



UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA, CIRUGÍA Y ANATOMÍA  
VETERINARIA

VALORACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CRIOPRESERVACIÓN  
ESPERMÁTICA DEL SEMEN PORCINO MEDIANTE TÉCNICAS DE  
CHOQUE A *FRIGORE* Y TERMORRESISTENCIA.

*Memoria que presenta para optar al grado de Doctor el Licenciado en  
Veterinaria*

RAÚL GONZÁLEZ URDIALES

*León, Enero de 2010*



*A mis padres y a Ana.*





*La ilusión al ver terminado este trabajo queda empañada por su ausencia, D. Miguel, lamentaré siempre no haberlo concluido antes para que hubiera formado parte del mismo como miembro del Tribunal, como a ambos nos hubiese gustado. Quiero expresar en estas líneas la admiración y el enorme aprecio que le he tenido, y decirle que mantendré en el recuerdo con orgullo y emoción sus amenas y didácticas conversaciones, así como el trato cariñoso que siempre me dispensó, por el que le estaré eternamente agradecido.*



# Agradecimientos

Este trabajo ha sido desarrollado gracias a la colaboración desinteresada de multitud de personas, por lo que es de justicia mostrar un más que sincero reconocimiento por dicha colaboración y un profundo agradecimiento a todas ellas, y en especial:

- A mis directores, el Dr. Juan Carlos Domínguez Fernández de Tejerina y el Dr. Jesús Peláez García de la Puerta; al primero, por introducirme en el campo de la Reproducción Animal y por facilitarme el acceso al mercado laboral ya hace más de nueve años, pero además, por mostrarme su constante apoyo y confianza en aquellas ideas que pretendía desarrollar y por proporcionarme los recursos materiales a su alcance para posibilitar la realización de esta Tesis Doctoral; al segundo, por su amistad, por dedicar parte de su tiempo a formarme en la manipulación y contrastación seminal y por inculcarme el rigor y la disciplina necesarios para realizar un buen trabajo en el laboratorio.
- A mi gran amigo y compañero de fatigas, el Dr. Fernando Tejerina Ampudia, por tirar de mí cuando las cosas no iban bien, compartiendo muchas decepciones pero también buenos momentos en aquellos interminables días de trabajo, por su ayuda constante y desinteresada, invirtiendo su tiempo y esfuerzo para facilitarme en todo lo posible el desarrollo de esta Tesis, por inculcarme su constancia, su esfuerzo y su buen hacer que han sido imprescindibles para que este barco llegue a buen puerto; y también por su calidad como persona, que hace que sea un ejemplo a seguir.
- A Sergio Bernal y a Sonia Cárdenas, por colaborar en este trabajo, estando constantemente dispuestos a ayudar en aquello que requiriese, y además, por su amistad y por su optimismo contagioso. Y cómo no, al pequeño Santiaguín, que se nos metió a todos en el bolsillo con su inmenso cariño y alegría; Santiago, cuando crezcas y, allí en México, empieces a ser consciente de que posees el don de tener siempre la razón, recuerda que es un vestigio del lugar donde naciste; un beso cazurrín, de tu padrino U.
- A todos mis compañeros de Centrotec S.A., cuya infraestructura me posibilitó la realización de esta Tesis, empezando por la Dra. Beatriz Alegre, por ayudarme en el trabajo cuando éste se solapaba con el desarrollo de alguno de los experimentos. A Erica, Adrián, Álvaro, Jesús Olmo y Raúl por estar dispuestos a echarme una mano en todo momento, colaborando activamente en la parte experimental.
- Al Dr. Humberto Cisale, por sus sabios consejos, por su disposición constante a ayudarme en aquello que yo requiriese y por compartir sus vastos conocimientos en criobiología,

biofísica y valoración seminal, que tanto me han aportado en el desarrollo de este trabajo y en el resto de mi labor profesional.

- Al Dr. Manuel Castejón, por la generosidad que ha mostrado poniendo a nuestro servicio su conocimiento en el análisis estadístico de poblaciones, diseñando los métodos utilizados en parte de esta tesis doctoral, además de invertir de forma desinteresada su tiempo para resolver todos los problemas que se me plantearon (fundamentalmente con el LyX).
- Al resto de compañeros de la Unidad de Reproducción y Obstetricia, especialmente a José Carlos García, Francisco Abad “Chisco”, Miguel Abad Valcarce “Michel”, Cristian Córdova, David Martín, Rocío y a Álvaro Ferreras, del que guardo un emocionado recuerdo, a todos ellos por su disposición permanente tanto para ayudarme en lo que necesitase, como para colaborar en cualquier proyecto que se me ocurriese.
- Al Dr. Julen Susperregui, por resolver algunas de mis dudas y mostrarme la vía más adecuada para la ejecución del análisis de regresión lineal y la interpretación de los resultados obtenidos.
- Al Dr. Carles Soler y a Francisco Blasco de PROISER R+D, por encargarse de nuestra formación inicial en el análisis computarizado de semen y por estar siempre dispuestos a resolver todos aquellos problemas que nos surgieron, tanto técnicos como infraestructurales.
- A César S. Morión, por poner a mi servicio sus amplios conocimientos de la lengua inglesa, facilitándome con ello la elaboración del *Summary* de este trabajo.
- A la Dra. Maite Carbajo, por su cercanía, sus buenos consejos y su ayuda desinteresada.
- A la empresa de reprografía CERSA, y en especial a mi madre M<sup>a</sup> Jesús y a Raquel, M<sup>a</sup> Jesús García y Mila, por estar siempre dispuestas a cumplir mis peticiones en el menor tiempo posible, facilitándome enormemente el desarrollo de mi trabajo.

Tanta importancia como aquellos que han colaborado directamente en el diseño y desarrollo de esta Tesis Doctoral tienen aquellos otros que han luchado para que yo me encontrase tanto física como anímicamente en las mejores condiciones posibles, por eso, gracias:

- A todos mis amigos, a los que he desatendido enormemente en los últimos años debido a la falta de tiempo libre, y que aun así, siempre me han dado su apoyo incondicional y sincero.
- A Cipri y a Jose, por preocuparse por mí y acogerme desde el primer momento como si de otro hijo suyo se tratara, por trabajar para que tuviese el camino más fácil y por poner siempre en mis manos todo lo que estaba en las suyas.
- A toda mi familia, por el interés y el apoyo constantes que han mostrado en los proyectos que he llevado a cabo, y fundamentalmente a mis abuelos, Mundo, al que echo mucho de menos, Chelo y Quico; este último ha sido el principal responsable de que yo eligiera esta profesión, al despertar en mí, cuando todavía era un niño, la pasión por la Veterinaria, explicándome las prácticas médicas y quirúrgicas que se veía obligado a realizar a sus

queridas ovejas y a sus no tan queridas vacas, y a las de todo aquel que requiriese su ayuda.

- A mi hermano Carlos, que ha sido siempre un gran apoyo y al que no sé como agradecer los esfuerzos realizados, junto a la Dra. Yolanda Martínez, para tratar de solventar los problemas de salud que me acuciaron durante año y medio.
- A mis padres, que lo han dado todo para que yo pudiese conseguir mis metas, inculcándome valores como el esfuerzo, la perseverancia o la importancia del trabajo bien hecho. Nunca os podré agradecer suficientemente todo lo que me habéis dado.
- A mis pequeñas y queridas sobrinas Alem y Sara, jamás imaginé que vuestra llegada pudiese generar en mí la cascada de sentimientos que ha supuesto; vuestra alegría, vuestro cariño y las tremendas ganas de vivir que demostráis en cada momento hacen que los problemas desaparezcan en menos de un segundo, no cambiéis nunca.
- Y cómo no, a Ana, a la que corresponde más de la mitad de esta tesis doctoral por estar siempre dispuesta a animarme en mis malos momentos, por perder su “escaso” tiempo libre en ayudarme más de lo imaginable, por quererme, por aguantarme y por estar siempre ahí, me lo mereciese o no. Trataré de compensar todos los años que me has esperado pacientemente.



# Índice general

ÍNDICE DE FIGURAS	XVI
ÍNDICE DE TABLAS	XXI
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	XXIX
<b>1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>7</b>
2.1. Criopreservación de semen. . . . .	9
2.1.1. Introducción. . . . .	9
2.1.1.1. Nacimiento y desarrollo de la técnica. . . . .	9
2.1.1.2. Panorama de la criopreservación en la especie porcina. . . . .	10
2.1.2. Efecto de la criopreservación sobre la célula espermática. . . . .	13
2.1.2.1. Efectos del enfriamiento celular. . . . .	14
2.1.2.2. Efectos de la formación y disolución de hielo. . . . .	21
2.1.2.3. Efectos de la adición del agente crioprotector. . . . .	30
2.1.3. Efectos y consecuencias de la criopreservación sobre la estructura y funcio- nalidad celular. . . . .	32
2.1.3.1. Efecto y consecuencias del proceso de criopreservación sobre las membranas. . . . .	32
2.1.3.2. Efectos sobre el citoesqueleto. . . . .	34
2.1.3.3. Efectos sobre la movilidad celular. . . . .	35
2.1.3.4. Efectos sobre el núcleo de la célula. . . . .	36
2.1.3.5. Otros efectos que alteran la capacidad fecundante de los esper- matozoides. . . . .	37
2.2. Técnicas de contrastación seminal. . . . .	38
2.2.1. Introducción. . . . .	38
2.2.2. Técnicas de contrastación seminal. . . . .	40
2.2.2.1. Valoración macroscópica del eyaculado. . . . .	40
2.2.2.2. Cálculo de la concentración espermática. . . . .	41
2.2.2.3. Evaluación de la movilidad espermática. . . . .	42
2.2.2.4. Evaluación de la morfología espermática. . . . .	44
	XI

2.2.2.5.	Evaluación de la integridad de la membrana plasmática (vitalidad espermática). . . . .	45
2.2.2.6.	Evaluación de la integridad de la membrana acrosómica y del <i>status</i> de capacitación. . . . .	50
2.2.2.7.	Valoración de la función mitocondrial. . . . .	56
2.2.2.8.	Valoración de la integridad del ADN. . . . .	57
2.2.3.	Citometría de flujo. . . . .	59
2.3.	Análisis de la movilidad espermática mediante sistemas computarizados. . . . .	60
2.3.1.	Introducción. . . . .	60
2.3.2.	Desarrollo, evolución y comercialización de los sistemas CASA. . . . .	63
2.3.2.1.	Introducción. . . . .	63
2.3.2.2.	Influencia de la electrónica en el desarrollo de los sistemas CASA. . . . .	63
2.3.2.3.	Evolución y comercialización de los sistemas CASA. . . . .	65
2.3.3.	El sistema CASA. . . . .	66
2.3.3.1.	Componentes y funcionamiento. . . . .	66
2.3.3.2.	Cuantificación del movimiento espermático. . . . .	69
2.3.4.	Fuentes de variación de los resultados en los sistemas CASA. . . . .	76
2.3.4.1.	Fuentes de variación originadas por los equipos de captura y análisis de imágenes. . . . .	76
2.3.4.2.	Factores de variación derivados de las condiciones del análisis. . . . .	79
<b>3.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>83</b>
3.1.	Productos y soluciones. . . . .	85
3.2.	Material biológico. . . . .	87
3.2.1.	Animales empleados. . . . .	87
3.2.2.	Recolección seminal. . . . .	88
3.3.	Contrastación seminal. . . . .	89
3.3.1.	Valoración rutinaria <i>in vitro</i> de la calidad seminal. . . . .	89
3.3.2.	Otras valoraciones seminales. . . . .	90
3.3.2.1.	Valoración de la integridad acrosómica. . . . .	91
3.3.2.2.	Análisis de la integridad de la membrana plasmática. . . . .	91
3.3.2.3.	Metodología general del análisis computarizado de la movilidad de los espermatozoides. . . . .	92
3.4.	Congelación y descongelación seminal. . . . .	95
3.5.	Grupos de calidad establecidos. . . . .	97
3.6.	Análisis estadístico. . . . .	98
3.7.	Diseño experimental. . . . .	100
3.7.1.	Experimento 1: Estudio de las pruebas de laboratorio como indicadoras de la congelabilidad seminal. . . . .	100
3.7.1.1.	Valoración convencional del semen. . . . .	102
3.7.1.2.	Realización de pruebas hiposmóticas (HOST y ORT). . . . .	103



3.7.1.3.	Evaluación de la resistencia de las células espermáticas a un estrés por calor (termorresistencia). . . . .	106
3.7.1.4.	Evaluación de la resistencia de las células espermáticas a un choque <i>a frigore</i> . . . . .	108
3.7.2.	Experimento 2: Estudio cinético mediante un sistema de análisis computarizado de semen (CASA) y su importancia como indicador de la congelabilidad. . . . .	110
3.7.2.1.	Descripción y análisis de los parámetros cinéticos de los espermatozoides. . . . .	111
3.7.2.2.	Identificación y distribución de subpoblaciones cinéticas. . . . .	112
3.7.3.	Experimento 3: Estudio de la resistencia al choque <i>a frigore</i> . . . . .	114
3.7.3.1.	Influencia de la inmadurez espermática en la resistencia celular al choque <i>a frigore</i> . . . . .	114
3.7.3.2.	Efecto del diluyente comercial y de la presencia de plasma seminal en la resistencia al choque <i>a frigore</i> . . . . .	116
3.7.3.3.	Influencia del tiempo de incubación previo sobre la congelabilidad espermática. . . . .	118
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>121</b>
4.1.	Análisis de las muestras descongeladas. . . . .	123
4.1.1.	Valores obtenidos para los parámetros estudiados en las muestras descongeladas. . . . .	123
4.1.2.	Resistencia de los diferentes eyaculados al proceso de criopreservación. . . . .	126
4.1.3.	Grupos de calidad establecidos. . . . .	131
4.2.	Experimento 1: Estudio de las pruebas de laboratorio como indicadoras de la congelabilidad seminal. . . . .	133
4.2.1.	Valoración convencional del semen. . . . .	133
4.2.1.1.	Análisis de los resultados obtenidos. . . . .	133
4.2.1.2.	Influencia de la aptitud de un eyaculado para la congelación sobre la respuesta a las pruebas rutinarias de contrastación seminal. . . . .	138
4.2.1.3.	Determinación de la congelabilidad de un eyaculado a partir de los resultados obtenidos en la valoración convencional. . . . .	140
4.2.2.	Evaluación de la resistencia de las células espermáticas a un estrés hiposmótico (HOST Y ORT). . . . .	141
4.2.2.1.	Análisis de los resultados obtenidos. . . . .	141
4.2.2.2.	Estudio de la correlación existente entre las distintas pruebas hiposmóticas realizadas. . . . .	143
4.2.2.3.	Influencia de la aptitud para la congelación de un eyaculado sobre la respuesta al estrés osmótico. . . . .	144
4.2.2.4.	Determinación de la congelabilidad de un eyaculado a partir de la respuesta observada al estrés osmótico. . . . .	145

4.2.3.	Evaluación de la resistencia de las células espermáticas a un estrés por calor (termorresistencia).	146
4.2.3.1.	Análisis de los resultados obtenidos.	146
4.2.3.2.	Influencia de la aptitud para la congelación de un eyaculado sobre la respuesta al estrés por calor.	154
4.2.3.3.	Determinación de la congelabilidad de un eyaculado a partir de los resultados obtenidos tras la realización de un estrés por calor.	157
4.2.4.	Evaluación de la resistencia de las células espermáticas a un choque <i>a frigore</i> .	160
4.2.4.1.	Análisis de los resultados obtenidos.	160
4.2.4.2.	Influencia de la aptitud para la congelación de un eyaculado sobre la respuesta al choque <i>a frigore</i> .	168
4.2.4.3.	Determinación de la congelabilidad de un eyaculado a partir de los resultados obtenidos tras un choque <i>a frigore</i> .	171
4.3.	Experimento 2: Evaluación de los patrones cinéticos descritos por los espermatozoides.	175
4.3.1.	Respuesta y evolución de los parámetros cinéticos individuales de los espermatozoides analizados.	175
4.3.1.1.	Respuesta y evolución de los parámetros cinéticos individuales.	175
4.3.1.2.	Respuesta de los parámetros cinéticos individuales en función de la aptitud para la congelación de los diferentes eyaculados.	184
4.3.1.3.	Determinación de la congelabilidad de un eyaculado a partir de los valores observados en los parámetros cinéticos individuales.	186
4.3.2.	Estudio de subpoblaciones a partir de los parámetros cinéticos de los espermatozoides.	192
4.3.2.1.	Determinación de las subpoblaciones cinéticas presentes en un eyaculado.	192
4.3.2.2.	Respuesta y evolución de las subpoblaciones cinéticas en las diferentes pruebas.	194
4.3.2.3.	Respuesta de las subpoblaciones espermáticas en función de la aptitud para la congelación de los diferentes eyaculados.	199
4.3.2.4.	Determinación de la congelabilidad de un eyaculado a partir del tamaño de las subpoblaciones cinéticas.	201
4.4.	Experimento 3: Estudio de la resistencia al choque <i>a frigore</i> .	206
4.4.1.	Influencia de la presencia de la gota citoplasmática en la resistencia celular al choque <i>a frigore</i> .	206
4.4.2.	Efecto del diluyente comercial y de la presencia de plasma seminal en la resistencia al choque <i>a frigore</i> .	208
4.4.2.1.	Integridad de la membrana plasmática.	209
4.4.2.2.	Integridad de la membrana acrosómica.	212
4.4.3.	Influencia del tiempo de incubación previo sobre la congelabilidad espermática.	215

4.4.3.1.	Estudio del efecto producido por el choque <i>a frigore</i> a lo largo del periodo de incubación. . . . .	216
4.4.3.2.	Influencia del tiempo de incubación sobre la resistencia celular a la congelación. . . . .	219
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>225</b>
5.1.	Calidad de las muestras descongeladas. . . . .	227
5.1.1.	Movilidad e integridad de la membrana plasmática tras la descongelación. . . . .	227
5.1.2.	Integridad acrosómica tras la descongelación. . . . .	228
5.1.3.	Resistencia al proceso de criopreservación. . . . .	229
5.1.4.	Grupos de calidad establecidos. . . . .	230
5.2.	Experimento 1: Estudio de las pruebas de laboratorio como indicadoras de la congelabilidad seminal . . . . .	231
5.2.1.	Valoración convencional del semen. . . . .	231
5.2.2.	Evaluación de la resistencia de las células espermáticas a un estrés hiposmótico (HOST Y ORT). . . . .	235
5.2.3.	Evaluación de la resistencia de las células espermáticas a un estrés por calor (termorresistencia). . . . .	239
5.2.4.	Evaluación de la resistencia de las células espermáticas a un choque <i>a frigore</i> . . . . .	241
5.3.	Experimento 2: Evaluación de los patrones cinéticos descritos por los espermatozoides. . . . .	249
5.3.1.	Respuesta y evolución de los parámetros cinéticos individuales de los espermatozoides analizados. . . . .	249
5.3.2.	Estudio de subpoblaciones a partir de los parámetros cinéticos de los espermatozoides. . . . .	264
5.4.	Experimento 3: Estudio de la resistencia al choque <i>a frigore</i> . . . . .	271
5.4.1.	Influencia de la presencia de la gota citoplasmática en la resistencia celular al choque <i>a frigore</i> . . . . .	271
5.4.2.	Efecto del diluyente comercial y de la presencia de plasma seminal en la resistencia al choque <i>a frigore</i> . . . . .	274
5.4.3.	Influencia del tiempo de incubación previo sobre la congelabilidad espermática. . . . .	282
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>285</b>
<b>7.</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>289</b>
<b>8.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>295</b>
	<b>Bibliografía</b>	<b>301</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>353</b>



# Índice de figuras

2.1. Representación gráfica del fenómeno de transición de fases que experimentan los fosfolípidos de membrana. . . . .	16
2.2. Interposición de colesterol entre fosfolípidos de membrana dificultando el acercamiento que deben experimentar éstos para quedar “empaquetados”. . . . .	17
2.3. Representación esquemática de los fenómenos físicos que experimentan la célula y el medio que la rodea durante el proceso de criopreservación, según sea la velocidad de enfriamiento. . . . .	22
2.4. Relación entre el porcentaje de supervivencia y la velocidad de enfriamiento en tres tipos celulares. . . . .	23
2.5. Representación de la “teoría de los dos factores”. . . . .	24
2.6. Esquema de la curva de enfriamiento registrada por una muestra seminal en el interior de un envase de congelación como consecuencia del fenómeno de cristalización. . . . .	28
2.7. Mecanismo de acción de diversas sustancias fluorescentes empleadas en la valoración de la integridad de la membrana citoplasmática. . . . .	48
2.8. Mecanismo de acción de diferentes sustancias empleadas en la evaluación de la integridad acrosomal. . . . .	53
2.9. Reconstrucción de una trayectoria a partir de la posición de la cabeza espermática en la secuencia de imágenes. . . . .	68
2.10. Representación del radio de búsqueda para el cálculo de trayectorias en la siguiente imagen y esquematización de posibles trazados al compartir dos espermatozoides la misma zona de probabilidad. . . . .	69
2.11. Métodos comunes de análisis del movimiento flagelar. . . . .	70
2.12. Distancias utilizadas para el cálculo de los diferentes parámetros de velocidad analizados. . . . .	72
2.13. Métodos utilizados en la derivación de la trayectoria media para el cálculo de la VAP. . . . .	73
2.14. Efecto de la frecuencia de captura en el trazado de la trayectoria. . . . .	78
2.15. Comparación de imágenes capturadas por cámaras de captura continua y de captura discontinua. . . . .	79
3.1. Composición del pienso administrado a los verracos. . . . .	89

