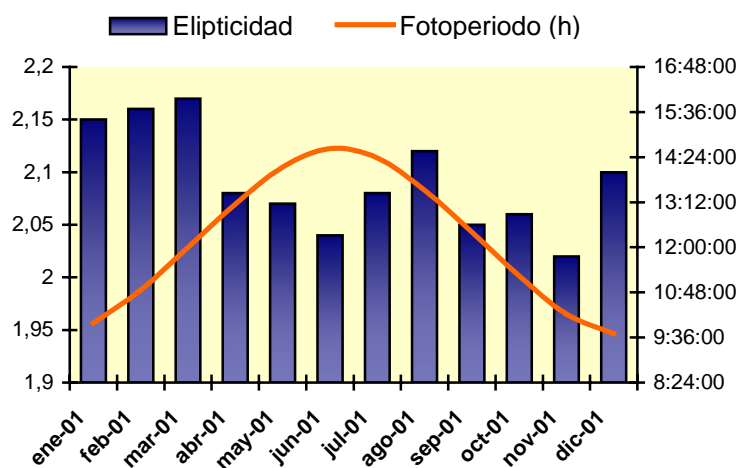
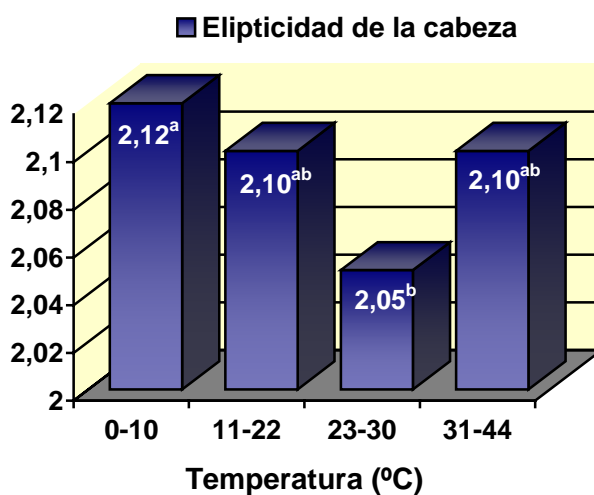


Gráfico 17. Evolución de la elipticidad de la cabeza de los espermatozoides de ambos machos frente a la temperatura.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

2.3. Parámetros seminales

2.3.a) Volumen eyaculado

El volumen medio eyaculado (VE) durante el período de estudio fue de $1,22 \pm 0,31$ ml, con un mínimo de 0,60 ml y un máximo de 2 ml. Se encontraron diferencias individuales para este parámetro ($p < 0,05$), con valores de $1,14 \pm 0,31$ ml para el macho A y de $1,29 \pm 0,29$ ml para el macho B.

Sin embargo no se observaron diferencias significativas en el VE entre las estaciones del año ($p > 0,05$); primavera ($1,28 \pm 0,36$ ml), otoño ($1,29 \pm 0,33$ ml) e invierno ($1,22 \pm 0,24$ ml) fueron similares entre sí, mientras que en verano ($1,08 \pm 0,25$ ml) el VE fue menor aunque no estadísticamente diferente (Tabla 13).

No se encontraron diferencias significativas en el VE entre los doce meses del estudio (Gráfico 18), registrándose valores similares a lo largo de toda la experiencia. No obstante se registró un pico en mayo ($1,38 \pm 0,38$ ml) desde el que descendió hasta su valor mínimo en agosto ($1,05 \pm 0,37$ ml), desde donde inició un segundo pico de crecimiento hasta octubre ($1,38 \pm 0,31$ ml), para disminuir ligeramente hasta el final de la experiencia.

El volumen medio eyaculado por ambos machos no mostró diferencias significativas entre fotoperiodos ($p > 0,05$), con valores medios de $1,27 \pm 0,30$ ml para el ascendente y $1,17 \pm 0,31$ ml para el descendente. No obstante, a partir del solsticio de invierno se inicia un aumento progresivo del VE hasta los meses anteriores al solsticio de verano (mayo), desde donde desciende hasta sus valores mínimos durante el verano (agosto), para iniciar un segundo pico de crecimiento con su valor máximo inmediatamente posterior al equinoccio de otoño (octubre), desde donde descendió hasta el final de la experiencia (Gráfico 19).

Tabla 13 . Volumen medio eyaculado (VE) durante las distintas estaciones del año para ambos machos.

ESTACIÓN	n	VE (ml)
Primavera	18	1,28±0,36
Verano	19	1,08±0,25
Otoño	20	1,29±0,33
Invierno	19	1,22±0,24

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. No se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$). n = número de eyaculados.

Gráfico 18. Evolución del volumen medio eyaculado (VE) e individual para cada macho (VEA; VEB), durante los doce meses del período de estudio.

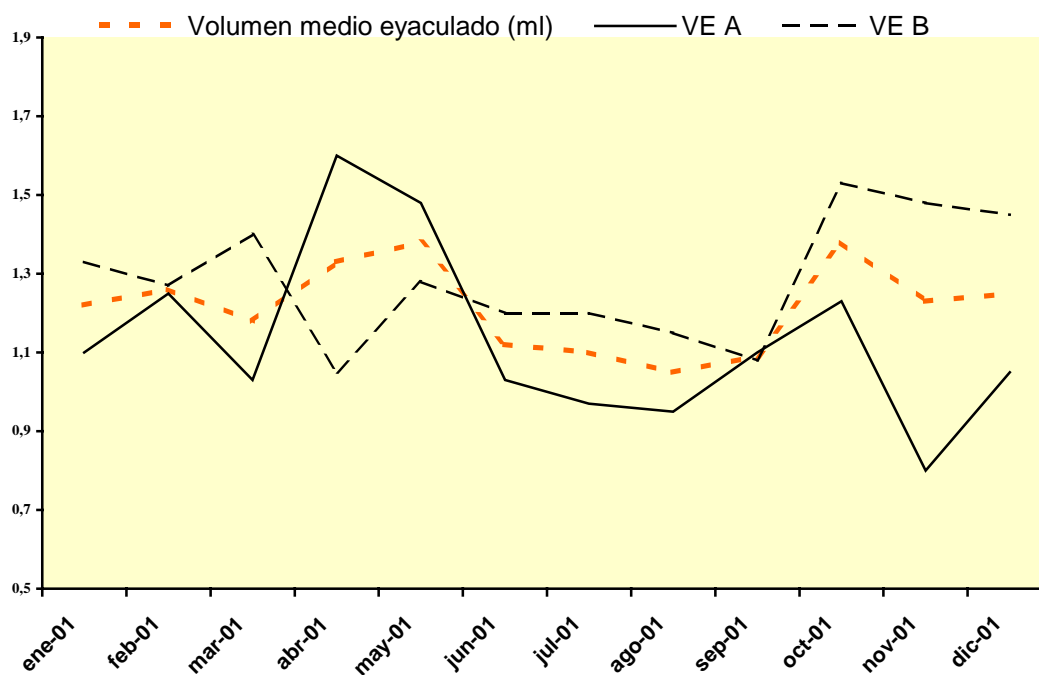
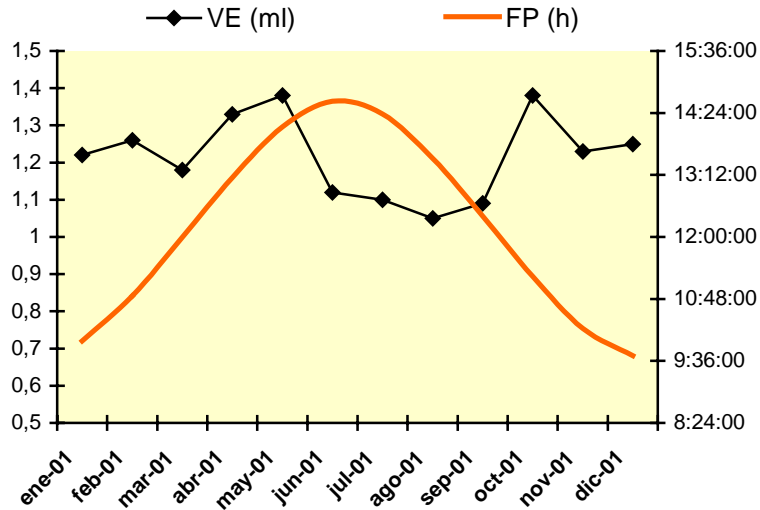
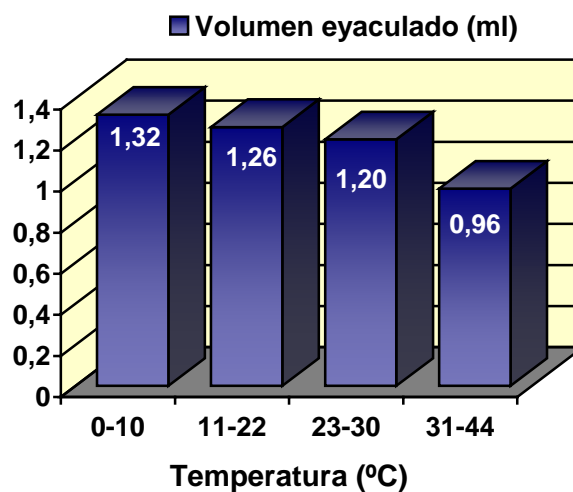


Gráfico 19. Evolución del volumen medio eyaculado (VE) para ambos machos frente al fotoperiodo.



La temperatura media ambiental no influyó significativamente sobre el VE ($p > 0,05$), si bien se registró un patrón de distribución (Gráfico 20) con valores inferiores durante los meses de verano, en los que las temperaturas fueron más elevadas; sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Gráfico 20. Evolución del volumen medio eyaculado para ambos machos frente a la temperatura.



No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$).

2.3.b) Concentración espermática

El valor medio anual de la concentración espermática fue de $3784,34 \pm 741,69 \times 10^6$ spz/ml, con un mínimo de 2192×10^6 spz/ml y un máximo de 5068×10^6 spz/ml. A diferencia del parámetro anterior, no se encontraron diferencias individuales ($p > 0,05$) entre los machos A ($3871,09 \pm 819,60 \times 10^6$ spz/ml) y B ($3700 \pm 657,89 \times 10^6$ spz/ml).

Al analizar la posible interacción de la estación del año sobre la concentración espermática (Tabla 14), se encontraron diferencias significativas al comparar los valores medios obtenidos en las cuatro estaciones ($p < 0,001$), con valores máximos en invierno ($4156,00 \pm 472,49 \times 10^6$ spz/ml) y primavera ($4419,75 \pm 573,26 \times 10^6$ spz/ml) y mínimos en verano ($3318,44 \pm 657,50 \times 10^6$ spz/ml) y otoño ($3379,40 \pm 592,16 \times 10^6$ spz/ml).

Durante la evolución de la concentración espermática a lo largo de la experiencia (Gráfico 21), se observaron diferencias significativas entre meses ($p < 0,001$), con un valor máximo en mayo ($4580,50 \pm 398,18 \times 10^6$ spz/ml), desde donde se produce un descenso hasta su valor mínimo en agosto ($2859,00 \pm 287,04 \times 10^6$ spz/ml) para incrementarse progresivamente hasta alcanzar de nuevo su valor máximo en mayo.

Al analizar el posible efecto del fotoperiodo sobre la evolución de la concentración espermática (Gráfico 22), obtuvimos diferencias significativas entre fotoperiodos ($p < 0,001$), con valores medios mayores durante el fotoperiodo ascendente ($4302,75 \pm 529,72 \times 10^6$ spz/ml) y menores durante el descendente ($3358,97 \pm 610,27 \times 10^6$ spz/ml).

La temperatura ambiental no mostró una influencia significativa ($p > 0,05$) sobre la evolución de la concentración espermática a lo largo del estudio (Gráfico 23), aunque se registraron concentraciones inferiores cuando las temperaturas fueron más elevadas, concretamente a partir de 31°C .

Resultados

Tabla 14. Concentración espermática media en cada estación del año para ambos machos.

ESTACIÓN	n	CONCENTRACIÓN ($\times 10^6/\text{ml}$)
Primavera	18	4419,75 \pm 573,26 ^a
Verano	19	3318,44 \pm 657,50 ^b
Otoño	20	3379,40 \pm 592,16 ^b
Invierno	19	4156,00 \pm 472,49 ^a

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,001$). n = número de eyaculados.

Gráfico 21. Evolución de la concentración espermática media durante los doce meses del período de estudio para ambos machos (CA;CB).

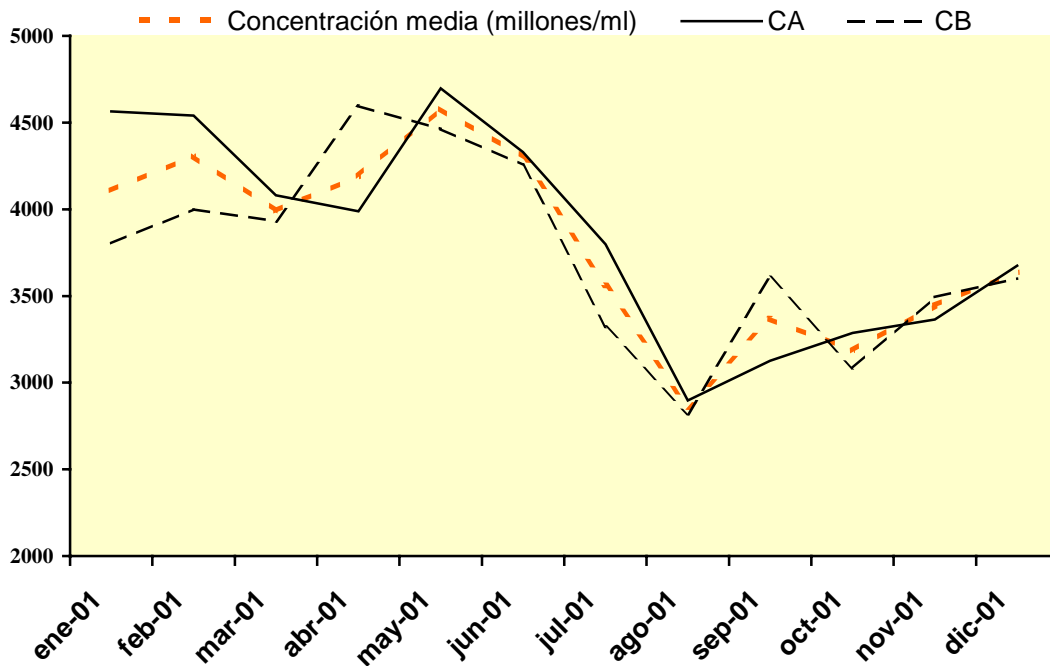


Gráfico 22. Evolución de la concentración espermática media para ambos machos frente al fotoperíodo.

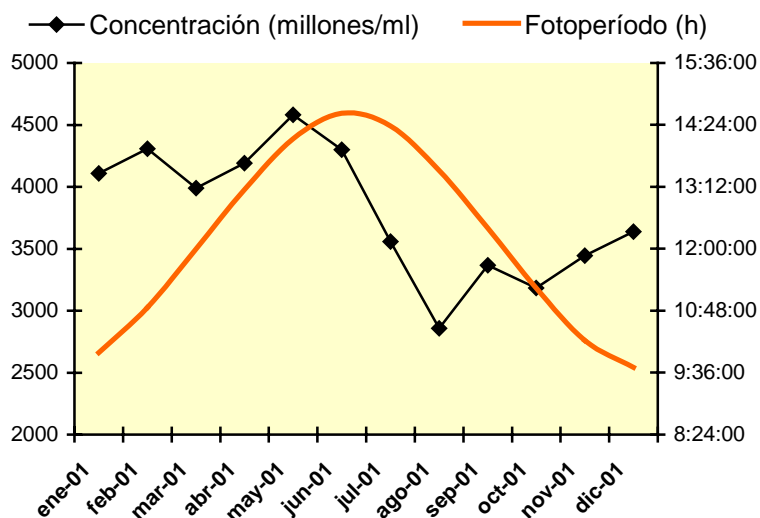
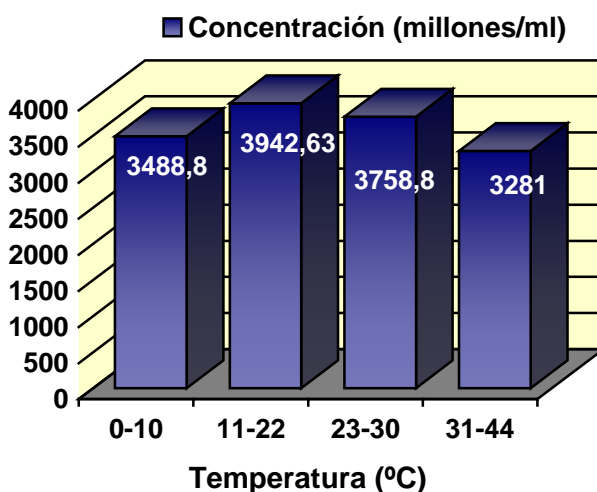


Gráfico 23. Evolución de la concentración espermática media para ambos machos frente a la temperatura.



No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Resultados

2.3.c) Movimiento espermático

El movimiento espermático se calculó valorando dos parámetros cinéticos distintos, el movimiento total (MT) y el movimiento rápido progresivo (MRP), cuyos valores medios durante la experiencia fueron de $82,66 \pm 9,23 \%$ y $56,93 \pm 10,88 \%$ respectivamente.

El valor medio del MT no mostró diferencias significativas entre las distintas estaciones del año ($p > 0,05$), con porcentajes similares en verano ($82,74 \pm 9,11 \%$) e invierno ($82,94 \pm 8,52 \%$), ligeramente superiores en primavera ($84,23 \pm 9,91 \%$) y ligeramente inferiores en otoño ($80,80 \pm 9,78 \%$), pero no estadísticamente diferentes (Tabla 15).

Asimismo, el MRP no mostró diferencias significativas entre estaciones ($p > 0,05$), con porcentajes similares en verano ($58,03 \pm 12,04 \%$) e invierno ($57,46 \pm 7,42 \%$). Se encontró una tendencia a la significación ($p = 0,06$) para obtener valores inferiores en primavera ($51,20 \pm 9,89 \%$) y superiores en otoño ($60,53 \pm 12,01 \%$), aunque estadísticamente no se mostraron diferentes del resto (Tabla 15).

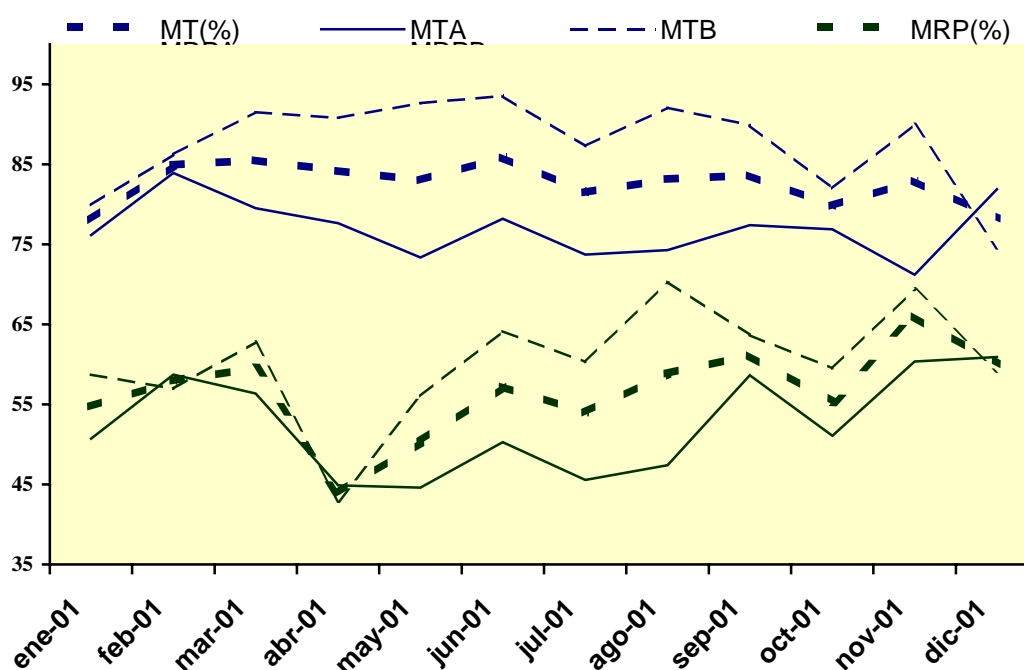
Tabla 15. Movimiento total (MT) y movimiento rápido progresivo (MRP) medios en cada estación del año para ambos machos.

ESTACIÓN	n	MT (%)	MRP (%)
Primavera	18	$84,23 \pm 9,91$	$51,20 \pm 9,89$
Verano	19	$82,74 \pm 9,11$	$58,03 \pm 12,04$
Otoño	20	$80,80 \pm 9,78$	$60,53 \pm 12,01$
Invierno	19	$82,94 \pm 8,52$	$57,46 \pm 7,42$

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$). n = número de eyaculados.

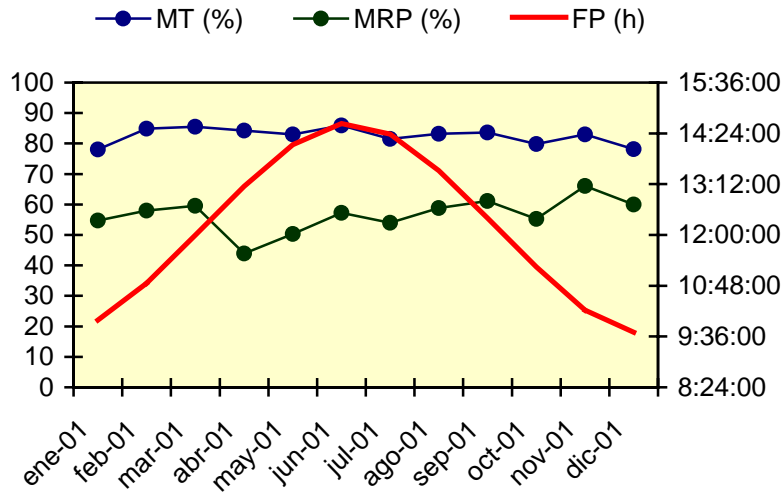
En la Gráfico 24 se representa la evolución del MT y MRP durante los doce meses de duración de la experiencia. No se encontraron diferencias significativas entre meses para los valores medios de MT y MRP. El MT mostró un patrón de distribución regular durante el período de estudio, mientras que el MRP presentó un suave ascenso en noviembre ($66,05 \pm 7,69 \%$) y un ligero descenso en abril ($43,89 \pm 4,34 \%$).

Gráfico 24. Evolución del movimiento total (MT) y rápido progresivo (MRP) medio durante los doce meses del período de estudio para ambos machos (MT A, MRP A; MT B, MRP B).



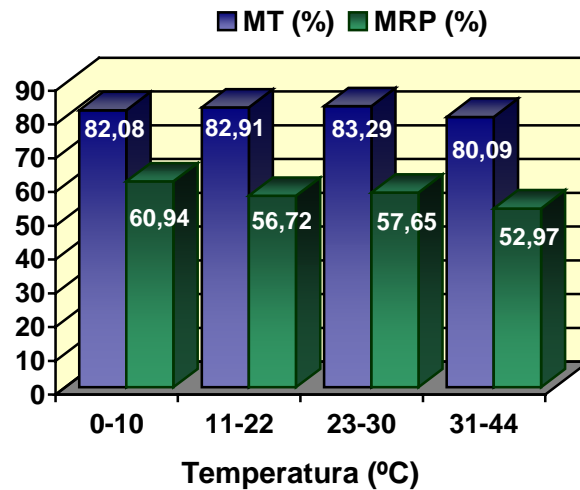
No se observó influencia del fotoperiodo sobre la evolución del movimiento espermático, ya que no se obtuvieron diferencias significativas para MT y MRP ($p > 0,05$), con valores de MT y MRP similares durante el fotoperiodo ascendente ($83,47 \pm 9,11 \%$; $54,50 \pm 9,36 \%$) y descendente ($81,95 \pm 9,39 \%$; $59,00 \pm 11,75 \%$) respectivamente (Gráfico 25).

Gráfico 25. Evolución del movimiento total (MT) y movimiento rápido progresivo medio (MRP) para ambos machos frente al fotoperiodo.



Asimismo, la temperatura media ambiental no mostró un efecto significativo sobre la evolución del MT y MRP a lo largo del periodo de estudio ($p > 0,05$), manteniendo ambos parámetros cinéticos un patrón de distribución regular durante toda la experiencia independientemente de la oscilación térmica (Gráfico 26).

Gráfico 26. Evolución del movimiento total (MT) y movimiento rápido progresivo medio (MRP) para ambos machos frente a la temperatura.



No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$).

2.3.d) Morfología espermática

El valor medio para el porcentaje de espermatozoides normales durante los doce meses de estudio fue de $75,92 \pm 18,94$ %. Se encontraron diferencias significativas entre individuos ($p < 0,001$), con un porcentaje medio de formas normales de $60,03 \pm 15,66$ % y $90,14 \pm 5,47$ % para los machos A y B respectivamente, que se vieron influidos por un proceso inflamatorio testicular que afectó al macho A entre los meses de junio a septiembre, y que fue de etiología desconocida, tratado con antibióticos de amplio espectro, y que al remitir tras 12 días, el macho recuperó su calidad seminal.

Al comparar el porcentaje medio de formas normales entre estaciones, no se encontraron diferencias estadísticas (Tabla 16). Sin embargo se observó una tendencia a la significación ($p < 0,1$) con una disminución de las formas normales en verano ($70,68 \pm 25,42$ %) y primavera ($71,67 \pm 21,78$ %), valores que tenderían a ser diferentes al aumento de la normalidad espermática producido en otoño ($85,23 \pm 7,90$ %), actuando el invierno ($76,58 \pm 13,16$ %) como un período intermedio de transición.

Tabla 16. Morfología espermática en cada estación del año para ambos machos.