3.2. Imágenes bajo contraste de fases de diferentes estados de la vesícula acrosómica, en función de su morfología. . . . .	91
3.3. Imagen de la cámara Makler y procedimiento de llenado de la misma. . . . .	93
3.4. Imágenes del análisis cinético de las células espermáticas. . . . .	94
3.5. Esquema del proceso de congelación realizado. . . . .	96
3.6. Régimen de enfriamiento utilizado en la congelación del semen. . . . .	97
3.7. Representación esquemática de las pruebas de estrés osmótico realizadas. . . . .	105
3.8. Representación esquemática de la prueba de termorresistencia. . . . .	107
3.9. Representación esquemática de la prueba del choque a frigore. . . . .	109
3.10. Representación esquemática de la prueba realizada para la determinación de la resistencia de los espermatozoides con GC al choque a frigore. . . . .	115
3.11. Representación esquemática de la prueba realizada para la determinación de la influencia del diluyente comercial y del plasma seminal en la resistencia espermática al choque a frigore. . . . .	117
4.1. Porcentajes medios de resistencia de la membrana plasmática al proceso de congelación/descongelación. . . . .	127
4.2. Valores medios obtenidos en la valoración de la movilidad espermática según el método utilizado. . . . .	135
4.3. Valores medios obtenidos para los tres métodos empleados en la valoración de porcentaje de movilidad en función de la raza. . . . .	136
4.4. Resultados medios totales obtenidos en la valoración de la integridad acrosómica, de la membrana plasmática y del análisis morfológico. . . . .	137
4.5. Valores medios obtenidos, en las valoraciones rutinarias realizadas, para cada uno de los grupos establecidos en función de la aptitud de los eyaculados para la congelación. . . . .	139
4.6. Valores medios obtenidos para las dos incubaciones empleadas en la realización del ORT y el HOST en función de la aptitud para la congelación de los eyaculados. . . . .	145
4.7. Promedios de integridad de la membrana plasmática en la prueba de la termorresistencia. . . . .	147
4.8. Porcentajes medios de integridad de la membrana plasmática, en función de la raza, en la prueba de la termorresistencia. . . . .	147
4.9. Porcentajes medios de integridad de la membrana plasmática, en función del verraco, en la prueba de la termorresistencia. . . . .	148
4.10. Promedios de integridad del acrosoma en la prueba de la termorresistencia. . . . .	149
4.11. Porcentajes medios de integridad del acrosoma, en función de la raza, en la prueba de la termorresistencia. . . . .	149
4.12. Porcentajes medios de integridad del acrosoma, en función del verraco, en la prueba de la termorresistencia. . . . .	150
4.13. Porcentajes medios de movilidad en la prueba de la termorresistencia. . . . .	151
4.14. Porcentajes de movilidad, en función de la raza, en la prueba de la termorresistencia. . . . .	151

4.15. Porcentajes de movilidad, en función del verraco, en la prueba de la termorresistencia. . . . .	152
4.16. Porcentajes medios de movilidad (tras incubación con cafeína), en función de la raza, en la prueba de la termorresistencia. . . . .	153
4.17. Porcentajes medios de movilidad (tras incubación con cafeína), en función del verraco, en la prueba de la termorresistencia. . . . .	154
4.18. Promedios de integridad de la membrana plasmática, en función del grupo de calidad, en la prueba de la termorresistencia. . . . .	155
4.19. Promedios de integridad del acrosoma, en función del grupo de calidad, en la prueba de la termorresistencia. . . . .	156
4.20. Promedios de movilidad, en función del grupo de calidad, en la prueba de la termorresistencia. . . . .	156
4.21. Porcentajes medios de movilidad (tras incubación con cafeína), en función del grupo de calidad, en la prueba de la termorresistencia. . . . .	157
4.22. Resistencia de la membrana a la prueba del choque a frigore. . . . .	161
4.23. Resistencia de la membrana a la prueba del choque a frigore, en función de la raza. . . . .	162
4.24. Resistencia de la membrana a la prueba del choque a frigore, en función del verraco. . . . .	162
4.25. Resistencia del acrosoma a la prueba del choque a frigore. . . . .	163
4.26. Resistencia del acrosoma a la prueba del choque a frigore, en función de la raza. . . . .	164
4.27. Resistencia del acrosoma a la prueba del choque a frigore, en función del verraco. . . . .	164
4.28. Resistencia de la movilidad a la prueba del choque a frigore. . . . .	165
4.29. Resistencia de la movilidad a la prueba del choque a frigore, en función de la raza. . . . .	166
4.30. Resistencia de la movilidad a la prueba del choque a frigore, en función del verraco. . . . .	166
4.31. Resistencia de la movilidad (tras incubación con cafeína) a la prueba del choque a frigore, en función de la raza. . . . .	167
4.32. Resistencia de la movilidad (tras incubación con cafeína) a la prueba del choque a frigore, en función del verraco. . . . .	168
4.33. Resistencia de la membrana plasmática a la prueba del choque a frigore, en función del grupo de calidad. . . . .	169
4.34. Resistencia del acrosoma a la prueba del choque a frigore, según del grupo de calidad. . . . .	169
4.35. Resistencia de la movilidad a la prueba del choque a frigore, según el grupo de calidad. . . . .	170
4.36. Resistencia de la movilidad (tras incubación con cafeína) a la prueba del choque a frigore, en función del grupo de calidad. . . . .	171
4.37. Valores medios obtenidos para cada uno de los parámetros analizados en el T0 y tras el descongelado, tanto en ausencia como en presencia de cafeína. . . . .	176
4.38. Valores medios de la VCL y VSL, en presencia y ausencia de cafeína, durante la prueba de la termorresistencia. . . . .	178
4.39. Valores medios de la VAP y LIN, en presencia y ausencia de cafeína, durante la prueba de la termorresistencia. . . . .	178

4.40. Valores medios del STR y WOB, en presencia y ausencia de cafeína, durante la prueba de la termorresistencia. . . . .	179
4.41. Valores medios de la ALH y BCF, en presencia y ausencia de cafeína, durante la prueba de la termorresistencia. . . . .	179
4.42. Valores medios de la VCL y VSL, en presencia y ausencia de cafeína, durante la prueba del choque “a frigore”. . . . .	182
4.43. Valores medios de la VAP y el LIN, en presencia y ausencia de cafeína, durante la prueba del choque “a frigore”. . . . .	182
4.44. Valores medios del STR y WOB, en presencia y ausencia de cafeína, durante la prueba del choque “a frigore”. . . . .	183
4.45. Valores medios del ALH y BCF, en presencia y ausencia de cafeína, durante la prueba del choque “a frigore”. . . . .	183
4.46. Dendograma resultante de la aplicación de los algoritmos de Ciampi <i>et al.</i> (2007) donde se establece el número de subpoblaciones cinéticas. . . . .	193
4.47. Altura de los nodos de unión en el árbol jerárquico aglomerativo. . . . .	193
4.48. Distribución de densidades de los datos cinéticos tras su proyección. . . . .	194
4.49. Distribución de las tres subpoblaciones, en ausencia de cafeína, durante la prueba de la termorresistencia. . . . .	196
4.50. Distribución de las tres subpoblaciones, en presencia de cafeína, durante la prueba de la termorresistencia. . . . .	197
4.51. Distribución de las tres subpoblaciones, en ausencia de cafeína, durante la prueba del choque “a frigore”. . . . .	198
4.52. Distribución de las tres subpoblaciones, en presencia de cafeína, durante la prueba del choque “a frigore”. . . . .	199
4.53. Porcentajes de integridad de la membrana plasmática obtenidos en los tres grupos de centrifugación tras los diferentes choques. . . . .	211
4.54. Porcentajes de integridad de la membrana acrosómica obtenidos en los tres grupos de centrifugación tras los diferentes choques. . . . .	213
4.55. Resistencia al choque “a frigore” que presentan los tres parámetros estudiados en los diferentes tiempos de incubación. . . . .	217
4.56. Resistencia de las diferentes estructuras analizadas a la prueba del choque “a frigore” en los diferentes tiempos de incubación. . . . .	219
4.57. Resistencia a la congelación observada por los tres parámetros estudiados en los diferentes tiempos de incubación. . . . .	221
4.58. Resistencia al proceso de congelación para los tres parámetros estudiados en los diferentes tiempos de incubación. . . . .	222
9.1. Dendograma resultante de la vinculación de Ward donde se establece el número óptimo de grupos en los que se dividen los eyaculados en función de su aptitud para la congelación. . . . .	355



# Índice de tablas

2.1. Porcentaje de inseminaciones utilizando semen refrigerado en los países con más censo de porcino. . . . .	12
2.2. Sustancias fluorescentes empleadas en la valoración seminal. . . . .	61
2.3. Sustancias fluorescentes empleadas en la valoración seminal (Continuación). . . . .	62
2.4. Parámetros cinéticos medidos por los sistemas CASA. . . . .	75
3.1. Proveedores y referencias de los productos utilizados. . . . .	85
3.2. Solución salina formolada 0,3%. . . . .	86
3.3. Solución de glutaraldehído al 2%. . . . .	86
3.4. Solución stock de Yoduro de Propidio. . . . .	86
3.5. Solución stock de Diacetato de Carboxifluoresceína. . . . .	86
3.6. Solución isosmótica para la realización del HOST. . . . .	87
3.7. Solución isosmótica para la realización del ORT. . . . .	87
3.8. Solución hiposmótica para la realización del ORT. . . . .	87
3.9. Diluyente de refrigeración. . . . .	87
3.10. Diluyente de congelación. . . . .	87
3.11. Fechas en las que se realizaron las extracciones de los diferentes eyaculados. . . . .	88
3.12. Parámetros de configuración empleados para las muestras analizadas. . . . .	93
3.13. Número de espermatozoides analizados antes y después del proceso de congelación/descongelación. . . . .	111
3.14. Número de espermatozoides analizados en la prueba de la termorresistencia. . . . .	111
3.15. Número de espermatozoides analizados en la prueba del choque a frigore. . . . .	111
4.1. Porcentaje de integridad de membrana obtenido en los eyaculados de los diferentes verracos tras el proceso de congelación/descongelación. . . . .	123
4.2. Integridad de la membrana plasmática tras la descongelación en función de la raza. . . . .	124
4.3. Grupos homogéneos establecidos en función de las diferencias obtenidas en el porcentaje de integridad de membrana tras el descongelado. . . . .	124
4.4. Porcentaje de integridad del acrosoma obtenido en los eyaculados de los diferentes verracos tras el proceso de congelación/descongelación. . . . .	124
4.5. Integridad de la membrana acrosómica tras la descongelación en función de la raza. . . . .	125
4.6. Integridad de la membrana acrosómica tras la descongelación en función del verraco. . . . .	125

4.7. Porcentaje de movilidad espermática (con y sin cafeína) obtenido por los eyaculados de los diferentes verracos tras el proceso de congelación/descongelación. . . . .	126
4.8. Porcentaje de movilidad espermática tras la descongelación en función del verraco. . . . .	126
4.9. Porcentaje de movilidad espermática tras la descongelación en función de la raza. . . . .	127
4.10. Subconjuntos homogéneos establecidos en función de las diferencias de resistencia de la membrana al proceso de congelación/descongelación. . . . .	128
4.11. Porcentajes medios de resistencia del acrosoma al proceso de criopreservación. . . . .	129
4.12. Resistencia del acrosoma al proceso de congelación/descongelación en función de la raza. . . . .	129
4.13. Resistencia del acrosoma al proceso de congelación/descongelación en función del verraco. . . . .	129
4.14. Porcentajes medios de resistencia de la movilidad espermática (con y sin cafeína) al proceso de congelación/descongelación. . . . .	130
4.15. Resistencia de la movilidad espermática al proceso de congelación/descongelación en función del verraco. . . . .	130
4.16. Resistencia de la movilidad espermática al proceso de congelación/descongelación en función de la raza. . . . .	130
4.17. Centros finales de los conglomerados establecidos tras la clasificación no jerárquica de las K-medias. . . . .	131
4.18. Número de integrantes de los diferentes grupos en función de la raza. . . . .	131
4.19. Clasificación de los eyaculados dentro de los grupos de calidad establecidos. . . . .	132
4.20. Resultados medios totales obtenidos en las diferentes pruebas de valoración seminal convencional. . . . .	133
4.21. Valores medios obtenidos para el volumen y concentración de los eyaculados en función de la raza. . . . .	134
4.22. Subconjuntos homogéneos de verracos en función del volumen y la concentración del eyaculado. . . . .	134
4.23. Subconjuntos homogéneos de verracos en función de los tres métodos empleados en la valoración del porcentaje de movilidad. . . . .	136
4.24. Valores medios obtenidos para la valoración de la integridad acrosómica, de la membrana plasmática y del análisis morfológico en función de la raza. . . . .	138
4.25. Subconjuntos homogéneos de verracos en función del porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y de la integridad de la membrana plasmática y del acrosoma. . . . .	138
4.26. Coeficientes de correlación entre los parámetros analizados dentro de la valoración rutinaria del semen y los índices calculados postdescongelación. . . . .	140
4.27. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad utilizando los parámetros analizados dentro de la valoración rutinaria del semen. . . . .	141
4.28. Valores medios obtenidos para las dos incubaciones empleadas en la realización del HOST. . . . .	141
4.29. Valores medios obtenidos para las dos incubaciones empleadas en la realización del HOST en función de la raza. . . . .	142

4.30. Valores medios obtenidos para las dos incubaciones empleadas en la realización del HOST en función del verraco. . . . .	142
4.31. Valores medios obtenidos para las dos incubaciones empleadas en la realización del HOST. . . . .	143
4.32. Valores medios obtenidos para las dos incubaciones empleadas en la realización del ORT en función de la raza. . . . .	143
4.33. Valores medios obtenidos para las dos incubaciones empleadas en la realización del ORT en función del verraco. . . . .	143
4.34. Coeficientes de correlación entre los valores obtenidos en las diferentes pruebas de estrés osmótico (HOST y ORT). . . . .	144
4.35. Coeficientes de correlación entre los valores obtenidos en las diferentes pruebas de estrés osmótico y los índices calculados postdescongelación. . . . .	146
4.36. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con las variables obtenidas tras la realización de las pruebas de estrés osmótico. . . . .	146
4.37. Coeficientes de correlación entre los valores obtenidos en los cuatro parámetros analizados en el T1,5 y los índices calculados postdescongelación. . . . .	158
4.38. Coeficientes de correlación entre los valores obtenidos en los cuatro parámetros analizados en el T3 y los índices calculados postdescongelación. . . . .	158
4.39. Coeficientes de correlación entre los valores obtenidos en los cuatro parámetros analizados en el T4,5 y los índices calculados postdescongelación. . . . .	158
4.40. Coeficientes de correlación entre los valores obtenidos en los cuatro parámetros analizados en el T7 y los índices calculados postdescongelación. . . . .	159
4.41. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad de un eyaculado empleando los valores analizados en el T1,5. . . . .	159
4.42. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad de un eyaculado empleando los valores analizados en el T3. . . . .	160
4.43. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad de un eyaculado empleando los valores analizados en el T4,5. . . . .	160
4.44. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad de un eyaculado empleando los valores analizados en el T7. . . . .	160
4.45. Coeficientes de correlación entre la resistencia de los cuatro parámetros analizados tras el S0 y los índices calculados postdescongelación. . . . .	172
4.46. Coeficientes de correlación entre la resistencia de los cuatro parámetros analizados tras el S1 y los índices calculados postdescongelación. . . . .	172
4.47. Coeficientes de correlación entre la resistencia de los cuatro parámetros analizados tras el S2 y los índices calculados postdescongelación. . . . .	172
4.48. Coeficientes de correlación entre la resistencia de los cuatro parámetros analizados tras el S3 y los índices calculados postdescongelación. . . . .	173
4.49. Coeficientes de correlación entre la resistencia de los cuatro parámetros analizados tras el S5 y los índices calculados postdescongelación. . . . .	173
4.50. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad de un eyaculado empleando los valores analizados tras el S0. . . . .	173

4.51. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad de un eyaculado empleando los valores analizados tras el S1. . . . .	174
4.52. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad de un eyaculado empleando los valores analizados tras el S2. . . . .	174
4.53. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad de un eyaculado empleando los valores analizados tras el S3. . . . .	174
4.54. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad de un eyaculado empleando los valores analizados tras el S5. . . . .	174
4.55. Valores medios obtenidos, sin la adición de cafeína, en cada uno de los parámetros analizados a lo largo de la prueba de la termorresistencia. . . . .	177
4.56. Valores medios obtenidos, con la adición de cafeína, en cada uno de los parámetros analizados a lo largo de la prueba de la termorresistencia. . . . .	178
4.57. Valores medios obtenidos, sin la adición de cafeína, en cada uno de los parámetros analizados a lo largo de la prueba del choque “a frigore”. . . . .	180
4.58. Valores medios obtenidos, con la adición de cafeína, en cada uno de los parámetros analizados a lo largo de la prueba del choque “a frigore”. . . . .	181
4.59. Coeficientes de correlación estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) entre los valores de los diferentes parámetros cinéticos en en T0 y los índices calculados postdescongelación. . . . .	186
4.60. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con los valores de los parámetros cinéticos en el T0. . . . .	186
4.61. Coeficientes de correlación estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) entre los valores de los diferentes parámetros cinéticos en la prueba de la termorresistencia y los índices calculados postdescongelación. . . . .	187
4.62. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con los valores de los parámetros cinéticos en el T1,5. . . . .	187
4.63. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con los valores de los parámetros cinéticos en el T3. . . . .	188
4.64. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con los valores de los parámetros cinéticos en el T7. . . . .	188
4.65. Coeficientes de correlación estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) entre los valores de los diferentes parámetros cinéticos en la prueba del choque a frigore y los índices calculados postdescongelación. . . . .	189
4.66. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con los valores de los parámetros cinéticos en el S1. . . . .	190
4.67. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con los valores de los parámetros cinéticos en el S2. . . . .	191
4.68. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con los valores de los parámetros cinéticos en el S3. . . . .	191
4.69. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con los valores de los parámetros cinéticos en el S5. . . . .	191
4.70. Promedio de los parámetros cinéticos en cada subpoblación. . . . .	192

4.71. Variación de la distribución de las subpoblaciones cinéticas tras el proceso de criopreservación. . . . .	195
4.72. Distribución de cada subpoblación para cada grupo de calidad, establecido en función de su aptitud para la congelación en el T0 y durante la prueba de la termorresistencia. . . . .	200
4.73. Distribución de cada subpoblación para cada grupo de calidad, establecido en función de su aptitud para la congelación en el T0 y durante la prueba del choque “a frigore”. . . . .	201
4.74. Coeficientes de correlación estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) entre el tamaño de las diferentes subpoblaciones en el T0 y los índices calculados postdescongelación. . . . .	201
4.75. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con el tamaño de las diferentes subpoblaciones espermáticas en el T0. . . . .	202
4.76. Coeficientes de correlación estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) entre el tamaño de las diferentes subpoblaciones en la prueba de la termorresistencia y los índices calculados postdescongelación. . . . .	202
4.77. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con el tamaño de las diferentes subpoblaciones espermáticas en el T3. . . . .	203
4.78. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con el tamaño de las diferentes subpoblaciones espermáticas en el T7. . . . .	203
4.79. Coeficientes de correlación estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) entre el tamaño de las diferentes subpoblaciones en la prueba del choque a frigore y los índices calculados postdescongelación. . . . .	204
4.80. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con el tamaño de las diferentes subpoblaciones espermáticas en el S1. . . . .	205
4.81. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con el tamaño de las diferentes subpoblaciones espermáticas en el S2. . . . .	205
4.82. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con el tamaño de las diferentes subpoblaciones espermáticas en el S3. . . . .	205
4.83. Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con el tamaño de las diferentes subpoblaciones espermáticas en el S5. . . . .	205
4.84. Porcentaje de espermatozoides vivos de cada una de las categorías morfológicas analizadas tras la realización del choque “a frigore”. . . . .	206
4.85. Porcentaje corregido de espermatozoides vivos de cada una de las categorías morfológicas analizadas tras la realización del choque “a frigore”. . . . .	207
4.86. Variación, con respecto a los valores del eyaculado, del porcentaje de espermatozoides normales, con presencia de gota citoplasmática y con otras alteraciones morfológicas. . . . .	207
4.87. Variación, con respecto a los valores del eyaculado, del porcentaje de las diferentes categorías morfológicas analizadas. . . . .	208
4.88. Resultados medios de integridad de la membrana plasmática obtenidos para cada grupo de muestras. . . . .	209

4.89. Resultados obtenidos tras la realización del análisis factorial de la varianza para la integridad de la membrana plasmática. . . . .	210
4.90. Porcentajes medios de integridad de la membrana plasmática en función tanto del diluyente empleado como del momento de eliminación del plasma seminal. . . . .	212
4.91. Resultados medios de integridad de la membrana acrosómica obtenidos para cada grupo de muestras. . . . .	212
4.92. Resultados obtenidos tras la realización del análisis factorial de la varianza para la integridad de la membrana acrosómica. . . . .	214
4.93. Porcentajes medios de integridad de la membrana acrosómica en función tanto del diluyente empleado como del momento de eliminación del plasma seminal. . . . .	215
4.94. Porcentajes medios de movilidad total y de integridad de la membrana plasmática y de la acrosómica en los diferentes tiempos de incubación. . . . .	215
4.95. Valores medios obtenidos para los tres parámetros estudiados tras la realización del choque en los diferentes tiempos de incubación. . . . .	216
4.96. Resistencia al choque “a frigore” que presentan los tres parámetros estudiados en los diferentes tiempos de incubación. . . . .	218
4.97. Resistencia de las diferentes estructuras analizadas a la prueba del choque “a frigore” en los diferentes tiempos de incubación. . . . .	219
4.98. Valores medios obtenidos para los tres parámetros estudiados tras la realización del choque en los diferentes tiempos de incubación. . . . .	220
4.99. Resistencia al proceso de congelación observada por los tres parámetros estudiados en los diferentes tiempos de incubación. . . . .	221
4.100 Resistencia al proceso de congelación para los tres parámetros estudiados en los diferentes tiempos de incubación. . . . .	222
5.1. Porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática en el testículo, el epidídimo y el eyaculado. . . . .	272
5.2. Composición (g/l) de los diluyentes BTS y MR-A . . . . .	281
9.1. Vinculación de Ward obtenida para establecer el número óptimo de grupos en los que se dividen los eyaculados en función de su aptitud para la congelación. . . . .	356
9.2. Valores medios obtenidos tras realizar las pruebas del HOST a los 40 eyaculados empleados. . . . .	357
9.3. Valores medios obtenidos tras realizar las pruebas del ORT a los 40 eyaculados empleados. . . . .	357
9.4. Coeficientes de correlación entre los parámetros analizados tras el S0. . . . .	358
9.5. Coeficientes de correlación entre los parámetros analizados tras el S1. . . . .	358
9.6. Coeficientes de correlación entre los parámetros analizados tras el S2. . . . .	358
9.7. Coeficientes de correlación entre los parámetros analizados tras el S3. . . . .	359
9.8. Coeficientes de correlación entre los parámetros analizados tras el S5. . . . .	359
9.9. Valores medios de los parámetros cinéticos, en presencia y en ausencia de cafeína, en el T0, en el descongelado y durante la prueba de la termorresistencia. . . . .	360

9.10. Valores medios de los parámetros cinéticos para cada raza, tanto en presencia como en ausencia de cafeína, en el T0 y durante la prueba del choque “a frigore”.	361
9.11. Valores medios de los parámetros VCL, VSL, VAP y LIN para cada verraco, en ausencia de cafeína, en el T0, en el descongelado y durante la prueba de la termorresistencia. . . . .	362
9.12. Valores medios de los parámetros STR, WOB, ALH y BCF para cada verraco, en ausencia de cafeína, en el T0, en el descongelado y durante la prueba de la termorresistencia. . . . .	363
9.13. Valores medios de los parámetros VCL, VSL, VAP y LIN para cada verraco, en presencia de cafeína, en el T0, en el descongelado y durante la prueba de la termorresistencia. . . . .	364
9.14. Valores medios de los parámetros STR, WOB, ALH y BCF para cada verraco, en presencia de cafeína, en el T0, en el descongelado y durante la prueba de la termorresistencia. . . . .	365
9.15. Valores medios de los parámetros VCL, VSL, VAP y LIN para cada verraco, en ausencia de cafeína, en el T0 y durante la prueba del choque “a frigore”. . . . .	366
9.16. Valores medios de los parámetros STR, WOB, ALH y BCF para cada verraco, en ausencia de cafeína, en el T0 y durante la prueba del choque “a frigore”. . . . .	367
9.17. Valores medios de los parámetros VCL, VSL, VAP y LIN para cada verraco, en presencia de cafeína, en el T0 y durante la prueba del choque “a frigore”. . . . .	368
9.18. Valores medios de los parámetros STR, WOB, ALH y BCF para cada verraco, en presencia de cafeína, en el T0 y durante la prueba del choque “a frigore”. . . . .	369
9.19. Valores medios de los parámetros cinéticos para cada grupo de calidad, establecido en función de su aptitud para la congelación, en ausencia de cafeína, en el T0, en el descongelado y durante la prueba de la termorresistencia. . . . .	370
9.20. Valores medios de los parámetros cinéticos para cada grupo de calidad, establecido en función de su aptitud para la congelación, en presencia de cafeína, en el T0, en el descongelado y durante la prueba de la termorresistencia. . . . .	371
9.21. Valores medios de los parámetros cinéticos para cada grupo de calidad, establecido en función de su aptitud para la congelación, en ausencia de cafeína, en el T0 y durante la prueba del choque “a frigore”. . . . .	372
9.22. Valores medios de los parámetros cinéticos para cada grupo de calidad, establecido en función de su aptitud para la congelación, en presencia de cafeína, en el T0 y durante la prueba del choque “a frigore”. . . . .	373
9.23. Valores medios de las tres subpoblaciones para cada raza, tanto en presencia como en ausencia de cafeína, en el T0, en el descongelado y durante la prueba de la termorresistencia. . . . .	374
9.24. Valores medios de las tres subpoblaciones para cada verraco, en presencia de cafeína, en el T0, en el descongelado y durante la prueba de la termorresistencia. . . . .	375
9.25. Valores medios de las tres subpoblaciones para cada verraco, en ausencia de cafeína, en el T0, en el descongelado y durante la prueba de la termorresistencia. . . . .	376

9.26. Valores medios de las tres subpoblaciones, en presencia y en ausencia de cafeína, en el T0, en el descongelado y durante la prueba de la termorresistencia. . . . .	377
9.27. Valores medios de las tres subpoblaciones, en presencia y en ausencia de cafeína, en el T0 y durante la prueba del choque “a frigore”. . . . .	377
9.28. Valores medios de las tres subpoblaciones para cada raza, tanto en presencia como en ausencia de cafeína durante la prueba del choque “a frigore”. . . . .	378
9.29. Valores medios de las tres subpoblaciones para cada verraco, en ausencia de cafeína, en el T0 y durante la prueba del choque “a frigore”. . . . .	379
9.30. Valores medios de las tres subpoblaciones para cada verraco, en presencia de cafeína, en el T0 y durante la prueba de la termorresistencia. . . . .	380



# Glosario de Abreviaturas

μl:	Microlitro.
μm:	Micrómetro.
μm <sup>2</sup> :	Micrómetro cuadrado.
AC:	Adenilato-ciclasa.
Acros.:	Acrosómica.
ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
AI:	Índice de angularidad.
ALH:	Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide.
Alt.:	Alteración.
AMP:	Adenosín monofosfato.
AMPc:	Adenosín monofosfato cíclico.
ANOVA:	Análisis de la varianza.
ASMA:	<i>Computer-assisted sperm morphometry analysis</i> (Análisis automático de la morfometría espermática).
ATP:	3'-5' Adenosín trifosfato.
AV:	Velocidad angular.
BC:	Buenos congeladores.
BCF:	Frecuencia de batido.
BHT:	Hidroxitolueno Butilado.
BSA:	Albúmina sérica bovina.
BTS:	<i>Beltsville Thawing Solution</i> (Solución "Beltsville" de descongelación).
Ca <sup>2+</sup> :	Ión de Calcio.

Caf.:	Cafeína.
CAM:	Éster de acetilmetilcalceína.
CASA:	Computer-assisted semen analysis (Análisis computarizado de semen).
CCD:	<i>Charge couple device</i> (Dispositivo de cargas interconectadas).
CECOS:	<i>Centre d'Etude et Conservation du Sperme Humain</i> (Centro para el Estudio y Conservación del Semen Humano).
CI:	Grupo Centrifugación Inicial.
Citoplasm:	Citoplasmáticas.
cm:	Centímetro.
CMto:	Grupo Centrifugación en el Momento.
CM:	Congeladores medios.
Coef:	Coefficiente.
COLA+GOTA:	Grupo que integra a los espermatozoides con gota citoplasmática que presentan además una alteración a nivel del flagelo.
ConA:	Aglutinina de <i>Concavalina ensiformis</i> .
Conc:	Concentración.
CONGEL.:	Congelación.
CONGELAB.:	Congelabilidad.
Correg.:	Corregido.
Correl:	Correlación.
COT:	Carbono Orgánico Total.
cs:	Cantidad suficiente.
CTC:	Clortetraciclina.
Da:	Daltons.
DABCO:	1,4-diazababíciclo [2,2,2] octano.
DCF:	Diacetato de Carboxifluoresceína.
Descong:	Descongelación.
Desv:	Desviación.

DHA:	Ácido Docosahexaenoico.
DIC:	Microscopía de Contraste Diferencial de Interferencia.
DMSO:	Dimetilsulfóxido.
DNC:	Dance.
DNM:	Dance medio.
EDTA:	Ácido Etilendiaminotetraacético.
EEUU:	Estados Unidos de Norteamérica.
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico.
ELISA:	Ensayo inmunoenzimático.
Epid.:	Epididimario/a.
ESHRE:	<i>European Society for Human Reproduction and Embriology</i> (Sociedad Europea para la Reproducción Humana y Embriología).
<i>et al.:</i>	<i>et alii</i> (y otros).
Eyac:	Eyaculado.
FCR:	Radio de curvatura flagelar.
fig:	Figura.
FITC:	Isotiocianato de Fluoresceína.
FIV:	Fecundación <i>in vitro</i> .
g:	Fuerza de la Gravedad.
GC:	Gota Citoplasmática.
GCD:	Gota Citoplasmática Distal.
GCP:	Gota Citoplasmática Proximal.
GD:	Grupo que integra a los espermatozoides que presentan una Gota Citoplasmática Distal.
GP:	Grupo que integra a los espermatozoides que presentan una Gota Citoplasmática Proximal.
GSH:	Glutación Reducido.
H_Y:	Amplitud del armónico.

H <sup>+</sup> :	Ión de Hidrógeno.
H <sub>2</sub> :	Hidrógeno.
H <sub>2</sub> DFCDA:	Diacetato de Diclorodihidrofluoresceína.
HAC:	Clasificación Jerárquica Aglomerativa.
HBS:	Armónico básico de la oscilación de la cabeza espermática.
HE:	Homodímero de Etidio.
HEPES:	[N-(2-hidroxietil) piperazina- N' - (2-ácido) etanosulfónico].
HHI:	Mayor oscilación armónica de la cabeza del espermatozoide.
HLO:	Menor oscilación armónica de la cabeza del espermatozoide.
HME:	Oscilación media de la cabeza del espermatozoide.
HMX:	Máxima amplitud de oscilación de la cabeza espermática.
HNAR:	Acrosomas íntegros en medio hiposmótico.
HOST:	Test de endósmosis.
HRT	test: Test de Resistencia Hiperosmótica.
HSD:	<i>Honestly Significant Difference</i> (Diferencia Honestamente Significativa).
Hz:	Herzios.
IA:	Inseminación Artificial.
ICSI:	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides.
IGF:	Factor de crecimiento similar a la insulina.
INAR:	Acrosomas íntegros en medio isosmótico.
Integr:	Íntegridad.
IP:	Ioduro de Propidio.
JC-1:	5,5,6,6'- Tetracloro- 1,1',3,3'ioduro tetraetil bencimidazolil carbozianina
JPL:	<i>Jet propulsion laboratory</i> (Laboratorio de propulsión).
K <sup>+</sup> :	Ión de Potasio.
kDa:	KiloDaltons.
kg:	Kilogramo.

LD:	Raza Landrace.
LDA:	Análisis Discriminante Lineal.
LIN:	Índice de linealidad.
LW:	Raza Large White.
m <sup>2</sup> :	Metro cuadrado.
MADAbs:	Desplazamiento angular medio absoluto.
MADAlg:	Desplazamiento angular medio algebraico.
MAPA:	Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino.
Max:	Máximo.
MC:	Malos congeladores.
MCT:	Medio completo de Tyrode.
MDA:	Malonildialdehido.
memb:	Membrana.
mg:	Miligramo.
Mg <sup>+</sup> :	Ión de Magnesio.
mill:	Millones.
Min:	Mínimo.
min/':	Minutos.
ml:	Mililitro.
mM:	MiliMolar.
mm <sup>2</sup> :	Milímetro cuadrado.
MOPS:	Ácido morfolino-propanosilfónico.
Morf.:	Morfológico/a
mOsm:	Miliosmoles.
MOV:	Movilidad.
MΩ:	Mega Ohmios.
N <sub>2</sub> :	Nitrógeno.

Na <sup>+</sup> :	Ión Sódio.
NAR:	Normal Acrosomal Ridge.
NASA:	<i>National aeronautics and space administration.</i>
NdYAG:	<i>Láser Neodymium-doped yttrium aluminium garnet.</i>
nm:	Nanómetros.
nmol:	Nanomoles.
Nº:	Número.
Norm:	Normales.
NRR:	<i>Non Return Rate.</i>
NTSC:	National television standards comitee.
°C:	Grados centígrados.
OMS:	Organización mundial de la salud.
ORT:	<i>Osmotic Resistance Test</i> (Test de resistencia osmótica).
p/v:	Peso/volumen
p:	Probabilidad.
pág:	Página.
PAL:	<i>Phase Alternating Line</i> (Línea Alternada en Fase ).
PATN:	<i>Patern Analysis System</i> (Sistema de Análisis de Patrones).
PBP:	Proteína ligadora de penicilina.
PBS:	Solución amortiguadora de sales de fosfato.
PCA:	Análisis de componentes principales.
PKA:	Proteín Kinasa A.
PNA:	Aglutinina de <i>Arachis hipogea</i> .
Prof.:	Profundidad
PS:	Plasma seminal.
PSA:	Aglutinina de <i>Pisum sativum</i> .
PVP:	Polivinil Pirrolidona.

- QDA: Análisis Discriminante Cuadrático.
- r: Coeficiente de correlación.
- R123: Rodamina 123.
- r<sup>2</sup>: Coeficiente de regresión.
- RA: Reacción acrosómica.
- Resist.: Resistencia.
- ROS: *Reactive oxygen species* (Especies reactivas del oxígeno).
- RPE: Ficoeritrina.
- s: Segundo.
- S 0/1/2/3/5: Momentos de realización de los choques por frío (0, 1, 2, 3 y 5 horas).
- SC: Grupo Sin Centrifugar.
- SCD: Test de dispersión de la cromatina.
- SCSA: *Sperm Chromatin Structure Assay* (Determinación de la Estructura de la Cromatina Espermática).
- SDS: Dodecil Sulfato Sódico.
- Sig: Significación.
- SM-CMA: *Stroemberg-Mika Cell Motion Analysis*.
- SOD: Superóxido dismutasa.
- SP: Subpoblación
- SPMI: Proteína inhibidor de la motilidad en el plasma seminal.
- SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*.
- STR: Índice de rectitud.
- T 0/1,5/3/4,5/7: Tiempo de incubación a 39 °C (0, 1,5, 3, 4,5 y 7 horas).
- tip: Típico/a.
- TRITC: Isocianato de Tetrametil Rodamina.
- t-test: Referido a la prueba estadística t-Student.
- TUNEL: *Terminal dUDP nick end labeling*.
- UEA: Aglutinina de *Ulex europaeus*.

UPGMA:	<i>Unweighted pair groups median average.</i>
USB:	<i>Universal Serial Bus.</i>
v/v:	Volumen/volumen.
VAP:	Velocidad media del espermatozoide.
VCL:	Velocidad circular del espermatozoide.
VIT:	Vitalidad espermática
VSL:	Velocidad rectilínea del espermatozoide.
WGA:	Aglutinina de <i>Triticus vulgaris</i> .
WOB:	Índice de oscilación.
WPGMC:	<i>Weighted pair-group method using centroids.</i>
Zn <sup>+</sup> :	Ión de Zinc.
ZP:	Zona pelúcida.



# Capítulo 1

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



La inseminación artificial (IA) es, posiblemente, la técnica de reproducción asistida que más impacto ha tenido sobre la producción animal en los últimos 50 ó 60 años (Córdova-Izquierdo, 2002), llegando, en el sector porcino, a presentar una amplia aplicación en todo el mundo, si bien es cierto que su grado de utilización depende del país al que nos refiramos, ya que mientras en muchos países de la Unión Europea (Holanda, Francia, España, Alemania, Noruega, etc.) su aplicación superaba en 2004 el 80 %, en los Estados Unidos permanecía en un porcentaje en torno al 50 %, aunque con una clara progresión a lo largo de los últimos años (Gadea, 2004).

La utilización de semen refrigerado (15-20 °C) copa más del 99 % de las inseminaciones artificiales realizadas en el mundo (Wagner y Tibier, 2000; Johnson *et al.*, 2000), quedando relegada la utilización de semen congelado/descongelado, bien a labores de investigación (Gadea, 2004), o bien a la incorporación de nuevo material genético de alto valor a núcleos de selección (Johnson *et al.*, 2000; Gadea, 2004; Saravia, 2004), por lo que en la producción comercial porcina no se están aprovechando las grandes ventajas que la criopreservación seminal puede aportar, como el mayor control sanitario de las dosis (Bailey *et al.*, 2008) o la gran disponibilidad espacio/temporal del material seminal (Domínguez *et al.*, 2008).

Esta menor aplicación del semen congelado/descongelado responde principalmente a una sustancial reducción de su rendimiento reproductivo con respecto al refrigerado, tanto en el porcentaje de partos (en torno a un 20 % menos [Johnson, 1985]) como de lechones nacidos (en torno a 2-3 menos [Almlid y Hofmo, 1996]), y es que los espermatozoides de porcino presentan una mayor susceptibilidad a la criopreservación que la mayoría de las especies domésticas, fundamentalmente debido a su mayor sensibilidad al proceso denominado choque *a frigore*, choque por frío o, en la literatura anglosajona, “cold shock” (Gadea, 2004).

Aunque el daño infringido por el proceso de criopreservación puede considerarse la principal causa del bajo rendimiento reproductivo, para Eriksson (2000) existen otros factores que también limitan considerablemente la utilización del semen congelado:

- El requerimiento de un mayor número de espermatozoides por dosis de inseminación (5-6 millones de spz.) en comparación con el fresco/refrigerado (2-3 millones de spz.).
- El elevado coste del proceso, ya que implica la adquisición de un equipamiento de laboratorio mucho más caro y una formación complementaria del personal.
- La carencia de análisis de laboratorio que determinen de una forma precisa la calidad seminal, lo cual es un obstáculo a la hora de relacionar la viabilidad *in vitro* con la fertilidad *in vivo*.
- El momento crítico de la inseminación, puesto que el rango “fértil” de los espermatozoides descongelados es considerablemente menor que en el semen fresco/refrigerado.
- La gran variación existente entre razas y entre verracos en relación con la supervivencia espermática al proceso.

---

Para poder lograr resultados aceptables en la criopreservación de semen porcino, es fundamental conocer los factores que afectan a la supervivencia y al mantenimiento de la capacidad fecundante de los espermatozoides tras el proceso. Estos factores pueden ser internos, o inherentes al espermatozoide, como demuestra la alta variabilidad existente entre razas o entre individuos (Medrano y Holt, 1998; Gadea, 2004; Holt *et al.*, 2005; Roca *et al.*, 2006a), o externos, como la composición de los medios empleados, la elección del agente crioprotector (y su concentración), la velocidad de enfriamiento, el tiempo de estabilización del semen, los envases empleados, o el método de congelación y descongelación utilizado (Johnson *et al.*, 2000). Es en estos últimos factores en los que se han introducido a lo largo de los últimos años avances significativos, mediante actuaciones sobre la curva de congelación (Murgas *et al.*, 2001; Ruiz *et al.*, 2002), las condiciones óptimas para la descongelación (Selles *et al.*, 2003), la composición de los diluyentes (fundamentalmente mediante la incorporación de sustancias con carácter antioxidante [Peña *et al.*, 2003b; Roca *et al.*, 2004]), los envases de congelación (Eriksson y Rodríguez-Martínez, 2000b; 2000a; Saravia *et al.*, 2005) o la aplicación de la dosis seminal (Roca *et al.*, 2000b), entre otros aspectos, llegando a conseguir resultados prometedores.

No obstante, la amplia variabilidad existente entre razas e individuos limita enormemente estos progresos, ya que el sector más importante de la ganadería española, que presenta una contribución económica del 33 % a la producción final ganadera (MAPA, 2006), no puede conformarse con resultados individuales altos, mientras el promedio obtenido por el conjunto de la población sigue manteniéndose en un rango insuficiente desde el punto de vista económico para su aplicación comercial. Es por esto por lo que la identificación de aquellos verracos con una buena capacidad para la congelación seminal resulta de gran interés, aunque hasta el momento la selección de machos en el sector porcino, a diferencia de lo ocurrido en el ganado vacuno de leche, no se ha basado nunca en este criterio, sino que se ha efectuado con base en los rendimientos productivos de la descendencia (índices de crecimiento y conversión, conformación, características de la canal, etc.), siempre y cuando, como es lógico, se mantuviesen unos mínimos de calidad seminal que aseguraran el rendimiento reproductivo.