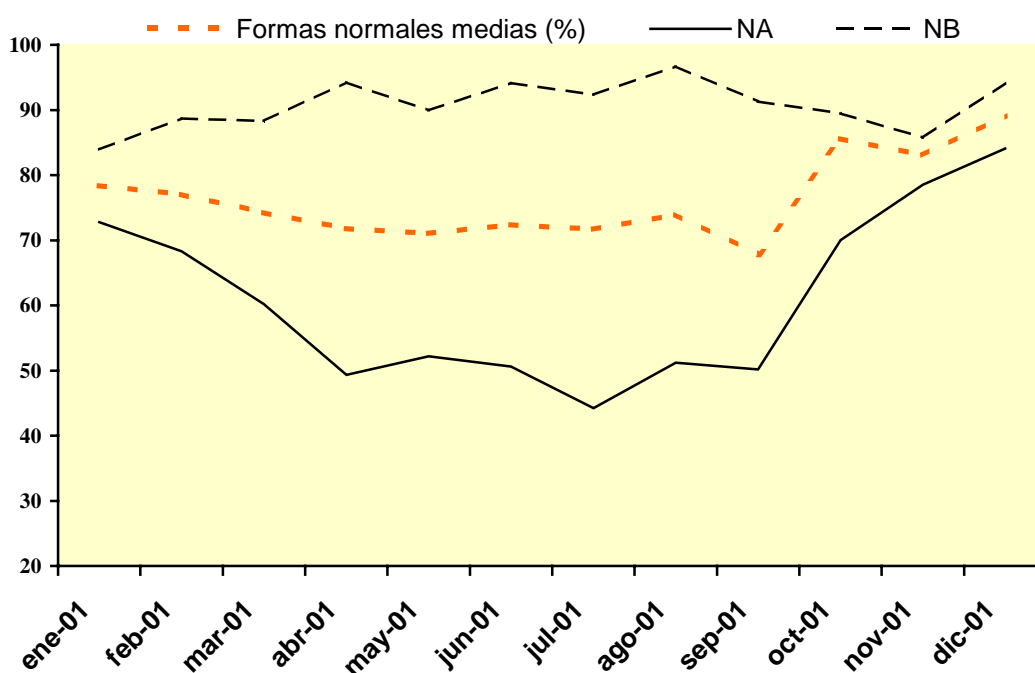
ESTACIÓN	n	FORMAS NORMALES (%)
Primavera	18	$71,67 \pm 21,78$
Verano	19	$70,68 \pm 25,42$
Otoño	20	$85,23 \pm 7,90$
Invierno	19	$76,58 \pm 13,16$

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$). n = número de eyaculados.

Resultados

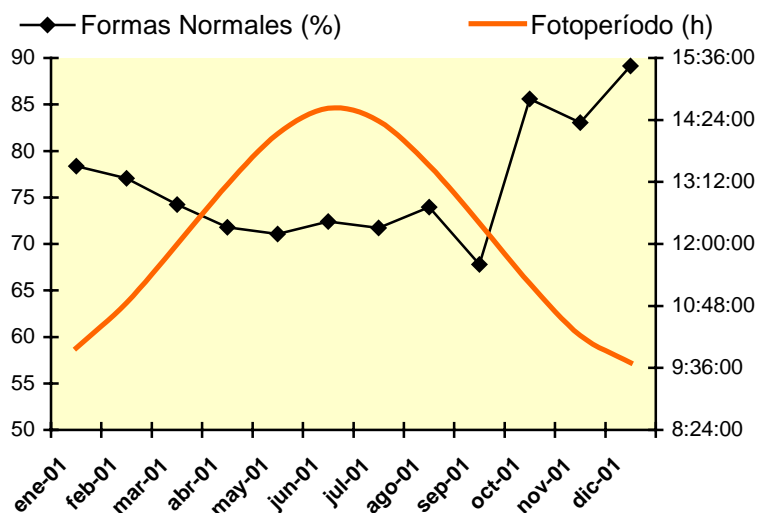
Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre los porcentajes mensuales de formas normales registrados durante la experiencia ($p > 0,05$). A pesar de ello, durante la evolución de la morfología espermática (Gráfico 27) se registró un valor máximo en el mes de diciembre ($89,13 \pm 5,85 \%$), desde donde se produjo un descenso suave hasta abril ($71,80 \pm 25,95 \%$), manteniéndose estos valores inferiores hasta agosto ($73,95 \pm 26,33 \%$) para descender hasta su valor mínimo en septiembre ($67,79 \pm 26,55 \%$) desde donde se produce un ascenso para, en los meses sucesivos alcanzar los valores más altos registrados durante la experiencia hasta su máximo en diciembre.

Gráfico 27. Evolución de la morfología espermática media para ambos machos (NA;NB) durante los doce meses del período de estudio.



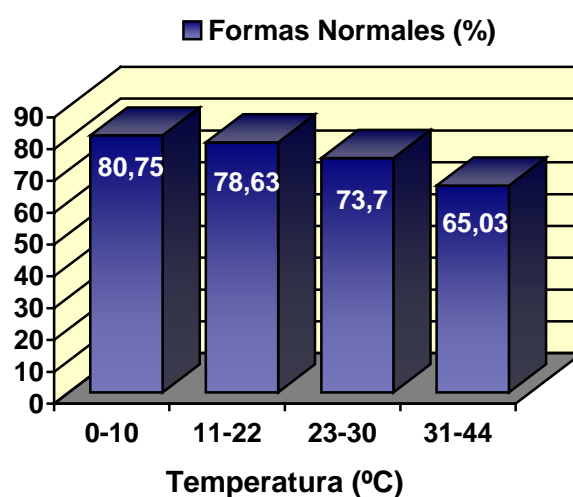
No se observó influencia del fotoperiodo sobre la evolución de la morfología espermática, ya que no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los porcentajes medios registrados en ambos fotoperiodos, con valores de $74,23 \pm 17,31 \%$ para el ascendente y $77,52 \pm 20,47 \%$ para el descendente (Gráfico 28).

Gráfico 28. Evolución de la morfología espermática media para ambos machos frente al fotoperíodo.



Del mismo modo, la temperatura ambiental media diaria no influyó significativamente ($p > 0,05$) sobre la evolución de la morfología espermática a lo largo de la experiencia (Gráfico 29), aunque esta fue descendiendo a medida que aumentaron las temperaturas.

Gráfico 29. Evolución de la morfología espermática media para ambos machos frente a la temperatura.



No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$).

2.3.e) Integridad del acrosoma

El porcentaje medio de acrosomas íntegros registrado durante la experiencia fue de $90,40 \pm 4,68$ %, con un mínimo de 79,40 % y un máximo de 99,20 %. No se observaron diferencias individuales para este parámetro ($p > 0,05$), con un valor medio para el macho A de $89,43 \pm 4,36$ % y de $91,34 \pm 4,85$ % para el macho B.

El porcentaje de acrosomas íntegros estuvo influido por la estación del año ($p < 0,01$), con valores significativamente inferiores en verano ($87,69 \pm 4,38$ %) que comenzaron a aumentar en otoño ($89,34 \pm 3,47$ %) para alcanzar sus valores máximos en invierno ($92,68 \pm 4,61$ %) y primavera ($92,17 \pm 4,69$ %) (Tabla 17).

Asimismo, se obtuvieron variaciones mensuales en la integridad del acrosoma ($p < 0,001$), con valores mínimos en julio ($85,81 \pm 3,28$) y septiembre ($86,28 \pm 3,12$), desde donde aumentó hasta sus valores máximos en febrero ($94,33 \pm 3,80$ %) y abril ($95,45 \pm 2,58$ %), para a continuación descender de nuevo hasta septiembre (Gráfico 30).

Al analizar la posible influencia del fotoperiodo sobre la integridad del acrosoma durante el desarrollo de la experiencia (Gráfico 31), se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) en los porcentajes medios de acrosomas íntegros registrados en cada fotoperiodo, con valores de $92,97 \pm 4,09$ % para el ascendente y $88,27 \pm 4,06$ % para el descendente.

La temperatura ambiental media diaria no influyó de forma significativa ($p > 0,05$) sobre el porcentaje de acrosomas íntegros (Gráfico 32), aunque se observa que cuando ascienden las temperaturas a partir de 23°C, decrece el porcentaje de acrosomas íntegros, que a su vez que vuelve a aumentar cuando desciende la temperatura por debajo de 22°C.

Tabla 17. Integridad del acrosoma en cada estación del año para ambos machos.

ESTACIÓN	n	INTEGRIDAD (%)
Primavera	18	92,17±4,69 ^a
Verano	19	87,69±4,38 ^b
Otoño	20	89,34±3,47 ^{ab}
Invierno	19	92,68±4,61 ^a

Los valores están expresados en media ± desviación típica. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,01$). n = número de eyaculados.

Gráfico 30. Evolución de la integridad del acrosoma media e individual para cada macho (IA;IB) durante los doce meses del período de estudio.

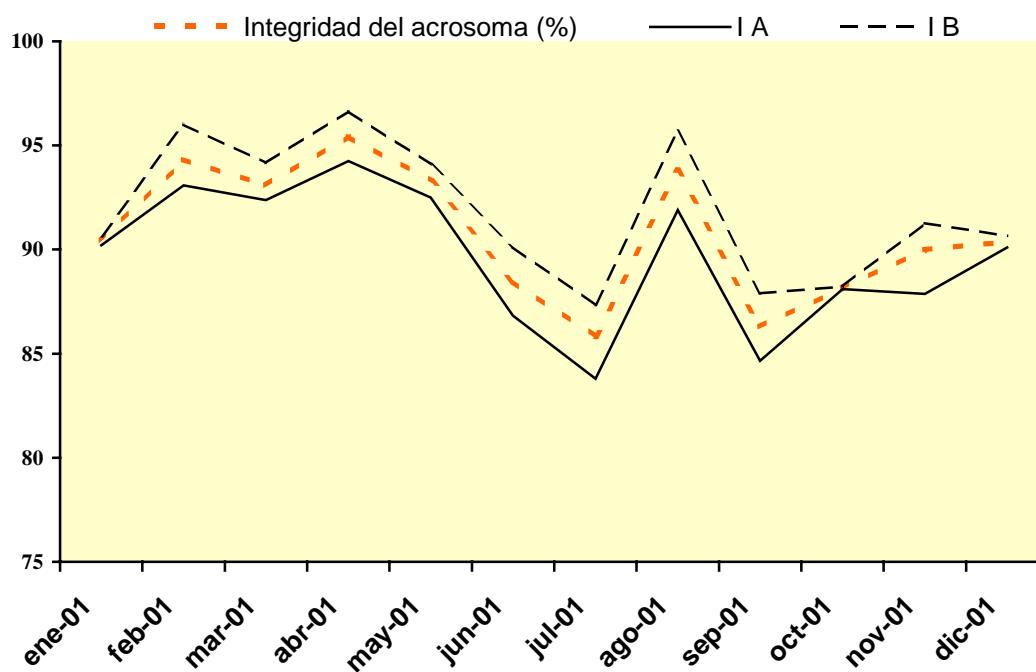


Gráfico 31. Evolución de la integridad del acrosoma para ambos machos frente al fotoperíodo.

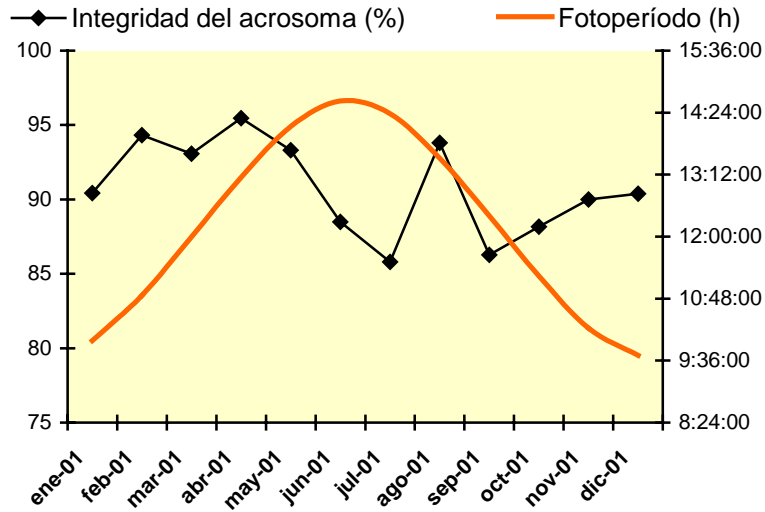
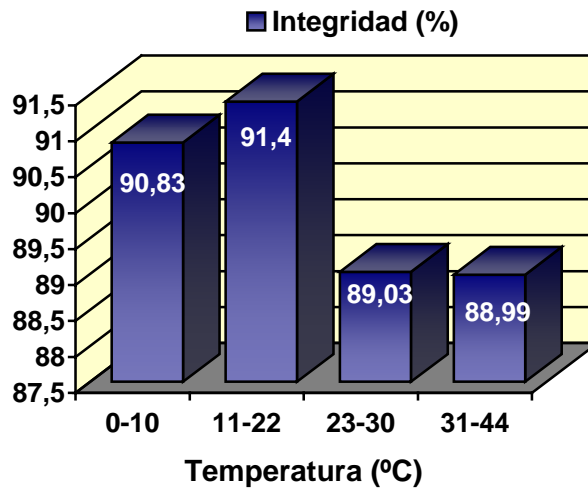


Gráfico 32. Evolución de la integridad del acrosoma para ambos machos frente a la temperatura.



No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$).

2.4. Correlación entre los parámetros espermáticos estudiados

Se calculó el coeficiente de correlación entre todos los parámetros morfométricos y seminales estudiados, así como entre estos y los factores individuo, estación, mes, fotoperiodo y temperatura (Tabla 18).

Todos los parámetros morfométricos evaluados estuvieron correlacionados entre sí, con unos índices de correlación que oscilaron entre $r=0,372$ y $p<0,01$ para la longitud respecto a la anchura y de $r=0,904$, $p<0,01$ y $r=-0,934$, $p<0,01$ para la longitud respecto del perímetro y anchura respecto de elipticidad respectivamente.

Los parámetros morfométricos mostraron una correlación significativa con los parámetros seminales evaluados para: la longitud respecto al movimiento total ($r=-0,273$, $p<0,05$); anchura frente a concentración ($r=-0,242$, $p<0,05$) e integridad ($r=-0,247$, $p<0,05$); y perímetro frente al movimiento total ($r=-0,244$, $p<0,05$).

Asimismo, los parámetros morfométricos evaluados se correlacionaron significativamente con los factores macho para la longitud ($r=-0,293$, $p<0,05$) y elipticidad ($r=-0,307$, $p<0,01$); estación para anchura ($r=-0,332$, $p<0,01$) y elipticidad ($r=0,448$, $p<0,01$); mes para anchura ($r=0,575$, $p<0,01$), área ($r=0,435$, $p<0,01$) y elipticidad ($r=-0,535$, $p<0,01$); fotoperiodo frente a anchura ($r=0,445$, $p<0,01$), área ($r=0,312$, $p<0,01$) y elipticidad ($r=-0,429$, $p<0,01$); y temperatura para longitud ($r=-0,369$, $p<0,01$), área ($r=-0,228$, $p<0,05$), perímetro ($r=-0,431$, $p<0,01$) y elipticidad ($r=-0,242$, $p<0,05$).

Por otro lado los parámetros seminales se correlacionaron entre sí (Tabla 18) para: VE frente a MRP ($r=0,238$, $p<0,05$); C respecto a MRP ($r=-0,291$, $p<0,05$); MT con MRP ($r=0,548$, $p<0,01$), N ($r=0,587$, $p<0,01$) e I ($r=0,302$, $p<0,01$); MRP con N ($r=0,440$, $p<0,01$) además de con los ya descritos VE, concentración y MT; N con I ($r=0,240$, $p<0,05$) además de con MT y MRP; y por último la I con los coeficientes ya referidos para MT y N.

Resultados

Los parámetros seminales evaluados se correlacionaron significativamente con los factores macho para MT ($r=0,589$ $p<0,01$) MRP ($r=0,384$ $p<0,01$) y N ($r=0,799$ $p<0,01$); mes para concentración ($r=-0,502$ $p<0,01$) e integridad ($r=-0,343$ $p<0,01$); fotoperiodo para C ($r=-0,638$ $p<0,01$) e I ($r=-0,502$ $p<0,01$); y temperatura para N ($r=-0,233$ $p<0,05$).

Tabla 18. Índices de correlación entre los parámetros morfométricos y seminales estudiados y entre estos y los factores individuo (macho), estación, mes, fotoperiodo y temperatura.

	L	W	A	P	E	VE	C	MT	MRP	N	I
L		,372**	,701**	,904**	-,022	,001	-,071	-,273*	-,060	-,122	-,148
W	,372**		,842**	,544**	-,934**	,075	-,242*	-,097	-,027	,140	-,247*
A	,701**	,842**		,848**	-,639**	,033	-,177	-,179	-,084	,077	-,198
P	,904**	,544**	,848**		-,241*	,059	-,062	-,244*	-,107	-,010	-,080
E	-,022	-,934**	-,639**	-,241*		-,084	,231	,010	,018	-,187	,212
VE	,001	,075	,033	,059	-,084		,027	,219	,238*	,164	,203
C	-,071	-,242*	-,177	-,062	,231	,027		,065	-,291*	-,028	,159
MT	-,273*	-,097	-,179	-,244*	,010	,219	,065		,548**	,587**	,302**
MRP	-,060	-,027	-,084	-,107	,018	,238*	-,291*	,548**		,440**	,129
N	-,122	,140	,077	-,010	-,187	,164	-,028	,587**	,440**		,240*
I	-,148	-,247*	-,198	-,080	,212	,203	,159	,302**	,129	,240*	
Macho	-,293*	,189	,023	-,190	-,307**	,252	-,116	,589**	,384**	,799**	,206
Estación	,188	-,332**	-,050	,191	,448**	,019	-,099	-,069	,215	,170	,075
Mes	,219	,575**	,435**	,208	-,535**	-,024	-,502**	-,063	,225	,125	-,343**
FP	,121	,445**	,312**	,084	-,429**	-,164	-,638**	-,082	,208	,087	-,502**
T^a	-,369**	,083	-,228*	-,431**	-,242*	-,192	-,151	,040	-,153	-,233*	-,220

* Correlación significativa ($p<0,05$); ** Correlación significativa ($p<0,01$); L= Longitud; W= Anchura; A= Área; P= Perímetro; E= Elipticidad; VE= volumen eyaculado; C= Concentración espermática; MT= Movimiento total; MRP= Movimiento rápido progresivo; N= Morfología espermática; I= Integridad del acrosoma; FP= Fotoperiodo; T^a= Temperatura.

3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN SOBRE LOS PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS DEL ESPERMATOZOIDE

Los 76 eyaculados recogidos durante la experiencia fueron sometidos a un proceso de congelación-descongelación con dos diluyentes diferentes (Tris; Lácteo), para valorar el posible efecto de este proceso sobre los parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide, analizando un total de 23913 células. Asimismo se valoraron los parámetros seminales movimiento, morfología e integridad del acrosoma antes y después de congelar con ambos diluyentes.

Se valoró la respuesta a la congelación-descongelación de los parámetros morfométricos de los eyaculados con los diluyentes Tris y Lácteo en función de si cumplieron o no los requisitos exigidos a la precongelación y a la descongelación (apdo. IV.2.6.d), pag. 106). De los 76 eyaculados recogidos durante la experiencia, 58 (76,31%) cumplieron los requisitos exigidos a la precongelación. No se encontraron diferencias significativas entre individuos ($p>0,05$), de tal forma que para el macho A, el 67,57% de los eyaculados cumplieron los requisitos (25/37) y para el macho B fue el 84,61% (33/39).

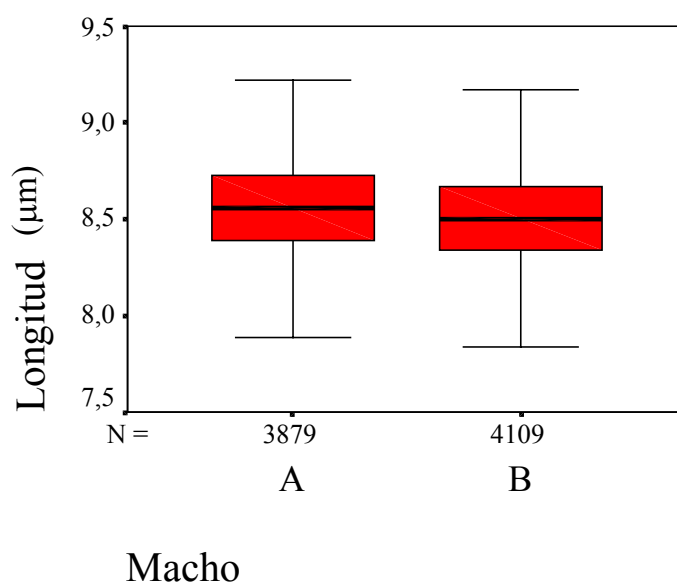
A su vez, De los 58 eyaculados seleccionados (116 dosis), 34 (58,62 %) presentaron dosis para ambos diluyentes (68/116), Tris y Lácteo, que superaron el 30% de MRP exigido, tras un período de incubación de 60 minutos a +37°C. De los 34 eyaculados, 13 pertenecían al macho A y 21 al macho B, no encontrando diferencias significativas entre individuos ($p>0,05$).

3.1. Parámetros morfométricos para el tamaño de la cabeza

3.1.a) Longitud de la cabeza

El valor medio para la longitud de la cabeza a la precongelación fue de $8,53 \pm 0,25 \mu\text{m}$, con un mínimo de $6,98 \mu\text{m}$ y un máximo de $9,61 \mu\text{m}$. Se observaron variaciones individuales para este parámetro ($p < 0,001$), con un valor medio para el macho A de $8,55 \pm 0,25 \mu\text{m}$ y de $8,50 \pm 0,25 \mu\text{m}$ para el macho B (Gráfico 33).

Gráfico 33. Diagrama de cajas y bigotes en el que se representa la longitud de la cabeza a la precongelación para ambos machos durante el período de estudio.



El valor medio de la longitud de la cabeza de los espermatozoides analizados a la descongelación fue de $8,41 \pm 0,31 \mu\text{m}$ (Tabla 19), resultado significativamente inferior ($p < 0,001$) al valor obtenido por este parámetro antes de congelar el esperma ($8,53 \pm 0,25 \mu\text{m}$). El proceso de congelación–descongelación ocasionó una pérdida de $0,11 \mu\text{m}$ en la longitud de la cabeza de los espermatozoides.

En cada macho (Tabla 19), la longitud de la cabeza se afectó de la misma manera ante el proceso de congelación-descongelación ($p < 0,001$), reduciéndose

respecto a su valor para el espermatozoides pre congelado tanto para el macho A ($8,43 \pm 0,31 \mu\text{m}$ vs. $8,55 \pm 0,25 \mu\text{m}$) como para el macho B ($8,39 \pm 0,31 \mu\text{m}$ vs. $8,50 \pm 0,25 \mu\text{m}$).

Tabla 19. Respuesta de la longitud de la cabeza a la congelación-descongelación (valores medios e individuales).

LONGITUD (μm)	n	Macho A	Macho B	Media
Precongelado	7988	$8,55 \pm 0,25^a$	$8,50 \pm 0,25^a$	$8,53 \pm 0,25^a$
Congelado-Descongelado	15925	$8,43 \pm 0,31^b$	$8,39 \pm 0,31^b$	$8,41 \pm 0,31^b$

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,001$). n= número de espermatozoides analizados.

El diluyente empleado influyó significativamente sobre la respuesta de la longitud de la cabeza a la congelación-descongelación (Tabla 20). Así, aunque con ambos diluyentes se produjo una reducción significativa de la longitud de la cabeza frente al espermatozoides fresco ($p < 0,001$), esta fue menor con el Lácteo ($8,49 \pm 0,30 \mu\text{m}$ vs. $8,53 \pm 0,25 \mu\text{m}$) que con el Tris ($8,34 \pm 0,30 \mu\text{m}$ vs. $8,53 \pm 0,25 \mu\text{m}$), con una pérdida de $0,04 \mu\text{m}$ y $0,19 \mu\text{m}$ respectivamente respecto a su valor antes de la congelación.

De la misma manera, en cada macho se produjo una pérdida significativa ($p < 0,001$) en el valor de la longitud de la cabeza (Tabla 20), que fue menor para el diluyente Lácteo ($8,50 \pm 0,30 \mu\text{m}$ macho A; $8,47 \pm 0,30 \mu\text{m}$ macho B) que para el Tris ($8,36 \pm 0,30 \mu\text{m}$ macho A; $8,32 \pm 0,31 \mu\text{m}$ macho B).

Tabla 20. Respuesta de la longitud de la cabeza a la congelación-descongelación con los diluyentes Tris y Lácteo (valores medios e individuales).

LONGITUD (μm)	n	Macho A	Macho B	Media
Precongelado	7988	$8,55 \pm 0,25^a$	$8,50 \pm 0,25^a$	$8,53 \pm 0,25^a$
Tris	8020	$8,36 \pm 0,30^c$	$8,32 \pm 0,31^c$	$8,34 \pm 0,30^c$
Lácteo	7905	$8,50 \pm 0,30^b$	$8,47 \pm 0,30^b$	$8,49 \pm 0,30^b$

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,001$). n= número de espermatozoides analizados.

Se comparó la respuesta a la congelación-descongelación, con los diluyentes Tris y Lácteo, de la longitud de la cabeza entre los 58 eyaculados aptos para congelar y

Resultados

los 18 clasificados como no aptos (Tabla 21). La longitud de la cabeza se afectó por el proceso de congelación-descongelación tanto en los eyaculados “aptos” como “no aptos”, con valores significativamente inferiores para los diluyentes Tris y Lácteo frente al precongelado ($p < 0,001$).

Tabla 21. Respuesta de la longitud de la cabeza a la congelación-descongelación con los diluyentes Tris y Lácteo en los eyaculados clasificados como “aptos” y “no aptos” para congelar.

Aptos precongelación	n	Longitud (μm)	No Aptos precongelación	n	Longitud (μm)
Precongelado	6004	8,53 \pm 0,25 ^a	Precongelado	1984	8,53 \pm 0,25 ^a
Tris	6098	8,33 \pm 0,31 ^b	Tris	1922	8,37 \pm 0,29 ^b
Lácteo	6043	8,49 \pm 0,30 ^c	Lácteo	1862	8,49 \pm 0,29 ^c

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,001$). n= número de espermatozoides analizados.

Se valoró la respuesta a la congelación-descongelación, con los diluyentes Tris y Lácteo, de la longitud de la cabeza tanto para los 34 eyaculados que presentaron dosis para ambos diluyentes aptas al test de longevidad del movimiento, como para los 24 con dosis que no superaron el test (Tabla 22). Tanto en los eyaculados con dosis para Tris y Lácteo aptas al test de longevidad del movimiento rápido progresivo a la descongelación, como en los que presentaron dosis no aptas, la longitud de la cabeza estuvo afectada por el proceso de congelación-descongelación, con valores significativamente inferiores al espermatozoides precongelado ($p < 0,001$).

Tabla 22. Respuesta de la longitud de la cabeza a la congelación-descongelación en los eyaculados con dosis para los diluyentes Tris y Lácteo “aptas” y “no aptas” al test de longevidad del movimiento.

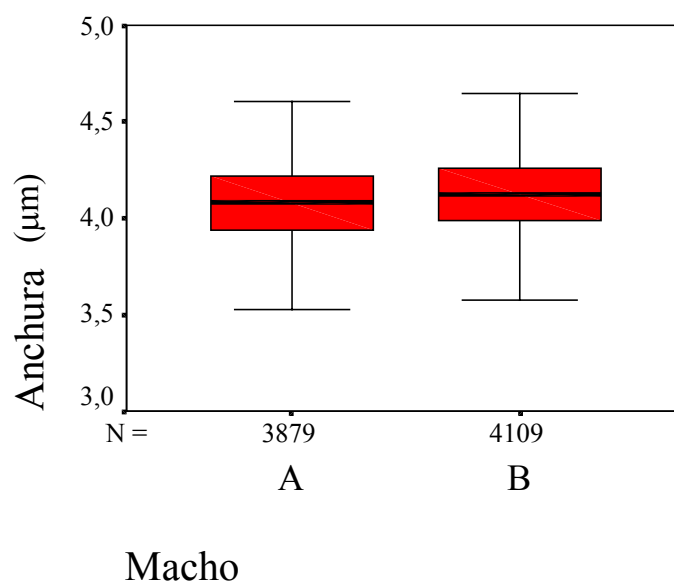
Aptos- descongelación	n	Longitud (μm)	No Aptos- descongelación	n	Longitud (μm)
Precongelado	3544	8,57 \pm 0,24 ^a	Precongelado	2460	8,55 \pm 0,26 ^a
Tris	3557	8,35 \pm 0,31 ^b	Tris	2541	8,33 \pm 0,31 ^b
Lácteo	3525	8,52 \pm 0,30 ^c	Lácteo	2518	8,48 \pm 0,30 ^c

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas. n= número de espermatozoides analizados.

3.1.b) Anchura de la cabeza

El valor medio de la anchura de la cabeza a la precongelaación fue de $4,10 \pm 0,20$ μm , con un mínimo de $3,28$ μm y un máximo de $4,72$ μm . Al igual que la longitud, este parámetro mostró diferencias individuales ($p < 0,001$) con un valor de $4,07 \pm 0,20$ μm para el macho A y de $4,12 \pm 0,20$ μm para el macho B (Gráfico 34).

Gráfico 34. Diagrama de cajas y bigotes en el que se representa la anchura de la cabeza a la precongelaación para ambos machos durante el período de estudio.



El valor medio de la anchura de la cabeza de los espermatozoides a la descongelación fue de $4,02 \pm 0,19$ μm frente a $4,10 \pm 0,20$ μm del espermatozoides precongelaado (Tabla 23), reduciéndose significativamente este parámetro en $0,08$ μm ($p < 0,001$).

De forma individual, la anchura de la cabeza se afecto por el proceso de congelaación (Tabla 23), con valores significativamente inferiores respecto al espermatozoides precongelaado ($p < 0,001$) tanto para el macho A ($4,07 \pm 0,20$ μm vs. $3,99 \pm 0,20$ μm) como para el macho B ($4,12 \pm 0,20$ μm vs. $4,05 \pm 0,19$ μm).

Tabla 23. Respuesta de la anchura de la cabeza a la congelación-descongelación (valores medios e individuales).

ANCHURA (μm)	n	Macho A	Macho B	Media
Precongelado	7988	4,07 \pm 0,20 ^a	4,12 \pm 0,20 ^a	4,10\pm0,20^a
Congelado-Descongelado	15925	3,99 \pm 0,20 ^b	4,05 \pm 0,19 ^b	4,02\pm0,19^b

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,001$). n= número de espermatozoides analizados.

Asimismo el diluyente de congelación influyó significativamente en el efecto de la congelación-descongelación sobre la anchura de la cabeza de los espermatozoides ($p < 0,001$), produciéndose una reducción menor frente al esperma fresco en el Lácteo (4,04 \pm 0,19 μm vs. 4,10 \pm 0,20 μm) que en el Tris (3,99 \pm 0,19 μm vs. 4,10 \pm 0,20 μm), con una pérdida de tamaño de 0,05 y 0,10 μm respectivamente (Tabla 24).

De forma individual, se registraron pérdidas en la anchura de la cabeza en los machos A y B con ambos diluyentes, con valores significativamente inferiores a los obtenidos en el esperma precongelado (Tabla 24).

Tabla 24. Respuesta de la anchura de la cabeza a la congelación-descongelación con los diluyentes Tris y Lácteo (valores medios e individuales).

ANCHURA (μm)	n	Macho A	Macho B	Media
Precongelado	7988	4,07 \pm 0,20 ^a	4,12 \pm 0,20 ^a	4,10\pm0,20^a
Tris	8020	3,96 \pm 0,19 ^c	4,02 \pm 0,18 ^c	3,99\pm0,19^c
Lácteo	7905	4,01 \pm 0,20 ^b	4,07 \pm 0,19 ^b	4,04\pm0,19^b

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,001$). n= número de espermatozoides analizados.

Se comparó la respuesta a la congelación-descongelación, con los diluyentes Tris y Lácteo, de la anchura de la cabeza entre los 58 eyaculados aptos para congelar y los 18 clasificados como no aptos (Tabla 25). La anchura de la cabeza se afectó por el proceso de congelación-descongelación en los eyaculados “aptos” y “no aptos”, con

valores significativamente inferiores para los diluyentes Tris y Lácteo frente al precongelado ($p < 0,001$).

Tabla 25. Respuesta de la anchura de la cabeza a la congelación-descongelación con los diluyentes Tris y Lácteo en los eyaculados clasificados como “aptos” y “no aptos” para congelar.

Aptos precongelación	n	Anchura (μm)	No Aptos precongelación	n	Anchura (μm)
Precongelado	6004	4,09 \pm 0,21 ^a	Precongelado	1984	4,12 \pm 0,19 ^a
Tris	6098	4,00 \pm 0,19 ^b	Tris	1922	3,97 \pm 0,19 ^b
Lácteo	6043	4,05 \pm 0,19 ^c	Lácteo	1862	4,01 \pm 0,19 ^c

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,001$). n= número de espermatozoides analizados.

Se valoró la respuesta a la congelación-descongelación, con los diluyentes Tris y Lácteo, de la anchura de la cabeza tanto para los 34 eyaculados que presentaron dosis para ambos diluyentes aptas al test de longevidad del movimiento, como para los 24 con dosis que no superaron el test (Tabla 26). En los eyaculados con dosis aptas, la anchura de la cabeza no se afectó por el proceso de congelación con el diluyente Lácteo y si con el Tris, con valores estadísticamente iguales e inferiores que los obtenidos a la precongelación respectivamente. En el caso de los eyaculados con dosis no aptas, tanto los valores de Tris como de Lácteo fueron significativamente inferiores al espermatozoides precongelado.

Tabla 26. Respuesta de la anchura de la cabeza a la congelación-descongelación en los eyaculados con dosis para los diluyentes Tris y Lácteo “aptos” y “no aptos” al test de longevidad del movimiento.

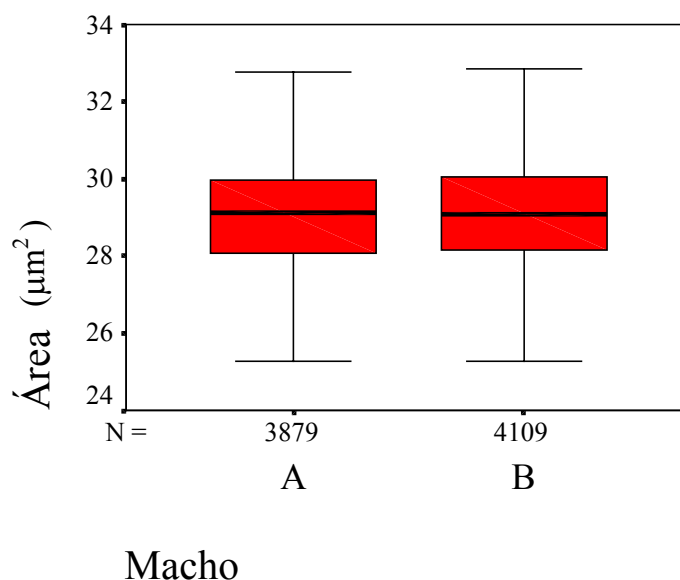
Aptos-descongelación	n	Anchura (μm)	No Aptos-descongelación	n	Anchura (μm)
Precongelado	3544	4,11 \pm 0,21 ^a	Precongelado	2460	4,12 \pm 0,19 ^a
Tris	3557	4,00 \pm 0,20 ^b	Tris	2541	4,00 \pm 0,19 ^b
Lácteo	3525	4,09 \pm 0,18 ^a	Lácteo	2518	4,04 \pm 0,20 ^c

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas. n= número de espermatozoides analizados.

3.1.c) Área de la cabeza

El valor medio anual del área de la cabeza a la pre congelación fue de $29,06 \pm 1,44 \mu\text{m}^2$, con un valor mínimo de $22,23 \mu\text{m}^2$ y un máximo de $34,63 \mu\text{m}^2$. A diferencia de los parámetros morfométricos anteriores, no se encontraron diferencias significativas entre individuos ($p > 0,05$), obteniendo unos valores medios de $29,04 \pm 1,43 \mu\text{m}^2$ y de $29,07 \pm 1,45 \mu\text{m}^2$ para los machos A y B respectivamente (Gráfico 35).

Gráfico 35. Diagrama de cajas y bigotes en el que se representa el área de la cabeza a la pre congelación para ambos machos durante el período de estudio.



El área de la cabeza de los espermatozoides analizados a la descongelación fue de $28,78 \pm 1,57 \mu\text{m}^2$ (Tabla 27), valor significativamente inferior ($p < 0,001$) al registrado para el esperma fresco ($29,06 \pm 1,44 \mu\text{m}^2$), lo que supuso una reducción de $0,28 \mu\text{m}^2$.

En cada individuo (Tabla 27), se observó una pérdida significativa ($p < 0,001$) en el valor del área de la cabeza de los espermatozoides descongelados frente a los pre congelados ($28,67 \pm 1,57 \mu\text{m}^2$ vs. $29,04 \pm 1,43 \mu\text{m}^2$ para el macho A; $28,87 \pm 1,56 \mu\text{m}^2$ vs. $29,07 \pm 1,45 \mu\text{m}^2$ para el macho B).

Tabla 27. Respuesta del área de la cabeza a la congelación-descongelación (valores medios e individuales).

ÁREA (μm^2)	n	Macho A	Macho B	Media
Precongelado	7988	29,04 \pm 1,43 ^a	29,07 \pm 1,45 ^a	29,06\pm1,44^a
Congelado-Descongelado	15925	28,67 \pm 1,57 ^b	28,87 \pm 1,56 ^b	28,78\pm1,57^b

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,001$). n= número de espermatozoides analizados.

El diluyente empleado influyó significativamente sobre el área de la cabeza de los espermatozoides sometidos a congelación-descongelación (Tabla 28), reduciéndola de forma significativa ($p < 0,001$), aunque el diluyente Lácteo conservó mejor el valor de este parámetro respecto al esperma fresco ($28,95 \pm 1,53 \mu\text{m}^2$ vs. $29,06 \pm 1,44 \mu\text{m}^2$) que el Tris ($28,60 \pm 1,59 \mu\text{m}^2$ vs. $29,06 \pm 1,44 \mu\text{m}^2$), con pérdidas de 0,11 y 0,46 μm^2 respectivamente.

Sin embargo, en el macho B el área de los espermatozoides congelados con el diluyente Lácteo no se afectó por la congelación descongelación, con valores estadísticamente iguales frente al esperma fresco ($29,05 \pm 1,52 \mu\text{m}^2$ vs. $29,08 \pm 1,45 \mu\text{m}^2$) y si se afectó el área de los congelados con Tris ($28,69 \pm 1,59 \mu\text{m}^2$ vs. $29,08 \pm 1,45 \mu\text{m}^2$). Por el contrario, en el macho A la anchura de la cabeza se afectó con ambos diluyentes, aunque la reducción frente al esperma fresco fue menor con el Lácteo ($28,84 \pm 1,54 \mu\text{m}^2$ vs. $29,04 \mu\text{m}^2 \pm 1,43 \mu\text{m}^2$) que con el Tris ($28,50 \pm 1,58 \mu\text{m}^2$ vs. $29,04 \pm 1,43 \mu\text{m}^2$) (Tabla 28).

Tabla 28. Respuesta del área de la cabeza a la congelación-descongelación con los diluyentes Tris y Lácteo (valores medios e individuales).

ÁREA (μm^2)	N	Macho A	Macho B	Media
Precongelado	7988	29,04 \pm 1,43 ^a	29,08 \pm 1,45 ^a	29,06\pm1,44^a
Tris	8020	28,50 \pm 1,58 ^c	28,69 \pm 1,59 ^b	28,60\pm1,59^c
Lácteo	7905	28,84 \pm 1,54 ^b	29,05 \pm 1,52 ^a	28,95\pm1,53^b

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,001$). n= número de espermatozoides analizados.

Resultados

Se comparó la respuesta a la congelación-descongelación, con los diluyentes Tris y Lácteo, del área de la cabeza entre los 58 eyaculados aptos para congelar y los 18 clasificados como no aptos (Tabla 29). En los eyaculados aptos para congelar, el área de la cabeza no se afectó por el proceso de congelación para el diluyente Lácteo y si con el Tris, con valores estadísticamente iguales e inferiores que los obtenidos a la precongelación respectivamente. En el caso de los eyaculados no aptos para congelar, tanto los valores de Tris como de Lácteo fueron significativamente inferiores al espermatozoides precongelado.

Tabla 29. Respuesta del área de la cabeza a la congelación-descongelación con los diluyentes Tris y Lácteo en los eyaculados clasificados como “aptos” y “no aptos” para congelar.

Aptos precongelación	n	Área (μm^2)	No Aptos precongelación	n	Área (μm^2)
Precongelado	6004	29,03 \pm 1,45 ^a	Precongelado	1984	29,14 \pm 1,39 ^a
Tris	6098	28,60 \pm 1,61 ^b	Tris	1922	28,59 \pm 1,51 ^b
Lácteo	6043	29,02 \pm 1,55 ^a	Lácteo	1862	28,72 \pm 1,47 ^c

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,001$). n= número de espermatozoides analizados.

Se valoró la respuesta a la congelación-descongelación, con los diluyentes Tris y Lácteo, de la área de la cabeza tanto para los 34 eyaculados que presentaron dosis para ambos diluyentes aptas al test de longevidad del movimiento, como para los 24 con dosis que no superaron el test (Tabla 30). En los eyaculados con dosis aptas, el área de la cabeza no se afectó por el proceso de congelación con el diluyente Lácteo y si con el Tris, con valores estadísticamente iguales e inferiores que los obtenidos a la precongelación respectivamente. En el caso de los eyaculados con dosis no aptas, tanto los valores de Tris como de Lácteo fueron significativamente inferiores al espermatozoides precongelado

Tabla 30. Respuesta del área de la cabeza a la congelación-descongelación en los eyaculados con dosis para los diluyentes Tris y Lácteo “aptas” y “no aptas” al test de longevidad del movimiento.

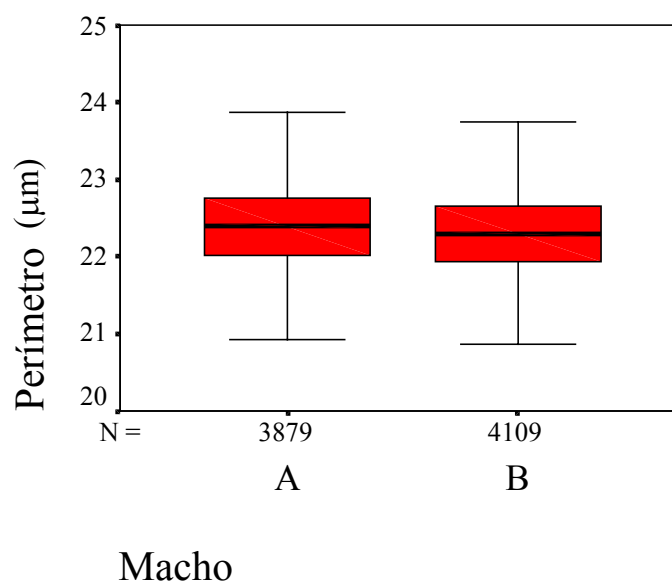
Aptos-descongelación	n	Área (μm^2)	No Aptos-descongelación	n	Área (μm^2)
Precongelado	3544	29,37 \pm 1,45 ^a	Precongelado	2460	29,23 \pm 1,34 ^a
Tris	3557	28,68 \pm 1,74 ^b	Tris	2541	28,64 \pm 1,62 ^b
Lácteo	3525	29,36 \pm 1,57 ^a	Lácteo	2518	28,96 \pm 1,56 ^c

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas. n= número de espermatozoides analizados.

3.1.d) *Perímetro de la cabeza*

El valor medio del perímetro de la cabeza a la precongelación fue de 22,34 \pm 0,57 μm con un rango que osciló entre un mínimo 19,29 μm de y un máximo de 24,55 μm , encontrándose diferencias significativas entre individuos ($p < 0,001$), con valores medios de 22,38 \pm 0,56 μm y de 22,30 \pm 0,57 μm para el macho A y B respectivamente (Gráfico 36).

Gráfico 36. Diagrama de cajas y bigotes en el que se representa el perímetro de la cabeza a la precongelación para ambos machos durante el período de estudio.



Resultados

El valor medio del perímetro de la cabeza a la descongelación fue de $22,22 \pm 0,67 \mu\text{m}$ (Tabla 31), valor significativamente inferior ($p < 0,001$) al registrado antes de congelar ($22,34 \pm 0,57 \mu\text{m}$), ocasionando el proceso de congelación una pérdida de $0,12 \mu\text{m}$.

De la misma manera, en ambos machos los valores medios para el perímetro de la cabeza de los espermatozoides analizados estuvieron afectados por el proceso de congelación-descongelación (Tabla 31), con valores significativamente inferiores ($p < 0,001$) a los obtenidos antes de congelar ($22,24 \pm 0,67 \mu\text{m}$ vs. $22,38 \pm 0,56 \mu\text{m}$ para el macho A; $22,20 \pm 0,67 \mu\text{m}$ vs. $22,29 \pm 0,57 \mu\text{m}$ para el macho B).

Tabla 31. Respuesta del perímetro de la cabeza a la congelación-descongelación (valores medios e individuales).

PERÍMETRO (μm)	n	Macho A	Macho B	Media
Precongelado	7988	$22,38 \pm 0,56^a$	$22,29 \pm 0,57^a$	$22,34 \pm 0,57^a$
Congelado-Descongelado	15925	$22,24 \pm 0,67^b$	$22,20 \pm 0,67^b$	$22,22 \pm 0,67^b$

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,001$). n= número de espermatozoides analizados.

Asimismo el diluyente de congelación influyó significativamente en el efecto de la congelación-descongelación sobre el perímetro de la cabeza de los espermatozoides ($p < 0,001$), produciéndose una reducción menor frente al esperma fresco en el Lácteo ($22,31 \pm 0,65 \mu\text{m}$ vs. $22,34 \pm 0,57 \mu\text{m}$) que en el Tris ($22,13 \pm 0,58 \mu\text{m}$ vs. $22,34 \pm 0,57 \mu\text{m}$), con una pérdida de tamaño de $0,03$ y $0,21 \mu\text{m}$ respectivamente (Tabla 32).

De forma individual (Tabla 32), al igual que el parámetro anterior, para el macho B el perímetro de la cabeza de los espermatozoides congelados con el diluyente Lácteo no estuvo afectado por el proceso de congelación-descongelación, no observando diferencias significativas con este diluyente entre el esperma descongelado ($22,29 \pm 0,65 \mu\text{m}$) y el precongelado ($22,30 \pm 0,57 \mu\text{m}$). Sin embargo, el perímetro de la cabeza de los espermatozoides del macho B congelados con Tris ($22,10 \pm 0,68 \mu\text{m}$) si fue significativamente inferior al obtenido en el esperma fresco. Por el contrario, en el

macho A, tanto el perímetro de la cabeza de los espermatozoides congelados-descongelados con Lácteo ($22,33 \pm 0,65 \mu\text{m}$) como el del diluyente Tris ($22,16 \pm 0,68 \mu\text{m}$) fueron significativamente inferiores al obtenido en el espermatozoides fresco ($22,38 \pm 0,56 \mu\text{m}$), aunque la reducción del perímetro de la cabeza fue menor con el Lácteo que con el Tris.

Tabla 32. Respuesta del perímetro de la cabeza a la congelación-descongelación con los diluyentes Tris y Lácteo (valores medios e individuales).

PERIMETRO (μm)	n	Macho A	Macho B	Media
Precongelado	7988	$22,38 \pm 0,56^a$	$22,30 \pm 0,57^a$	$22,34 \pm 0,57^a$
Tris	8020	$22,16 \pm 0,68^c$	$22,10 \pm 0,68^b$	$22,13 \pm 0,68^c$
Lácteo	7905	$22,33 \pm 0,65^b$	$22,29 \pm 0,65^a$	$22,31 \pm 0,65^b$

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,001$). n= número de espermatozoides analizados.

Se comparó la respuesta a la congelación-descongelación, con los diluyentes Tris y Lácteo, del perímetro de la cabeza entre los 58 eyaculados aptos para congelar y los 18 clasificados como no aptos (Tabla 33). En los eyaculados aptos para congelar, el perímetro de la cabeza no se afectó por el proceso de congelación para el diluyente Lácteo y si con el Tris, con valores estadísticamente iguales e inferiores que los obtenidos a la precongelación respectivamente. En el caso de los eyaculados no aptos para congelar, tanto los valores de Tris como de Lácteo fueron significativamente inferiores al espermatozoides precongelado.

Tabla 33. Respuesta del perímetro de la cabeza a la congelación-descongelación con los diluyentes Tris y Lácteo en los eyaculados clasificados como “aptos” y “no aptos” para congelar.

Aptos precongelación	n	Perímetro (μm)	No Aptos precongelación	n	Perímetro (μm)
Precongelado	6004	$22,34 \pm 0,57^a$	Precongelado	1984	$22,35 \pm 0,56^a$
Tris	6098	$22,12 \pm 0,69^b$	Tris	1922	$22,17 \pm 0,65^b$
Lácteo	6043	$22,32 \pm 0,66^a$	Lácteo	1862	$22,26 \pm 0,61^c$

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,001$). n= número de espermatozoides analizados.

Resultados

Se valoró la respuesta a la congelación-descongelación, con los diluyentes Tris y Lácteo, del perímetro de la cabeza tanto para los 34 eyaculados que presentaron dosis para ambos diluyentes aptas tras el test de longevidad del movimiento, como para los 24 con dosis que no superaron el test (Tabla 34). En los eyaculados con dosis aptas, el perímetro de la cabeza no se afectó por el proceso de congelación con el diluyente Lácteo y sí con el Tris, con valores estadísticamente iguales e inferiores que los obtenidos a la pre congelación respectivamente. En el caso de los eyaculados con dosis no aptas, tanto los valores de Tris como de Lácteo fueron significativamente inferiores al espermatozoide pre congelado

Tabla 34. Respuesta del perímetro de la cabeza a la congelación-descongelación en los eyaculados con dosis para los diluyentes Tris y Lácteo “aptas” y “no aptas” al test de longevidad del movimiento.

Aptos- descongelación	n	Perímetro (μm)	No Aptos- descongelación	n	Perímetro (μm)
Precongelado	3544	22,46 \pm 0,52 ^a	Precongelado	2460	22,40 \pm 0,56 ^a
Tris	3557	22,17 \pm 0,73 ^b	Tris	2541	22,14 \pm 0,70 ^b
Lácteo	3525	22,42 \pm 0,68 ^a	Lácteo	2518	22,33 \pm 0,66 ^c

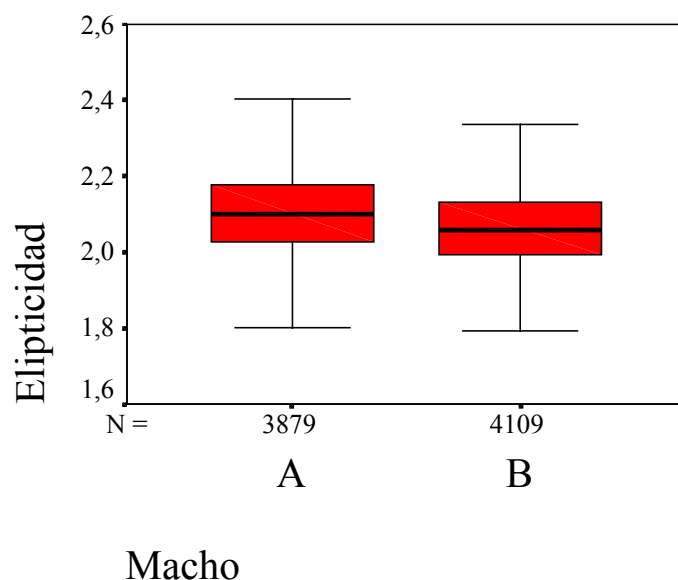
Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas. n= número de espermatozoides analizados.

3.2. Parámetros morfométricos para la forma de la cabeza

3.2.a) Elipticidad

El valor medio de la elipticidad (Longitud / Anchura) a la pre congelación durante el período de estudio fue de $2,09 \pm 0,11$. Se encontraron diferencias individuales para este parámetro ($p < 0,001$), con valores de $2,11 \pm 0,11$ para el macho A y $2,07 \pm 0,11$ para el macho B (Gráfico 37).

Gráfico 37. Diagrama de cajas y bigotes en el que se representa la elipticidad de la cabeza a la precongelación para ambos machos durante el período de estudio.



A la descongelación la elipticidad media de la cabeza fue de $2,10 \pm 0,11$ (Tabla 35), valor significativamente superior ($p < 0,001$) al registrado antes de congelar ($2,09 \pm 0,11 \mu\text{m}$).

En cada individuo (Tabla 35), se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) en el valor de la elipticidad de la cabeza de los espermatozoides descongelados frente a los precongelados ($2,12 \pm 0,11$ vs. $2,11 \pm 0,11$ para el macho A; $2,08 \pm 0,10$ vs. $2,07 \pm 0,11$ para el macho B).

Tabla 35. Respuesta de la elipticidad de la cabeza a la congelación-descongelación (valores medios e individuales).

ELIPTICIDAD	n	Macho A	Macho B	Media
Precongelado	7988	$2,11 \pm 0,11^a$	$2,07 \pm 0,11^a$	$2,09 \pm 0,11^b$
Congelado-Descongelado	15925	$2,12 \pm 0,11^b$	$2,08 \pm 0,10^b$	$2,10 \pm 0,11^a$

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,001$). n= número de espermatozoides analizados.

El diluyente empleado influyó significativamente ($p < 0,001$) sobre la respuesta de la elipticidad de la cabeza a la congelación-descongelación (Tabla 36). Los valores

Resultados

obtenidos con Tris ($2,093 \pm 0,103$) y Lácteo ($2,105 \pm 0,108$) fueron significativamente superiores a los del esperma precongelado ($2,087 \pm 0,110$).

De forma individual (Tabla 36), en cada macho se registraron valores significativamente superiores para Tris ($2,12 \pm 0,10$ macho A; $2,07 \pm 0,10$ macho B) y Lácteo ($2,12 \pm 0,11$ macho A; $2,09 \pm 0,10$ macho B) frente a los valores del esperma precongelado ($2,11 \pm 0,11$ macho A; $2,07 \pm 0,11$ macho B)

Tabla 36. Respuesta de la elipticidad de la cabeza a la congelación-descongelación con los diluyentes Tris y Lácteo (valores medios e individuales).