La única clasificación que se viene realizando tradicionalmente, en vista del desconocimiento existente acerca de las causas de la variabilidad individual, ha consistido en englobar a los machos en las categorías de “buenos congeladores” o “malos congeladores” (Watson, 1995; Medrano *et al.*, 2002b; Roca *et al.*, 2006a). Thurston *et al.* (2002) han evidenciado principios con base genética que justifican esta variabilidad, lo que conduciría a la detección de aquellos animales con buena capacidad de congelación mediante el uso de marcadores genéticos, pero hasta que esta nueva alternativa sea una realidad, sería conveniente que esta selección se basara en análisis seminales simples, que traten de determinar, de la forma más precisa posible, la viabilidad espermática posdescongelación.

Con carácter general, el objetivo de este trabajo es determinar la eficacia de sencillas pruebas de laboratorio, como aquellas que se emplean de forma rutinaria en cualquier Centro de IA comercial, o de otras basadas en la resistencia de los espermatozoides a un determinado estrés (osmótico, por calor, o por frío) en la predicción de la supervivencia espermática al proceso de criopreservación, así como establecer la importancia que presenta la movilidad espermática en

dicha predicción, mediante el estudio de los parámetros cinéticos analizados, bien de forma individual, o bien conjunta a través del estudio de subpoblaciones espermáticas.

Con carácter secundario, resulta interesante evaluar otros aspectos:

- Describir los patrones cinéticos que presentan los espermatozoides en el semen fresco y establecer la distribución subpoblacional de los mismos, para posteriormente determinar los cambios que experimentan tras el proceso de congelación/descongelación, después de la realización de un choque por frío o durante la permanencia varias horas a una temperatura elevada.
- Estudiar la variabilidad individual y de la raza en todos estos procesos, así como determinar la influencia de la aptitud para la congelación de los eyaculados en los resultados de las diferentes pruebas.
- Profundizar en los aspectos que influyen en la resistencia de los espermatozoides al choque *a frigore*.
- Establecer la importancia del tiempo de estabilización de los espermatozoides en el protocolo de criopreservación, estudiando el efecto de varios tiempos preestablecidos en la viabilidad espermática posdescongelación.



## Capítulo 2

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA





## 2.1. Criopreservación de semen.

### 2.1.1. Introducción.

#### 2.1.1.1. Nacimiento y desarrollo de la técnica.

La primera anotación recogida en torno a la preservación seminal mediante el enfriamiento fue realizada por Lázaro Spallanzani en 1776, que comprobó que las células espermáticas de humano, de caballo y de rana, pasaban a un estado de inactividad tras enfriar las muestras con nieve durante algo más de 30 minutos, pero mantenían la capacidad de ser revividas con posterioridad; desde entonces, la disminución térmica ha sido el recurso de referencia para reducir la actividad metabólica de los espermatozoides, incrementando con ello su vida útil (Bwanga, 1991).

Para encontrar una de las primeras referencias a la preservación seminal por debajo de 0°C ha de transcurrir casi un siglo, cuando Paolo Mantegazza comprueba en 1866 que las células espermáticas de humano eran capaces de sobrevivir a una congelación a -17 °C, aunque el desarrollo de este método de conservación no empezará a fraguarse hasta mediados del siglo XX, cuando en 1949 el equipo del Dr. Christopher Polge, en Cambridge (Reino Unido), emplea por primera vez con éxito el glicerol como agente crioprotector de los espermatozoides, en concreto de gallo, comprobando dos años más tarde que los espermatozoides descongelados mantenían su capacidad fecundante (Polge, 1951, citado en Watson [1990]). La importancia del descubrimiento de esta sustancia como crioprotector espermático radica en que ha permitido el nacimiento y desarrollo de la criopreservación seminal, ya que abrió nuevos horizontes para la aplicación de la inseminación artificial (IA), tanto en humano como en las especies animales de interés zootécnico, posibilitando la conservación durante largos periodos de tiempo, dado que, hasta ese momento la IA sólo había conseguido implantarse entre las especies ganaderas de una forma aceptable en el bovino con semen refrigerado, que mantenía su capacidad fecundante por un espacio de cuatro días (Watson, 1990).

Durante la siguiente década se suceden las experiencias de congelación con semen de otras especies, produciéndose en 1950 la primera congelación en caballo (Watson, 1990); por aquel entonces también se realizaban pruebas en toro, que dieron lugar al nacimiento de la primera cría con semen congelado en 1951 (Curry, 2000); en cambio, la obtención de descendencia de equino no se consiguió hasta 1957 (Curry, 2000); los primeros ensayos en morueco y en verraco son de 1956 (Watson, 1990), pero los primeros nacimientos no se lograron hasta 1967 (Curry, 2000) y 1970 (Polge *et al.*, 1970), respectivamente. Por otro lado, en humano las primeras referencias que recogen nacimientos de bebés utilizando semen descongelado datan de 1953.

El gran interés inicial que suscitó esta técnica se ha mantenido con los años y el extenso trabajo experimental realizado ha conseguido grandes avances, haciendo que en la actualidad contemos con métodos mucho más apropiados de dilución, de envasado, de congelación o de descongelación para el semen de las diferentes especies (Watson, 1995; Curry, 2000); no obstante, parece que únicamente la especie bovina es la que ha conseguido incorporar con éxito esta técnica al campo de la IA comercial (Polge *et al.*, 1970; Iritani, 1980; Curry, 2000) y en este éxito

ha podido jugar un papel importante la posible coyuntura socioeconómica favorable de esta especie, evidenciada en el gran interés mostrado desde un primer momento por la implantación de la criopreservación seminal en este sector, que habría permitido la disposición de suficientes recursos económicos para investigación y, por ende, la consecución de un desarrollo más temprano de la técnica en esta especie, por lo que no sería casual que sea en ella donde han aparecido los primeros diluyentes específicos para congelación o se han obtenido los primeros descendientes con semen descongelado, junto con los de humano. No obstante, la implantación a nivel comercial no responde exclusivamente a esta supuesta coyuntura favorable; de hecho, la especie porcina, con características socioeconómicas similares, vio limitado su desarrollo al quedar acaparada la atención de los investigadores por la gran demanda desatada por parte de los ganaderos de bovino con los buenos resultados obtenidos (Polge, 1956); y es que para que una determinada técnica tenga éxito desde un punto de vista comercial, es necesario que se obtengan con ella resultados equiparables a los de las técnicas empleadas con anterioridad (Curry, 2000), en este caso la monta natural o la IA con semen refrigerado, lo cual hasta el momento, sólo se ha podido conseguir en el bovino dentro de las especies de ganado de renta.

La criopreservación de semen también se ha llevado a cabo en numerosas especies de mamíferos, aves, reptiles y peces (Curry, 2000) sin una finalidad comercial prioritaria, sino con el fin de conservar los recursos genéticos de animales en peligro de extinción (Holt y Pickard, 1999; Yoshida, 2000; Delgado, 2000).

### 2.1.1.2. Panorama de la criopreservación en la especie porcina.

#### Desarrollo histórico.

Las primeras experiencias de criopreservación seminal en porcino se realizaron en 1956 y continuaron desarrollándose durante la década de los 60 con resultados bastante satisfactorios en cuanto a la supervivencia celular se refiere (revisado por Polge *et al.*, 1970), no así en cuanto a los resultados de fertilidad; en 1970 se lograron resultados similares a los obtenidos con semen fresco, pero realizando la deposición directa de los espermatozoides en el oviducto, pues si las células espermáticas se inoculaban vía cervical o en el extremo de los cuernos uterinos no prosperaban (Polge *et al.*, 1970), lo cual fue achacado por los autores al daño que la congelación provocaba en la membrana espermática, que favorecería la destrucción celular por parte de los leucocitos durante el transcurso de los espermatozoides por el útero. No obstante, un año después, en 1971, aparecen tres métodos de congelación para los espermatozoides de porcino que sí conseguían mantener la fertilidad tras una IA intracervical (Crabo y Einarsson, 1971; Graham *et al.*, 1971; Pursel y Johnson, 1971 [citados en Bwanga, 1991]), y a partir de ellos se produjo un continuo y creciente interés por desarrollar metodologías que permitieran la aplicación de la criopreservación en el ámbito comercial, lo que propició la aparición de numerosos y exitosos procedimientos en los siguientes quince años.

En 1975 se publican dos metodologías que han sido el referente de prácticamente todas las utilizadas hasta el día de hoy; por un lado, en EEUU, Pursel y Johnson (1975a) con un método de congelación en pastillas o “pellets” y, por otro, en Alemania, Westendorf y sus colaboradores

(1975) mediante un novedoso sistema de envasado en pajuelas; ambos métodos presentan diferencias evidentes pero coinciden en la utilización de diluyentes caracterizados por la presencia de yema de huevo y de glicerol para la crioprotección de las células, así como por una alta concentración de azúcares y por la adición de un agente detergente (*Orvus es Paste*). Las importantes novedades introducidas por Pursel y Johnson no sólo se referían a metodología de congelación y descongelación, con la que consiguieron un notable incremento de la calidad y capacidad fecundante del semen, sino también a la practicidad del proceso, facilitando en gran medida el trabajo en los centros que producían el semen congelado y en las granjas donde se realizaban con él las inseminaciones (Johnson, 1985). Por su parte, el sistema de envasado de semen en pajuelas de 5 ml ideado por el equipo de Westendorf para proceder a su congelación en vapores estáticos de nitrógeno revolucionó el sector, aunque esta idea ya había sido mencionada diez años antes para semen de toro (Watson, 1990). Posteriormente, Paquignon y Courot (1976) y Larsson *et al.* (1977) proponen dos nuevos procedimientos prácticos de congelación en pastillas sobre nieve carbónica, que no tuvieron éxito en el ámbito comercial, al decantarse los ganaderos por los dos anteriores (Johnson, 1985), que al mismo tiempo fueron la base del abundante trabajo experimental llevado a cabo por la comunidad científica en los años venideros, con el fin primordial de conseguir optimizar las condiciones de congelación y descongelación, así como mejorar la practicidad en el uso del semen congelado [ver, por ejemplo, Hammitt y Martin (1989); Fiser y Fairfull (1990); Bwanga *et al.* (1991b); Berger y Fischerleitner (1992); Fiser *et al.* (1993); Eriksson y Rodríguez-Martínez (2000b),(2000a); Saravia *et al.* (2005)] .

### **Situación actual.**

La utilización de semen congelado en el sector porcino sigue siendo en la actualidad muy reducida, prácticamente anecdótica, si la comparamos con el porcentaje de inseminaciones que se realizan con dosis frescas/refrigeradas, si bien hay que tener en cuenta que éste último también muestra variaciones notables en función del país al que nos reframos (tabla 2.1). Por su parte, en cuanto a la elaboración y utilización de las dosis congeladas, Wagner y Tibier (2000) recogieron la existencia de un cierto desfase entre ambas, pues mientras el 60 % de las mismas eran producidas en EEUU y el 40 % restante en Europa, los porcentajes en cuanto a su utilización ya no coincidían, variando notablemente al aparecer una amplia lista de terceros países a los que se habían exportado, fundamentalmente las dosis producidas en EEUU, donde el comercio exterior de dosis seminales ha caracterizado desde hace unos años la producción de semen congelado en la especie porcina (Reed, 1985; Almlid y Hofmo, 1996); en concreto, en 1991 los EEUU exportaron la mitad de las dosis congeladas producidas (Crabo, 1991), y en 1998 únicamente se contabilizaron 1000 inseminaciones a pesar de que se elaboraron en torno a 10000 dosis (Wagner y Tibier, 2000).

Esta escasa utilización del semen congelado en el ámbito comercial se debe principalmente a que su rendimiento productivo es muy inferior al del semen fresco/refrigerado, ya que se ha determinado que disminuye de forma considerable, tanto el porcentaje de partos obtenidos, que es en torno a un 20 % menos (Johnson, 1985), como el número de lechones nacidos, en torno a 2 ó 3 menos (Hofmo y Almlid, 1991). Además, la aparición de nuevos diluyentes mejorados

ha permitido incrementar el periodo de tiempo de preservación de la capacidad fecundante del semen refrigerado, a temperaturas entre 15 y 20 °C, de 3 ó 4 días a 6 ó 7 (Dube *et al.*, 2004; Vyt *et al.*, 2004a), posibilitando la creación de redes de distribución de semen que proporcionan a los ganaderos la obtención de resultados similares a los de la monta natural pero con las innumerables ventajas que la IA tiene sobre ésta.

País	nº Cerdas	% IA Refrigerado
China	39.500.000	30
Vietnam	2.806.000	70
Filipinas	1.091.000	55
Japón	991.000	10
Rep. Corea	671.000	15
EEUU	6.216.000	55
Brasil	3.100.000	20
Canadá	1.238.000	55
México	1 085 000	30
Alemania	2.630.000	70
España	2.172.000	90
Polonia	1.951.000	40
Francia	1.588.000	65
Holanda	1.342.000	90
Dinamarca	1.250.000	70
Italia	850.000	40
Reino Unido	770.000	35
Australia	280.000	35

**Tabla 2.1:** Porcentaje de inseminaciones utilizando semen refrigerado en los países con más censo de porcino.

la mejora genética de los animales de explotación (Gadea, 2004) o la introducción en otros países de nuevas líneas selectas de bisabuelos/as y abuelo/as (Almlid y Hofmo, 1996).

Entre los últimos avances logrados para tratar de hacer más rentable este procedimiento, destaca la utilización de un catéter especial que permite depositar el material seminal más allá del cuello uterino (Roca *et al.*, 2000b; Vázquez *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2001), con lo que se minimizan algunos de los inconvenientes, ya que además de incrementar los porcentajes de fertilidad (76-80 %) y prolificidad (9,3-9,5 lechones por camada), se consigue reducir el número de espermatozoides necesarios para llevar a cabo la inseminación (con el consiguiente aumento del número de dosis producidas y, por ende, la disminución del coste); así, Bolarin *et al.* (2006) utilizando este método y con sólo 1000 millones de espermatozoides descongelados por dosis, obtuvieron notables resultados tanto en fertilidad (70 %) como en prolificidad (9 lechones nacidos vivos).

No obstante, existen otras muchas causas que van a limitar la utilización de las dosis seminales criopreservadas en el ganado porcino, como son el requerimiento de un mayor número de espermatozoides por dosis de inseminación, el elevado coste del proceso, la ausencia de análisis de laboratorio que determinen de una forma precisa la calidad seminal, la disminución de la vida fértil de los espermatozoides descongelados o la gran variación existente entre razas y entre verracos en relación con la supervivencia espermática al proceso (Eriksson, 2000). Todos estos inconvenientes son los que han hecho que hoy en día la utilización de semen congelado/descongelado en el ganado porcino se haya reducido, aparte de su uso en investigación, a la producción en pureza en las granjas de selección genética, puesto que en este caso los rendimientos reproductivos, aunque no dejan de ser importantes, son secundarios con respecto a la consecución del objetivo primario, que es

Otra de las líneas de investigación desarrolladas durante los últimos años, que además está relacionada con la técnica anterior, trata de buscar una mejor sincronización del momento de la ovulación con la llegada de los espermatozoides descongelados al oviducto, dada la reducida vida fértil que éstos presentan (Abad *et al.*, 2006).

Últimamente también se ha centrado la atención en los fenómenos relacionados con las especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species* [ROS]), que causan parte de las alteraciones estructurales y funcionales que sufre el espermatozoide porcino durante los procesos de congelación y descongelación; en este sentido, se han venido utilizando en los diluyentes de congelación enzimas (superóxido dismutasa [SOD], catalasa) o sustancias antioxidantes ( $\alpha$ -tocoferol) con el fin de proteger, en cierto modo, a las estructuras espermáticas de su efecto nocivo, consiguiendo con ello implementar no sólo los resultados de motilidad e integridad de las membranas acrosómica y plasmática (Breininger *et al.*, 2005), sino también la capacidad fecundante en pruebas de fecundación *in vitro* (Roca *et al.*, 2005).

### 2.1.2. Efecto de la criopreservación sobre la célula espermática.

La utilización de bajas temperaturas en las técnicas de conservación celular es una práctica muy difundida, dada la drástica disminución del metabolismo que conlleva (Gao y Critser, 2000); no obstante, también implica la aparición de efectos deletéreos que pueden llegar a causar incluso la muerte de la célula (Hammerstedt *et al.*, 1990), o bien producir en ella cambios similares a los que suceden durante la capacitación espermática (Cormier *et al.*, 1997; Maxwell y Johnson, 1997a; Neild *et al.*, 1999), dificultando su capacidad para interactuar con el ovocito durante la fecundación (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2000), con lo que esta preservación perdería su finalidad.

Hammerstedt *et al.* (1990) dividieron al proceso de criopreservación en cinco etapas en función de la relación existente entre el tiempo y la temperatura, cada una de las cuales presenta una relación especial con el metabolismo celular y las características funcionales y estructurales de las membranas. Estas etapas y sus efectos son los siguientes:

1. Dilución y enfriamiento: produce una alteración de las propiedades físicas de las membranas celulares.
2. Adición de un agente crioprotector penetrante y envasado: provoca una notable variación del volumen celular, seguida de una rápida recuperación posterior.
3. Congelación propiamente dicha: altera tanto la estructura de las membranas como el volumen celular en un pequeño espacio de tiempo.
4. Almacenamiento: etapa caracterizada por la estabilidad celular.
5. Descongelación e inseminación: recuperación de las características de membrana y del volumen celular.

La inexorable aparición de todos estos cambios puede provocar daños que condicionen la correcta funcionalidad del espermatozoide (Watson, 1995; Gao *et al.*, 1997), así como su supervivencia, por lo que el éxito de la criopreservación va a depender notablemente de la capacidad de adaptación que la célula presente a todas y cada una de estas etapas, y especialmente a algunas de ellas, las que resultan más perjudiciales para la célula; en concreto, la adición del agente crioprotector (Watson, 2001), tanto por el estrés osmótico que produce como por su toxicidad a ciertas concentraciones, y las etapas de congelación y descongelación (Watson, 1995), porque en ellas van a coincidir dos sucesos claramente estresantes como son la formación y disolución de cristales de hielo y el cambio de temperatura.

### 2.1.2.1. Efectos del enfriamiento celular.

De forma previa a la realización de la congelación propiamente dicha, la temperatura de la suspensión espermática se hace descender desde sus valores fisiológicos tras el eyaculado a otros ligeramente superiores a 0 °C, provocando con este descenso térmico un estado de hipotermia celular que puede ser muy perjudicial para el espermatozoide (Parks, 1997). La sensibilidad de la célula espermática a ese estado hipotérmico fue descrita ya en 1934 por Milovanov (citado en Parks, 1997) al observar que los espermatozoides de toro perdían irreversiblemente la movilidad al descender la temperatura hasta valores cercanos a los 0 °C, denominando a este proceso “shock por temperatura”. En la actualidad este proceso se conoce como choque *a frigore*, choque por frío o *cold shock* en la literatura anglosajona (Parks, 1997) y hace referencia principalmente a la susceptibilidad celular frente a un descenso rápido de temperatura (Watson, 1995, Mazur *et al.*, 2008), aunque hay que tener en cuenta que los daños celulares producidos al someter a las suspensiones celulares al frío, no sólo van a estar íntimamente relacionados con la velocidad con la que suceda el descenso térmico, sino también con la temperatura final que se alcance. A partir de esta idea surge el concepto de enfriamiento extremo o *chilling injury* (Watson, 1990; 1995), definido como el daño o muerte celular ocasionado como consecuencia de la exposición de las células a bajas temperaturas pero por encima del punto de congelación (Mazur *et al.*, 2008). Si los espermatozoides son enfriados de forma brusca entre los 20 y los 0 °C sufrirán una manifiesta pérdida de integridad de membrana y de sus funciones celulares (Watson, 1995), entre las que destaca la desaparición irreversible de la capacidad para desplazarse (Mazur *et al.*, 2008), siendo los efectos más acusados si el rango térmico se sitúa entre los 12 y los 2 °C (Watson, 1995); en cambio, si la velocidad de descenso térmico es lenta (<10 °C/min), esta pérdida de movilidad se va a ver claramente minimizada, al igual que la severidad y la extensión del resto de lesiones celulares (Mazur *et al.*, 2008). La implicación del *chilling injury* en el daño celular por enfriamiento queda de manifiesto al comprobar que la extensión de las lesiones resulta mayor cuanto más baja es la temperatura alcanzada por la célula, siendo además proporcional al tiempo de exposición (Mazur *et al.*, 2008).