ELIPTICIDAD	n	Macho A	Macho B	Media
Precongelado	7988	$2,11 \pm 0,11^c$	$2,07 \pm 0,11^b$	$2,087 \pm 0,110^c$
Tris	8020	$2,12 \pm 0,10^b$	$2,07 \pm 0,10^b$	$2,093 \pm 0,103^b$
Lácteo	7905	$2,12 \pm 0,11^a$	$2,09 \pm 0,10^a$	$2,105 \pm 0,108^a$

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,001$). n= número de espermatozoides analizados.

Se comparó la respuesta a la congelación-descongelación, con los diluyentes Tris y Lácteo, de la elipticidad de la cabeza entre los 58 eyaculados aptos para congelar y los 18 clasificados como no aptos (Tabla 37). La elipticidad de la cabeza se afectó por el proceso de congelación-descongelación tanto en los eyaculados “aptos” como “no aptos”, con valores significativamente superiores para los diluyentes Tris y Lácteo frente al precongelado

Tabla 37. Respuesta de la elipticidad de la cabeza a la congelación-descongelación con los diluyentes Tris y Lácteo en los eyaculados clasificados como “aptos” y “no aptos” para congelar.

Aptos precongelación	n	Elipticidad	No Aptos precongelación	n	Elipticidad
Precongelado	6004	$2,09 \pm 0,11^a$	Precongelado	1984	$2,07 \pm 0,10^a$
Tris	6098	$2,09 \pm 0,10^b$	Tris	1922	$2,11 \pm 0,10^b$
Lácteo	6043	$2,10 \pm 0,11^c$	Lácteo	1862	$2,12 \pm 0,11^c$

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,001$). n= número de espermatozoides analizados.

Se valoró la respuesta a la congelación-descongelación, con los diluyentes Tris y Lácteo, de la elipticidad de la cabeza tanto para los 34 eyaculados que presentaron dosis para ambos diluyentes aptas al test de longevidad del movimiento, como para los 24 con dosis que no superaron el test (Tabla 38). En los eyaculados con dosis aptas, la elipticidad de la cabeza no se afectó por el proceso de congelación ni con el diluyente Lácteo ni con el Tris, con valores estadísticamente iguales al esperma precongelado. En el caso de los eyaculados con dosis no aptas, tanto los valores de Tris como de Lácteo fueron significativamente superiores al esperma precongelado.

Tabla 38. Respuesta de la elipticidad de la cabeza a la congelación-descongelación en los eyaculados con dosis para los diluyentes Tris y Lácteo “aptas” y “no aptas” al test de longevidad del movimiento.

Aptos-descongelación	n	Elipticidad	No Aptos-descongelación	n	Elipticidad
Precongelado	3544	2,09±0,11 ^a	Precongelado	2460	2,08±0,11 ^a
Tris	3557	2,09±0,10 ^a	Tris	2541	2,09±0,10 ^b
Lácteo	3525	2,09±0,09 ^a	Lácteo	2518	2,10±0,11 ^c

Los valores están expresados en media ± desviación típica. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas. n= número de espermatozoides analizados.

3.3. Parámetros seminales

3.3.a) *Movimiento total y rápido progresivo*

Los valores medios a la precongelación durante la experiencia para el movimiento total (MT) y el movimiento rápido progresivo (MRP) fueron de 82,66 ± 9,23 y 56,93 ± 10,88 respectivamente. Se encontraron diferencias individuales tanto para el MT (P<0,001) como para el MRP (P<0,01); así para el macho A los valores medios para MT y MRP fueron de 77,04 ± 7,86 % y 52,66 ± 10,59 % respectivamente, y para el macho B de 87,84 ± 7,18 % y 60,97 ± 9,65 %.

Resultados

El valor medio del movimiento total a la descongelación fue de $54,53 \pm 15,19$ % (Tabla 39). Este parámetro se vio influido significativamente por el proceso de congelación-descongelación ($p < 0,001$), registrándose una pérdida de un 34,03 % en el porcentaje de espermatozoides móviles tras la descongelación.

Asimismo, en cada macho se observó una reducción significativa ($p < 0,001$) del valor de ese parámetro respecto al obtenido antes de congelar (Tabla 39), con pérdidas de 34,31 % y 33,44 % para los machos A y B respectivamente

Tabla 39. Porcentajes medios e individuales para el movimiento total del espermatozoides precongelado y congelado-descongelado.

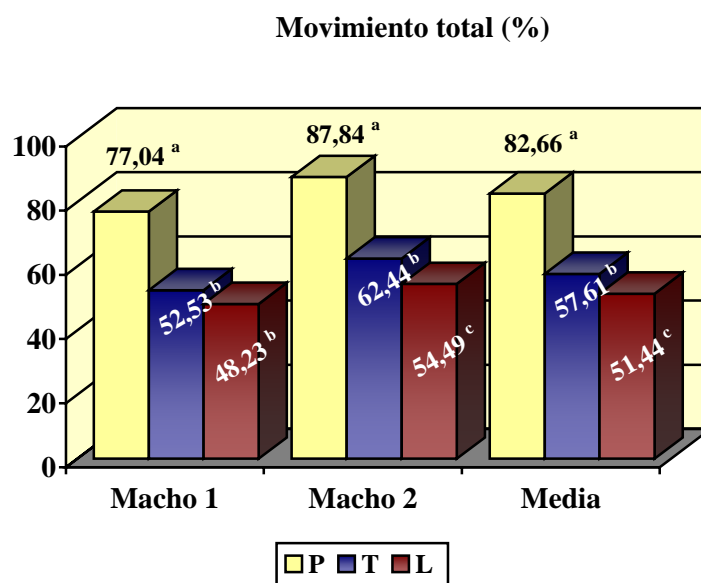
MT (%)	n	Macho A	Macho B	Media
Precongelado	76	$77,04 \pm 7,86^a$	$87,84 \pm 7,18^a$	$82,66 \pm 9,23^a$
Congelado-Descongelado	152	$50,38 \pm 12,75^b$	$58,46 \pm 16,32^b$	$54,53 \pm 15,19^b$

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas indican en la misma columna diferencias significativas ($p < 0,001$). n= número de eyaculados (precongelación) y dosis (descongelación).

Al valorar el posible efecto del diluyente sobre la respuesta a la congelación-descongelación del movimiento total espermático (Gráfico 38), se observaron diferencias significativas entre diluyentes, con valores superiores para Tris ($57,61 \pm 13,09$ %) que para el Lácteo ($51,44 \pm 16,55$ %), aunque ambos fueron significativamente inferiores al movimiento total espermático obtenido antes de congelar ($82,66 \pm 9,23$ %).

De forma individual, para el macho B el movimiento total espermático se comportó de la misma manera, reduciéndose en menor grado con el diluyente Tris ($62,44 \pm 12,31$ %) que con el Lácteo ($54,49 \pm 18,86$ %), con pérdidas de 28,92 y 37,97 % respectivamente. Si embargo, en el caso del macho A, no se observaron diferencias significativas en los valores del movimiento total a la descongelación entre los diluyentes Tris ($52,53 \pm 12,05$ %) y Lácteo ($48,23 \pm 13,22$ %), aunque con ambos diluyentes los valores fueron significativamente inferiores a los obtenidos antes de congelar (Gráfico 38), con pérdidas de 31,82 % y 37,40 % respectivamente.

Gráfico 38. Porcentajes medios e individuales para el movimiento total del esperma precongelado (P) y congelado-descongelado con los diluyentes Tris (T) y Lácteo (L).



Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,001$) para cada grupo de columnas.

El valor medio para el movimiento rápido progresivo a la descongelación fue de $32,96 \pm 12,56$ % (Tabla 40), valor significativamente inferior ($p < 0,001$) al obtenido antes de congelar ($56,93 \pm 10,88\%$), con una reducción de un 42,10 %.

De forma individual, en cada macho este parámetro se vio significativamente ($p < 0,001$) afectado por el proceso de congelación descongelación (Tabla 40), con pérdidas en su valor de 45,23 % y 39,53 % para los machos A y B respectivamente.

Tabla 40. Porcentajes medios e individuales para el movimiento rápido progresivo del esperma precongelado y congelado-descongelado.

MRP (%)	n	Macho A	Macho B	Media
Precongelado	76	$52,66 \pm 10,59^a$	$60,97 \pm 9,65^a$	$56,93 \pm 10,88^a$
Congelado-Descongelado	152	$28,84 \pm 10,51^b$	$36,87 \pm 13,15^b$	$32,96 \pm 12,56^b$

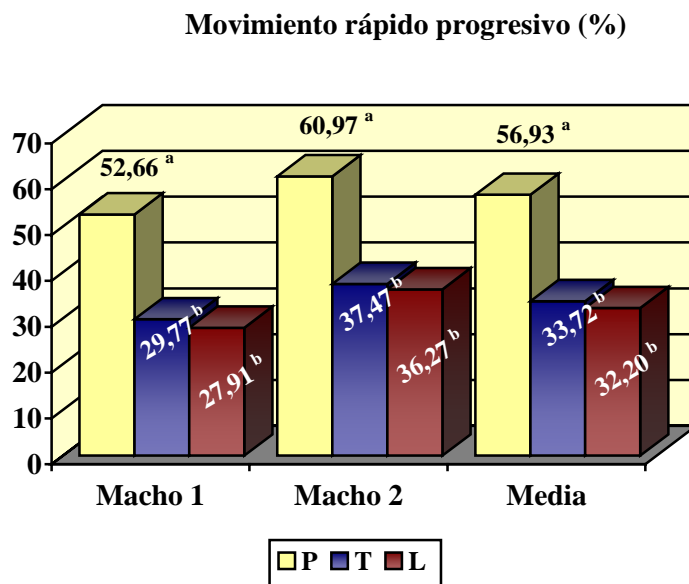
Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,001$). n= número de eyaculados (precongelación) y dosis (descongelación).

Resultados

No se observaron diferencias significativas en los valores del movimiento rápido progresivo a la descongelación entre los diluyentes Tris ($33,72 \pm 10,92$) y Lácteo ($32,20 \pm 14,04$), con pérdidas de 40,76 % y 43,43 % respectivamente, con referencia al valor inicial obtenido en el espermatozoides pre congelado (Gráfico 39).

En cada macho, este parámetro se comportó de la misma manera, con valores estadísticamente iguales para el movimiento rápido progresivo a la descongelación con los diluyentes Tris y Lácteo y a su vez significativamente inferiores a los obtenidos antes de congelar (Gráfico 39).

Gráfico 39. Porcentajes medios e individuales para el movimiento rápido progresivo del espermatozoides pre congelado (P) y congelado-descongelado con los diluyentes Tris (T) y Lácteo (L).



Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,001$) para cada grupo de columnas.

3.3.b) Morfología espermática

El valor medio para el porcentaje de espermatozoides normales a la pre congelación durante los doce meses de estudio fue de $75,92 \pm 18,94$ %

El porcentaje medio de formas normales a la descongelación fue de $73,55 \pm 20,37$ % (Tabla 41). No se observó una influencia del proceso de congelación-descongelación sobre el porcentaje de formas normales, con valores estadísticamente iguales para la morfología del espermatozoide fresco y congelado-descongelado ($p > 0,05$). Sin embargo, aunque no se encontraron diferencias estadísticas, el porcentaje de formas normales en el espermatozoide descongelado fue ligeramente inferior al obtenido antes de congelar.

De la misma manera, en cada macho se obtuvieron porcentajes estadísticamente iguales para la forma de los espermatozoides precongelados y congelados descongelados (Tabla 41), aunque para ambos machos los valores de este parámetro para los espermatozoides descongelados fue ligeramente inferior al obtenido antes de congelar.

Tabla 41. Porcentajes medios e individuales para morfología del espermatozoide precongelado y congelado-descongelado.

Formas Normales (%)	n	Macho A	Macho B	Media
Precongelado	76	60,03±15,66	90,14±5,47	75,92±18,94
Congelado-Descongelado	152	57,42±16,66	88,86±7,96	73,55±20,37

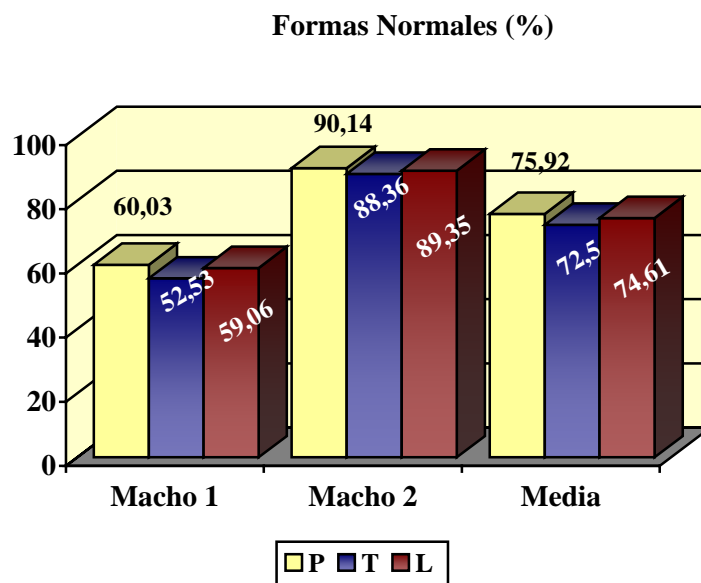
Los valores están expresados en media \pm desviación típica. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$). n= número de eyaculados (precongelación) y dosis (descongelación).

Al valorar la influencia del diluyente de congelación sobre la respuesta a la congelación-descongelación de la morfología espermática (Gráfico 40), no se encontraron diferencias significativas entre diluyentes ni entre estos y los valores obtenidos a la precongelación. Sin embargo, los porcentajes de formas normales a la descongelación obtenidos con el diluyente Lácteo ($74,61 \pm 20,23$ %) fueron ligeramente superiores a los del Tris ($72,50 \pm 20,59$ %), y en ambos casos inferiores a los del espermatozoide precongelado ($75,92 \pm 18,94$ %), aunque estas diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$).

Resultados

Al valorar de forma individual la influencia del diluyente de congelación sobre la respuesta a la congelación-descongelación de la morfología espermática (Gráfico 40), se observó en ambos machos el mismo patrón de distribución, con valores estadísticamente iguales para los porcentajes obtenidos en el esperma fresco y congelado-descongelado con los diluyentes Tris y Lácteo. De la misma manera, en cada macho los porcentajes de formas normales fueron ligeramente superiores para el diluyente Lácteo frente al Tris y ambos inferiores al esperma precongelado, aunque estas diferencias no fueron significativas.

Gráfico 40. Porcentajes medios e individuales para la morfología del esperma precongelado (P) y congelado-descongelado con los diluyentes Tris (T) y Lácteo (L).



No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$).

3.3.c) Integridad del acrosoma

El porcentaje medio de acrosomas íntegros a la precongelación registrado durante la experiencia fue de $90,40 \pm 4,68$ %, con un mínimo de 79,40 % y un máximo de 99,20 %.

A la descongelación, el porcentaje medio de acrosomas íntegros fue de $51,12 \pm 13,94$ % (Tabla 42), valor significativamente inferior ($p < 0,001$) al encontrado antes de congelar ($90,40 \pm 4,68$ %), lo que supuso una pérdida en este parámetro de un 43,46 % tras el proceso de congelación-descongelación.

Valorando la respuesta individual de este parámetro (Tabla 42), en cada macho el porcentaje de acrosomas íntegros fue significativamente inferior en el espermatozoides descongelado, con valores de $51,11 \pm 13,20$ y $51,12 \pm 14,74$ para los machos A y B, frente al obtenido antes de congelar ($89,43 \pm 4,36$ y $91,34 \pm 4,85$ respectivamente), lo que supuso una pérdida en el valor de este parámetro de un 42,85 % para el macho A y de un 44,04 % para el macho B.

Tabla 42. Porcentajes medios e individuales para la integridad del acrosoma del espermatozoides precongelado y congelado-descongelado.

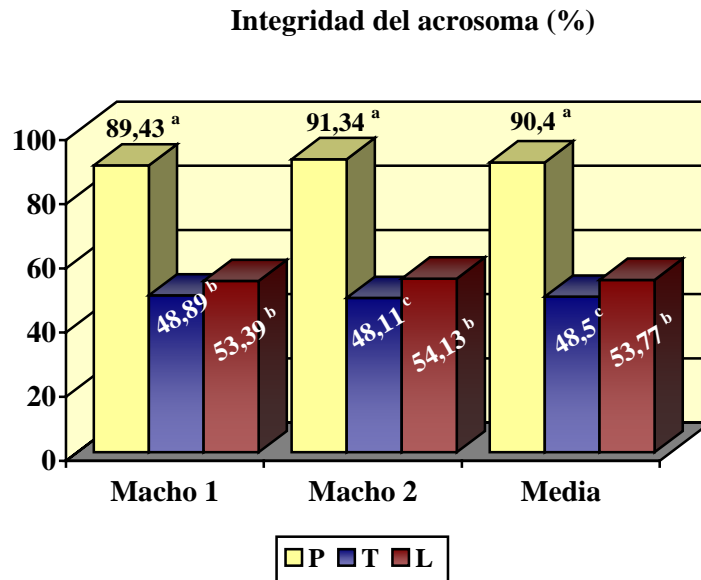
Integridad (%)	n	Macho A	Macho B	Media
Precongelado	76	$89,43 \pm 4,36^a$	$91,34 \pm 4,85^a$	$90,40 \pm 4,68^a$
Congelado-Descongelado	152	$51,11 \pm 13,20^b$	$51,12 \pm 14,74^b$	$51,12 \pm 13,94^b$

Los valores están expresados en media \pm desviación típica. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,001$). n= número de eyaculados (precongelación) y dosis (descongelación).

Se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los porcentajes de acrosomas íntegros obtenidos con cada diluyente de congelación (Gráfico 41), con valores superiores del Lácteo ($53,77 \pm 13,06$ %) frente al Tris ($48,50 \pm 14,38$ %) y en ambos casos significativamente inferiores al espermatozoides fresco ($90,40 \pm 4,68$ %).

Sin embargo, en el macho A los diluyentes Tris ($48,89 \pm 14,18$ %) y Lácteo ($53,39 \pm 11,86$ %) obtuvieron valores estadísticamente iguales e inferiores al fresco ($89,43 \pm 4,36$ %), a diferencia del macho B en el que el diluyente Lácteo obtuvo un porcentaje significativamente mayor de acrosomas íntegros con el Lácteo ($54,13 \pm 14,28$ %) que con el Tris ($48,11 \pm 14,76$ %), aunque de nuevo ambos fueron significativamente inferiores al obtenido en el espermatozoides fresco ($91,34 \pm 4,85$ %) (Gráfico 41).

Gráfico 41. Porcentajes medios e individuales para la integridad del acrosoma del esperma precongelado (P) y congelado-descongelado con los diluyentes Tris (T) y Lácteo (L).



Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,001$) para cada grupo de columnas.

3.4. Correlación entre los parámetros morfométricos y seminales a la descongelación

Se calcularon los coeficientes de correlación para todos los parámetros espermáticos evaluados a la descongelación (Tabla 43).

Todos los parámetros morfométricos mostraron una correlación significativa entre sí ($p < 0,01$), a excepción del perímetro de la cabeza con la elipticidad. Los índices de correlación oscilaron entre $r = 0,227$, $p < 0,01$ para la longitud respecto a la elipticidad y entre $r = 0,868$, $p < 0,01$ para la anchura respecto del área.

En cuanto a la correlación entre los parámetros morfométricos y seminales, la longitud de la cabeza se correlacionó significativamente con MT ($r = -0,226$, $p < 0,05$) e I ($r = 0,280$, $p < 0,01$); la anchura con N ($r = 0,172$, $p < 0,05$) e I ($r = 0,211$, $p < 0,05$); el área

con I ($r=0,232$, $p<0,01$); y el perímetro con MT ($r=-0,196$, $p<0,05$) e I ($r=0,258$, $p<0,01$).

Los parámetros seminales se correlacionaron entre sí en los casos de MT con MRP ($r=0,873$, $p<0,01$) y con N ($r=0,320$, $p<0,01$); MRP con N ($r=0,343$, $p<0,01$) además de con MT; y N con los ya referidos MT y MRP. La Integridad del acrosoma no se correlacionó significativamente con ninguno de los parámetros seminales evaluados.

Tabla 43. Índices de correlación entre los parámetros morfométricos y seminales a la descongelación.

	L	W	A	P	E	MT	MRP	N	I
L		,365**	,636**	,860**	,227**	-,226**	-,125	-,006	,280**
W	,365**		,868**	,598**	-,822**	-,053	-,002	,172*	,211*
A	,636**	,868**		,873**	-,518**	-,085	-,008	,117	,232**
P	,860**	,598**	,873**		-,099	-,196**	-,125	,018	,258**
E	,227**	-,822**	-,518**	-,099		-,086	-,077	-,186*	-,051
MT	-,226**	-,053	-,085	-,196*	-,086		,873**	,320**	,099
MRP	-,125	-,002	-,008	-,125	-,077	,873**		,343**	,011
N	-,006	,172*	,117	,018	-,186*	,320**	,343**		,089
I	,280**	,211*	,232**	,258**	-,051	,099	,011	,089	

Correlación significativa ($p<0,05$); ** Correlación significativa ($p<0,01$); L= Longitud; W= Anchura; A= Área; P= Perímetro; E= Elipticidad; MT= Movimiento total; MRP= Movimiento rápido progresivo; N= Morfología espermática; I= Integridad del acrosoma.

VI. DISCUSIÓN

1. SELECCIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS MORFOMÉTRICO Y OBTENCIÓN DE VALORES MORFOMÉTRICOS MEDIOS DEL ESPERMATOZOIDE

El SCA, sistema automático diseñado para el análisis de esperma, fue originalmente validado para su aplicación en el hombre (de Monserrat y col., 1995), consiguiendo coeficientes de variación intrínsecos bajos, lo que demuestra una gran precisión y exactitud, así como una alta repetibilidad al no encontrar diferencias cuando se analiza varias veces una misma muestra. Para aplicar la precisión y repetibilidad de esta tecnología en especies animales, es necesario elegir un método de preparación y tinción de las muestras adecuado a las características espermáticas de la especie que se esté estudiando, y que permita que el SCA reconozca y analice adecuadamente las células espermáticas (Boersma y col., 2001; Davis y Gravance, 1993).

Para ello, de cada eyaculado recogido para los 4 machos se realizaron tres extensiones que siguieron tres protocolos de tinción diferentes. La elección de los métodos de tinción se realizó acorde con el rendimiento ofrecido por los sistemas automáticos de análisis de la morfometría espermática (ASMA) en experiencias previas. En este sentido, si bien entre las tinciones utilizadas tradicionalmente en esta especie para el análisis de la morfología espermática se encuentran, entre otros, los métodos Trypan azul y Giemsa (Kusunoki y col., 1988), Papanicolau (Hafez, 1987) o Spermac (Oettle, 1986), estas no son válidas cuando empleamos sistemas ASMA, ya que los espermatozoides no alcanzan el grado de tinción adecuado que permita su correcta digitalización (Gravance y col., 1995). Así, los métodos de tinción empleados en este trabajo, Diff-Quik (DQ), Hemacolor (HC) y Hematoxilina de Harris (HH), fueron elegidos en base a las siguientes consideraciones: el primero de ellos fue seleccionado porque ha sido recomendado para el análisis morfológico del esperma humano (Menkveld y col., 1990) y empleado con éxito para el análisis morfométrico (Lacquet y col., 1996); HC fue utilizado originalmente para validar el SCA en el hombre (de Monserrat y col., 1995; Soler y col., 2003) y ha obtenido buenos resultados en algunas

especies animales (Buendía y col., 2002; Estes y col., 2003). HH ha sido empleado por los sistemas ASMA en varias especies domésticas obteniendo buenos resultados (Casey y col., 1997; Gago y col., 1998; Gravance y col., 1995). Así, en el caso concreto del caballo, Rodríguez y col. (2004) compararon estas tres técnicas de tinción con el SCA eligiendo para realizar el análisis morfométrico la HH.

Según los resultados obtenidos, en esta especie los tres métodos de tinción han permitido la captura y posterior análisis de las imágenes digitalizadas de la cabeza de los espermatozoides, sin embargo, se han mostrado diferentes en cuanto al porcentaje de eficacia en la captura y análisis morfométrico de las mismas, en base a las diferencias observadas en el porcentaje de espermatozoides correctamente capturados y analizados con las tres tinciones empleadas, así como, los coeficientes de variación obtenidos con cada método de tinción, criterios utilizados por Sancho y col. (1998), en morueco, para valorar la eficacia del método de tinción.

El SCA analiza las imágenes digitalizadas, elaborando una máscara que se adapta a los límites externos de la imagen microscópica del espermatozoide, diferenciando la cabeza de la pieza intermedia. Para ello es necesario que los espermatozoides tengan un buen contraste con el fondo de la preparación y que no existan partículas que interfieran en la delineación de las células (Hidalgo y col., 2002). Los resultados obtenidos en esta experiencia indican que la eficacia del SCA, en base al porcentaje de espermatozoides correctamente capturados y analizados, ha sido ligeramente superior para las preparaciones teñidas con DQ frente a aquellas en las que se empleó HH, y a su vez, en ambos casos los porcentajes fueron significativamente superiores a los obtenidos con HC. Si bien en el caso de los pequeños rumiantes no existen referencias previas que valoren DQ, los resultados obtenidos para la eficacia del método con Hematoxilina de Harris son inferiores a los observados por Gravance y col. (1995) empleando el sistema ASMA CellForm-HumanTM en macho cabrío, sin embargo sus porcentajes son similares a los resultados definidos en esta experiencia con DQ. Estas diferencias entre métodos de tinción quizás sean debidas al uso de diferentes sistemas ASMA, lo que hace más indicado el empleo de una técnica u otra en cada caso.

Así, en el caso de Hemacolor, pese a no ser el método que obtiene mejores porcentajes en esta experiencia, los resultados son similares a los obtenidos por Sancho y col., (1998) con el SCA en morueco.

Además, estos tres métodos de tinción han sido comparados con el SCA en otras especies, concretamente para los espermatozoides del hombre (Soler y col., 2003) y del mono (Gago y col., 1998), obteniendo los mejores resultados con HC y HH respectivamente, aunque con unos porcentajes de eficacia similares a los obtenidos en esta experiencia con DQ. Estas diferencias pueden ser debidas a que, a pesar de emplear el mismo sistema ASMA, los espermatozoides de cada de especie se comportan de manera diferente ante cada método de tinción y esto hace que el grado de tinción y patrón de distribución del colorante en la célula sea diferente, permitiendo una mejor digitalización por el SCA en cada caso.

Las diferencias entre los porcentajes de espermatozoides correctamente analizados con cada método de tinción empleado en esta experiencia podrían deberse a que la cabeza de los espermatozoides teñidos con DQ y HC adquiere una coloración de mayor intensidad, consiguiendo así un buen contraste con el fondo de la preparación. Sin embargo, en el caso de HC el número de partículas extrañas que se tiñen como consecuencia de la acción del colorante es mayor, lo que provoca interferencias con los límites de las células y hace necesario eliminar un mayor número de espermatozoides. Así, con HC se disminuyen los porcentajes de espermatozoides correctamente analizados lo que se enlentece el análisis morfométrico. En el caso de la HH, si bien los niveles de gris que proporciona el colorante son adecuados para una correcta digitalización y además se disminuye la tinción de partículas extrañas, las máscaras aunque delimitan correctamente la imagen microscópica original, no se adaptan de forma tan exacta a los límites externos de la cabeza de los espermatozoides como sucede con DQ.

Al calcular el coeficiente de variación como segundo criterio para evaluar la eficacia del método de tinción en la captura de imágenes, se observa que son menores

Discusión

cuando se emplea DQ frente a HH y HC, lo que indica una menor variabilidad y, por tanto, una mayor homogeneidad en los resultados obtenidos con dicha técnica de tinción, de manera que obtendremos porcentajes de espermatozoides correctamente analizados con esta tinción que serán más similares entre diferentes eyaculados e individuos, que con HH y HC (por este orden). Además, los CV calculados para cada parámetro morfométrico evaluado son menores con DQ, lo cual indica una menor variabilidad en los resultados del análisis cuando se emplea esta tinción. Por tanto, los resultados para la eficacia en el análisis morfométrico indican que con DQ el porcentaje de espermatozoides correctamente analizado es mayor y más constante, las máscaras se adaptan mejor a los límites externos de la cabeza de los espermatozoides y en consecuencia los valores para los parámetros morfométricos calculados se muestran más homogéneos y consistentes.

Los resultados de la valoración de la influencia del número de espermatozoides analizados por preparación, indican que es suficiente analizar 50 células para caracterizar morfométricamente una muestra de esperma de un macho cabrío. Sin embargo, aunque no existen diferencias significativas entre los parámetros morfométricos del grupo de 50 y 200 células, cuando se analiza un mayor número de espermatozoides la variabilidad de los resultados (CV) tiende a disminuir, estabilizándose a partir del grupo de 100 células. Por todo esto, y con el fin de reducir el posible error matemático, recomendamos realizar el análisis de un mínimo de 100 espermatozoides por preparación para caracterizar morfométricamente a la población celular. Estos resultados coinciden con los referidos por varios autores que consideran que el macho cabrío pertenece al grupo de especies animales que presentan una distribución de los espermatozoides homogénea dentro de cada individuo y heterogénea entre individuos, con coeficientes de variación intraindividuales bajos e interindividuales altos (Gago y col., 1998 en mono; Sancho y col., 1998 en morueco; Tablado y col., 1998 en ratón). Sin embargo, en otras especies animales sucede lo contrario (Buendía y col., 2002 en alpaca; Dahlbom y col., 1997 en perro; Gravance y col., 1996 en toro), y la variabilidad intraindividual requiere el estudio de 200 células por preparación.

Los resultados indicaron que los valores para la morfometría espermática estuvieron influenciados por el método de tinción empleado. DQ y HC dan una mayor intensidad de gris a las células, lo que provoca que su tamaño sea mayor, influyendo sobre la longitud, anchura, área y perímetro de la cabeza. De forma general, la relación de los tres métodos de tinción respecto al tamaño sería: DQ>HC>HH. Opinamos, al igual que Boersma y col. (1999), que el hecho de que los valores morfométricos estén afectados por la técnica de tinción hace necesario definir con cada método de tinción los valores morfométricos medios para una correcta interpretación de los resultados.

Todos los eyaculados empleados para estandarizar el método de análisis morfométrico presentaron valores de volumen, concentración, movimiento, morfología e integridad del acrosoma, incluidos dentro de los rangos considerados normales para esta especie (Roca y col., 1992a y b; Cabrera y col., 1998a y b; Hidalgo y col., 2002 y 2003b; Dorado y col., 2003a), que según nuestra experiencia son compatibles con una fertilidad normal (Dorado, 2003). En este sentido, la población celular analizada se correspondería con la de machos cabríos con una calidad seminal adecuada de acuerdo con los criterios establecidos para la valoración del espermatozoides en condiciones de laboratorio.

En cuanto al estudio morfométrico, los valores medios obtenidos fueron superiores a los observados por Gravance y col. (1995) en esta especie, si bien estas diferencias posiblemente sean debidas al empleo de diferentes métodos de tinción (Hidalgo y col., 2003b) o a la influencia del factor raza (Gravance y col., 1995).

Por otro lado, hemos observado variabilidad individual en el análisis morfométrico (Hidalgo y col., 2002), ya que en todos los parámetros morfométricos evaluados se encontraron diferencias entre animales. El hecho de que estas diferencias entre machos de una adecuada calidad seminal sean pequeñas aunque significativas, sumado a los bajos coeficientes de variación obtenidos en el análisis, sugiere que el SCA tenga una capacidad potencial como método objetivo y preciso para añadir un criterio métrico que permita, junto a los parámetros seminales descritos, reconsiderar la

normalidad “in vitro” de una muestra de espermatozoides. En este sentido sería interesante valorar la posible relación que tengan esos individuos morfológicamente diferentes, aunque catalogados como aptos en la valoración seminal, con los porcentajes de fertilidad obtenidos.

2. INFLUENCIA DE LA ESTACIÓN Y FACTORES CLIMÁTICOS SOBRE LOS PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS DEL ESPERMATOZOIDE

En este estudio, la mayoría de los parámetros seminales valorados fueron similares a los registrados para las razas caprinas Boer (Corteel 1981), Murciano-Granadina (Roca y col., 1991a y 1992a y b; Vázquez y col., 1998), Agrupación Caprina Canaria (Cabrera y col., 1998a), Malagueña y Verata (Pérez y col., 1991; Pérez y Mateos, 1996); Alpina; Saanen y Damasco (Karagiannidis y col., 2000), realizados en localizaciones geográficas y condiciones climáticas similares a las acaecidas en nuestra experiencia, y están en la línea con los observados por nuestro grupo de investigación en esta raza (Dorado y col., 2003a; Hidalgo y col., 2003b).

Es conocido que el volumen eyaculado varía, entre otros factores, en función del individuo, edad y raza (Corteel, 1975; Vázquez y col., 1998). Nuestros resultados indican diferencias significativas entre individuos para este parámetro (Cabrera y col., 1998b; Roca y col., 1992b; Pérez y Mateos, 1996), coincidiendo con Vijil y col., 1986 en moruecos Caracul, los volúmenes registrados mostraron una distribución homogénea a lo largo de toda la experiencia no observando sobre ellos la influencia de la estación del año, a diferencia de lo descrito para otras razas caprinas como son, entre otras, Saanen (Delgadillo y col., 1991), Verata (Pérez y col., 1991), Murciano-Granadina (Roca y col., 1992b) Malagueña (Pérez y Mateos, 1996) o Agrupación Caprina Canaria (Cabrera y col., 1998a). Por esto consideramos que quizás el volumen eyaculado ha estado influido más por el grado de madurez de los machos utilizados y por el ritmo de recogida de espermatozoides, que por el propio efecto de la estación (Corteel, 1975; Summermatter y Fuschini, 1995).

Los factores climáticos fotoperiodo y temperatura ambiental no influyeron significativamente sobre el volumen eyaculado. Estos resultados son contrarios a los obtenidos en otras razas caprinas por Pérez y col. (1991), Pérez y Mateos (1996), y Karagiannidis y col. (2000). Si bien se registró un ligero ascenso en el volumen durante el fotoperiodo ascendente, así como, un ligero descenso en los meses más calurosos, creemos que debido a la variación fotoperiodica poco intensa característica de la zona en la que se desarrolla este estudio condiciona una influencia poco marcada de horas luz al día en estas áreas geográficas (Folch, 1984; Pelletier y col., 1988).

La concentración espermática no registró variaciones individuales, en cambio si mostró una marcada estacionalidad con valores máximos en invierno y primavera y mínimos en verano y otoño. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otras razas caprinas por Cabrera y col. (1998a y b) y Karagiannidis y col. (2000). Sin embargo difieren de los aportados por Ahmad y Noakes (1996) en British al sur de Inglaterra, Ahmed y col. (1997) con Saanen en Sudan y Delgadillo y col. (1999) en machos criollos en México, si bien estas diferencias pueden ser debidas a la influencia de factores raciales, ambientales y geográficos (Roca y col., 1991a; Pérez y Mateos, 1996; Karagiannidis y col., 2000).

La concentración espermática estuvo influenciada significativamente tanto por la estación como por el fotoperiodo. En este punto la estacionalidad de la concentración espermática frente a estos factores podría explicarse en base a la relación existente ente esta y la circunferencia escrotal, asociación que ya ha sido documentada ampliamente en los pequeños rumiantes (Vijil y col., 1986; Lincoln, 1989; Ritar y col., 1992; Pérez y Mateos, 1993; Walkden-Brown y col., 1994; Delgadillo y col., 1995). Así, según lo trabajos previos realizados por Dorado y col. (2002a y b), en machos cabríos de raza Florida en el sur de la península ibérica, se demuestra un patrón estacional moderado en la evolución de la circunferencia escrotal que iría en consonancia con la evolución de la concentración espermática observada en esta experiencia. Así, los valores máximos para la concentración se registraron en invierno y primavera, período en el que la circunferencia esta creciendo hasta su pico justo antes del solsticio de verano. A partir

Discusión

de aquí comienza a descender la circunferencia y observamos los valores inferiores para la concentración en verano y otoño. La circunferencia volvería a crecer justo antes del solsticio de invierno iniciándose un nuevo ciclo.

La temperatura ambiental no influyó sobre la concentración espermática, a pesar de que esta sufrió un ligero descenso, aunque no significativo, en los períodos más calurosos. En este sentido, la correlación entre ambos parámetros fue escasa.

En cuanto a los parámetros cinéticos (MT y MRP), se apreciaron diferencias individuales al igual que ha sido descrito anteriormente para otras razas caprinas (Roca y col., 1992b; Pérez y Mateos, 1996; Karagiannidis y col., 2000). Coincidimos con Cabrera col., (1998a y b) en la Agrupación Caprina Canaria y Vijil y col. (1986) en ovino Caracul, en la escasa estacionalidad mostrada por el MT. Sin embargo, en el caso del MRP se observó una tendencia a la estacionalidad, con valores superiores en otoño e inferiores en primavera. Si bien estos resultados no fueron estadísticamente significativos, si están en la línea de los trabajos de Karagiannidis y col. (2000) en las razas caprinas Alpina, Saanen y Damasco, donde se registraron porcentajes elevados de MRP en otoño.

El movimiento espermático no estuvo influenciado por el fotoperiodo y la temperatura ambiental, con valores constantes a lo largo de toda la experiencia. Estos resultados son similares a los registrados por Cabrera y col. (1998a), sin embargo, difieren de los de Pérez y col. (1991) y Karagiannidis y col. (2000), en los que se produjo un incremento del movimiento espermático durante el fotoperiodo descendente. En este punto, la variabilidad de respuesta de cada raza a la influencia del fotoperiodo unida al efecto de otros factores como la localización geográfica (Pérez y Mateos, 1996) podría explicar la diferencia en los resultados obtenidos para el MRP.

El valor medio en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales registrado en nuestra experiencia ha sido inferior a los observados por otros investigadores (Chemineau y col., 1991; Roca y col., 1992a; Chauhan y col., 1994;

Cabrera y col., 1998a; Vázquez y col., 1998; Karagiannidis y col., 2000). Según Evan y Maxwell (1987), el esperma de pequeños rumiantes no debe de presentar más de un 15-20% de espermatozoides morfológicamente anormales, para ser considerado normal y con buena capacidad fecundante. Aunque los valores medios han sido inferiores, creemos que esto pudo ser debido a la variabilidad individual propia que se reflejó en uno de los machos, que presentó un gran porcentaje de morfoanomalías durante todo el estudio, y con valores de normalidad obtenidos para el otro macho (85-95%) dentro de los márgenes establecidos por la mayoría de los investigadores (Pérez y col., 1991; Roca y col., 1992b; Cabrera y col., 1998a; Karagiannidis y col., 2000).

La morfología espermática, aunque no de forma significativa, presentó una tendencia a la estacionalidad, con valores inferiores en primavera y verano, intermedios en invierno y superiores en otoño, lo cual está en la línea de los trabajos realizados en diferentes razas caprinas por Ahmed y col. (1997) y Karagiannidis y col. (2000). Algunos investigadores, por el contrario, han observado la presencia de un mayor porcentaje de morfoanomalías entre los meses de enero y abril, quizá debido a la influencia de la edad, raza, localización geográfica o condiciones ambientales.

En esta experiencia, el fotoperiodo no influyó sobre el porcentaje de formas normales. Si bien la estacionalidad del esperma de pequeños rumiantes esta asociada, entre otros, a la duración de los días (Corteel, 1981), esta influencia del fotoperiodo es más o menos intensa en función de la localización geográfica; así en latitudes comprendidas entre los 30°-40°, como sucede en esta experiencia, las variaciones debidas al número de horas luz no son demasiado marcadas (Skalet y col., 1988; Roca y col., 1992b; Karagiannidis y col., 2000). Aunque la influencia del fotoperiodo no fue estadísticamente significativa, durante el ascendente se registró un menor porcentaje de formas normales, lo cual coincide con trabajos realizados en morueco (Colas 1980) y macho cabrío (Pérez y Mateos 1996), en los que si se encontró una influencia del fotoperiodo sobre la morfología espermática. Por otro lado, aunque la temperatura ambiental no influyó significativamente sobre este parámetro, si se registró un descenso en el porcentaje de formas normales como consecuencia del aumento de la

temperaturas, que fue más acusado durante los meses más cálidos, quizás como consecuencia al stress ocasionado por el calor (Chemineau y col., 1991).

Los porcentajes medios registrados durante el estudio para el porcentaje de acrosomas íntegros fueron similares a los obtenidos por Chauhan y col. (1994) y superiores a los de Ahmed y col. (1997), no apreciando variaciones individuales. Este parámetro presentó un patrón estacional con valores mínimos en verano que comenzaron a aumentar a partir de otoño (Skalet y col., 1988; Roca y col., 1991a; Ahmed y col., 1997). Este descenso estival podría deberse a una variación en la composición del plasma seminal, con un incremento en la proporción de la enzima fosfolipasa A de las glándulas bulbouretrales, como se ha observado en otras razas caprinas en períodos no estacionales (Ritar y Salamon, 1982 y 1991).

El fotoperiodo influyó significativamente sobre la evolución de la integridad del acrosoma, con un mayor porcentaje de acrosomas intactos durante el fotoperiodo ascendente (Pérez y Mateos, 1996). Si bien la temperatura ambiental no tuvo un efecto significativo sobre este parámetro, al igual que observaron Pérez y Mateos (1996) se registró un descenso de este parámetro cuando las temperaturas fueron elevadas.

El análisis morfométrico permite poner de manifiesto diferencias sutiles entre individuos, tanto de esta como de otras especies, que quizás con otro tipo de análisis subjetivo pasarían inadvertidas (Hidalgo y col., 2003a y b). Así, a pesar del reducido número de animales que participaron en esta fase del estudio, para todos los parámetros morfométricos evaluados, a excepción del área de la cabeza, se han registrado variaciones individuales.

Los parámetros morfométricos valorados durante los 12 meses de duración de la experiencia han presentado un claro patrón estacional, diferenciándose el otoño como la estación en la que los valores morfométricos son máximos para el tamaño de la cabeza y mínimos para la elipticidad, es decir las cabezas se hacen más grandes y más cortas. Aunque todos los parámetros morfométricos se correlacionaron significativamente entre

sí, los índices fueron mayores entre longitud y perímetro por un lado y anchura y área por otro. En el caso de los dos primeros, los valores mínimos se obtuvieron en verano, actuando primavera e invierno como períodos intermedios. En el caso del área y la anchura, que a su vez se correlacionaron significativamente con el factor estación, los valores inferiores se obtuvieron en invierno, seguidos de verano y primavera. Estos resultados parecen indicar como existe una tendencia a encontrar menores dimensiones para las cabezas espermáticas durante el verano, aunque no en todos los parámetros, ya que en dos de ellos esta estación fue la segunda inferior para el tamaño de la cabeza. Parece, por tanto que el efecto del factor estación se refleja claramente y de forma conjunta durante el otoño, en el que los valores son homogéneos para todos los parámetros. En este punto, para explicar este patrón de distribución, no hemos encontrado en la bibliografía revisada aportaciones sobre la estacionalidad en la morfometría espermática, así que, si tenemos en cuenta los parámetros seminales evaluados, la morfología espermática y el MRP que se correlacionaron significativamente entre sí, mostraron una tendencia a la estacionalidad en su distribución, alcanzando los mayores porcentajes durante el otoño. Aunque en el esperma fresco la correlación es escasa entre los parámetros morfométricos evaluados y los parámetros seminales MRP y N, si sucede que durante el otoño, cuando encontramos valores óptimos para MRP y N, el tamaño y forma de la cabeza se muestra diferente, con cabezas más grandes y más cortas. Este hecho quizás pueda indicar una variabilidad estacional en la morfometría espermática con cambios de tamaño y forma relacionados con períodos en los que se incrementan algunos parámetros que identifican la calidad seminal. En este sentido creemos que sería interesante contrastar los cambios observados durante esta estación con los índices de fertilidad, ya que algunos autores refieren para algunas razas caprinas un mayor porcentaje de fertilidad durante el otoño.

En cuanto al fotoperiodo, este influyó de forma significativa sobre los parámetros morfométricos. En este sentido, solsticios y equinoccios actuaron como puntos de inflexión alrededor de los cuales se produjeron ascensos y descensos en la distribución para el tamaño de la cabeza. Así, alrededor de los solsticios se produjeron los valores máximos y alrededor de los equinoccios los mínimos, con un aumento de las

dimensiones espermáticas en los períodos equinoccio-solsticio y una disminución en los períodos solsticio-equinoccio. Este patrón de distribución frente al fotoperiodo no fue similar a ninguno de los registrados para los parámetros seminales evaluados. Creemos que quizás la información a cerca del efecto de la estacionalidad sobre el análisis morfométrico que aportan estos datos “in vitro”, puede ayudar a interpretar los resultados de futuros análisis según la época del año en razas caprinas ubicadas en estas localizaciones geográficas; si bien la correlación estadística de los parámetros morfométricos tanto con los factores ambientales como con el resto de parámetros seminales evaluados en el esperma en fresco no es demasiado significativa

Del mismo modo, la temperatura influyó significativamente sobre el tamaño de la cabeza, ocasionando una disminución en los períodos calurosos para la longitud y perímetro de la misma, que a su vez fueron los más correlacionados con este parámetro. La anchura y el área, si bien no se afectaron estadísticamente si que mostraron igualmente un descenso cuando las temperaturas fueron elevadas, manteniendo además el área una correlación significativa con la temperatura. Estos resultados indican que en épocas de altas temperaturas las dimensiones de las cabezas espermáticas se muestran inferiores. Estos resultados podrían apoyar a los obtenidos para el efecto de la estación, al indicar como el stress por calor, que coincide fundamentalmente con los meses de verano, produce un descenso en el tamaño de la cabeza. Esta disminución en las dimensiones de la cabeza se acompaña además de una ligero descenso en todos los parámetros seminales utilizados para evaluar la calidad seminal. Este hecho podría apoyar una posible relación entre la estacionalidad de la calidad seminal y la morfometría, con valores superiores en otoño e inferiores en verano.

Las diferencias en el tamaño de las cabezas espermáticas se han relacionado en estudios previos a posibles alteraciones en la condensación de la cromatina del núcleo (Casey y col., 1997; Gravance y col., 1998; Arruda y col., 2002; Estes y col., 2003); así, quizás la estacionalidad mostrada por el tamaño de la cabeza, tanto para la estación como para el fotoperiodo o la temperatura, pueda ser reflejo de una sutil aunque mayor presencia de anomalías nucleares. Sin embargo, en este trabajo no se valora de forma

específica esta estructura espermática, de ahí que no podamos establecer una relación directa. Haciendo alusión a las experiencias previas, en el caso concreto del toro (Gravance y col., 1998) y el caballo (Arruda y col., 2002) se concluye que la congelación de espermatozoides, provoca una reducción en el tamaño de la cabeza que puede estar relacionado con una sobrecondensación de la cromatina y una menor viabilidad espermática. Por el contrario, Casey y col. (1997) en el caballo encontraron mayores dimensiones para las cabezas de animales subfértiles frente a los fértiles, pensando que estas diferencias podrían ser el reflejo de una patología ocasionada durante la espermatogénesis, concretamente durante la maduración y el transporte espermático, y que sea consecuencia de una anormal condensación de la cromatina.

En definitiva, creemos que los resultados aportados por esta experiencia demuestran una estacionalidad en la morfometría espermática que quizás pueda ser complementaria a otros parámetros seminales empleados habitualmente para la valoración de la calidad seminal en condiciones “in vitro”. Además, el análisis morfométrico podría ser una herramienta objetiva y precisa para diferenciar variaciones estacionales sutiles, quizás achacables a la cromatina del núcleo, así como actuar de punto de origen para futuras investigaciones que cuantifiquen el tamaño de la cabeza del macho cabrío en relación a los índices de fertilidad obtenidos.

3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN SOBRE LOS PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS DEL ESPERMATOZOIDE

Al igual que hemos observado en otras variables espermáticas estudiadas (movimiento, velocidad e integridad del acrosoma), según los resultados obtenidos en la valoración morfométrica de la congelación-descongelación de los 76 eyaculados recogidos sobre una población celular total de 23913 espermatozoides, todos los parámetros morfométricos evaluados para la cabeza del espermatozoide (longitud,

anchura, área, perímetro y elipticidad) estuvieron significativamente afectados por el proceso de congelación-descongelación.

El valor medio para los parámetros morfométricos longitud, anchura, área y perímetro, que informan a cerca del tamaño de la cabeza, fue significativamente inferior en la población de espermatozoides descongelados respecto a la de los espermatozoides procedentes de todos los eyaculados. Estos resultados son contrarios a los previamente aportados para esta especie por Gravance y col. en 1997 que no encontraron un efecto significativo del proceso de congelación-descongelación sobre el tamaño de la cabeza del espermatozoide, sin embargo, este autor en su experiencia diferencia un grupo de reducido de animales que si se afectó por el proceso de congelación-descongelación.

Según nuestros resultados, el efecto significativo de la congelación-descongelación sobre los parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide, provoca una reducción en el tamaño y un alargamiento en la forma de las cabezas espermáticas. Este efecto ha sido anteriormente referido por algunos investigadores para otras especies animales; así, Gravance y col. (1998) en el toro, demuestran que el tamaño de la cabeza de los espermatozoides se ve reducido de forma significativa tras la congelación, para los parámetros morfométricos longitud, anchura, área y perímetro de la cabeza; y Arruda y col. (2002) en el caballo, con reducción en todos los parámetros morfométricos para el tamaño de la cabeza de los espermatozoides (longitud, anchura, área y perímetro). Al igual que estos autores observamos como aumenta la relación longitud/anchura, aumentando la elipticidad, con lo que la forma de la cabeza se hace más alargada tras la congelación. Igualmente, en ambos casos los índices de reducción para los parámetros morfométricos son similares a los indicados en esta experiencia.

Entre los factores dependientes de los protocolos de congelación-descongelación que pueden provocar en mayor o menor medida daño celular, y afectan a una serie de parámetros seminales como el movimiento a la descongelación, vitalidad espermática, integridad del acrosoma, la estructura de la cromatina o la fertilidad, se encuentran el tipo de crioprotector, composición del diluyente de congelación, rampa de descenso de

temperatura hasta -196°C , así como, el método empleado para descongelar las dosis. Recientemente algunos investigadores han puesto de manifiesto un efecto de diferentes crioprotectores y diluyentes de congelación (Arruda y col., 2002), así como, de métodos de descongelación de las dosis (Esteso y col., 2003) sobre la respuesta a la congelación-descongelación de los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides.

Según Gravance y col. (1998) y Arruda y col. (2002), la reducción en el tamaño de la cabeza de los espermatozoides que se produce tras el proceso de congelación-descongelación podría ser consecuencia de una alteración en la estructura de la cromatina espermática o de la membrana acrosómica.

Royere y col. (1988), encontraron una tendencia a que el área ocupada por la cabeza de los espermatozoides del hombre decreciera tras la congelación-descongelación como consecuencia de una mayor condensación de la cromatina espermática. Otros estudios han asociado una alteración de la cromatina espermática con los procesos de congelación, así como, con formas anormales de la cabeza espermática (Gledhill y col., 1971) y descenso en la fertilidad (McCosker, 1969). Si las pequeñas, aunque significativas diferencias de tamaño, detectadas entre los valores morfométricos del espermatozoide fresco y congelado-descongelado pudieran asociarse a una alteración de la cromatina, quizás los sistemas automáticos de análisis morfométrico podrían utilizarse como herramienta para detectar anomalías sutiles originadas en el núcleo de las células espermáticas y que a su vez permitan valorar la respuesta “*in vitro*” de muestras de espermatozoide a las técnicas de congelación-descongelación, si bien no podemos concluir sobre la hipótesis planteada, ya que en este estudio no se valora de forma específica la cromatina del núcleo espermático. Además, la relación que pueda existir entre esta disminución de tamaño de la cabeza con descensos en la fertilidad, deberá ser objeto de futuras investigaciones (Gravance y col., 1998; Arruda y col., 2002).

La segunda hipótesis para explicar estos resultados sería la presencia, en la población de espermatozoides descongelados, de un mayor número de células con el

Discusión

acrosoma alterado, como consecuencia del proceso de congelación-descongelación. Coincidiendo con nuestros resultados en el análisis de la integridad del acrosoma, algunos investigadores describen la presencia de un mayor porcentaje de acrosomas activados en muestras de espermatozoides que han sido sometidas a congelación-descongelación (Chauhan y col., 1994). Sin embargo, no está claro que las diferencias de tamaño observadas en este estudio puedan ser justificadas por una alteración del acrosoma, ya que por un lado, la técnica de tinción empleada (Diff-Quik) no es específica para el acrosoma de esta especie, luego el SCA no diferenciaría esta región en la cabeza espermática. Por otro lado, al no conocer el espesor de la membrana y contenido acrosómico, no está claro que la reducción del tamaño provocada por la congelación sea debida a una exocitosis de la matriz acrosomal como consecuencia de un daño en la membrana acrosómica. Sin embargo, al contrario que sucede para el espermatozoide fresco, en la población de espermatozoides congelados-descongelados si se estableció una correlación significativa y positiva entre todos los parámetros morfométricos evaluados para el tamaño de la cabeza y la integridad del acrosoma, de manera que a medida que aumentó el tamaño de la cabeza también lo hizo el porcentaje de acrosomas intactos. Además el porcentaje medio de acrosomas íntegros a la descongelación fue significativamente inferior al encontrado a la precongelación, lo que parece sugerir que el descenso en el porcentaje de acrosomas íntegros puede estar relacionado con la reducción en el tamaño de la cabeza. Si esto fuera así, quizás el análisis morfométrico podría utilizarse como herramienta para detectar alteraciones del acrosoma que sean consecuencia del proceso de congelación-descongelación (Gravance y col., 1998; Arruda y col., 2002).