A pesar de que estos fenómenos afectan en general a los espermatozoides de todas las especies, la sensibilidad al enfriamiento varía considerablemente entre ellas (Parks, 1997); así, mientras

que los espermatozoides de gallo o de humano presentan una alta resistencia al frío, los de verraco van a mostrar una extremada sensibilidad al descenso térmico. En un término medio, nos vamos a encontrar con otras especies como la canina o la felina que a pesar de caracterizarse por tener una resistencia relativamente alta al frío, no llegan a la mostrada en humano o en aves de corral y, en el lado opuesto, se situarían los espermatozoides de ungulados, como el toro, el morueco o el caballo, que son considerados altamente sensibles (Watson, 1995), si bien, tampoco llegan a alcanzar la susceptibilidad mostrada por las células espermáticas del verraco.

Esta diversa resistencia entre especies ha sido atribuida a las características estructurales de las membranas celulares, fundamentalmente a las diferencias en su composición lipídica (De Leeuw *et al.*, 1990a; Parks y Linch, 1992; White, 1993). La pérdida de viabilidad espermática después de un choque *a frigore*, que implica indudablemente la ruptura de las membranas celulares, así como la disminución detectada de fosfolípidos tras este proceso, ha hecho suponer la importancia de ciertos componentes de membrana, como los fosfolípidos o el colesterol, en la resistencia al enfriamiento ya que también se les ha atribuido un papel relevante en el mantenimiento de la integridad estructural de las membranas celulares (White, 1993).

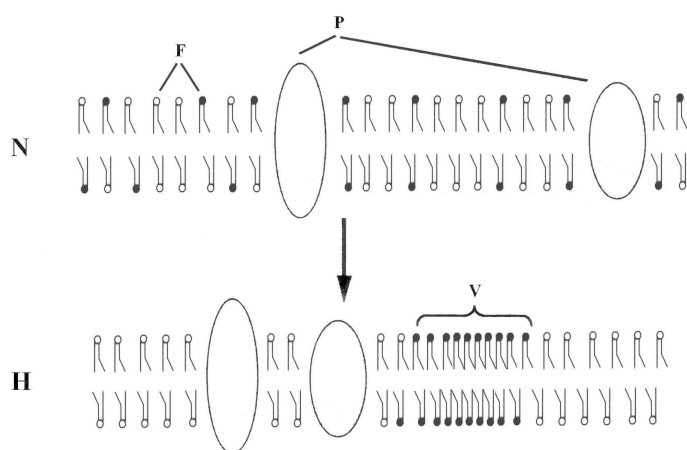
Los fosfolípidos son los componentes mayoritarios de las membranas de los espermatozoides eyaculados en prácticamente todas las especies animales y, aunque la gran variabilidad existente en su composición sugiere variaciones en las características estructurales de las membranas, esto no sería suficiente para establecer las diferencias de susceptibilidad al frío entre especies (White, 1993); de hecho, nos encontramos con que los espermatozoides de humano y de verraco, a pesar de mostrar una resistencia al frío diametralmente opuesta, presentan una composición en cuanto a fosfolípidos similar (White, 1993). Por otro lado, la composición de fosfolípidos de la membrana plasmática no es necesariamente indicativa de la composición lipídica de otras membranas de la célula, como la acrosomal, que también resultan notablemente sensibles al descenso de temperatura (Parks *et al.*, 1987, en White, 1993).

Sin embargo, el tipo de ácido graso presente en el fosfolípido y la proporción de colesterol sí han sido correlacionados con la sensibilidad al choque por frío (Watson, 1990). Atendiendo al ratio de ácidos grasos insaturados y saturados en los fosfolípidos, los espermatozoides de las diferentes especies pueden dividirse en dos grupos, uno con valores cercanos a 1, como en el humano, el gallo, el perro o el conejo (especies caracterizadas por una alta resistencia al frío), y otro con valores que oscilan entre el 2,5 y el 3,0, donde se encuadran las células espermáticas del verraco, del toro o del morueco (especies notablemente más susceptibles que las anteriores) [Watson y Plummer, 1985; White, 1993]. En cuanto a la proporción de colesterol, se ha determinado que cuanto menor es el cociente colesterol/fosfolípidos mayor resulta la susceptibilidad al choque por frío (Watson y Plummer, 1985; De Leeuw *et al.*, 1990b; White, 1993; Parks, 1997). La implicación del colesterol en el mantenimiento y estabilización de las membranas celulares es clara, y su presencia resulta importante en la cohesión y creación de una cierta impermeabilización de las membranas, fundamentalmente en aquellas ricas en ácidos grasos poliinsaturados, como se recoge a partir de estudios físico-químicos realizados con modelos de membrana (White, 1993). Su

implicación sobre la resistencia al frío se pone de manifiesto, por ejemplo, al analizar los cocientes colesterol/fosfolípidos de los espermatozoides de humano y de verraco, pues mientras en humano alcanza valores en torno a 0,9 - 1, en verraco permanece sobre el 0,2 (Watson y Plummer, 1985).

La importancia de estos dos componentes es tal que autores como Nikolopoulou *et al.* (1985) o De Leeuw *et al.* (1990b) han llegado a afirmar que la escasez de moléculas de colesterol y la abundancia de fosfolípidos con elevado número de insaturaciones podrían ser la causa de la elevada susceptibilidad al enfriamiento que muestra el espermatozoide de verraco. Esta influencia radica en que ambos van a condicionar la facilidad con la que aparecen fenómenos de transición y separación lateral de fases (Alberts *et al.*, 1989), que son, en definitiva, a los que se ha atribuido el daño que el enfriamiento causa al espermatozoide (Drobnis *et al.*, 1993).

Los fenómenos de transición y separación lateral de fases son el resultado del comportamiento termotrópico que presentan los sistemas de membrana que contienen lípidos con ácidos grasos (Parks, 1997); en estos sistemas, bajo condiciones fisiológicas, los lípidos y proteínas se encuentran íntimamente asociados, pero no por medio de uniones covalentes, lo que permite, siempre y cuando las temperaturas se sitúen por encima de un valor determinado, una cierta libertad para el desplazamiento lateral de los primeros. A medida que esta temperatura va descendiendo, ciertos lípidos que forman parte de la membrana pasan de fase líquida a gel (puntos de fusión); en concreto, van a existir a lo largo de todo el proceso varias temperaturas críticas en las que se van a producir estos fenómenos de transición de fases y conforme vayan apareciendo se irán formando “parches” gelificados rodeados de otros fosfolípidos aún en fase líquida, dado su punto de fusión más bajo, cuyos movimientos laterales van a provocar la agrupación de aquellos fosfolípidos con puntos de fusión más altos en dominios gelificados, experimentando la membrana un fenómeno de separación lateral de fases (Alberts *et al.*, 1989) [figura 2.1].



**Figura 2.1:** Representación gráfica del fenómeno de transición de fases que experimentan los fosfolípidos de membrana. F: fosfolípidos; P: proteínas; Grupo polar de color oscuro representa los fosfolípidos que al pasar de un estado normotérmico (N) a otro hipotérmico (H), forman un parche de fase viscosa (V). (Figura extraída de Parks, 1997).

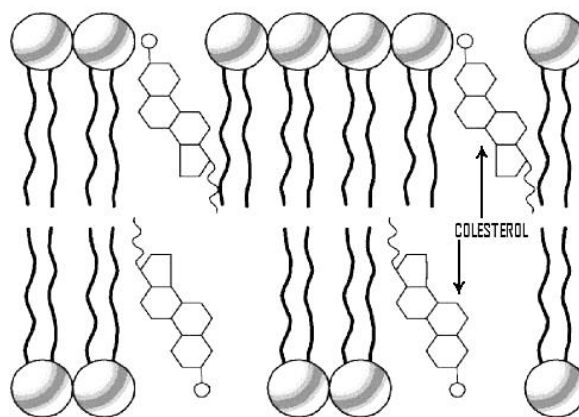
El carácter deletéreo de este fenómeno radica en el desencadenamiento de varios sucesos, como el notable incremento de la permeabilidad de la membrana debido a los defectos de ensamblaje entre las diferentes fases, la exclusión de las proteínas estructurales de membrana de las fases viscosas, lo que alteraría la correcta funcionalidad de las mismas dada la importancia de la interacción lípido/proteína, o la alteración del transporte de membrana al complicar la difusibilidad de las proteínas por la bicapa lipídica (Parks, 1997;



Peláez *et al.*, 2002). A pesar de que en teoría este fenómeno puede ser revertido con el calentamiento de la célula, se ha determinado que la reversibilidad del mismo va a ser únicamente parcial, ya que algunas de las consecuencias acaecidas mientras estuvo instaurado no van a poder ser eliminadas, afectando de forma considerable a la viabilidad celular (De Leeuw *et al.*, 1990b).

La importancia del grado de saturación de los ácidos grasos en la resistencia al descenso térmico parece responder a que la configuración tridimensional que confiere la presencia de dobles o triples enlaces a la estructura molecular, va a dificultar en gran medida la interacción necesaria para el “empaquetamiento” de los fosfolípidos en dominios gelificados, mientras que la presencia de colesterol complicará el acercamiento de los fosfolípidos necesario para este mismo fin, al interponerse entre las moléculas de éstos (Alberts *et al.*, 1989) [figura 2.2].

No obstante, el alto contenido de ácidos grasos insaturados en las membranas de los espermatozoides porcinos no va a dificultar la supervivencia al enfriamiento únicamente por su implicación en los fenómenos de transición y separación lateral de fases, ya que el incremento de las ROS, que se ha puesto de manifiesto, tanto en el enfriamiento celular (Bilodeau *et al.*, 2000; Chatterjee y Gagnon, 2001; Chatterjee *et al.*, 2001), como en el proceso de la criopreservación de semen de hombre (Wang *et al.*, 1997), toro (Chatterjee y Gagnon, 2001) o cerdo (Cerolini *et al.*, 2001; Maldjian *et al.*, 2005), va a constituir otro factor importante en el daño celular, dado que las insaturaciones de los ácidos grasos constitutivos de los fosfolípidos y el colesterol, son las dianas de las ROS, produciéndose como resultado de su ataque peróxidos lipídicos y productos de oxidación del colesterol, lo que conlleva un cambio cuantitativo del plasmalema, al reducirse ambos constituyentes (Álvarez y Storey, 1992, Cerolini *et al.*, 2001; Maldjian *et al.*, 2005), y una alteración funcional del mismo, al disminuir su fluidez (Sanocka y Kurpisz, 2004).



**Figura 2.2:** Interposición de colesterol entre fosfolípidos de membrana dificultando el acercamiento que deben experimentar éstos para quedar “empaquetados”.

El incremento de la permeabilidad del plasmalema originado por los fenómenos de transición y separación lateral de fases va a ocasionar, entre otras consecuencias, un aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  que, mediante la activación de las proteínas-kinasas, desencadenará una cascada de procesos similares a los de la capacitación espermática (Green y Watson, 2001), que serán responsables de parte de las alteraciones morfofuncionales que sufren los espermatozoides tras el enfriamiento y que se engloban bajo la denominación de *criocapacitación* o *capacitation like changes* en la literatura anglosajona. Este proceso ha sido descrito en las células espermáticas de un gran

número de especies, como la porcina (Watson, 1996; Maxwell y Johnson, 1997a), la bovina (Cormier *et al.*, 1997), la ovina (Gillan *et al.*, 1997), la equina (Schembre *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2006), o incluso en ciertos roedores (Fuller y Whittingham, 1996).

El nombre de criocapacitación responde a que los cambios sucedidos en los espermatozoides recuerdan, como se ha mencionado, a los que se experimentan en la capacitación fisiológica, donde por la influencia de unas condiciones específicas en el oviducto de la hembra (secreciones, interacción del espermatozoide con las células epiteliales, etc.) [Hunter, 1988], se capacita a la célula espermática para el proceso de fecundación. En la actualidad se conoce que la capacitación espermática es un proceso de desestabilización del plasmalema caracterizado por la eliminación o la modificación de sustancias adsorbidas en la misma, que provocará un incremento del influjo de iones de calcio al interior de la célula (Yanagimachi, 1988), posibilitando, de este modo, la aparición de un movimiento de “hiperactivación”, necesario para que el espermatozoide se desplace por los fluidos viscosos del oviducto (Yanagimachi, 1970), así como la preparación del mismo para sufrir la reacción acrosómica (RA).

La similitud entre los procesos de capacitación fisiológica y criocapacitación también se ha puesto de manifiesto al detectar mediante la utilización de clortetraciclina (CTC) la presencia de patrones de tinción, en espermatozoides sometidos a un enfriamiento a 5 °C, similares a los observados en aquellos otros que han sido incubados en medios capacitantes (Maxwell y Johnson, 1997a), si bien se da por hecho que se trata de dos procesos diferentes, al no ser completamente similares las vías de regulación de ambos (Bravo *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2006). No obstante, a pesar de que existan ciertas diferencias entre estos dos procesos, el resultado final va a ser la desestabilización de la membrana plasmática y el desencadenamiento de la RA (Green y Watson, 2001), lo que supondrá una drástica reducción de la “vida fértil” de los espermatozoides; este hecho, en el caso de los espermatozoides criocapacitados, va a ser uno de los factores que determinen la disminución manifiesta de fertilidad característica de este tipo de células, dado que experimentan dicho cambio fuera del aparato reproductor de la hembra (Green y Watson, 2001; Kaneto *et al.*, 2002). En especies cuyas hembras presentan celos de larga duración (como la porcina o la equina) este fenómeno se agrava aún más, ya que se dificulta considerablemente la confluencia de los dos gametos en el momento óptimo para la fecundación.

Con el fin de hacer frente a los fenómenos dañinos acaecidos durante la criopreservación seminal, se han venido adoptando una serie de estrategias que intentan adecuar las condiciones del medio a las características de los espermatozoides, entre las que destacan, la elaboración de diluyentes de congelación y de descongelación específicos para cada especie y la adecuación del manejo seminal en los protocolos de congelación/descongelación.

En los primeros años de aplicación de la criopreservación en la especie porcina se adaptaron diluyentes empleados en semen de toro, con resultados poco satisfactorios, lo que incentivó la investigación y el desarrollo de diluyentes específicos para semen porcino. La composición de los diluyentes elaborados varía notablemente de unos a otros, por lo que no resulta apropiada la utilización de un determinado medio para una técnica diferente de aquella para la que fue diseñado (Paquignon, 1985), si bien presentan una serie de características comunes, como pueden ser la

incorporación de agentes crioprotectores o de sustancias amortiguadoras o tampón.

Con el paso de los años se han ido identificando diferentes compuestos que, incorporados a los diluyentes, han colaborado en la minimización del efecto de algunos de los procesos que incurren en la criopreservación seminal. Para el control del daño ocasionado por el enfriamiento celular se han venido utilizando con asiduidad una serie de sustancias, entre las que se podría destacar la yema de huevo que, a pesar de no tener un efecto protector sobre los espermatozoides de verraco tan eficaz como en otras especies, como la bovina o la ovina (Watson, 1990), es considerado un componente indispensable en los diluyentes crioprotectores de verraco (Bwanga, 1991). La yema de huevo es administrada en los diluyentes de enfriamiento en una proporción de un 20 %, con el fin de prevenir la desestabilización del plasmalema, y aunque se ha comprobado que posee esta capacidad, el modo en que ejerce dicho efecto protector no está del todo claro (Watson, 1990; Holt, 2000a), parece ser que es mediante el componente fosfolipídico de la fracción lipoproteica de baja densidad que contiene, que va a actuar sobre la superficie de la membrana plasmática, pero sin provocar cambios en la composición de la misma, por lo que aunque no consigue impedir la aparición de los fenómenos de transición de fase, sí limita las consecuencias de éstos. También se ha sugerido que influye sobre la permeabilidad de la membrana, al agua y a otros iones, por medio de la asociación de algún componente con la capa lipídica externa de la misma, así como mediante la activación de las bombas de iones a través de la adenilato ciclasa (AC) intracelular (Peláez, 2003). Esta modificación de la permeabilidad del plasmalema podría afectar al comportamiento osmótico de la célula variando su respuesta frente a situaciones de estrés osmótico como la adición de glicerol o la congelación y descongelación (Holt, 2000a).

Otra sustancia que ha demostrado poseer propiedades beneficiosas en el control del enfriamiento espermático es el Dodecil Sulfato Sódico (Orvus es Paste); se trata de un detergente sintético con propiedades surfactantes cuyo efecto protector sólo ocurre en combinación con la yema de huevo (Johnson *et al.*, 2000), ya que se presupone que modifica las partículas de ésta para incrementar su eficacia en la interacción con la membrana plasmática (Holt, 2000a). Su incorporación se efectúa fundamentalmente en diluyentes de criopreservación de equino y de porcino (Watson, 1990), con concentraciones que van del 0,5 al 2 % (Bwanga, 1991).

Otras moléculas que están siendo empleadas con cierta frecuencia en el control del enfriamiento de las muestras celulares son las ciclodextrinas; se trata de oligómeros cíclicos de glucosa que forman complejos solubles en agua con otras moléculas orgánicas que por sí mismas no lo son y pueden ser usadas para aportar colesterol a la membrana plasmática (Purdy y Graham, 2004b), de modo que, por medio de ciclodextrinas cargadas con colesterol, se ha conseguido proteger de forma eficiente a los espermatozoides de porcino frente al choque por frío (Bailey *et al.*, 2008), o implementar la supervivencia espermática al proceso de criopreservación en semen ovino y bovino (Bailey *et al.*, 2003; Purdy y Graham, 2004a; 2004b).

La incorporación de colesterol a la membrana espermática no sólo ha incrementado la supervivencia al enfriamiento, sino que también ha reducido la aparición de fenómenos de criocapa-

citación y de reacciones acrosómicas espontáneas (Galantino-Homer *et al.*, 2006), al compensar la disminución en el contenido de colesterol que sucede durante el enfriamiento (Maldjian *et al.*, 2005; Bailey *et al.*, 2008), dado que éste, a la postre, supondrá el desencadenamiento de la cascada de cambios iónicos intracelulares que, a través de vías de señalización intracelular, como la fosforilación de la tirosina, desencadenará la llamada criocapitación y la aparición de la RA (Visconti *et al.*, 1999a). A este respecto, la utilización de ciclodextrinas cargadas con colesterol previene la aparición de la fosfoproteína p32, un marcador bioquímico del daño producido por el choque por frío, que está altamente relacionado con la viabilidad post-choque y la aparición de reacciones acrosómicas espontáneas (Galantino-Homer *et al.*, 2006).

El elevado contenido de ácidos grasos insaturados presente en las membranas de los espermatozoides de verraco, hace que el control del estrés oxidativo resultante del incremento de ROS generadas durante el enfriamiento sea de gran importancia. Se han empleado multitud de sustancias con poder antioxidante con el fin de reducir este fenómeno claramente perjudicial para las células, tanto sobre la integridad de las membranas y el mantenimiento de la movilidad celular, como sobre la aparición de fenómenos de capacitación/criocapitación; en concreto, la utilización de Hidroxitolueno Butilado (BHT) en el medio de dilución proporciona a los espermatozoides de verraco un incremento de movilidad y de integridad acrosómica tras un choque por frío a 5 °C (Stewart, 1951 [en Grossfeld *et al.*, 2008]; Roca *et al.*, 2004), además de reducir considerablemente la peroxidación lipídica y de permitir un mayor desarrollo embrionario en muestras descongeladas, mediante su adición al diluyente de congelación (Grossfeld *et al.*, 2008). También se han recogido resultados satisfactorios en porcino al emplear otras sustancias antioxidantes en el medio de congelación, como pueden ser la Catalasa, en combinación o no con la Superóxido Dismutasa (SOD) [Roca *et al.*, 2005], el  $\alpha$ -Tocoferol (Polge, 1956 citado en Grossfeld *et al.*, 2008]) o el Trolox (Beconi *et al.*, 1991; Beconi *et al.*, 1993 [citados en Grossfeld *et al.*, 2008]; Peña *et al.*, 2003b; 2004). En otras especies también se ha conseguido implementar la calidad de las muestras descongeladas mediante la adición de este tipo de sustancias en los diluyentes de congelación, si bien su eficacia varía en función de la especie y la sustancia empleada; así, en bovino, moléculas como la Catalasa (White, 1993), el Glutatión Reducido (GSH) [Chatterjee *et al.*, 2001], la SOD (Lindemann *et al.*, 1988) o la vitamina E (Aitken *et al.*, 1989 en Grossfeld *et al.*, 2008) han mostrado su eficacia; en humano se han observado buenos resultados con la utilización de la vitamina E (de Lamirande y Gagnon, 1992), mientras que en equino no se ha visto incrementada con la adición al diluyente de congelación de sustancias como la SOD, el GSH, la catalasa o el  $\alpha$ -Tocoferol (Dukelow y Graham, 1962, en Grossfeld *et al.*, 2008), la calidad posdescongelado de las muestras.

A parte de la administración de ciertas sustancias a los medios de dilución, se pueden llevar a cabo una serie de medidas con el fin de incrementar la resistencia espermática al enfriamiento, entre las que destacan, por un lado, el mencionado control de la velocidad de enfriamiento, para tratar de reducir la extensión y severidad de las lesiones realizando un descenso de temperatura lento (Woelders *et al.*, 2005), y por otro, el establecimiento de un tiempo de espera de varias horas antes de la reducción térmica por debajo de los 15 °C (Watson, 1979; Pursel y Park, 1985; Watson, 1990), dado el incremento de la resistencia al enfriamiento que experimenta el esper-

matozoide a medida que va transcurriendo el tiempo a temperatura ambiente (15-30 °C) [Pursel *et al.*, 1972b; Pursel *et al.*, 1973; Tamuli y Watson, 1992; Nath *et al.*, 1994]; se desconoce el mecanismo por el que éste se produce y aunque se ha considerado una característica inherente a la célula, se ha determinado que está influenciado por otros factores externos, como pueden ser la composición o el pH del diluyente (Pursel *et al.*, 1972a; 1972b) o la presencia del plasma seminal (Johnson *et al.*, 2000). Este fenómeno no ocurre únicamente en el semen porcino, también ha sido descrito en el de toro o el de morueco (Watson y Plummer, 1985; Watson, 1990), y a pesar de que su efecto en estas especies resulta bastante menos pronunciado, también se suele incluir esta pausa como parte importante de los protocolos de criopreservación habituales. Su inclusión en los protocolos empleados para el semen de verraco resulta esencial, pues se ha comprobado que se reducen considerablemente los daños celulares (Maxwell y Johnson, 1997a); suele establecerse con una duración entre las 2 y las 4,5 horas, generalmente en presencia de plasma seminal (Bwanga, 1991), aunque no está del todo aclarado cuál es el periodo óptimo, puesto que en estudios posteriores se observó que la resistencia al enfriamiento iba incrementándose hasta las 16 horas (Tamuli y Watson, 1994a), lo que proporciona un aumento de la calidad seminal posdescongelado (Kotzias-Bandeira *et al.*, 1997; Eriksson *et al.*, 2001), pero sin un reflejo positivo claro sobre la capacidad fecundante del semen (Eriksson *et al.*, 2001).

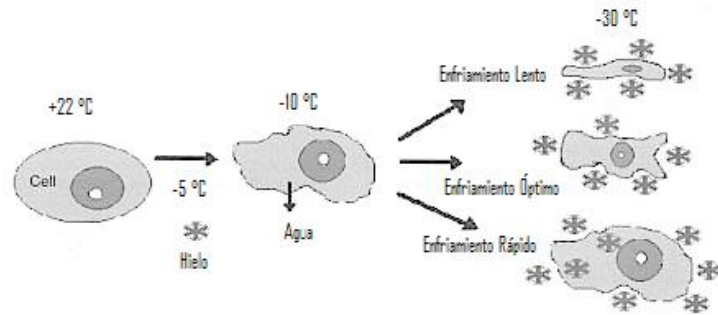
#### **2.1.2.2. Efectos de la formación y disolución de hielo.**

Por lo que respecta a las fases de congelación y descongelación, las teorías propuestas para explicar el daño celular hacen referencia a las consecuencias de la formación de hielo y su disolución, que dependen, respectivamente, de las velocidades de enfriamiento y calentamiento (Watson, 1995).

En cuanto a la formación de hielo, podemos aplicar el siguiente modelo genérico, descrito por Mazur (1985), a la hora de explicar los fenómenos que se producen en la célula espermática durante el proceso de congelación (figura 2.3):

- Por encima de -5 °C, ni las células ni el medio extracelular presentan indicios de congelación, pues los agentes crioprotectores que se añaden al medio disminuyen el punto de fusión; ambos, se mantienen en estado de “superenfriamiento” (*supercooling* en la literatura anglosajona), una situación inestable determinada por la presencia de agua en estado líquido a temperaturas inferiores a los 0 °C.
- Entre -5 y -15 °C empiezan a formarse de manera espontánea los primeros cristales de hielo en el medio extracelular, mientras que el interior de la célula permanece aún en estado de superenfriamiento, pues la membrana plasmática evita que los cristales extracelulares de hielo penetren en el citoplasma a través de sus poros acuosos, impidiendo así que crezcan en el espacio intracelular. La cristalización parcial extracelular reduce la cantidad de agua disponible para solubilizar los solutos, por lo que al aumentar la concentración de éstos, el agua intracelular, no congelada, fluirá hacia el exterior para equilibrar las presiones osmóticas a uno y otro lado del plasmalema y como consecuencia de ello, la célula comenzará a experimentar un proceso de deshidratación.

Los acontecimientos posteriores dependen de la rapidez con que las células sean congeladas, pues el grado de permeabilidad de la membrana plasmática al agua varía en función de la temperatura, de forma que la velocidad de enfriamiento condicionará el tiempo durante el cual el agua puede fluir a través de la membrana. Podemos diferenciar los fenómenos que se producirán según que el ritmo



**Figura 2.3:** Representación esquemática de los fenómenos físicos que experimentan la célula y el medio que la rodea durante el proceso de criopreservación, según sea la velocidad de enfriamiento. (Figura extraída de Gao y Critser, 2000).

de enfriamiento sea lento o rápido. Si el ritmo de enfriamiento resulta lento, se tardará en alcanzar la temperatura en la que la membrana se hace impermeable al agua, por lo que la célula contará con tiempo suficiente para deshidratarse; a medida que el agua fluye del compartimento intracelular, la concentración de solutos en el interior de la célula aumenta, y el estado de superenfriamiento desaparece, de forma que la célula se deshidrata pero no se congela. Por el contrario, si la temperatura desciende de modo rápido, la célula se hace relativamente impermeable al agua en poco tiempo, y al no fluir ésta con la suficiente rapidez como para que se alcance el equilibrio osmótico en el tiempo disponible, existirá un “exceso” de hidratación en la célula que va a mantener el estado de superenfriamiento, lo cual conduce eventualmente a la formación de hielo intracelular como solución final para alcanzar el equilibrio osmótico.

En definitiva, el estrés que el proceso de congelación causa a la estructura de la célula está relacionado con la circulación del agua a través de la membrana y la deshidratación, así como con la posibilidad de que se forme hielo intracelular si el enfriamiento es rápido; del mismo modo, se ha de suponer la existencia de un proceso inverso en la descongelación (Watson, 1995).

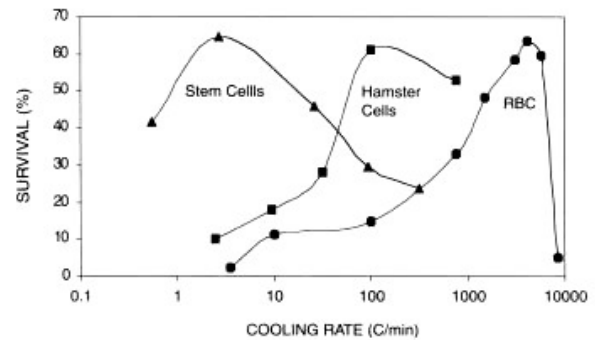
**Influencia de la velocidad de enfriamiento.** Cuando tienen lugar descensos rápidos de temperatura, el fenómeno físico más destacable es la formación de cristales de hielo en el espacio intracelular, hecho que provoca la aparición de severas lesiones o incluso la muerte de la célula (Mazur, 1985; De Leeuw *et al.*, 1990b). No obstante, las consecuencias de este fenómeno dependen del tamaño de los cristales que se formen, lo cual va a depender a su vez del ritmo de enfriamiento mantenido: rápido, que conduce a la formación de cristales voluminosos, o muy rápido, con el que se forman cristales de pequeño tamaño (microcristales), que por lo general no se consideran dañinos (De Leeuw *et al.*, 1990b). Por el contrario, aunque el proceso de deshidratación que acompaña a la congelación lenta se asocia potencialmente con la supervivencia celular (Watson, 1995), velocidades demasiado lentas también provocan alteraciones importantes en la célula, dando lugar a bajos índices de supervivencia (Mazur, 1985). Como se ha demostrado en la práctica, tanto en las células espermáticas como en otros muchos tipos celulares, existe una velocidad de enfriamiento considerada óptima, por encima o por debajo de la cual van a ser menos las células

que sobrevivan al proceso (Mazur, 1985). De esta forma, la representación gráfica de la relación entre el porcentaje de supervivencia celular y la velocidad en el descenso de temperatura produce unas curvas características en forma de “U” invertida, donde el punto más elevado correspondería a la velocidad considerada óptima; así se ha verificado tanto en células espermáticas de algunas especies (Watson, 1995), como en otros muchos tipos celulares (figura 2.4) [Gao *et al.*, 1997].

Ya en 1965 Mazur explicó los motivos que subyacen bajo este comportamiento, proponiendo que existían dos factores responsables que mostraban tendencias opuestas en su relación de dependencia con la velocidad de enfriamiento; así, en esta “teoría de los dos factores” (figura 2.5), a velocidades más lentas que la óptima las células quedan expuestas durante demasiado tiempo a los llamados “efectos solución”, que son todas las propiedades de la solución extracelular que se modifican a medida que se produce la formación de hielo (aumento de la concentración salina, aumento de la osmolaridad, cambios de pH, alteración de la composición de la solución, puesto que las sales alcanzan su nivel de saturación y precipitan, etc.); en cambio, a velocidades de enfriamiento por encima de la óptima, no hay suficiente tiempo para que el agua salga de la célula, conduciendo a una situación de superenfriamiento, que aumenta la probabilidad de que se produzca la formación de hielo intracelular, lo que suele ser letal. Otros autores, no obstante, citados por Woelders (1997), consideran que, más que la formación de hielo, lo que daña a la célula en este rango de velocidades de enfriamiento es la rapidez con que se produce la salida de agua, que podría desequilibrar la presión a ambos lados de la membrana, o también, los extremadamente rápidos cambios de forma, tamaño y ultraestructura de la célula que ocurren como consecuencia de dicho fenómeno.

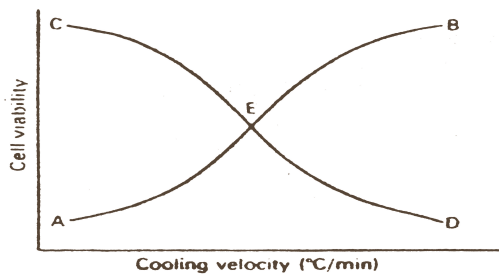
No obstante, independientemente de la velocidad de enfriamiento que se aplique, la mayoría de los tipos celulares no sobreviven a la congelación sin un agente crioprotector. La incorporación de estas sustancias a la suspensión celular modifica el trazado de la curva, incrementando el porcentaje de supervivencia, en un rango determinado de velocidades de enfriamiento respecto de los valores que se obtienen en su ausencia. Se establece, además, una interacción entre la concentración del crioprotector y la velocidad de enfriamiento, de tal manera que la optimización del proceso, cuando se añaden bajas concentraciones de crioprotector, requiere utilizar velocidades de enfriamiento más rápidas, y viceversa (Watson, 1990).

La velocidad óptima de enfriamiento oscila entre 10 y 80 °C/min (Watson, 1995) dependiendo del tipo celular, y dentro de los espermatozoides, de la especie de procedencia; en concreto, está entre 30 y 50 °C/min para el semen de verraco, entre 50 y 60 °C/min para el de morueco, y



**Figura 2.4:** Relación entre el porcentaje de supervivencia y la velocidad de enfriamiento en tres tipos celulares (forma de “U” invertida). “Stem cells” hace referencia a células de médula ósea de ratón; “Hamster cells” hace referencia a ovocitos de hamster; “RBC” se refiere a eritrocitos humanos (Figura extraída de Gao y Critser, 2000).

entre 26 y 52 °C/min para el de toro (Woelders, 1997).



**Figura 2.5:** Representación de la “teoría de los dos factores”, que muestra la influencia que ejercen dos mecanismos letales dependientes de la velocidad de enfriamiento sobre la supervivencia celular. AB: “supervivencia bajo los efectos solución”; CD: “supervivencia bajo los efectos de la formación intracelular de hielo”. El trazado AED explicaría las tendencias observadas en la figura 2.4 (Figura extraída de Watson, 1990).

así como el volumen de agua que es necesario perder para alcanzar la situación de equilibrio entre los compartimentos extra e intracelulares. Mediante la combinación de tales fórmulas se puede llegar a estimar la probabilidad de congelación intracelular como función de la velocidad de enfriamiento (Mazur, 1985).

A partir de este planteamiento teórico, se han calculado los parámetros biofísicos de interés para los espermatozoides de unas cuantas especies domésticas [ver, por ejemplo, Watson (1995), Gao *et al.* (1997) y Curry (2000)], pero cuando las velocidades óptimas de enfriamiento que se derivan del cálculo teórico a partir de estos parámetros se comparan con las observaciones experimentales, los valores no coinciden (Watson, 1995; Holt, 2000a). No obstante, el valor predictivo de estos modelos ha podido ser testado en una gran variedad de tipos celulares, desde protoplastos de plantas hasta ovocitos o embriones de mamíferos (Gao *et al.*, 1997; Holt, 2000a), por lo que se cree que las discrepancias encontradas con el espermatozoide pueden ser debidas a ciertas peculiaridades que presenta, por ejemplo, a la organización de la membrana plasmática del espermatozoide en dominios, afectando por tanto al cálculo de la conductividad hidráulica y de la energía de activación, cuyos valores podrían variar entre dominios, o a que su morfología es un tanto particular, haciendo complicado el cálculo del área de la membrana con los métodos que habitualmente se utilizan en otros tipos celulares (Holt, 2000a); Watson (1995), sin embargo, se ha mostrado más partidario de atribuir las diferencias al hecho de que en esta célula los daños se producen también a través de otros mecanismos, posiblemente de naturaleza osmótica.

Estas diferencias entre tipos celulares sugieren que características intrínsecas a la célula van a influir en el trazado de las curvas, características que se refieren a factores que afectan a la facilidad con que el agua puede salir de la célula, si bien el grado en que ésta se pierde está en función del diferencial de presión osmótica a ambos lados de la membrana y también viene definido tanto por el coeficiente de permeabilidad al agua del plasmalema, llamado “conductividad hidráulica”, a su vez dependiente de la temperatura e influido por una constante llamada “energía de activación”, como por el área o superficie de la célula. Se han podido formular, entonces, complejas ecuaciones matemáticas que permiten estimar la medida en que la célula se deshidrata bajo unas condiciones determinadas,



**Efecto de la desaparición del hielo.** La supervivencia de las células al proceso de criopreservación implica superar con éxito no sólo la etapa de congelación, sino también otra de descongelación, puesto que durante esta última también pueden producirse efectos con consecuencias letales para la célula, por lo que la efectividad de una congelación bien llevada a la práctica podría quedar anulada si no se realiza la descongelación de forma adecuada. Más concretamente, se considera que el verdadero desafío al que se enfrenta la célula en el proceso de criopreservación se encuentra en superar con éxito una franja de temperaturas de  $-15$  a  $-60$  °C que afecta muy negativamente a su integridad, y por la que debe pasar en dos ocasiones, una vez durante el enfriamiento y otra durante la descongelación (Mazur, 1985).

En el proceso de descongelación hay que tener especial cuidado con dos fenómenos que pueden dañar a los espermatozoides; en primer lugar, si las células se han congelado muy rápidamente y se produce un calentamiento lento, existirá un fenómeno de “recristalización”, en virtud del cual los microcristales formados en el interior de la célula tenderán a agruparse y a formar cristales de mayor tamaño, con un resultado fatal (Mazur, 1985); y en segundo lugar, células congeladas lentamente en presencia de un crioprotector penetrante, pueden quedar lesionadas mediante estrés osmótico si se descongelan demasiado rápido, ante la imposibilidad de que el crioprotector abandone la célula con la suficiente rapidez como para mantener el equilibrio osmótico, con el consiguiente hinchamiento por efecto de la entrada de agua (Watson, 1990). Por tanto, la velocidad óptima de descongelación depende de la pauta de enfriamiento seguida en su momento, si bien debe representar una situación intermedia entre los dos extremos anteriores, con la que se minimicen los daños causados por inapropiadas velocidades de transporte de solutos y agua a través de las membranas, y por el agrupamiento de los microcristales intracelulares de hielo (Hammerstedt *et al.*, 1990).

También se han constatado desestabilizaciones moleculares en el plasmalema a causa del cambio de temperatura, contribuyendo a la aparición de lesiones durante esta fase; así, Holt *et al.* (1992) comprobaron la aparición de alteraciones en la membrana plasmática que se manifestaban sólo durante esta etapa de descongelación, y para las que sugirieron un mecanismo causal basado en el fenómeno de transiciones de fase de los lípidos de membrana, resaltando así la importancia de la descongelación en el ciclo de criopreservación. En esta misma línea, se ha propuesto que las membranas se desestabilizan inicialmente durante la etapa de congelación, tanto por efecto de las bajas temperaturas como por la exposición a altas concentraciones salinas, y ello resulta en una degeneración postdescongelación, al combinarse nuevamente efectos letales de naturaleza térmica y osmótica (Holt y North, 1994).

A raíz de lo expuesto, parece claro que establecer un correcto control sobre el descenso de la temperatura va a influir positivamente en la calidad posdescongelado del semen. La introducción de biocongeladores programables para este propósito ha sido determinante, puesto que el método clásico de congelación en vapores estáticos de nitrógeno, únicamente permitía incrementar o disminuir la velocidad de congelación mediante el acercamiento o alejamiento de las pajuelas a la superficie del nitrógeno líquido (Hofmo y Almlid, 1991). En cambio, la congelación en máquinas

computarizadas, que para semen de verraco fue introducida por Hammitt y Martin (1989), posibilita establecer unas condiciones exactas de congelación, permitiendo evaluar la importancia que presentan pequeñas variaciones en la velocidad de enfriamiento sobre la calidad posdescongelado (Hernández *et al.*, 2007b; Medrano *et al.*, 2009); esto ha hecho posible, por ejemplo, el establecimiento de pausas en el descenso de temperatura mientras dura la meseta del punto de congelación, lo cual resulta interesante para algunos autores (Park y Pursel, 1985; Peláez, 2003), pero es desaconsejado por otros (Woelders *et al.*, 2005) por la inestabilidad manifiesta de los espermatozoides a temperaturas por debajo de cero; también ha permitido la aplicación de diferentes velocidades de enfriamiento para la etapa previa a la cristalización y para la etapa posterior, teniendo en cuenta que los protocolos habituales recogen que la primera oscile entre 2 y 6 °C/min (Hofmo y Almlid, 1991; Hernández *et al.*, 2007b), mientras que la segunda suele ser notablemente superior, con descensos térmicos entre -20 a -80 °C/min (Bwanga, 1991; Hernández *et al.*, 2007b; Medrano *et al.*, 2009). Este control sobre la velocidad de enfriamiento va a permitir condicionar la curva de congelación al verraco donante correspondiente, puesto que se ha determinado que la idoneidad de una u otra velocidad, tanto antes como después de la cristalización, va a depender del animal del que proceda el semen (Hernández *et al.*, 2007b; Medrano *et al.*, 2009).

Como ya se ha indicado, independientemente del correcto control de las temperaturas, la supervivencia de las células espermáticas suele estar ligada a la utilización de crioprotectores (Watson, 1990), clasificados comúnmente en dos tipos, penetrantes y no penetrantes. El segundo de ellos lo forman moléculas que ejercen su efecto protector sin necesidad de traspasar al interior de la célula, como la polivinil pirrolidona (PVP) o, fundamentalmente, diversos tipos de azúcares como la glucosa, la lactosa o, en menor medida, la fructosa (Bwanga, 1991), al actuar, presumiblemente, promoviendo la deshidratación de la célula por mecanismos osmóticos, incrementando con ello el porcentaje de agua no congelada a una temperatura dada y reduciendo la concentración de solutos en la fracción acuosa extracelular (Holt, 2000a). Este tipo de crioprotectores van a resultar menos eficaces que los penetrantes, sobre todo cuando las velocidades de enfriamiento son altas, ya que el tiempo disponible para que se elimine agua del interior de la célula es limitado (Watson, 1990). Otro tipo de crioprotectores no penetrantes los forman compuestos como la glicina betaina, la prolina o la trehalosa, de los que se supone que interactúan directamente con los lípidos y proteínas de membrana modificando el comportamiento de transición de fase y estado de hidratación (Holt, 2000a).

Dentro de los penetrantes destaca el glicerol, que resulta el compuesto más eficaz tanto para el semen de verraco (Watson, 1990) como para la mayoría de las especies (Curry, 2000); también integra este grupo otros crioprotectores como el metanol, el dimetilsulfóxido (DMSO), el etilenglicol u otros polialcoholes. En cuanto a su mecanismo de acción, varios son los propuestos; en primer lugar, el glicerol y algunos otros azúcares son polialcoholes, teniendo con ello la capacidad de formar puentes de hidrógeno con los grupos polares de los lípidos de membrana en condiciones de deshidratación, sustituyendo así a las moléculas de agua que son las que establecen dichos puentes en situaciones normales, hecho que resulta extremadamente importante para la estabilidad de la membrana (Woelders, 1997). En segundo lugar, se especula con las propiedades

“captadoras de agua” del glicerol que incrementarían la fracción acuosa sin congelar del medio extracelular a una determinada temperatura, viéndose así disminuida la concentración de solutos y, por ende, disminuidas las consecuencias del “efecto solución” (Watson, 1990). Sin embargo, no queda claro el porqué de la mayor efectividad del glicerol con respecto a otros crioprotectores; a este respecto, Curry (2000) hipotetiza con la relación existente entre esta sustancia y la Aquaporina AQP7, presente en la membrana plasmática, que va a facilitar la entrada del glicerol en la célula al actuar como ruta específica para esta sustancia; de hecho, las membranas espermáticas de especies caracterizadas por una alta permeabilidad al agua y una baja energía de activación, donde destaca la presencia del canal AQP7, van a ser las que mejor respondan al glicerol. Por el contrario, otras especies como el conejo, caracterizadas por lo opuesto (relativamente baja permeabilidad al agua y alta energía de activación) el glicerol no va a ser el crioprotector de elección, sino el DMSO, posiblemente por la escasez de canales AQP7.