En otro orden de cosas, en esta experiencia el efecto de la congelación-descongelación se valoró empleando dos diluyentes de congelación de composición diferente (Tris y Lácteo). En ambos casos se produjo un efecto significativo de la congelación-descongelación sobre los parámetros morfométricos, aunque ambos se comportaron de forma diferente ante esta técnica. Como ha sido reflejado con anterioridad, recientemente se han publicado experiencias que ponen de manifiesto una influencia de las pautas de congelación-descongelación sobre los resultados del análisis

morfométrico. Concretamente, y centrándonos en el diluyente de congelación, en el caso del macho cabrío no se han aportado trabajos que valoren el efecto del mismo sobre la morfometría espermática. Haciendo alusión al caballo, nuestros resultados serían similares a los obtenidos por Arruda y col. (2002), ya que al comparar varios diluyentes de congelación y crioprotectores, observaron diferencias entre ellos para los mismos parámetros morfométricos evaluados en esta experiencia, y en todos los casos con valores inferiores al esperma precongelado.

De los diluyentes empleados en esta experiencia, fue el Tris el que presentó una reducción mayor para el tamaño de la cabeza, con valores significativamente inferiores para los parámetros morfométricos longitud, anchura, área y perímetro. En el caso del diluyente Lácteo, la reducción de la cabeza fue menor para todos los parámetros morfométricos de tamaño evaluados, aunque fue significativamente inferior a los valores morfométricos obtenidos para el esperma precongelado. Quizás estos resultados puedan sugerir una mayor protección por parte del diluyente Lácteo durante el proceso de congelación-descongelación, considerando que ha sido menor la reducción del tamaño de la cabeza; en este sentido, las experiencias previas realizadas en nuestro laboratorio, valorando el efecto de la congelación-descongelación sobre el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro, indican que con el diluyente Lácteo dicho porcentaje fue mayor, y aunque no hubo diferencias significativas en las tasas de fertilidad entre diluyentes, los mayores porcentajes se obtuvieron cuando se emplearon las dosis congeladas con el diluyente Lácteo (Dorado, 2003).

Aunque el número de donantes de esperma empleado en esta fase del estudio se reduce a dos, según los resultados obtenidos podría existir una variabilidad individual en la morfometría espermática a la descongelación de la misma manera que sucede en las muestras de esperma fresco procedentes de los 4 machos que intervinieron en la fase de selección del método de análisis morfométrico. En este sentido, aunque en ambos machos se produce un descenso en los parámetros morfométricos longitud, anchura área y perímetro de la cabeza tras la congelación, la respuesta de estos parámetros de tamaño de la cabeza no es la misma entre machos cuando se añade el factor diluyente. Así,

aunque con el Tris no se observan diferencias individuales, reduciéndose en ambos machos todos los parámetros morfométricos evaluados para el tamaño de la cabeza de los espermatozoides tras la congelación, cuando se emplea el diluyente Lácteo, el macho B no se afecta por el proceso de congelación para los parámetros morfométricos área y perímetro, con valores similares a los obtenidos para el esperma fresco. Estas variaciones individuales en la respuesta a la congelación-descongelación de los parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide coinciden con los trabajos de Gravance y col. (1997 y 1998) en macho cabrío y toro, en los que se diferencian los animales en dos grupos en función de si el tamaño de la cabeza se afecta o no por el proceso de congelación-descongelación. En este sentido, quizás el análisis morfométrico pudiera informar de forma indirecta sobre la congelabilidad del esperma de diferentes animales o de eyaculados concretos de un mismo individuo. Si existe o no diferencias en la fertilidad entre los individuos o muestras de esperma que no se afectan por la congelación-descongelación frente a los que si se afectan está aun por determinar.

De forma paralela y como complemento del análisis morfométrico a la descongelación, se evaluaron los parámetros seminales movimiento, morfología e integridad del acrosoma, incluidos dentro de una serie de pruebas que habitualmente se emplean para la valoración “in vitro” de las dosis de esperma congelado.

Con el fin de estimar la viabilidad espermática de cada eyaculado tras el proceso de congelación-descongelación, se valoró el movimiento espermático inicial y a la descongelación (Saacke y White, 1972). En este sentido, uno de los test que ofrece mayor información y fiabilidad a cerca de la capacidad fecundante del esperma congelado-descongelado es el test de la longevidad del movimiento espermático (Garde, 1993), que fue empleado en esta experiencia para valorar el movimiento total y rápido progresivo de la dosis descongeladas tras un proceso de incubación de una hora a +37°C. Ambos parámetros cinéticos estuvieron afectados por el proceso de congelación-descongelación, lo que provocó un descenso en su valor inicial de un 34% y un 42 % para el movimiento total y rápido progresivo respectivamente, tras el período de incubación. Este descenso de la movilidad espermática podría estar influido por la

intervención de una serie de factores, entre los que se encuentran, por un lado el propio proceso de congelación-descongelación, que provoca alteraciones irreversibles sobre la estructura y funcionalidad de los espermatozoides (Parks y Graham, 1992; Watson, 2000), así como, por el tiempo y temperatura de incubación utilizado en este estudio (Fiser y col., 1991; Valcárcel y col., 1994; Bag y col., 2002a y b en morueco; Dorado, 2003). Además es conocido que la congelabilidad del esperma depende de una serie de factores como son, entre otros, la especie animal, raza o individuo.

Si bien durante la fase de dilución y equilibrado del esperma se registra una ligera pérdida en el movimiento, esta no se hace significativa hasta el proceso de refrigeración y congelación-descongelación, adquiriendo mayor importancia en este estadio del proceso la influencia de diluyente de congelación (Dunner y Vázquez, 1991). En este sentido, nuestros resultados indican que la reducción del movimiento espermático a la descongelación fue menor con el diluyente Tris que con el Lácteo, en línea de lo observado por Chauhan y Anand (1990), Pintado y col. (1991) y Dorado (2003) cuando compararon Tris con otros diluyentes, aunque las pérdidas registradas por estos autores para Tris (50%) fueron mayores a las observadas en esta experiencia. Estas diferencias observadas entre diluyentes nos hace considerar el papel que pueda ejercer su capacidad tamponadora (Pintado y col., 1991) y grado de protección de sus componentes básicos (tipo y cantidad de crioprotectores) sobre el flagelo y resto de estructuras celulares, así como de la capacidad de preservar el metabolismo energético tras el proceso de congelación-descongelación.

Además de una menor reducción de los parámetros cinéticos tras el proceso de congelación-descongelación, el diluyente Tris mostró resultados superiores a los registrados para el diluyente Lácteo, si bien esta diferencia fue significativa solamente en el caso del movimiento total. Estos resultados se corresponden con los obtenidos por Chauhan y Anand (1990) en machos cabríos Jamunapari, Pintado y col. (1991) en Veratos, Pérez y Mateos (1995) en machos cabríos de raza indeterminada y Dorado (2003) en la raza Florida.

Coincidimos con Pérez y Mateos (1995) y Dorado (2003), en que la mayor disminución del movimiento a la descongelación cuando se emplea el diluyente Lácteo podría ser debido a la precipitación de las proteínas de la leche mantenidas a más de 37° C, si bien también podría deberse a la interacción entre la leche y restos del plasma seminal, que al reaccionar con las proteínas lácteas, o con la lecitina de la yema de huevo daría lugar a la producción de sustancias tóxicas para el espermatozoide. Por otro lado, quizás el diluyente Tris mostró resultados ligeramente superiores para el movimiento a la descongelación debido al efecto del ténsido crioprotector Equex-STM® que fue añadido de forma adicional, y que según Helleman y Jara (1997) ejerce sobre el flagelo un efecto protector contra el shock osmótico; asimismo, aunque las diferencias no fueron significativas, la mejor respuesta al Tris en uno de los machos pudiera indicar una cierta predisposición individual por uno de los diluyentes empleados, al igual que sucede en otras especies (Rodríguez y col., 2001).

En relación al análisis de la morfología espermática a la descongelación, el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales no estuvo afectado por el proceso de congelación-descongelación. Si bien en esta experiencia los porcentajes de normalidad fueron ligeramente inferiores en el esperma descongelado, resultados en línea con algunas investigaciones realizadas tanto en la especie caprina (Sing y col., 1995) como en el toro (Salisbury y col., 1978), cerdo (Monji, 1988) y búfalo (Sing y col., 1991) donde la normalidad espermática disminuyó considerablemente tras el proceso de equilibrado y descongelación, sin embargo las diferencias observadas en este estudio no fueron significativas.

Dunner y Vazquez (1991) en machos murciano-granadinos, concluyen que el descenso en la normalidad espermática depende más del factor de dilución que de la propia solución diluyoconservadora. Así, en esta experiencia y al igual que Dunner (1991a y b) en machos veratos, no observamos diferencias significativas en la proporción de espermatozoides morfológicamente normales a la descongelación según el diluyente empleado, aunque el diluyente Lácteo mostró porcentajes ligeramente superiores a los registrados por el Tris. Nuestros resultados son similares a los aportados

por Sing y col. (1995 y 1996), que apreciaron una mayor protección durante el proceso de congelación-descongelación cuando empleaban diluyentes que contenían en su composición lactosa sola o en combinación con glicerol, con el consiguiente incremento en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales.

El porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro a la descongelación fue similar entre ambos machos de forma opuesta a los trabajos de López y col. (1999) en morueco, si bien estas diferencias podrían deberse al reducido número de animales estudiados, así como, al efecto raza, ambiente y/o localización geográfica. Por otro lado, como ya ha sido referido anteriormente, los procesos de congelación-descongelación provocan, entre otros, una alteración tanto del acrosoma como de la membrana plasmática (Salamon y Maxwell, 1995a y b; Watson, 1995 y 2000; Maxwell y Watson, 1996; Valcárcel y col., 1996; Ollero y col., 1998). También es conocida la relación existente entre el porcentaje de acrosomas intactos en una muestra de esperma y la fertilidad (Saacke y White, 1972; Saacke y col., 1980; Juneja y col., 1989), consecuencia de la importancia de las enzimas proteolíticas que contiene esta estructura para la fertilización del oocito (Crozet y col., 1987; First y Parrish, 1987). Ambos sucesos hacen de la valoración “in vitro” de la integridad del acrosoma un test de gran valor a la hora de predecir la congelabilidad de una muestra de esperma, así como, su fertilidad potencial (Benoff y col., 1993; Bielsa y col., 1994).

En el macho cabrío, morueco, cerdo y toro, se ha observado un drástico descenso en el porcentaje de acrosomas íntegros tras el proceso de congelación-descongelación (Pascual y col., 1993; Chauhan y col., 1994; Sing y col., 1995; García y col., 1996; Ollero y col., 1996). En nuestra experiencia también se ha producido un incremento de acrosomas activados tras la descongelación, con porcentajes similares a los registrados por Chauhan y col. (1994) y Dorado (2003), aunque inferiores a los trabajos de Azerêdo y col. (2001) en macho cabrío y Valcárcel y col. (1994) en moruecos, si bien estas diferencias podrían deberse a la influencia de una serie de factores, como son, entre otros, el método de tinción, temperatura de congelación (Bag

Discusión

y col., 2002 a y b), duración y temperatura de la incubación (Glogowski y col., 1998; López y col., 1999), o el método de descongelación empleado (Söderquist y col., 1997).

Si bien en el caso del morueco se ha demostrado una influencia de la temperatura de congelación sobre la integridad del acrosoma (Bag y col., 2002 a y b), esta estructura espermática parece no alterarse por la centrifugación durante la separación del plasma seminal (Pereira y col., 2000), así como por la dilución, refrigeración, glicerolización y equilibrado. Según nuestros resultados, la integridad del acrosoma estuvo influenciada por el diluyente de congelación (Memon y col., 1985; Deka y Rao; 1987; Chauhan y Anand, 1990; Tuli y Holtz., 1992; Aisen y col., 1995). Así con el diluyente Lácteo se observaron mayores porcentajes de integridad y en consecuencia un menor daño acrosomal. Estos resultados coinciden con los registrados para esta especie por Sing y col. (1996) que demostraron, mediante determinación enzimática, una mayor protección en los diluyentes a base de lactosa sola o en combinación con glicerol, con mejores porcentajes para formas normales y acrosomas intactos. Una posible explicación sería, que la lactosa al ser un azúcar impermeable a la membrana espermática ejerce una acción deshidratante, lo que provoca una menor formación de cristales de hielo en el interior de la célula y en consecuencia una mejor preservación (Aisen y col., 1995).

Para valorar la congelabilidad del esperma, se fijaron dos criterios de selección, uno para los eyaculados en fresco y otro para las dosis descongeladas y se estudió la respuesta a la congelación-descongelación de los parámetros morfométricos con cada diluyente de congelación entre eyaculados y dosis según si superaron o no los requisitos exigidos.

Como primer criterio de selección a la pre congelación, se fijaron unos requisitos en la evaluación en fresco de los eyaculados recogidos, en base a los valores obtenidos para el volumen, movimiento, concentración y morfología, ya que de acuerdo con algunos investigadores, una buena calidad seminal puede favorecer el éxito del proceso de congelación.

Los resultados obtenidos reflejan una diferencia en la respuesta a la congelación-descongelación de los parámetros morfométricos entre los eyaculados que cumplieron los requisitos a la precongelación y los que no. En los eyaculados que no cumplieron los requisitos, se observa como todos los parámetros morfométricos evaluados con ambos diluyentes son significativamente inferiores al esperma fresco, es decir, se han afectado por el proceso de congelación-descongelación con una reducción de tamaño respecto a sus valor inicial y un aumento de su elipticidad. En el caso de los eyaculados que cumplieron los requisitos, para el diluyente Lácteo los parámetros morfométricos área y perímetro de la cabeza fueron estadísticamente iguales a su valor a la precongelación, de manera que estos parámetros no se afectaron por el proceso de congelación-descongelación. El hecho de que para el diluyente Lácteo el grado de reducción de la cabeza sea menor, puede sugerir como hemos indicado anteriormente, una mayor protección de este durante el proceso de congelación-descongelación. Además el que esta menor reducción en la morfometría espermática se produzca en las muestras de mejor calidad seminal, sugiere que quizás la valoración morfométrica pueda ser un criterio válido y complementario al resto de parámetros seminales a la hora de diferenciar entre muestras “congelables” o no, en definitiva para valorar y predecir la congelabilidad de una muestra de esperma en fresco. Si bien es posible que pueda existir una relación positiva entre la morfometría y la calidad seminal para valorar “in vitro” los eyaculados aptos para congelar, creemos que sería interesante establecer la relación que pueda existir entre estos eyaculados y sus dosis con la fertilidad.

Por otro lado, partiendo de los eyaculados “aptos para congelar” según los requisitos establecidos en esta experiencia, como segundo criterio de selección se diferencié, en base a la longevidad del movimiento a la descongelación, entre dosis aptas ($\geq 30\%$ MRP) y no aptas a la descongelación ($< 30\%$ MRP). Se empleó este test ya que permite valorar la viabilidad espermática (Saacke y White, 1972) y es uno de los que ofrece mayor información y fiabilidad a cerca de la capacidad fecundante el esperma congelado-descongelado (Garde, 1993; Dorado, 2003).

Según nuestros resultados, la respuesta a la congelación-descongelación de los parámetros morfométricos para ambos diluyentes entre los eyaculados con dosis aptas y no aptas a la descongelación fue diferente. Así, se observa como en los eyaculados con dosis clasificadas como no aptas a la descongelación, todos los parámetros morfométricos evaluados estuvieron afectados por el proceso de congelación-descongelación con una reducción significativa de su tamaño y un aumento de su elipticidad. En los eyaculados con dosis aptas a la descongelación, para el diluyente Lácteo los parámetros morfométricos anchura, área y perímetro de la cabeza fueron estadísticamente iguales a su valor en fresco y además la elipticidad de la cabeza fue estadísticamente igual a la medida obtenida a la precongelación tanto para el diluyente Lácteo como para el Tris. El hecho de que en estos eyaculados, que han superado los dos criterios de selección en base a su calidad tanto antes como después de la congelación, se observe que 4 de los 5 parámetros morfométricos evaluados no se encuentren afectados por el proceso de congelación, sugiere la posibilidad de que a medida que se van seleccionando los eyaculados según la calidad seminal, se van reduciendo las diferencias morfométricas ocasionadas por el proceso de congelación y protección del diluyente, lo cual indica que el análisis morfométrico podría ser un método complementario adecuado para valorar la respuesta a la congelación de los eyaculados y quizás en algún caso, aprovechando la precisión de este sistema, diferenciar a su vez entre eyaculados con una buena calidad seminal.

Estudios recientes (Esteso y col., 2003), comparando una pauta rápida y lenta para la descongelación de dosis de ciervo, se concluye que el protocolo en el que los espermatozoides resisten peor este proceso es aquel en el cual se produce una disminución en el movimiento acompañado de una reducción significativa en el tamaño de la cabeza. Al igual que sucede en esta experiencia, un mayor daño celular ocasionado por el proceso de congelación-descongelación iría acompañado de una mayor reducción para el tamaño de la cabeza.

En definitiva, los resultados para la valoración de la congelabilidad del espermatozoides empleando los parámetros morfométricos indican que a medida que aumenta el daño

celular se reducen en mayor medida los valores morfométricos para el tamaño de la cabeza; que influido por el diluyente, la selección de los eyaculados antes de congelar según su calidad seminal reduce el efecto de la congelación sobre la morfometría espermática y además, cuando las dosis congeladas-descongeladas superan el test de longevidad del movimiento ($\geq 30\%$ MRP-60min-37°C), el número de parámetros morfométricos que no se afectan por la congelación-descongelación es mayor. Estos resultados pueden significar una propuesta para emplear del SCA como un método objetivo y preciso para valorar “in vitro” la congelabilidad de una muestra de esperma en base a su respuesta a la congelación-descongelación, si bien, quedaría por establecer si existe una relación positiva entre las dosis que presenten unas dimensiones para el tamaño de la cabeza similar a las obtenidas en fresco y la fertilidad del esperma “in vivo”.

VII. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el estudio del efecto de la congelación-descongelación sobre los parámetros morfométricos del espermatozoide de macho cabrío, que han sido expuestos en este documento, se pueden extraer las conclusiones que se enumeran a continuación:

1. El método de tinción influyó significativamente sobre la eficacia y resultados del análisis morfométrico, siendo Diff-Quik el más adecuado para realizar de forma objetiva y eficaz dicha valoración, analizando para ello un mínimo de 100 espermatozoides por preparación.
2. La estación del año influyó significativamente sobre todos los parámetros morfométricos, con un aumento del tamaño de la cabeza y una disminución de su elipticidad durante el otoño, coincidiendo con los mayores porcentajes para el movimiento rápido progresivo y normalidad.
3. La temperatura ambiental media influyó significativamente sobre los parámetros morfométricos, con una reducción del tamaño de la cabeza durante los periodos más calurosos.
4. El proceso de congelación y descongelación del esperma afectó a todos los parámetros morfométricos evaluados, provocando una reducción en el tamaño de la cabeza y un aumento de su elipticidad que fue más acusado con el diluyente Tris.
5. Los parámetros morfométricos área y perímetro de la cabeza de los espermatozoides correspondientes a los eyaculados que cumplieron los requisitos utilizados en esta experiencia a la precongelación, no se afectaron tras la congelación-descongelación cuando se empleó el diluyente Lácteo.

Conclusiones

6. El número de parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide afectados por el proceso de congelación-descongelación fue menor en las dosis que cumplieron el test de longevidad del movimiento.

7. Como conclusión final y de acuerdo con los resultados obtenidos, el empleo del SCA con la metodología descrita, nos informa acerca de la posible respuesta a la congelación-descongelación del espermatozoide de macho cabrío ofreciendo una información complementaria y objetiva al test de valoración del movimiento a la descongelación empleado en esta experiencia.

VIII. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo ha sido validar el Sperm-Class Analyzer[®] (SCA) para investigar el efecto de la estacionalidad y congelación-descongelación sobre los parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide de macho cabrío. Para validar el SCA, se recogieron 16 eyaculados de 4 machos determinado el número de células a analizar y la influencia de 3 tinciones (Diff-Quik, Hemacolor y Hematoxilina de Harris) en la eficacia del análisis y valores morfométricos. La estacionalidad se valoró sobre 76 eyaculados recogidos de 2 machos durante 1 año. El esperma se congeló empleando dos diluyentes (Tris y Lácteo) y se descongeló. Los parámetros seminales movimiento total y rápido progresivo, morfología, acrosoma y los morfométricos de tamaño (longitud, anchura, área y perímetro) y forma (elipticidad) de la cabeza, se compararon antes y después de congelar. Para valorar el efecto de la congelación-descongelación sobre los parámetros morfométricos en función de la congelabilidad de los eyaculados, estos se clasificaron en aptos o no aptos según los parámetros seminales evaluados antes y después de congelar. Analizar 100 espermatozoides por preparación empleando Diff-Quik, resultó el método más eficaz para valorar con el SCA la morfometría espermática. La estacionalidad influyó sobre los parámetros morfométricos, aumentando el tamaño de la cabeza y disminuyendo su elipticidad durante el otoño, coincidiendo con el incremento del movimiento rápido progresivo y formas normales. Además, en los periodos más calurosos disminuyó el tamaño de la cabeza y aumento su elipticidad. La congelación-descongelación redujo el tamaño de la cabeza y aumento su elipticidad, descendiendo el movimiento e integridad del acrosoma. Se observaron diferencias entre diluyentes, con una mayor reducción de las dimensiones espermáticas tras la congelación-descongelación con Tris. El efecto de la congelación-descongelación fue diferente en las muestras clasificadas como aptas o no aptas antes y después de congelar basado en el número de parámetros morfométricos que se han reducido tras la congelación-descongelación, y que fue menor en aquellos eyaculados aptos a la precongelación con el diluyente Lácteo, y en las dosis aptas a la descongelación. Estos cambios morfométricos podrían indicar daño celular ocurrido durante la congelación-descongelación y entonces valorar la congelabilidad de una muestra de esperma.

IX. SUMMARY

The aim of this study was to validate the Sperm-Class Analyzer to investigate the effect of season and cryopreservation on buck sperm head morphometry. For the first purpose, 16 ejaculates from 4 bucks were collected and the effect of sample size and three staining procedures (Diff-Quik, Hemacolor and Harris' Haematoxylin), on the accuracy of the image processing and sperm measurements assessed. The influence of season on sperm morphometric parameters was assessed in 76 ejaculates collected from two bucks across 1 year. Semen samples were frozen with two different extenders (Tris and Milk), and thawed. Total and rapid progressive sperm motility, morphology, intact acrosome, sperm head dimensions (length, width, area and perimeter) and shape (ellipticity) were compared between fresh and frozen-thawed samples. The ability of semen samples to successfully freeze was determined by classifying the samples as suitable or not suitable according to the semen parameters evaluated before and after cryopreservation. To obtain objective and accurate morphometric measurements by the SCA, 100 spermatozoa from slides stained with Diff-Quik is recommended. Seasonal variations affected the sperm head morphometry. In autumn, sperm head dimensions were increased and sperm ellipticity decreased in relation with increased values for rapid progressive motility and normal sperm morphology. Elevated ambient temperatures reduced sperm head dimension and increased sperm ellipticity. Sperm head dimensions of frozen-thawed samples were smaller and sperm ellipticity greater than those of the fresh samples. Alternatively, sperm motility and intact acrosome were lower in thawed samples. Semen extender affected sperm head morphometry, with smaller dimensions after thawing by Tris. The effect of cryopreservation on sperm head morphometry was different in semen samples as suitable or not suitable before freezing and after thawing based in the number of morphometric parameters which had been reduced after freeze-thawing procedure. In this way, the number of sperm head morphometric parameters reduced after cryopreservation was lower in fresh samples classified as suitable before freezing using Milk extender, and in frozen-thawed samples classified as suitable according to post-thaw motility. Changes in sperm head morphometry might reflect spermatozoa injury occurred during cryopreservation and thus predict the ability of semen samples to successfully freeze.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Aamdal, J., Amdersen, K. (1968). Freezing of ram semen in straws. Proc. 6th Int. Congr. On Anim. Reprod. and AI 2, 977-981.
- Aguado, M.J., Garcia-Cervigon, M., Manso, A., Perez-Guzman, M.D., Garde, J., Montoro, V. (1998). Estudio preliminar del poder fecundante del semen de ovino Manchego mantenido durante 24 horas en refrigeración. XXIII Jornadas Científicas SEOC, Producción Ovina y Caprina, 521-524.
- Ahmad, K. (1987). Antibiotics for bull semen: effects of new antibiotics on post-thaw survival and fertility of frozen bull spermatozoa. Dissertation Abstracts International 47, 2689.
- Ahmad, N., Noakes, D.E. (1996). Seasonal variations in the semen quality of young British goats. Br. Vet. J. 152(2), 225-236.
- Ahmed, M.M.M., Makawi, S.A., Gadir, A.A. (1997). Reproductive performance of Saanen bucks under tropical climate. Small Ruminant Research 26, (1-2), 151-155.
- Aisen, E.G., Alvarez, H.L., Venturino, A., Larreguy, D., Garde, J.J., Vazquez, I. (1995). Efecto comparativo de diluyos conservadores de diferente composición y tonicidad sobre la criopreservación del semen ovino. Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim. 10(3), 223-231.
- Aitken, R.J. (1990). Evaluation of human sperm function. British Med. Bull., 46(3), 654-674.
- Amann, R.P., Hay, S.R., Hammersted, R.H. (1982). Yield characteristics, motility and cAMP content of sperm isolated from seven regions of ram epididymis. Biol. Reprod. 27, 723-733.
- Amann, R.P. and Pickett, B.W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. Equine. Vet. Sci. 7, 145-173.
- Amir, D., Gacitua, H., Ron, M., Lehrer, A.R. (1986). Seasonal variation in semen characteristics and fertility of Finn cross rams subjected to frequent ejaculation. Anim. Reprod. Sci. 10, 75-84.
- Anchordoguy, T.J., Rudolph, A.S., Carpenter, J.F., Crowe, J.H. (1987). Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. Cryobiology 24, 324-331.

Bibliografía

- Anel, E., Anel, L., Boixo, J.C., Carbajo, M., Domínguez, J.C., Chamorro, C., Olmedo, J.A., Celorrio, I. (1996). Automated evaluation of frozen-thawed ram semen. 13th Int. Cong. Anim. Reprod., Sydney, Australia, 2, 2-8.
- Anel, E., Alvarez, M., Kaabi, M., Paz, J.C., Anel, L. (1998). Influencia de la adición de algunos antibióticos en las características del semen descongelado de morueco. XXIII Jornadas Científicas SEOC, Producción Ovina y Caprina, Vitoria, España, 513-515.
- Anel, E. (1999). Automatización en la contrastación espermática. II Congreso Ibérico de Reproducción animal, Lugo, España, 292-296.
- Armitage, W.J. (1986). Osmotic stress as a factor in the detrimental effect of glycerol on human platelets. *Cryobiology* 23, 116-125.
- Arruda RP, Ball BA, Gravance CG, Garcia AR, Liu IKM. (2002). Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. *Theriogenology* 58, 253-256.
- Ayodeji, O., Baker, H.W. (1986). Is there a specific abnormality of sperm morphology in men with varicoceles?. *Fertil. Steril.* 45, 839-842.
- Azerêdo, G.A., Esper, C.R., Resende, K.T. (2001). Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Ruminant Research* 41, 257-263.
- Baas, J.W., Molan, P.C. and Shanon, P. (1983). Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 68, 275-280.
- Backer, H.W.G. and Clarke, G.N. (1987). Sperm morphology: Consistency of assessment of the same sperm by different observers. *Clin Reprod Fertil* 5, 37-43.
- Bag, S., Joshi, A., Naqvi, S.M.K., Rawat, P.S., Mittal, J.P. (2002a). Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 72, 175-183.
- Bag, S., Joshi, A., Rawat, P.S., Mittal, J.P. (2002b). Effect of initial freezing temperature on the semen characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa in a semi-arid tropical environment. *Small Ruminant Research* 43, 23-29.

- Bains, H.K., Pabst, M.A. and Bawa, S.R. (1993). Changes in the lecitin binding sites of the testicular, epididymal, vas, and ejaculated spermatozoon surface of dog. *Andrologia* 25, 19-24.
- Baker, C.A. (1957). Some aspects of artificial insemination in swine and goat. In: Proc. 10th Ann. Conv. National Assoc. Artif. Breeders, Toronto, Canada, 127-132.
- Barrio, F. (1996). Estudio de los factores que afectan a la criopreservación del semen en la raza ovina gallega. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, 213pp.
- Barrios, B., Perez-Perez, R., Fernandez I., Gallego, M., Peleato, M., Muiño-Blanco, T., Cebrian-Perez, J., (1998). Purificación de proteínas del plasma seminal ovino. Capacidad reversora del daño producido por frío sobre espermatozoides. XXIII Jornadas Científicas SEOC, Producción Ovina y Caprina, Vitoria, España, 507-511.
- Bedford, J.M. (1970). Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod.* 2, 128-158.
- Bellvé, A.R. and O'Brien, D.A. (1983). The mammalian spermatozoon: structure and temporal assembly. In: Mechanism and control of animal fertilization. Ed JF Hartman. Academic Press, 55-137.
- Benoff, S., Hurley, I., Cooper, G.W., Mandel, F.S., Hershlag, A., Scholl, G.M., Rosenfeld, D.L. (1993). Fertilization potential in vitro is correlated with head-specific mannose-ligand receptor expression, acrosome status and membrane cholesterol content. *Hum. Reprod.* 8(12), 2155-2166.
- Bielsa, M.A., Andolz, P., Gris, J.M., Martinez, P., Egozcue, J. (1994). Which semen parameters have a predictive value for pregnancy in infertile couples?. *Hum. Reprod.* 9(10), 1887-1890.
- Boersma, A, Braun, J, Stolla, R. (1999). Influence of random factors and two different staining procedures on computer-assisted sperm head morphometry in bulls. *Reprod. Dom. Anim.* 34, 77-82.
- Boersma, A., Rasshofer, R. and Stolla, R. (2001). 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, 222-229.

Bibliografía

- Boixo, J.C. (1994). Valoración laboratorial de la calidad seminal. Correlación con la fertilidad. 7ª Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, Murcia, España, 61-69.
- Boletín Oficial del Estado (BOE N° 279/97 del 21/11/1997). RD 1682/1997, 7 de noviembre. Actualización del catálogo oficial de razas de ganado de España.
- Bongso, T.A., Jainudeen, M.R., Siti, A. (1982). Relationship of scrotal circumference to age, body weight and onset of spermatogenesis in goats. *Theriogenology* 18(5), 513-524.
- Buendía, P., Soler, C., Paolicchi, F., Gago, C., Urquieta, B., Pérez-Sánchez, F. and Bustos-Obregón, E. (2002). Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm-Class Analyzer® computer assisted system. *Theriogenology* 57, 1207-1218.
- Cabrera, F., Gonzalez, F., Batista, M., Forga, J., Calero, P.O., Gracia, A. (1998a). Estudio sobre la producción seminal del macho de la Agrupación Caprina Canaria (variedad Majorera) a lo largo del año. *Archivo de Reproducción Animal*, 6-11.
- Cabrera, F., Gonzalez, F., Batista, M., Forga, J., Calero, P.O., Gracia, A. (1998b). Influencia de la edad y los factores ambientales sobre la producción seminal del macho de la Agrupación Caprina Canaria (Variedad Majorera) a lo largo de todo el año. XXIII Jornadas Científicas SEOC, Producción Ovina y Caprina, Vitoria, España, 525-528.
- Casey, P.J., Gravance, C.G., Davis, R.O., Chabot, D.D. and Liu, I.K.M. (1997). Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. *Theriogenology* 47, 575-582.
- Cochran, R.C., Judy, J.K., Parker, C.F., Hallford, D.M. (1985). Prefreezing and post-thaw semen characteristics of five ram breeds collected by electroejaculation. *Theriogenology*, 23(3), 431-440.
- Cochran, J.D., Amann, R.P., Froman, D.P., Pickett, B.W. (1984). Effect of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology* 21, 25-39.
- Cognie, Y., Guerin, Y., Gyader, C., Poulin, N., Crozet, N. (1991). In vitro fertilization of sheep oocytes matured in vivo. *Theriogenology* 25, 146-149.

- Colas, G. (1975). Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J. Reprod. Fert.* 42, 277-285.
- Colas, G. (1980). Variations saisonnières de la qualité du sperma chez la bélière Ile-de-France. I. Etude de la morphologie cellulaire et de la qualité du massale. *Reprod. Nutr. Develop* 20(6), 1789-1799.
- Colenbrander, B., Gadella, B.M., Stout, T.A.E. (2003). The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reprod. Dom. Anim.* 38, 305-311.
- Cooper, T.G. (1986). *The epididymis, sperm maturation and fertilisation.* Springer Verlag, Heidelberg.
- Cooper, T.G., Atkinson, A.D. and Nieschlag, E. (1999). Experience with external quality control in spermatology. *Hum. Reprod.* 14, 765-769.
- Corteel, J.M. (1974). Viabilité des spermatozoïdes de boucs conservés congelés avec ou sans leur plasma seminal. Effect du glucose. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 14, 741-745.
- Corteel, J.M. (1975). Production du sperm chez le bouc: variation saisonnière de la quantité et de la qualité du sperm récolté selon l'âge des animaux. 1^{eres} journées de la recherche ovine et caprine, tome 1, 4-17.
- Corteel, J.M. (1977). Production, storage and artificial insemination of goat semen. *Proc. Symposium on Management of Reproduction in Sheep and Goats.* Madison, Wisconsin, USA, 41-57.
- Corteel, J.M. (1980). Effects of seminal plasma on the survival and fertility of spermatozoa kept in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* 20 (4a), 1111-1123.
- Corteel, J.M. (1981). *Goat Production: Collection, Processing and Artificial Insemination of Goat semen.* Ed. Academic Press, London, 171-191.
- Corteel, J.M. (1990). Maîtrise de la reproduction chez les caprins à vocation laitière. 5^a Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, Zaragoza, tomo I, 191-274.
- Corteel, J.M. (1992). Involvement of seminal plasma in goat sperm preservation. 5th Intern. Confer. On Goats, New-Dheli, India, II, parts II, 290-297.
- Cross, N.L., Morales, P., Overstreet, J.W., Hanson, F.W. (1986). Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res.* 15, 213.

Bibliografía

- Crozet, N, Theron, MCP, Chemineau, P. (1987). Ultrastructure of in vivo fertilization in the goat. *Gamete Res* 18, 191-199.
- Cummins, J.M. and Woodall, P.F. (1985). On mammalian sperm dimensions. *J. Reprod. Fertil.* 75, 153-175.
- Chakraborty, P.K., Stuart, L.D., Brown, J.L. (1989). Puberty in the male Nubian goat: Serum concentration of LH, FSH and testosterone from birth through puberty and semen characteristics at sexual maturity. *Anim. Reprod. Sci.* 20, 91-101.
- Chandler, J.E., Painter, C.L., Adkinson, R.W., Memon, M.A. and Hoyt, P.G. (1988). Semen quality characteristics of dairy goats. *J. Dairy Sci.* 71, 1638-1646.
- Chang, M.C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa into the fallopian tubes. *Nature* 168, 697.
- Chauhan, M.S., Anand, S.R. (1990). Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. *Theriogenology* 34(5), 1003-1013.
- Chauhan, M.S., Kapila, R., Gandhi, K.K., Anand, S.R. (1994). Acrosome damage and enzyme leakage of goat spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *Andrología* 26(1), 21-26.
- Chemineau, P. (1986). Sexual behaviour and gonadal activity during the year in the tropical Creole meat goat. 2. Male mating behaviour, testis diameter, ejaculate characteristics and fertility. *Reprod. Nutr. Develop.* 26, 453-460.
- Chemineau, P., Cognie, Y., Guerin, Y., Orgeur, P., Vallet, J.C. (1991). Training manual on artificial insemination in sheep and goats. Food and agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 222.
- Dahlbom, M., Andersson, M., Vierula, M., and Alanko, M. (1997). Morphometry of normal and teratozoospermic canine sperm heads using an image analyzer: work in progress. *Theriogenology* 48, 687-698.
- Davis, R.O. and Katz, D.F. (1989). Computer-aided sperm analysis (CASA): image digitisation and processing. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 17(1), 93-116.
- Davis, R.O., Bain, D.E., Siemers, R.J., Thal, D.M., Adrew, J.B., Gravance, C.G. (1992). Accuracy and precision of the CellForm-Human automated sperm morphometry system. *Fertil Steril* 58, 763-769.

- Davis, R.O., and Gravance, C.G. (1993). Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis. *Fertil. Steril.* 59, 412-417.
- de Monserrat, J.J., Pérez-Sánchez, F., Tablado, L. and Soler, C.(1995). The Sperm-Class Analyzer[®]: a new automated system for human sperm morphometry and classification. *Contraception Fertilité Sexualité* 23(9), S126.
- Deka, B.M., Rao, A.R. (1987). Effect of storage at -196°C on quality of goat semen frozen with and without seminal plasma in Tris-based extender. *Cherion* 16(2), 65-69.
- Delgadillo, J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P. (1991). Decrease in the seasonality of sexual behavior and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. *Theriogenology* 36(5), 755-770.
- Delgadillo, J.A., Hochereau-De Reviers, M.T., Daveau, A., Chemineau, P. (1995). Effect of short photoperiodic cycles on male genital tract and testicular parameters in male goats (*Capra hircus*). *Reprod. Nutr. Dev.* 35(5), 549-558.
- Delgadillo, J.A., Canedo, G.A., Chemineau, P., Guillaume, D. (1999). Evidence for an annual reproductive rhythm independent of food availability in male Creole goats in subtropical northern Mexico. *Theriogenology* 52, 727-737.
- Didion, B.A., Graves, C.N. (1986). In vivo capacitation and acrosome reaction of bovine sperm in estrous and diestrous cows. *J. Anim. Sci.* 62, 1029-1033.
- Dorado, J., Pérez, C., Hidalgo, M., Rodríguez, I., Sanz, J., Santiago, J., Sánchez, M. (2002a). Medidas de circunferencia escrotal y rubor inguinal sexual en el macho cabrío de raza Florida. *Archivos de Zootecnia* 51, 393-396.
- Dorado, J., Rodríguez, I., Pérez, C.C., Hidalgo, M., Molina, A., Sanz, J., Sánchez, M. (2002b). Evolución de la circunferencia escrotal y “skin flush sexual” en el macho cabrío de raza Florida. XXVI Jornadas Científicas y VI Internacionales de la SEOC, Valencia, España, 1028-1033.
- Dorado, J., Rodríguez, I., Pérez, C., Hidalgo, M., Sanz, J., Santiago, J., Sánchez, M. (2002c). Respuesta de la cabra Florida al tratamiento de once días con esponjas

Bibliografía

- vaginales. XXVI Jornadas Científicas y VI Internacionales de la SEOC, Valencia, España, 1022-1027.
- Dorado, J. (2003). Respuesta a la congelación-descongelación del espermatozoa de macho cabrío. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba, 165 pp.
- Dorado, J., Rodríguez, I., Hidalgo, M., Pérez, C.C., Corral, S., Sanz, J., Sánchez, M. (2003a). Estudio del efecto de la estación sobre la calidad del espermatozoa del macho cabrío de raza Florida. XXVIII Jornadas Científicas y VII Internacionales de la SEOC, Badajoz, España, 165-168.
- Dorado, J., Rodríguez, I., Hidalgo, M., Pérez, C., Corral, S., Sanz, J., Sánchez, M. (2003b). Eficacia del diagnóstico precoz de gestación mediante ecografía vía rectal en el ganado caprino Florida. XXVIII Jornadas Científicas y VII Internacionales de la SEOC, Badajoz, España, 161-164.
- Dresdner, R.D., Katz, D.F. (1981). Relationship of mammalian sperm motility and morphology to hydrodynamic aspects of cell function. *Biol. Reprod.* 25, 920-930.
- Drobnis, E.Z., Nelson, E.A., Lin, T.Y. (1982). The effect of freezing rate on motility and GOT release of frozen goat spermatozoa. *Proc. 3rd Int. Conf. On Goat Prod. And Disease*, Arizona, USA, 282.
- Dunner, S. (1991a). Calidad del semen de macho cabrío refrigerado en diluyentes a base de sustancias zwitteriónicas. I Motilidad. *ITEA 11*, 34-36.
- Dunner, S. (1991b). Calidad del semen de macho cabrío refrigerado en diluyentes a base de sustancias zwitteriónicas. II Endósmosis, formas normales y acrosomas normales. *ITEA 11*, 37-39.
- Dunner, S., Vazquez, I. (1991). Effects de milieu de conservation a base de substances amino-organiques sur la qualite de la semence de bouc mesuree in vitro apres conservation a +15°C ou +5°C. *Archivos de Zootecnia* 149(4), 391-401.
- Dunner, S. (1993). Freezing buck semen diluted in amine-organic buffers. *Anim. Prod.* 56(3), 387-391.
- Eggert-Kruse, W., Klinga, K., Schwalbach, B., Tilgen, W., Rohr, G., Runnebaum, B. (1993). Evaluation of polyacrylamide gel as substitute for human cervical mucus in the sperm penetration test. *Fertil. Steril.* 60(3), 540-549.

- Ericsson, S.A., Garner, D.L., Jhonson, L.A., Redelman, D., Ahmad K. (1990). Flow cytometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa processed using a new antibiotic combination. *Theriogenolgy* 33, 1211-1220.
- Esteso, MC, Fernández-Santos, MR., Soler, AJ., Garde, JJ. (2003). Head Dimensions of cryopreserved red deer spermatozoa are affected by thawing procedure. *CryoLetters* 24, 261-268.
- Evans, G., Maxwell, W.M.C. (1987). *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butterworth, London, 123pp.
- Fawcett, DW. (1989). *Tratado de histología*. Bloom-Fawcett. 11a Edición. Interamericana Mcgraw-Hill, Mexico DF, 809-816.
- First, NL., Parrish, J.J. (1987). In vitro fertilization of ruminants. *J. Reprod. Fert.* 34, 151-165.
- Fiser, P.S., Hansen, C., Underhill, H., Marcus, G.J. (1991). New thermal stress test to asses the viability of cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* 28, 454-459.
- Folch, J. (1984). The influence of age, photoperiodism and temperature on semen production of rams. In: Courot M (ed), *The male in Farm Animal Reproduction*. Amsterdam, 141-160.
- Folch, J. (2000). Manejo del morueco. XXV Jornadas Científicas SEOC, Producción ovina y caprina, 61-64.
- Foote, R.H. (1978). Factors influencing the quantity and quality of semen harvested from bulls, rams, boars and stallions. *J. Anim. Sci.* 47(2), 1-11.
- Foulkes, J.A., Watson, P.A. (1995). Hyaluronidase activity in seminal plasma as a method of assessing bull sperm integrity. *J. Reprod. Fert.* 43, 349-353.
- Franca, L.R., Becker-Silva, S.C. and Chiarini-García, H. (1999). The length of the cycle of seminiferous epithelium in goats (*Capra hircus*). *Tissue and Cell* 31(3), 274-280.
- Gadea, J. (1996). Predicción de la fertilidad "in vivo" de los eyaculados de verraco mediante parámetros rutinarios de contrastación seminal, pruebas bioquímicas y el test homólogo de penetración "in vivo". Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, 101 pp.
- 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

Bibliografía

- evaluation of sperm heads in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) using computer-assisted image analysis. *Int. J. Androl.* 21, 169–176.
- García Artiga, C., Vázquez, I., Garde, J., Martínez, E. (1993). Estudio in vitro de la viabilidad del semen congelado de morueco. *Investigación Agraria: Producción y Sanidad Animales* 8(1), 33-43.
- García, J., Ruttle, J. (1987). Artificial insemination of goats with diluted fresh semen. *Proc. IV Int. Confer. Goats, Brasilia, Brasil, II*, 1502-1503.
- García-López, N., Ollero, M., Muiño-Blanco, T., Cebrian-Pérez, J.A. (1996). A dextran swim-up procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma. *Theriogenology* 46(1), 141-151.
- Garde, J. (1993). Congelación de semen en la especie ovina: características biológicas de las dosis descongeladas. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 137 pp.
- Gledhill, BL, Darzynkiewicz, Z, Ringert, NR. (1971). Changes in deoxyribonucleoprotein during spermatogenesis in the bull: increased (3H) actinomycin D binding to nuclear chromatin of morphologically abnormal spermatozoa. *J. Reprod. Fertil* 26, 25-38.
- Glogowski, J., Demianowicz, W., Piros, B., Ciereszko, A. (1998). Determination of acrosin activity of boar spermatozoa by the clinical method: Optimization of the assay and changes during short-term storage of semen. *Theriogenology* 50, 861-872.
- Glover, T.D., Barrat, C.L.R., Tyler, J.P.P. and Hennessey, J.F. (1990). Sperm production and its control, En: *Human Male Fertility and Semen Analysis*, Academic Press, London.
- Gracia, A., Cabrera, F., Gonzalez, F., Batista, M., Forga, M., Calero, P. (1998). Efecto de la proporción de yema sobre la conservación del semen congelado en la Agrupación Caprina Canaria (Variedad Majorera). *XXIII Jornadas Científicas SEOC, Producción Ovina y Caprina*, 517-520.
- Graham, E.F., Crabo, B.G., Brown, K.I. (1972). Effect of some zwitter ion buffers on the freezing and storage of spermatozoa. I. *Bull. Journal of Dairy Science* 55, 372-378.

- Graham, E.F., Vazquez, I.A., Schmehl, M.K.L., Evensen, B.K. (1976). An assay of semen quality by use of sephadex filtration. VIII Int. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem, Kracow, 4, 896-899.
- Graham, E.F., Schmehl, M.K.H., Nelson, D.S. (1980). Problems with laboratory assays. 8th NAAB Tech. Conf. Reprod. & AI, Milwaukee, USA, 67-70.
- Graham, E.F., Nelson, D.S., Schmehl, M.K. (1982). Development of extender and techniques for frozen turkey semen. 1. Development Poult. Sci. 61(3), 550-557.
- Graham, J.K., Foote, R.H. (1987). Dilauroylphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and in vitro penetration of zona-free hamster eggs by bull sperm: II. A fertility assay for frozen-thawed semen. Gamete Res. 16, 147-158.
- Graham, J.K., Kunze, E., Hammerstedt, R.H. (1990). Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry. Biol. Reprod. 43, 55-64.
- Gravance, C.G., Lewis, K.M. and Casey, P.J. (1995). Computer automated sperm head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa. Theriogenology 44, 989–1002.
- Gravance, C.G., Vishwanath, R., Pitt, C. and Casey, P.J. (1996). Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. Theriogenology 46, 1205–1215.
- Gravance, CG, White, C, Robertson, KR, Champion, ZJ and Casey, PJ. (1997). The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of caprine sperm heads. Anim. Reprod. Sci. 49, 37-43.
- Gravance, CG, Vishwanath, R, Pitt, C, Garner, DL and Casey, PJ. (1998). Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. J. Androl. 19(6), 704-709.
- Grootte, O., Graffer, T., Olesen, I. (1992). Artificial insemination with frozen ram semen in Norway. Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod. 3, 1557-1559.
- Hafez, E.S.E. (1987). Semen evaluation. In: E.S.E. Hafez (Editor), Reproduction in Farm Animals, 5 th edn. Lea & Febiger, Philadelphia, 455-480.
- Hellemann, C., Jara, C. (1997). Efecto de un surfactante sobre la integridad de espermatozoides ovinos crioconservados. Arch. Med. Vet. 1, 153-160.
- Hermo, L., Barin, K. And Oko, R. (1994). Developmental expression of immobilin in the rat epididymis. Anat. Rec. 240, 86-103.

Bibliografía

- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Pérez, C., Dorado, M. and Sánchez, M. (2002). Parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide de macho cabrío. Jornadas Internacionales de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Valencia, España, 1053-1058.
- Hidalgo, M. (2003). Valoración de La calidad del esperma y su correlación con la fertilidad. I Jornadas de Reproducción Equina, Valencia, España.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., Pérez, C., Corral, S., Sanz, J. (2003a). Valoración objetiva de la morfología de la cabeza del espermatozoide del caballo de Pura Raza Española. IV Congreso Ibérico de Reproducción Animal, Las Palmas de Gran Canaria, España, 89.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., Pérez, C., Corral, S., Sanz, J., Sánchez, M. (2003b). Influencia del método de tinción en la valoración morfométrica de la cabeza del espermatozoide de macho cabrío. XXVIII Jornadas Científicas y VII Jornadas Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Badajoz, 185-187.
- Hube, A., Uribe, H. (1980). Efecto de diferentes temperaturas de descongelación sobre acrosomas y movimiento progresivo en semen bovino. 9th Intern. Cong. of Anim. Reprod. & AI, 233-236.
- Hunton, J.R., Flecker, S.E., Maxwell, W.M.C. (1987). Pregnancy rates following intra-uterine insemination with pellet or straw-frozen ram semen. J. Agric. Sci. 109, 189-191.
- Iguer-Ouada, M. and Verstegen, J. (2001). Evaluation of the Hamilton Thorn Computer Based automated system for dog semen analysis. Theriogenology 55, 733-749.
- Iritani, A., Nishikawa, Y. (1961). Proceedings for the Silver Jubilee. Lab. Anim. Husb., Coll. of Agric., Kyoto University, Japan.
- Jagoe, J.R., Washbrook, N.P., and Hudson, E.A. (1986). Morphometry of spermatozoa using semiautomatic image analysis. J. Clin. Pathol. 39, 1347-1352.
- Jasko, D.J., Bedford, S.J., Cook, N.L., Mumford, E.L., Squires, E.L., Pickett, B.W. (1993). Effects of antibiotics on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. Theriogenology 40, 885-893.

- Jegou, B. and Legac-Jegou, F. (1978). Androgen-binding protein in the seminal plasma of some mammalian species. *J. Endocr.* 77, 267-268.
- Jennings, J.J., Mcweeney, J. (1976). Effect of frequent ejaculation on semen characteristics in rams. *Vet. Rec.* 98, 230-233.
- Jequier, A.M. and Ukombe, E.B. (1983). Errors inherent in the performance of routine semen analysis. *Br. J. Urol.* 55, 434-436.
- Jeulin, C. and Lewin, L.M. (1996). Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Human. Reprod. Update.* 2, 87-102.
- Johnson, L.A., Maxwell, W.M.C., Dobrinsky, J.R., Welch, G.R. (1996). Staining sperm for viability assessment. *Reprod. Dom. Anim.* 31, 37-47.
- Jones, R.C. (1965). The use of dimethyl sulphoxide, glycerol and reconstituted skim milk for the preservation of ram spermatozoa. II. The influence of diluent composition and processing time during freezing to -79°C with dimethyl sulphoxide or glycerol or both compounds. *Aust. J. Biol. Sci.* 18, 887-900.
- Jouannet, P., Volochine, B., Deguent, P., Serres, C. and David, G. (1977). Light scattering determination of various characteristic parameters of spermatozoa motility in a series of human sperm. *Andrologia* 9, 36-49.
- Juneja, S.C., Swanson, R.J., Roudebush, W.E., Dodson, M.G. (1989). Routine human sperm function analysis and the sperm hipo-osmotic swelling test. *Biol. Reprod.* 40(1), 115.
- Karagiannidis, A., Varsakeli, S., Karatzas, G. (2000). Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born raised in Greece. *Theriogenology* 53, 1285-1293.
- Karatzas, G., Karagiannidis, A., Varsakeli, S., Brikas, P. (1997). Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology* 48(6), 1049-1059.
- Kaya, A., Aksoy, M., Tekeli, T. (2002). Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. *Small Ruminant Research* 44, 153-158.

Bibliografía

- Krishnamoorthy, R. (1981). Studies on certain sugars as cryoprotectants in semen extenders without and with reduced levels of glycerol for freezing the bull spermatozoa in straws. HAU Thesis abstr, 106-107.
- Kruger, T.F., Acosta, A.A., Simmonn, K.F., Swanson, R.J., Matta J.F. and Oehninger, S. (1988). Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 49, 112–117.
- 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.
- Kusunoki, H., Kato, S., Kanda, S. (1988). Identification of acrosome reacted goat sperm by trypan blue–giemsa method. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 59, 235-240.
- Kusunoki, H., Kato, S., Kanda, S. (1989). Induction of the acrosome reaction in goat spermatozoa in simple physiological salt solution. *J. Exp. Zool.*, 250(3), 346-8.
- Lacquet, F.A., Kruger, T.F., du Toit, T.C., Lombart, C.J., Sanchez Sarmiento, C.A., de Villiers, A. and Coetzee, K. (1996). Slide preparation and staining procedures for reliable results using computerised morphology (IVOS). *Arch. Androl.* 36, 133-138
- Leboeuf, B. (1992). Extensive application of Artificial Insemination in goats. Proceedings Vth International Conference on Goats, New-Dheli, India, part II, 298-308.
- Leclerc, P. and Goupil, S. (2002). Regulation of the human sperm tyrosine kinase c-yes. Activation by cyclic adenosine 3' 5'-monophosphate and inhibition by Ca (2+). *Biol. Reprod.* 67, 301-307.
- Lightfoot, R.J., Salamon, S. (1969). Freezing of ram semen by the pellet method. II. The effect of method of dilution, dilution rate, glycerol concentration, and duration of storage at 5°C prior to freezing on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 22, 1547-1560.
- Lincoln, G.A. (1987). Long-term stimulatory effects of a continuous infusion of LHRH agonist on testicular function in male red deer (*Cervus elaphus*). *J. Reprod. Fertil.* 80(1), 257-61.