A pesar de la importancia del glicerol en la criopreservación seminal de la mayoría de las especies, los diluyentes empleados no sólo van a incorporar un crioprotector penetrante, sino que incluyen de forma sistemática otros no penetrantes, como la lactosa, que colaboran a la deshidratación celular y a la disminución de la concentración de sales en la fracción acuosa extracelular (Holt, 2000a).

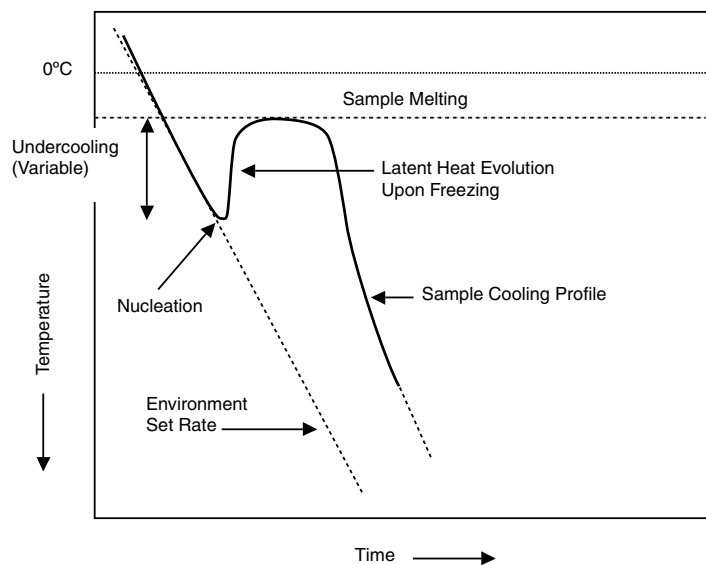
A pesar de la importancia que presenta el glicerol en la criopreservación del semen de verraco, su efecto y la concentración a la que es incorporado a los diluyentes va a resultar otro factor claramente estresante para las células espermáticas, como se mencionará en el epígrafe 2.1.2.3.

En otro orden de cosas, las características geométricas de los envases en los que se deposita el semen de forma previa a su congelación también influyen de forma notable en la calidad posdescongelado. Durante el proceso de congelación, cuando tiene lugar la cristalización tras la situación de superenfriamiento, aparece un efecto rebote en la temperatura de la muestra, debido a que la cristalización es un proceso exotérmico que libera el llamado “calor latente de fusión” aumentando la temperatura del interior del envase de forma brusca (figura 2.6); hasta que se produce la disipación completa de este calor, la temperatura de la muestra va a dejar de discurrir de forma paralela a la de la curva establecida, determinando la llamada “meseta del punto de congelación”, siendo la duración de este lapso de tiempo claramente perjudicial para la supervivencia espermática (Holt, 2000a), considerándose, por algunos autores (Pursel y Park, 1985), como el periodo en que aparecen la mayor parte de las lesiones generadas en el espermatozoide.

De este modo, la elección del tipo de envase va a presentar una gran importancia en la calidad final de las muestras, en concreto, resulta determinante el valor de la ratio superficie/volumen que éstos presenten. A este respecto, Bwanga *et al.* (1990) analizaron el comportamiento criobiológico de muestras envasadas en minipajuelas (0,25 ml) y en maxipajuelas (5 ml) bajo condiciones controladas de congelación, comprobando que la disipación del calor latente de fusión en las segundas era mucho más lenta que en las primeras y, además, que la congelación no iba a ser uniforme en todo el espesor de la pajuela, registrándose en el centro de la misma una curva de congelación muy distinta a la que se producía en la superficie, con diferencias de temperatura de más de 40 °C al finalizar la meseta del punto de congelación.

Weitze *et al.* (1988), por su parte, constatan, además de las diferencias en las curvas de congelación en función de la geometría del envase, diferencias en la curva de descongelación, atribuyéndolas a la conductividad específica del calor y a la ratio superficie/volumen de las pajuelas. Así, estos autores consideraban que los envases más voluminosos (5 ml) son inapropiados, puesto que la descongelación no se realiza en ellos de forma simultánea, sino que la región periférica será la primera en descongelarse y, dada la menor conductividad del agua frente al hielo, la propagación del calor hacia el centro de la muestra va a verse claramente ralentizada, comprometiendo con ello su descongelación, ya que la velocidad de descongelación de la región periférica de estas pajuelas es 3,75 veces más rápida que la observada en el centro de la pajuela (Hofmo y Almlid, 1991), con diferencias de temperatura entre ellas de hasta 15 °C (Bwanga *et al.*, 1990); en consecuencia, para conseguir una descongelación completa del centro de la pajuela se va a requerir un mayor tiempo de descongelación, lo cual implica un tiempo de exposición excesivo de las células espermáticas de las zonas periféricas (Peláez, 2003).

Para evitar esta circunstancia resulta aconsejable la utilización de envases con un menor volumen, como las minipajuelas (de 0,25 ó de 0,5 ml) o las pajuelas planas, ya que proporcionan una mayor supervivencia espermática que las maxipajuelas (Bwanga *et al.*, 1990), si bien esto, fundamentalmente a nivel de campo, no está exento de inconvenientes, debido al requerimiento de un gran número de pajuelas para constituir una única dosis seminal. A este respecto, se han desarrollado nuevos tipos de envase que persiguen aunar una gran relación superficie/volumen con una mayor capacidad que las minipajuelas, posibilitando el contenido de una dosis completa en su interior; así, inicialmente surgieron las bolsas plásticas que, con su gran superficie mantenían un mayor porcentaje de espermatozoides móviles y acrosomas intactos tras la descongelación que las maxipajuelas (Simmet, 1993 en Eriksson, 2000), si bien no consiguieron desplazar la utilización de las maxipajuelas por su inadaptabilidad para los contenedores de almacenamiento habituales (Eriksson, 2000). Posteriormente, se ha desarrollado otro tipo de envase que sí ha tenido más aceptación, el FlatPack, obteniendo con él excelentes rendimientos reproductivos tanto de calidad seminal posdescongelado (Eriksson y Rodríguez-Martínez, 2000b; Eriksson *et al.*, 2001), como de fertilidad y prolificidad en granjas (Eriksson y Rodríguez-Martínez, 1999; Eriksson *et al.*, 2002).



**Figura 2.6:** Esquema de la curva de enfriamiento registrada por una muestra seminal en el interior de un envase de congelación como consecuencia del fenómeno de cristalización. Imagen tomada de Cryopreservation manual: a guide to cryopreservation techniques (distribuido por ThermoForma, Marietta, OH, USA).

Como se ha indicado, otro de los factores más deletéreos va a ser la exposición celular al superenfriamiento, y para minimizar sus efectos se suele realizar una maniobra llamada *seeding* o, lo que es lo mismo, la inducción de la formación artificial de núcleos de cristalización. Esta técnica ha sido empleada de forma rutinaria en los protocolos de criopreservación de multitud de células, con la finalidad de evitar el citado superenfriamiento y la cristalización del agua intracelular (Fiser *et al.*, 1991). Su ejecución se ha realizado tradicionalmente tocando las pajuelas con una pinza que previamente se ha enfriado con su inmersión en nitrógeno líquido, si bien, hoy en día, se efectúa de forma automática por los biocongeladores programables en el momento en el que la temperatura está ligeramente por encima del punto de congelación (Cabodevila y Teruel, 2001).

El hecho de que la velocidad de enfriamiento influya en la dinámica de crecimiento de los cristales de hielo, así como en el grado de eliminación del agua del interior del espermatozoide, hace que la inducción de la cristalización afecte de forma diferente a los métodos de enfriamiento rápidos y a los que son más lentos, y es en estos últimos donde los criobiólogos recomiendan activamente la utilización de este proceso (Fiser *et al.*, 1991). Una lenta velocidad de enfriamiento entre los 5 y -5 °C, fundamentalmente si el tamaño del envase dificulta la disipación del calor, implica una mayor exposición al estado de superenfriamiento, y una propagación de la cristalización notablemente más lenta e irregular (Woelders *et al.*, 2005), modificándose la morfología de los cristales de hielo por la formación de agregados y fusiones entre ellos (Fiser *et al.*, 1991), pudiendo lesionar la célula por su mayor tamaño e irregularidad.

Estudios recientes (Woelders *et al.*, 2005) basados en la criomicroscopía han conferido una mayor importancia a la realización de esta técnica de la que ya se le había otorgado con anterioridad, observando una mayor supervivencia celular y una notable resistencia de la membrana acrosómica a la criopreservación, si bien recalcan, una vez más, la importancia del tipo de envase para que la propagación de la cristalización sea lo más rápida posible, puesto que se aprecian diferencias de 11 °C entre la parte de las pajuelas donde se induce el *seeding* y su opuesta.

Para minimizar estas diferencias, los citados autores proponen la utilización de otros dispositivos, basados en la configuración empleada por Beckmann sobre leucocitos, en los que las pajuelas se van a deslizar por un bloque de metal que presenta un gradiente de temperatura continuo a lo largo de su longitud, de tal forma que el diferencial térmico existente en un determinado centímetro puede ser completamente distinto del que presenta el centímetro siguiente. Las pajuelas se desplazan con una velocidad lineal por dicho bloque de tal forma que todos sus segmentos van a experimentar idéntica secuencia de acontecimientos, presentando la misma relación térmica con el exterior de la pajuela y con los segmentos vecinos en cada posición y temperatura. Esto significará que todo el material seminal tendrá la misma velocidad de enfriamiento reduciendo con ello la exposición al superenfriamiento de ciertas porciones de la pajuela.

La elección correcta del protocolo de descongelación a utilizar va a resultar una de las decisiones que, a la postre, más influye en la calidad de las muestras posdescongelado. El método empleado en la descongelación de las pajuelas, bolsas planas u otros envases como el FlatPack

consiste en la inmersión de las mismas en un baño termostático un determinado tiempo y a una temperatura concreta, si bien, para poder establecer unas condiciones óptimas de descongelación no sólo hay que tener muy en cuenta la velocidad de descongelación sino también la de congelación (y la influencia del envase utilizado sobre ambas) además de la concentración del crioprotector (Mazur, 1985), siendo, para el espermatozoide de verraco, ampliamente estudiada la interacción entre estas tres variables por Fiser y Fairfull (1990) y Fiser *et al.* (1993). Estos autores llegan a la conclusión de que con la utilización de pajuelas de 0,5 ml, el mejor porcentaje tanto de movilidad como de integridad acrosómica se consigue con una concentración de glicerol del 3% además de con una velocidad de congelación (entre 0 y -50 °C) de 30 °C/min y de descongelación de 1200 °C/min. Por su parte, si las condiciones de congelación se caracterizan por la utilización de un 3% de glicerol y de una curva de congelación multifásica, en la que la temperatura descendía suavemente (3 °C/min) en el intervalo que va de los 5 °C a los -6 °C y, tras mantener una pausa de un minuto a esta temperatura, pasaba a un ritmo de 20 °C/min hasta los -100 °C, Bwanga *et al.* (1991a) proponen una descongelación de 25 segundos a 50 °C, si el envasado se realizaba en bolsas planas y Fiser y Fairfull (1990) de 8 segundos a 60 °C para la utilización de minipajuelas de 0,5 ml. Si la opción son los envases de 5 ml, bien maxipajuelas o FlatPacks, parece ser más recomendable velocidades de enfriamiento de unos 50 °C/min y concentraciones de glicerol de en torno al 3%, procediendo a descongelar el material seminal a 50 °C durante 13 segundos, lo que equivaldría a 900 °C/min. (Eriksson y Rodríguez-Martínez, 2000b); mientras que para el envasado en minipajuelas de 0,25 ml Woelders y den Besten (1993) recogen una velocidad de congelación idónea también de 50 °C/min pero, en este caso, con sólo un 1,5% de glicerol.

Parece ser que, a pesar de las diferencias observadas en las conclusiones de los citados trabajos, tanto en las minipajuelas como en los envases de gran capacidad, la velocidad de enfriamiento se sitúa entre los 30 y los 50 °C/min, mostrando una cierta tolerancia en un rango de velocidades en torno a la óptima (Watson, 1979). A su vez, parece claro el interés de que también la velocidad de descongelación sea elevada, al existir varios trabajos que recomiendan la de 1200 °C/min (Salamon *et al.*, 1973; Pursel y Johnson, 1976; Fiser *et al.*, 1993); no obstante, la velocidad de descongelación no sigue una relación lineal con la supervivencia espermática como demuestran los resultados recogidos por Eriksson y Rodríguez-Martínez (2000b), para los que velocidades de descongelación más elevadas no mostraron mayores promedios de espermatozoides viables, lo que sugiere la existencia de una velocidad de descongelación óptima para cada envase y cada ritmo de enfriamiento, con la que se ve minimizado el riesgo de recristalización durante el descongelado y por encima de la cual no se produce un incremento de la calidad espermática (Eriksson, 2000).

### 2.1.2.3. Efectos de la adición del agente crioprotector.

A pesar de que la presencia de crioprotectores en los diluyentes de congelación es prácticamente imprescindible para conseguir la viabilidad posdescongelado de los espermatozoides, su adición no va a carecer de inconvenientes. Por una parte, la adición de crioprotectores no penetrantes puede acarrear alteraciones en la membrana plasmática o incrementar en exceso la

concentración de solutos en el medio extracelular (Barbas y Mascarenhas, 2009), si bien estos efectos van a ser mucho menos dañinos que los del glicerol, a pesar de la mayor eficacia mostrada por éste.

Aunque las razones por las cuales los espermatozoides reducen su capacidad fecundante al permanecer en contacto con concentraciones elevadas de glicerol no están aún bien identificadas (Paquignon, 1985), se cree que los efectos deletéreos con toda probabilidad son debidos principalmente a la acción tóxica y al estrés osmótico que esta sustancia ejerce sobre los espermatozoides (Watson, 2001). Con el fin de minimizar los daños, se ha estipulado que la concentración recomendada de glicerol resulta de 1-2 M, si bien, numerosos estudios han revelado que por encima de 0,5 M éste ya ejerce un efecto dañino, pareciendo ser, para Watson (1995), más consecuencia de la citotoxicidad que manifiesta que del posible estrés osmótico al que somete a la célula. Se han sugerido varias teorías para justificar esta citotoxicidad; unas que relatan un incremento en la viscosidad del citoplasma lo que implica una limitación en los procesos de difusión a través de la membrana (Hammerstedt *et al.*, 1978), otras que sugieren que por medio de la incorporación del glicerol a la membrana, se van a inducir cambios en la estructura lipídica y, con ello, la posibilidad de alterar la estabilidad y la permeabilidad al agua de la misma. Por otra parte, Hammerstedt *et al.*, 1990 argumentaba que el glicerol, en su condición de sustrato, podría alterar el estado bioenergético del espermatozoide interfiriendo en el balance entre la síntesis y la utilización de ATP, haciendo que se comprometan procesos dependientes de iones lo que provocaría daños irreversibles en la célula.

La escasa tolerancia al glicerol varía extremadamente entre las especies; así, mientras en el toro, el morueco o el caballo, se utilizan concentraciones comprendidas entre el 4 y el 9% (Watson, 1990), la concentración óptima para los espermatozoides de los marsupiales ronda el 20% (Holt, 2000b) o, por el contrario, en otros, como los espermatozoides de verraco (Watson, 1990, 1995; Holt, 2000b) o de ratón (Holt, 2000b), no se recomienda incorporar a los diluyentes más de un 3 ó un 1,75%, respectivamente, dadas las graves lesiones que se originan a nivel de ciertas estructuras como el acrosoma; en concreto, en verraco se ha determinado que la integridad de esta estructura desciende de forma lineal con el incremento de la concentración de glicerol del 0 al 6%, mientras que, por el contrario, otras características espermáticas como la movilidad van a verse estimuladas al incrementar dicha sustancia entre un 0 y un 4% (Paquignon, 1985; Almlid y Johnson, 1988; Fiser *et al.*, 1993; Fiser *et al.*, 1995).

El estrés osmótico al que se refieren los autores responde a las variaciones osmóticas ocurridas tanto por la penetración del crioprotector en la célula, circunstancia que depende del grado de permeabilidad de la membrana al mismo (Gao *et al.*, 1993a; Watson, 1995), como por su eliminación (Watson, 2000). A este respecto, Gao *et al.* (1995) observó en semen humano que la exposición de los espermatozoides a una concentración 1 M de glicerol añadido en un solo momento, provocaba variaciones de volumen que excedían los límites tolerables, tanto en la adición como en la eliminación del crioprotector, por lo que, en ciertas ocasiones, se ha recomendado añadir el glicerol en varias etapas sucesivas con el fin de reducir el daño celular (Watson, 1995).

Otros factores a tener en cuenta van a ser, por un lado, la temperatura a la que se añade el glicerol, de la cual parece que va a depender la severidad de este efecto osmótico, como demuestra el hecho de que la capacidad de fecundación de los espermatozoides se vea mermada

si la incorporación del crioprotector se realiza a 20 °C con respecto a si ésta se efectúa a los 5 °C (Wilmot y Polge, 1974); y por otro, el tiempo de estabilización con el glicerol, ya que, a pesar de que la penetración en la célula se produce en unos pocos segundos tras su adición, se ha comprobado que mantener el contacto con los espermatozoides durante un periodo de 2-4 horas puede ser beneficioso para la supervivencia posdescongelación (Fiser *et al.*, 1995; Yi *et al.*, 2002), si bien, al existir estudios previos que, por el contrario, lo desaconsejan (Wilmot y Polge, 1974; Almlid y Johnson, 1988) se ha sugerido que el periodo de estabilización a 5 °C es, independientemente de la presencia o no del glicerol, el factor que ha podido incrementar la supervivencia celular al proceso.

### **2.1.3. Efectos y consecuencias de la criopreservación sobre la estructura y funcionalidad celular.**

#### **2.1.3.1. Efecto y consecuencias del proceso de criopreservación sobre las membranas.**

La conjunción de situaciones estresantes a lo largo de todo el proceso de criopreservación, tales como la adición de crioprotectores, las variaciones en el volumen celular en respuesta a cambios osmóticos, la aparición de fenómenos de transición de fases de los fosfolípidos, la formación de especies reactivas de oxígeno o de cristales de hielo o, incluso, el contacto celular con concentraciones elevadas de solutos, va a determinar que la primera causa de daño celular en la congelación sea la alteración de la membrana plasmática (Parks y Graham, 1992), que si bien no es la única membrana celular afectada, ya que se aprecian notables lesiones en otras como la acrosómica o la mitocondrial (Watson, 1995; Salamon y Maxwell, 2000; Schober *et al.*, 2007), sí parece ser la estructura espermática más severamente castigada por el proceso de congelación/descongelación (Parks, 1997).

Los efectos del proceso de criopreservación sobre las membranas celulares van a consistir en la alteración de su estructura (Holt y North, 1984; Watson y Plummer, 1985; Hofmo y Andersen, 1989; De Leeuw *et al.*, 1990a) y en la modificación de su composición lipídica y organización molecular (Hinkovska *et al.*, 1989; Buhr *et al.*, 1994; Boronchuk *et al.*, 1996; Cerolini *et al.*, 2001), que a su vez, dado el incremento de la permeabilidad que se produce, van a originar la pérdida de moléculas (ATP, ácidos nucleicos, enzimas) e iones intracelulares (magnesio, potasio), provocando notables trastornos en el balance iónico (Watson y Plummer, 1985; White, 1993; Bailey y Buhr, 1995). De esta forma, las lesiones acontecidas en la membrana plasmática, el acrosoma y las mitocondrias producen como efectos inmediatos la pérdida de la permeabilidad selectiva del plasmalema (disminuyendo la capacidad para regular la entrada de iones de calcio y sodio, que se acumulan en el espacio intracelular), la aparición de trastornos en el metabolismo aerobio (respiración celular) y la glucólisis anaerobia, que limitan las posibilidades de generar nuevas moléculas de ATP, comprometiendo, como consecuencia de ello, todas aquellas funciones celulares dependientes de energía, entre las que destaca la motilidad (De Leeuw *et al.*, 1990a; Bwanga, 1991; White, 1993).

En cuanto a las alteraciones estructurales, varios autores han estudiado los efectos de la



criopreservación, bajo microscopía electrónica, sobre células espermáticas de diferentes especies como la ovina (Holt y North, 1984), la bovina y la porcina (De Leeuw *et al.*, 1990a), o incluso del zorro del Ártico (Hofmo y Andersen, 1989), detectando todos ellos lesiones similares, caracterizadas por agrupaciones de partículas intramembranas que reflejan la aparición de separaciones laterales de fase.