- Lincoln, G.A. (1989). Seasonal aspects of testicular function. In: Burguer H. Krester D (eds). The testis. New York, 329-385.
- Lopez, A., Söderquist, L., Rodriguez-Martinez, H. (1999). Efecto de la temperatura y del tiempo de incubación sobre la evaluación de la integridad de la membrana en semen congelado de carnero. Archivos de Reproducción Animal 10, 30-35.
- Mareco, G., Arosteguy, R.P. (1994). Exitosa congelación de semen caprino en pajuelas. VII Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias.
- Marnet, B., Vieitez, G., Milhet, P., Richoilley, G., Lesourd, F., Parinaud, J. (2000). Computer-assisted assessment of sperm morphology: comparison with conventional techniques. Int. J. Androl. 23, 22-28.
- Martín, J.C., Klug, E., Günzel, A.R. (1978). Investigations on centrifugation of stallion semen and storage in large volume straws. 2nd Int. Symposium on Equine Reprod. Davis, California, USA, 24-28.
- Martínez, E., Ruiz, S., Roca, J., y Vázquez, J.M. (1989). Fecundación “in vitro” en los animales de granja. Ed: Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Murcia, Murcia.
- Mateos, E., Perez, B. (1994). Influencia del “lavado” en la calidad del semen caprino congelado. 7^a Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, Murcia, España, 320.
- Maxwell, W.M.C., Landers, A.J., Evans, G. (1995). Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straw and minitubes. Theriogenology 43(7), 1201-1210.
- Maxwell, W.M.C., Watson, P.F. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. Anim. Reprod. Sci. 42, 55-65.
- Maxwell, W.M.C., Welch, G.R., Johnson, L.A. (1997). Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. Reprod. Fertil. Dev. 8, 1165-1178.
- Mazur, P. (1985). Basic concepts in freezing cells. In: Johnson L.A. and Larsson K. (eds). Deep freezing of boar semen. Swedish University of Agriculture Sci., Uppsala, 91-111.

Bibliografía

- McCosker, P.J. (1969). Abnormal spermatozoan chromatin in infertile bulls. *J. Reprod. Fertil.* 18, 363-365.
- McKinnon, A.O., Voss, J.L. (1993). *Equine Reproduction*. Malvern, PA: Lea &Febiger, Philadelphia, 715-745.
- McRorie, R.A., Williams, W.L. (1974). Biochemistry of mammalian fertilization. *Ann. Rev. Biochem.* 43, 777.
- Memon, M.A. and Ott, R.S. (1981). Methods of semen preservation and artificial insemination in sheep and goats. *World. Rev. Anim. Prod.* 17(1), 19-25.
- Memon, M.A., Bretzlaff, K.N., Ott, R.S. (1985). Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 46(2), 473-475.
- 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.
- Meryman, H.T. (1966). *Crioprotective agents. Cryobiology*. Ed. Academic Press.
- Mole, J.R., Fitzgerald, J.A. (1990). Comparison of ram semen sperm interaction with bovine cervical mucus. *Theriogenology* 33(5), 1031-1043.
- Molinia, F.C., Evans, G., Maxwell, W.M.C. (1994). Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology* 42, 849-858.
- Monji, Y. (1988). Studies on deep freezing storage of bull, goat and boar semen. *J. Agric. Sci. Tokio Nogyo Daigoku*, 32, pp: 224-234. *Anim. Breed Abstr* 56, 6710.
- Moruzzi, J.F., Wyrobek, A.J., Mayal, B.H. and Gledhill, B.L. (1988). Quantification and classification of human sperm morphology by computer-assisted image analysis. *Fertil. Steril.* 50, 142-152.
- Nunes, J.F., Corteel, J.M., Combarous, Y., Baril, G. (1982). Role of seminal plasma in the in vitro survival of goat sperm. *Reprod. Nutr. Dev.* 22 (4), 611-620.
- Oettle, EE. (1986). Using a new acosome stain to evaluate sperm morphology. *Vet. Med. Mar*, 263-266.
- Ollero, M., Muiño-Blanco, T., Lopez-Pérez, M.J., Cebrian-Pérez, J.A. (1996). Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-current

- distribution in an aqueous two-phase system. Effect of different cryoprotectants. *J. Chrom.* 157-164.
- Ollero, M., Bescos, O., Cebrian-Perez, J.A., Muiño-Blanco, T. (1998). Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. *Theriogenology* 49, 547-555.
- Ombelet, W., Pollet, H., Bosmans, E. and Vereecken, A. (1997). Results of a questionnaire on sperm morphology assessment. *Hum. Reprod.* 12, 1015–1020.
- Overstreet, J.W., Katz, D.F., Hanson, F.W. and Fonseca, J. (1979). A simple inexpensive method for objective assessment of human sperm movement characteristics. *Fertil. Steril.* 31, 162-172.
- Parks, J.E., Graham, J.K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38 (2), 209-222.
- Pascual, M.L., Muiño-Blanco, T., Cebrian-Pérez, J.A., Lopez-Pérez, M.J. (1993). Sperm cell heterogeneity revealed by centrifugal counter current distribution in an aqueous two-phase system. *J. Chrom* 617, 51-57.
- Pasteur, M.D.X., Sabido, O., Maubon, I.M.D., Peerin-Cottier, M., Laurent, M.D.J. (1991). 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, 383-390.
- Pelletier, J., Chemineau, P., Delgadillo, J.A. (1988). Seasonality of sexual activity and its photoperiodic control in the adult ram and he-goat. *Proc. 11th Int. Cong. Anim. Reprod. AI, Dublin*, 5, 211-219.
- Pellicer, M.T., Combarous, Y. (1994). Efecto negativo sobre la viabilidad espermática del enzima triacilglicerol lipasa presente en la secreción de las glándulas bulbouretrales del macho cabrío. *7as Jornadas Internacionales de Reproducción Animal. Murcia, España*, 128.
- Pellicer-Rubio, M.T., Combarous, Y. (1998). Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *J. Reprod. Fertil.* 112(1), 95-105.
- Pereira, R.J., Tuli, R.K., Wallenhorst, S., Holtz, W. (2000). The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A23187 on in vitro induction of the acrosome

Bibliografía

- reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa. *Theriogenology* 54(2), 185-192.
- Perez Llano, B., Mateos Rex, E., Pintado, B. (1991). Características seminales del ganado caprino de la raza Verata. *ITEA* 11, 40-42.
- Perez, B., Mateos, E. (1993). Evolución del tamaño testicular en machos cabríos de las razas Verata y Malagueña. *Prod. Sanid. Anim.* 8(3), 257-268.
- 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.
- Perez Llano, B., Mateos Rex, E. (1995). Efecto del tipo de crioprotector externo y del porcentaje de glicerol sobre la calidad in vitro del semen congelado de macho cabrío. *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.* 10(3), 211-221.
- Perez, B., Mateos, E. (1996). Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malagueña breeds. *Small Ruminant Research* 23(1), 23-28.
- Phillips, P.H., Lardy, H.A. (1940). A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J. Dairy Sci.*, 23, 399-404.
- Pintado, B. (1991). Estudio físico-químico de cinco diluyentes de semen caprino con distintos métodos de conservación. *ITEA* 11, 28-30.
- Pintado, B., Pérez B, Gil, L. (1991). Efecto de cinco diluyentes en la conservación in vitro de semen de macho cabrío Verato. *ITEA* 11, 31-33.
- Polge, C., Smith, A.U., Parkes, A.S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164, 666-668.
- Ritar, A.J., Salamon, S. (1982). Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.* 35(3), 305-312.
- Ritar, A.J., Ball, P.D., O'May, P.J. (1990). Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reprod. Fertil. Dev.* 2(1), 27-34.
- Ritar, A.J., Salamon, S. (1991). Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. *Small Ruminant Research*, 4(1), 29-37.

- Ritar, A.J., Mendoza, G., Salamon, S., White, I.G. (1992). Frequent semen collection and sperm reserves of the male Angora goat (*Capra hircus*). *J. Reprod. Fertil.* 95(1), 97-102.
- Roca, J., Martinez, E., Vazquez, J.M., Ruiz, S., Coy, P. (1991a). Influencia de la edad sobre los parámetros reproductivos de machos cabríos de raza Murciano-Granadina. *Archivos de Zootecnia* 40, 173-179.
- Roca, J., Martinez, E., Vazquez, J.M., Ruiz, S., Coy, P. (1991b). Influence of season on testicle size and libido in male goats from the Mediterranean area. *Anim. Prod.* 52(2), 317-321.
- Roca, J., Martinez, E., Sánchez-Valverde, M.A., Ruiz, S., Vazquez, J.M. (1992a). Seasonal variations of semen quality in male goats: study of sperm abnormalities. *Theriogenology* 38(1), 115-125.
- Roca, J., Martinez, E., Vazquez, J.M., Coy, P. (1992b). Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area. *Anim. Reprod. Sci.* 29(3-4), 255-262.
- Roca, J., Carrizosa, J.A., Campos, I., Lafuente, A., Vazquez, J.M., Martinez, E. (1997). Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. *Small Ruminant Research* 25, 147-153.
- Rodríguez, I., Sanz, J., Acosta, M. (1989). Ficha protocolo para evaluar la fertilidad del caballo. 4ª Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, León, España.
- Rodríguez, I., Sanz, J., Pérez, C., Felipe, M., Dorado, J. and Hidalgo, M. (2001). Fertilidad in vivo del esperma congelado-descongelado. I Jornadas de Investigación. Córdoba, España, 317-321.
- Rodríguez, I., Dorado, J., Hidalgo, M., Pérez, C.C., Corral, S., Sanz, J. (2003). Influencia de la circunferencia escrotal y de los factores ambientales sobre la producción seminal del macho de raza Florida. IV Congreso Ibérico de Reproducción Animal, LasPalmas de Gran Canaria, España, 67.
- Rodríguez, I., Hidalgo, M., Dorado, J., Pérez, C., Sanz, J. (2004). Effect of three staining procedures on the accuracy of image processing and stallion sperm head

Bibliografía

- morphometry using the Sperm Class Analyzer (SCA). *Reprod. Dom. Anim.* 39(4), 266.
- Rodríguez, O.L., Brendtson, W.E., Ennen, B.D. and Pickett B.W. (1975). Effects of rates of freezing, thawing and level of glycerol on the survival of bovine spermatozoa in straws. *J. Anim. Sci.* 41, 129-136.
- Roy, A. (1957). Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature* 79, 318-319.
- Royere, D, Hamamah, S, Nicolle, JC, Lansac, J. Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: fluorescence acridine orange staining and and fueelgen-ADN cytophotometric studies. (1988). *Gamete Res.* 21, 51-57.
- Rugg, C.D., Berndtson, W.E., Mortimer, R.G., Pickett, B.W. (1977). *J. Anim. Sci.*, 44, pp: 266-270.
- Saacke, R.G. and Marschall, CE. (1968). Observation on the acrosomal cap of fixed and unfixed bobine spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 16, 511-514.
- Saacke, R.G., White, J.M., (1972). Semen quality test and their relationship to fertility. *Proc. 4th tech. Conf. Artif. Insem. Reprod. NAAB*, 22.
- Saacke, R.G., Marshall, C.E., Vinson, W.E., O'connor, M.L., Chandler, J.E., Mullins, K.J., Amann, R.P., Wallace, R.A., Vincel, W.N., Kellgren, H.C. (1980). Semen quality and heterospermic insemination in cattle. *IX Int. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem. Madrid., España*, 5, 75.
- Saacke, R.G. (1984). Semen quality: importance of and influencing factors. *Proc. 10th Tech. Conf. AI Reprod. National Association of Animals Breeders*, pp: 30-36.
- Sakkas, D., Manicardi, G., Bianchi, P.G., Bizarro D. and Bianchi, U. (1995). Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* 52, 1149-1155.
- Salamon, S., Maxwell, W.M.C. (1995a). Frozen storage of ram semen: I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 37, 185-249.

- Salamon, S., Maxwell, W.M.C. (1995b). Frozen storage of ram semen: II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim. Reprod. Sci.* 38, 1-36.
- Salisbury, G.W., Vandemark, N.L., Lodge, J.R. (1978). *Physiology of Reproduction and artificial Insemination of Cattle*. G.W. Salisbury ed. W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- Salles, M.G.F., Nunes, J.F. (1993). Agua de coco in natura, adicionada de zeatina e de JYP, como diluidores do sémen caprino. 6º congreso Internacional de Medicina Veterinaria em Língua Portuguesa. Salvador, Brasil, K6, 419-420.
- Sánchez Rodríguez, M., Herrera Garcia, M., Sánchez Romero, J.A., Alvarez Núñez, J.J. (1990). Origen, censo y distribución de la cabra florida. XV Jornadas Científicas de la SEOC, Córdoba, España.
- Sancho, M., Pérez-Sánchez, P., Tablado, L., de Monserrat, J.J. and Soler, C. (1998). Computer-assisted morphometric analysis of ram sperm heads: evaluation of different fixative techniques. *Theriogenology* 50, 27–37.
- Sanz, J., Rodríguez, I., Acosta, M., Pérez, C., Mota, J. (1999). Situación actual de la congelación de esperma equino. II Congreso Ibérico de Reproducción Animal, Lugo, España, 175-178.
- Sekoni, V.O. and Gustafsson, B.K. (1987). Seasonal variations in the incidence of sperm morphological abnormalities in dairy bulls regularly used for artificial insemination. *Br. Vet. J.* 143, 312–317.
- Shanis, B.S., Check, J.H., Bollendorf, A. (1989). Interpretation and misinterpretation of semen parameters. *Arch. Androl.* 23, 213-217.
- Shina, N.K., Wani, G.M., Sahni K.L. (1981). Effect of seasons and age on seminal attributes of Jamunapari buck. *Indian Vet. J.* 58(12), 963-965.
- Singer, S.J. and Nicholson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.
- Singh, J., Pangawkar, G.R., Biswas, R.K., Kumar, N. (1991). Studies on buffalo sperm morphology during various stages of freezing in certain extenders. *Indian J. Anim. Reprod.* 12, 126-129.

Bibliografía

- Singh, J. Pangawkar, G.R., Shrivastava, A.K. (1992). Efficacy of certain extenders on leakage of phosphatase from buffalo spermatozoa during deep freezing. *Indian J. Anim. Reprod.* 13, 35-38.
- Singh, M.P., Sinha, A.K., Singh, B.K. (1995). Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology* 43(6), 1047-1053.
- Singh, M.P., Sinha, A.K., Singh, B.K., Prasad, R.L. (1996). Effect of cryoprotectants on release of various enzymes from buck spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 45, 405-416.
- Skalet, L.H., Rodrigues, H.D., Goyal, H.O., Maloney, M.A., Vig, M.M., Noble, R.C. (1988). Effects of age and season on the type and occurrence of sperm abnormalities in Nubian bucks. *Am. J. Vet. Res.*, 49(8), 1284-1289.
- Smith, A.H. and Polage, C. (1950). Survival of spermatozoa at low temperatures. *Nature* 166, 668-671.
- Söderquist, L., Madrid-Bury, N., Rodríguez-Martínez, H. (1997). Assessment of ram membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology* 48(7), 1115-1125.
- Soler, C., Yeung, C.H. and Cooper TG. (1994). Development of sperm motility patterns in the murine epididymis. *Int. J. Androl* 17, 271-278.
- Soler, C., Pérez-Sánchez, F., Schulze, V., Bergmann, M., Oberpenning, F., Yeung C.H. and Cooper, T.G. (2000). Objective evaluation of the morphology of human epididymal sperm heads. *Int. J. Androl.* 23, 77-84.
- Soler, C., de Monserrat, J.J., Gutierrez, R., Núñez, J., Núñez, M., Sancho, M., Pérez-Sánchez, F., Cooper, T.G. (2003). Use the Sperm Class Analyzer for objective assessment of human sperm morphology. *Int. J. Androl.* 26, 262-270.
- Summermatter, P., Fuschini, E. (1995). Semen productivity of different Swiss goat breeds. *Reprod. Dom. Anim.* 30(3), 129-132.
- Tablado, L., Pérez-Sánchez, F., Núñez, J., Núñez, M. and Soler, C. (1998). Effects of exposure to static magnetic fields on the morphology and morphometry of mouse epididymal sperm. *Bioelectromagnetics* 19, 377-383.

- Talbot, P., Chacon, R.S. (1981). A triple technique for evaluating acrosome reaction of human sperm. *J. Exp. Zool.*, 215, 201-208.
- Thurston, L.M., Watson, P.F., Mileham, A.J. and Holt, W.V. (2001). Morphologically distinct sperm subpopulations defined by fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J. Androl* 22, 382-394.
- Tuli, R.K., Holtz, W. (1992). The effect of zwitterions buffers on the freezability of Boer goat semen. *Theriogenology* 37, 947-951.
- Turner, T.T. and Giles, R.D. (1982). Sperm motility-inhibiting factor in rat epididymis. *Am. J. Physiol.* 242, 199-203.
- Uwland, J. (1984). Possibilities and limitations of semen evaluation for the prognosis of male fertility. In: *The male in farm animal reproduction*, edited by M. Courot, 269-289.
- Valcárcel, A., de las Heras, M.A., Pérez, L., Moses, D.F., Baldassarre, H. (1994). Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. *Theriogenology* 41(2), 483-489.
- Valcarcel, A., Heras, M.A., Pérez, L., Moses, D.F., Baldassarre, H., Heras, M.A. (1996). Assessment of the acrosomal status of membrane intact ram spermatozoa after freezing and thawing by simultaneous lectin-Hoechst 33258 staining. *Anim. Reprod. Sci.* 45, 299-309.
- Varner, D.D., Ward, C.R., Storey, B., Kenney, R. (1987). Induction and characterization of acrosome reaction in equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 48(9), 1383-9.
- Vazquez, J.M., Martinez, E., Roca, J., Coy, P., Ruiz, S. (1992). Use of Triple stain technique for simultaneous assessment of vitality and acrosomal status in boar spermatozoa. *Theriogenology* 38(5), 843-852.
- Vazquez, I., Cortes, S., Borque, C. (1998). Conservación del semen de macho cabrío. XXIII Jornadas Científicas SEOC, Producción Ovina y Caprina, Vitoria, España, Ponencia 2, 31-36.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onelin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 149-179.

Bibliografía

- Vijil, E., Gonzalo, C., Ruiz-Poveda, J., Ciudad, C. (1986). Evolución estacional del diámetro testicular en el ovino Karakul: Repercusión sobre el comportamiento copulatorio y características seminales. CENSYRA de Valdepeñas, 132-149.
- Voss, J.L., Pickett, B.W. and Squires, E.L. (1981). Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 178, 287-289.
- Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Taylor, W.A. (1994). Testicular and epididymal sperm content in grazing Cashmere bucks: seasonal variation and prediction from measurements in vivo. *Reprod. Fertil. Dev.* 6(6), 727-736.
- Watson, P.F. (1981). The effect of cold shock on sperm cells membranes. En: *Effects of low temperatures on biological membranes*, Morris, G.J. and Clarke, A. Academic Press, Orlando, Fla/London, 189-417.
- Watson, P.F. (1990). Artificial insemination and preservation of semen. En: Laming, G.E. (ed), *Marshall's Physiology of Reproduction. 2.: Reproduction in the male.* Churchill Livingstone (ed), Edimburgo, 747-869.
- Watson, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 871-891.
- Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60-61, 481-492.
- Weitze, K.F. and Petzoldt, R. (1992). Preservation of semen. *Reprod. Sci.* 28, 229-235.
- 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. (1991). Determination of the capacity of ram epididymal and ejaculated sperm to undergo the acrosome reaction and penetrate ova. *Biol. Reprod.* 44(6), 1080-1091.
- Yanagimachi, R. (1988). Mammalian fertilization. In: *The physiology of reproduction.* Ed. E Knobil and J.D. Neill. Raven Press, New York, 135-185.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. In: *The physiology of reproduction.* Second Edition. Ed. E Knobil and J.D. Neill. Raven Press Ltd, New York, 189-317.

Zaini, A., Jennings, M.G. and Baker, H.W.G. (1985). Are conventional sperm morphology and motility assessments of predictive value in subfertile men. *Int J Androl* 8, 427–435.

XI. ABREVIATURAS

apdo.: Apartado	mod.: Modelo
C: Concentración	MRP: Movimiento Rápido Progresivo
cc: Centímetro cúbico	MT: Movimiento total
cm: Centímetro	N: Normalidad
cm²: Centímetro cuadrado	°C: Grado centígrado
col.: Colaboradores	p: Nivel de confianza
FP: Fotoperiodo	pag.: Página
gr: Gramo	r: Coeficiente de correlación
h: Hora	spz: Espermatozoides
I: Integridad	T: Diluyente Tris
Km.: Kilómetro	T^a: Temperatura ambiental media
L: Diluyente Lácteo	Tris: Triladyl [®]
l: litro	UI: Unidades Internacionales
Lácteo: Gent [®]	VA: Vagina artificial
m: Metro	VE: Volumen eyaculado
m²: Metro cuadrado	vs: Versus
mg: Miligramo	µg: Microgramo
min.: Minuto	µl: Microlitro
ml: Mililitro	µm: Micrómetro
mm: Milímetro	

XII. ANEXO

Ficha 1. Valoración del espermatozoide.

<u>Fecha:</u>	<u>Nº crotal:</u>	<u>Edad:</u>
<u>Recogida espermatozoide:</u>		<u>Eyaculado</u>
Hora		
Técnico		
Tª vagina		
Observaciones		
<u>Comportamiento sexual:</u>		
Libido		
Tiempo a la 1ª erección		
Tiempo al 1º salto		
Tiempo eyaculación		
Nº saltos para eyaculación		
<u>Control espermatozoide</u>		
Aspecto		
Color/olor		
V (ml)		
pH		
MT		
MRP		
C (x10 ⁶ spz/ml)		
<u>Morfología (Tinción)</u>		
% macrocabezas/filiforme		
% microcabezas/piriforme		
% cabeza doble		
% cabezas caídas		
% cabezas sueltas		
% inserción abaxial		
% pieza intermedia doblada		
% pieza intermedia engrosada		
% gota citoplasmática p-d		
% cola lazo		
%cola gancho		
% cola en ovillo		
Otras células		
<u>Acrosoma (Tinción)</u>		
% íntegros		
% activados		
% desnudos		
<u>Morfometría</u>		
Dilución		
Extensiones		
Tinciones:		
DQ:		
HC		
HH:		

VE= volumen eyaculado; MRP= movimiento rápido progresivo; C= concentración espermática;
DQ=Diff-Quik, HC=Hemacolor; HH= Hematoxilina de Harris

Ficha 2. Valoración morfológica y del acrosoma.

Macho:	Identificación:	Fecha estudio:	Tinción:	Fecha congelación:	Observaciones:
---------------	------------------------	-----------------------	-----------------	---------------------------	-----------------------

MORFOLOGIA

ACROSOMA

% Normales:

%Anormales:

% Anomalías Primarias:

% Anomalías secundarias:

%Integro:

%Activado:

%Desnudo:

	MORFOLOGIA													ACROSOMA		
	N	Cb suelt	Cb caíd	Cb dobl	Macro/ filif	Mic/ Pir	In Abx.	GC P-D	PID	PIE	C lazo	C Ganc	C Ovil	I	A	D
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																
10																
11																
12																
13																
14																
15																
16																
17																
18																
19																
20																

Totales:

N= espermatozoides normales; Cb suelt= cabeza suelta; Cb caíd= cabeza caída; Cb dobl= cabeza doble; Macr= macrocabeza; Filif= cabeza filiforme; Mic= microcabeza; Pir= cabeza piriforme; In Abax= inserción abaxial; GCP= gota citoplasmática proximal; GCD= gota citoplasmática distal; PID= pieza intermedia doblada; PIE= pieza intermedia engrosada; C lazo= cola lazo; C Ganc= cola gancho; C Ovil= cola ovillo; I= acrosoma íntegro; A= acrosoma activado; D= acrosopma desnudo.

Ficha 3. Congelación de esperma.

<u>Fecha:</u>	<u>Nº crotal macho:</u>	<u>Hora:</u>	<u>Identificación:</u>
		Extensiones Morfometría:	
		Tinciones:	
Volumen eyaculado		SP:	h
		DQ:	h
Volumen procesado:			
<u>Dilución:</u>	ml sp + DPBS (h)	<u>Id caso:</u>	<u>Id caso:</u>
		I: h.	I: h.
		F: h.	F: h.
		3 ser.	3 ser.
<u>Lavado:</u>	ml esperma + Biladyl 1:9 (2500 rpm= 20 min.) ==		h.
<u>Concentración Espermática:</u>			
Media:			
M.R.P.:			
Dosis 125×10^6 spz MRP/ml en 0.5 ml:			
<u>Añadir diluyente:</u>			
<u>Refrigeración (5° C):</u> Equitainer (h.).			
-refrigeración de a h.			
<u>Envasado:</u>			
-de	a h.	dosis 0.5 ml (APV / US).⇒	
		dosis 0.5 ml (APV / US).⇒	
<u>Curva de vapor de Nitrógeno líquido (20 min):</u>			
<u>Almacenaje en Bombona de Nitrógeno líquido:</u>			
- dosis	macrotubos	h.	Canister:
- dosis	macrotubos		

Ficha 4. Descongelación de Dosis.

<u>DOSIS TRIS :</u>			
Fecha Congelación:	Hora:	h. (39° C= 30'').	Canister:
Fecha Descongelación	Sello:		
Dilución: (h.)	↑	Extensiones: h
	Tubo	↓	Tinciones:
			SP:
			DQ:
Control 5' : (_____ h)		↑	Control 60' (_____ h).
1ª gota	↑ I	h	↑
Id:	↓ F	h	↓
			3 ser
2ª gota :	↑ I	h	↑
Id:	↓ F	h	↓
			3 ser
			2ª gota
			I
			h
			↓
			3 ser
			1ª gota
			I
			h
			↓
			3 ser
			F
			h
			↓
			3 ser
<u>DOSIS LACTEO :</u>			
Fecha Congelación:	Hora:	h. (39° C= 30'').	Canister:
Fecha Descongelación	Sello:		
Dilución: (h.)	↑	Extensiones: h
	Tubo	↓	Tinciones:
			SP:
			DQ:
Control 5' : (_____ h)		↑	Control 60' (_____ h).
1ª gota	↑ I	h.	↑
Id:	↓ F	h.	↓
			3 ser
2ª gota :	↑ I	h	↑
Id:	↓ F	h.	↓
			3 ser
			2ª gota
			I
			h
			↓
			3 ser
			1ª gota
			I
			h
			↓
			3 ser
			F
			h
			↓
			3 ser