Por su parte, Watson y Plummer (1985), en un estudio detallado de las alteraciones ultraestructurales de las membranas plasmática, acrosómica y mitocondrial del espermatozoide de verraco, exponen que las células criopreservadas presentan, en un alto porcentaje de ellas, desprendimientos de la membrana acrosomal externa, acompañados de la pérdida parcial del contenido de la matriz acrosomal, así como soluciones de continuidad en el plasmalema, mientras que a nivel de la mitocondria el grado de alteración de las lesiones recogidas varía notablemente, si bien, la intensidad de todas parece depender tanto de la severidad del estrés térmico producido, como del grado de susceptibilidad de cada estructura, para lo que la membrana plasmática de la pieza intermedia se ha mostrado, en cierto modo, más resistente.

Los cambios en la composición lipídica de la membrana se van a caracterizar no tanto por una variación en el contenido de lípidos totales, donde se han podido detectar tanto pérdidas (Chesmedjieva *et al.*, 1996) como ganancias (Cerolini *et al.*, 2001), como en variaciones en su composición (Hinkovska *et al.*, 1989; Buhr *et al.*, 1994; Boronchuk *et al.*, 1996), que se han puesto recientemente de manifiesto en estudios elaborados con Merocianina, que comprueban que dichos desórdenes lipídicos pueden tener su explicación en la movilización de la fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, desde su localización interna en la membrana hacia el exterior de la misma, como consecuencia del proceso de criocapacitación (Thomas *et al.*, 2006)

La pérdida de enzimas intracelulares, consecuencia de estos trastornos, va a tener una especial importancia en el devenir de la célula; a este respecto, se han detectado pérdidas de enzimas como la lactato deshidrogenasa, la glutamato oxaloacético transaminasa, la glucosa fosfato isomerasa, la fostatasa alcalina, la superóxido dismutasa, la catalasa o la glutatión peroxidasa en varias especies de mamíferos domésticos (Watson y Plummer, 1985; Bwanga, 1991; Álvarez y Storey, 1992; Lasso *et al.*, 1994; Upreti *et al.*, 1996), ocurridas en una o en varias fases del proceso, pudiendo ser éstas diferentes para cada especie y para cada enzima en cuestión; sea como fuere, dichas pérdidas repercuten de forma notable en el metabolismo de los carbohidratos, ocasionando un descenso importante de los niveles de actividad glucolítica y respiratoria (Watson y Plummer, 1985). Otro grupo importante de enzimas que ve disminuida su concentración tras la criopreservación lo conforman moléculas como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, que se responsabilizan de la metabolización de las ROS (Álvarez y Storey, 1992; Lasso *et al.*, 1994), lo que va a originar un incremento de los niveles de éstas (Wang *et al.*, 1997; Cerolini *et al.*, 2001; Chatterjee y Gagnon, 2001; Maldjian *et al.*, 2005), causando alteraciones como la peroxidación lipídica de componentes de las membranas celulares, alteraciones del citoesqueleto, inhibición de la unión ovocito-espermatozoide o lesiones en el axonema asociadas con pérdida de la motilidad espermática (citadas por Breininger *et al.*, 2005); la situación se ve agravada por la disminución en el medio extracelular de otros compuestos antioxidantes ( $\alpha$ -tocoferol, ácido

ascórbico, taurina, hipotaurina, etc) tras la dilución y/o centrifugación previa a la congelación en la mayoría de protocolos de criopreservación (Brouwers *et al.*, 2005). Hay que tener en cuenta que la repercusión de esta pérdida resulta mucho más preocupante en los espermatozoides de porcino, debido a la alta susceptibilidad que presentan por el elevado contenido en ácidos grasos insaturados en los lípidos de membrana y a la pobre capacidad antioxidante (Breininger *et al.*, 2005) que presentan.

Respecto a las alteraciones del balance iónico, se hace referencia a perturbaciones en el equilibrio de las concentraciones de sodio, zinc y calcio, que se acumulan en el medio intracelular, y de las de potasio y magnesio, que salen de forma masiva de la célula (Watson y Plummer, 1985). El acúmulo de iones de calcio en el interior de la célula es muy significativo en el verraco (White, 1993; Bailey y Buhr, 1995), aunque con destacadas diferencias entre individuos (Watson y Plummer, 1985); en cambio, el grado de alteración del equilibrio de los restantes iones es similar en los espermatozoides de verraco, morueco y toro (Watson y Plummer, 1985). El incremento de la concentración del calcio intracelular puede deberse a la alteración de la actividad de la bomba que la regula (White, 1993), pues con el descenso de temperatura las proteínas de membrana que funcionan como bomba de iones disminuyen su actividad (Watson y Plummer, 1985) y también interferirá con los mecanismos de transporte de este elemento la segregación de proteínas, debido a las separaciones laterales de fase (Watson y Plummer, 1985). No obstante, el enfriamiento no afecta en todas las especies de igual modo a la capacidad que tiene la célula para regular el calcio (Bailey y Buhr, 1995), pudiendo entonces el incremento intracelular estar relacionado con la susceptibilidad a la hipotermia que cada una presente (Watson y Plummer, 1985). Finalmente, dado el papel que desempeña el calcio en la reacción acrosómica, se ha sugerido que la pérdida de continuidad y la vesiculización de la membrana, que se observan en la región anterior de la cabeza espermática, pueden ser consecuencia del acúmulo intracelular de este ión (Parks, 1997).

### 2.1.3.2. Efectos sobre el citoesqueleto.

Existen evidencias de que determinadas proteínas del citoesqueleto ejercen una función estabilizadora de la membrana plasmática del espermatozoide (Holt y North, 1991), y dado que muchas de ellas manifiestan un proceso de despolimerización y repolimerización dependiente de la temperatura (Watson, 1995), aquella podría verse comprometida en caso de que se vieran afectadas por el enfriamiento. Por otro lado, el glicerol altera la polimerización y despolimerización de los microtúbulos del citoesqueleto, lo cual podría repercutir indirectamente en la membrana plasmática; en concreto, los cambios en la estructura de éstos pueden alterar la interacción que mantienen con las proteínas de la membrana, afectando así al mecanismo de transducción de señales, o desorganizando la característica estructuración en “dominios” (Parks y Graham, 1992).

Del mismo modo, la rapidez con que se producen cambios en el volumen celular también tendría consecuencias reseñables sobre el sostén esquelético de las membranas plasmática y acrosomal, aunque no se ha profundizado mucho en el tema (Watson, 1995). Constituye un dato reseñable el hecho de que la dimensión de la cabeza espermática influye en la alteración estructu-

ral de la membrana plasmática de la región acrosómica, pues en el espermatozoide de las especies más vulnerables ésta es alargada y plana, mientras que en las especies resistentes es más pequeña y convexa. Los elementos estabilizadores del citoesqueleto parecen no estar presentes en la región anterior de la cabeza, con lo que las consecuencias del enfriamiento serían más graves en las especies con espermatozoides de cabeza plana y alargada, al ocupar esta región, generalmente, una mayor superficie (Watson y Plummer, 1985).

### 2.1.3.3. Efectos sobre la movilidad celular.

La pérdida de movilidad que experimentan los espermatozoides criopreservados podría ser debida a los cambios ocurridos en el transporte activo y en la permeabilidad del plasmalema, así como en la alteración de la disponibilidad energética; algunos autores apuntan que también podría ser consecuencia de los daños que se producen durante el proceso en los componentes del axonema (Watson, 1995), si bien esta última posibilidad resulta un tanto controvertida, puesto que hay otros que no encuentran tales evidencias o que comprueban que esas alteraciones se revierten con la descongelación (autores citados por Watson, 1995).

Así mismo, esta reducción de movilidad de los espermatozoides criopreservados puede ser relacionada también con el fenómeno de peroxidación lipídica que se produce en la membrana. El hecho de que afecte de una manera más intensa a nivel de la pieza intermedia (Brouwers *et al.*, 2005), hace suponer que va a interferir en la producción energética a través de la respiración oxidativa en las mitocondrias de esa zona; en efecto, se han establecido correlaciones significativas entre los daños morfológicos de la pieza intermedia y el descenso de la movilidad observado en la población espermática (Karow, 1997). En esta misma línea, se ha determinado igualmente la existencia de una elevada correlación entre la formación de ROS y el descenso de movilidad posdescongelación y entre éste y la pérdida de la superóxido dismutasa [SOD] (Álvarez y Storey, 1992; Brouwers *et al.*, 2005). No obstante, la acción de las ROS no sólo se limita a perjudicar la producción de energía del espermatozoide criopreservado, sino que también (como citan Breininger *et al.*, 2005) afecta al citoesqueleto, sumándose a los daños causados por la formación y la dilución de hielo, lo que repercute directamente en la función motil de la célula espermática. Las modificaciones que se producen durante el proceso de criopreservación en la movilidad del espermatozoide, no son únicamente cuantitativas, sino que también existen cambios cualitativos en el patrón de movimiento espermático; en concreto, en la etapa en la que se elimina el plasma seminal del eyaculado y en la que tiene lugar la adición del diluyente de refrigeración se ha observado un incremento de los espermatozoides que presentan una elevada VCL y ALH y un reducido LIN (Cremades *et al.*, 2005), características que recuerdan a las de los espermatozoides hiperactivados en la capacitación previa a la fecundación (Schmidt y Kamp, 2004). Estas alteraciones en los parámetros de movilidad vienen a reflejar un proceso parecido a la capacitación que sufre el espermatozoide debido posiblemente a la pérdida de factores decapacitantes que se produciría con la eliminación del plasma seminal en la centrifugación (Mortimer *et al.*, 1998), así como a los cambios en la membrana plásmatica similares a la capacitación descritos tanto por Maxwell y Johnson (1997b) como por Green y Watson (2001). No obstante, dicha población de espermatozoides hiperactivados no aparece tras la descongelación, con lo que se especula que

los procesos de deterioro de la membrana progresan hasta causar la muerte celular, siendo este fenómeno otro de los causantes de la drástica caída de la movilidad espermática.

### 2.1.3.4. Efectos sobre el núcleo de la célula.

En estudios realizados con espermatozoides de humano se ha comprobado que el proceso de congelación/descongelación altera el estado de condensación de la cromatina nuclear (se dice que se supercondensa) [revisado por Royère *et al.* (1991)] y como también se ha constatado que en ovocitos fecundados *in vitro* con espermatozoides criopreservados se produce un retraso considerable en la aparición de los pronúcleos, con respecto a los que son fecundados con espermatozoides procedentes de eyaculados frescos, podría haber una relación causa-efecto entre ambos fenómenos, que tendría consecuencias importantes sobre la capacidad fecundante del espermatozoide, y quizás también sobre las primeras etapas del desarrollo embrionario (Hamamah *et al.*, 1991). Estas alteraciones en el núcleo de la célula, que se producen ya desde la misma etapa de dilución y se acentúan después en la fase de congelación, podrían estar originadas por movimientos de iones de zinc, o cambios en el equilibrio de los puentes disulfuro o de los grupos tiol, que afectarían a la relación entre el ADN y las proteínas nucleares (Royère *et al.*, 1991). En espermatozoides criopreservados de verraco se ha observado igualmente un estado similar de supercondensación de la cromatina nuclear (Hamamah *et al.*, 1990), y en algunos estudios (Cairolì *et al.*, 1991) se relaciona con la capacidad fecundante y/o el desarrollo embrionario, al obtener embriones menos desarrollados en cerdas inseminadas con semen descongelado; estos autores atribuyen este hecho al insuficiente número de espermatozoides en la unión utero-tubárica debido a las alteraciones del transporte espermático, como consecuencia de los daños de membrana, mientras que Martín-Rillo *et al.* (1999) asocian este tipo de trastornos a alteraciones en la organización de la cromatina nuclear, pues la proporción de embriones en estadios menos avanzados de desarrollo y de embriones degenerados es mayor en las cerdas que habían sido inseminadas con semen descongelado, en comparación con las que se inseminaron con semen refrigerado, en el que se evidenciaba una menor condensación de la cromatina; no obstante, estas modificaciones no mermaban la capacidad fecundante del espermatozoide.

Otros autores también determinan que el proceso de congelación/descongelación disminuye la capacidad de fecundación de los espermatozoides mediante la desestabilización de la cromatina, lo que provocaría un incremento de la susceptibilidad del ADN a la desnaturalización *in situ* (Peris *et al.*, 2004); de hecho, se ha determinado que tras la criopreservación la fragmentación y la oxidación del ADN sufren un incremento significativo en espermatozoides humanos (Zribi *et al.*, 2008). El daño del ADN espermático ha sido asociado con niveles elevados de ROS en el semen descongelado (Wang *et al.*, 2003; Zini y Libman, 2006; Li *et al.*, 2007), por lo que mediante la suplementación con antioxidantes se ha conseguido reducir los niveles de ROS y el daño del ADN nuclear, lo que conlleva un incremento notable de la calidad de las muestras (Li *et al.*, 2007) y, consecuentemente, de la fertilidad mostrada por ellas (Gadea *et al.*, 2008). Esta relación entre el estrés oxidativo y el daño del ADN ha sido sugerida en diversos estudios (Irvine *et al.*, 2000; Moustafa *et al.*, 2004), dada la capacidad de las ROS de dañar el ADN mitocondrial y nuclear por medio de alteraciones como la fragmentación, depleciones, modificaciones de bases u otras

(Shamsi *et al.*, 2008); de hecho, en varios trabajos se recoge un incremento en la fragmentación del ADN tras el proceso de criopreservación (Fraser y Strzerek (2007); Zribi *et al.*, 2008), resultando independiente del medio y del método de congelación utilizados (Fraser y Strzerek, 2007). Por otro lado, se ha establecido que el sistema de empaquetamiento en protaminas proporciona una cierta protección frente a la oxidación, por lo que una posible deficiencia en la protaminación hace a las células mucho más susceptibles al ataque de estas ROS (Oliva, 2006).

Las causas del daño del ADN no han podido ser esclarecidas completamente, pues mientras unos autores apuntan a la influencia del estrés oxidativo (Thomson *et al.*, 2009), otros consideran que ésta es menor (Kadirvel *et al.*, 2009) y proponen una incidencia mayoritaria de otros procesos, como la activación de caspasas y la apoptosis, o la deficiencia en las enzimas encargadas de reparar el ADN (Zribi *et al.*, 2008). En este mismo sentido Van der Schans *et al.* (2000) observaron en espermatozoides de toro, mediante la utilización de un test de ELISA para medir el daño oxidativo en la doble hélice del ADN, que éste no se incrementaba tras el proceso de criopreservación. Asimismo, Flores *et al.* (2008a) no recogen la aparición de fragmentación tras el proceso de criopreservación, pero sin embargo sí obtuvieron cambios en la protamina-1-DNA, con los que justifican la pérdida de capacidad fecundante debido a la incorrecta formación de la estructura nuclear que éstos producirían tras la penetración del ovocito. Sea como fuere, aunque parece claro que la criopreservación va a originar daños a nivel del ADN, posiblemente mediante su fragmentación o su oxidación, va a ser necesario continuar investigando para dilucidar cuáles son los mecanismos que los originan.

#### **2.1.3.5. Otros efectos que alteran la capacidad fecundante de los espermatozoides.**

Como consecuencia de esta amplia gama de alteraciones que tienen lugar durante el proceso de criopreservación, en torno al 40 ó 50 % de las células espermáticas no consiguen sobrevivir (Watson, 2000), incluso utilizando protocolos optimizados para intentar minimizar los daños (Watson, 1995), pero además, la mayoría de los espermatozoides supervivientes van a presentar características distintas a las que tenían con anterioridad al proceso de congelación/descongelación, que van a repercutir en su capacidad fecundante (Watson, 1995); así, la exposición de los espermatozoides a las situaciones de enfriamiento, de adición del crioprotector o de formación o disolución de hielo, origina en ellos alteraciones de la capacidad motora, así como deficiencias en el reconocimiento de receptores y en el mantenimiento de un posterior desarrollo embrionario, o va a hacer que presenten una alta susceptibilidad a la peroxidación lipídica; en definitiva, la disminución de la capacidad fecundante de los espermatozoides criopreservados va más allá de la simple reducción de espermatozoides catalogados como “vivos” (Watson, 2000).

Entre todos estos fenómenos que van a interferir de uno u otro modo en la capacidad fecundante, destaca la ostensible reducción del tiempo de supervivencia que sufren los espermatozoides como consecuencia de modificaciones estructurales y funcionales acaecidas en el proceso, de tal forma que éstos no van a ser capaces de mantenerse vivos en el aparato genital de la hembra durante varios días, como relataba Curry (2000), y de permanecer en el oviducto con un estado de “competencia funcional” (obtenido a través de la capacitación) cuando se produzca la ovulación. Este conjunto de alteraciones morfofuncionales que sufre el espermatozoide, como hemos

mencionado con anterioridad, que responde al nombre de criocapacitación o *capacitation like changes*, provoca un estado de reactividad similar al observado en la capacitación fisiológica, pero en este caso, desde el mismo momento en el que se produce la descongelación (Watson, 1995; 2000; Curry, 2000), por lo que no es que los espermatozoides presenten una menor capacidad fecundante, sino que la adquieren en un momento anterior al fisiológicamente establecido (Pérez *et al.*, 1996; Cormier *et al.*, 1997; Rota *et al.*, 1999), lo que va a provocar una caída de la fertilidad si la inseminación no se efectúa en un momento adecuado para que se produzca un encuentro rápido entre aquellos y el ovocito.

## 2.2. Técnicas de contrastación seminal.

### 2.2.1. Introducción.

Las técnicas de contrastación seminal pretenden establecer la capacidad fecundante de un determinado eyaculado o de una muestra seminal cualquiera, si bien, hasta el momento ningún test que podamos realizar en un laboratorio lo ha conseguido por sí solo, como demuestran las bajas correlaciones existentes entre los resultados obtenidos en laboratorio y la fertilidad en campo (Rodríguez-Martínez, 2003). Esto es, en cierto modo, razonable puesto que el proceso reproductivo presenta una gran complejidad y su resultado final va a estar influenciado, además de por las características de los espermatozoides implicados, por factores condicionantes de la hembra, por la interacción entre el macho y la hembra, así como por el efecto de la manipulación humana en el proceso (Colenbrander *et al.*, 2003; González-Urdiales *et al.*, 2006).

Aunque no se pueda determinar con exactitud, por medio de los análisis del semen efectuados en el laboratorio, la fertilidad que vamos a obtener en las inseminaciones artificiales realizadas, éstos han resultado y resultan imprescindibles a la hora de conocer la calidad de unas muestras seminales concretas, tanto para establecer el efecto que ejercen sobre ellas determinados factores, como pueden ser las variaciones de temperatura, los medios artificiales de dilución, el paso del tiempo o ciertos procesos tecnológicos a los que las sometemos (entre los que se encuentra la criopreservación), como para seleccionar verracos con alta capacidad reproductiva, junto con otras pruebas como el análisis clínico del aparato reproductor, la evaluación de la libido y la capacidad de monta, o el estudio de los datos relativos a las inseminaciones pasadas (Colenbrander *et al.*, 2003; González-Urdiales *et al.*, 2006).

Los análisis que se realizan de forma rutinaria en los Centros de Inseminación comerciales se reducen a la valoración de los parámetros que históricamente han estado más considerados (movilidad, morfología celular o estado del acrosoma), además de aquellos que resultan necesarios para establecer otro factor clave en la fertilidad y prolificidad, como es el número de espermatozoides inoculados por inseminación (volumen y concentración del eyaculado). A pesar de que estas valoraciones presentan una limitada predicción de la capacidad fecundante, hay que reconocer que les corresponde una buena parte del éxito que ha supuesto la instauración y generalización de la IA como técnica reproductiva en numerosas especies, y precisamente con base en los buenos resultados obtenidos con ésta, se ha de considerar que la valoración seminal habitual es efectiva,

si bien esta efectividad surge principalmente de la eliminación de aquellos eyaculados con pobres espermogramas y que con toda seguridad presentarían fertilidades bajas, estando el contrapunto en que aquellos otros que muestran buenas características, no nos van a garantizar necesariamente buenos resultados de fertilidad (Colenbrander *et al.*, 2003; Gadea, 2004; 2005).

Hasta el momento, no existen muchos trabajos que correlacionen los parámetros espermáticos con la fertilidad (Gadea *et al.*, 2004b), y en la mayoría de ellos estas correlaciones presentan pobres significaciones estadísticas (Woelders, 1990; Flowers, 2002) o son enormemente variables dentro de un mismo parámetro, encontrándonos así con coeficientes que van del 0,15 al 0,83 para el análisis de la movilidad espermática, o del 0,06 al 0,86 para la morfología celular (datos recogidos en Rodríguez-Martínez, 2003). En este sentido, la comunidad científica continúa intentando desarrollar pruebas que, mediante la evaluación de ciertas funciones espermáticas, nos proporcionen correlaciones más estables y contundentes con la fertilidad; así, se han incrementado los estudios de la interacción espermatozoide-ovocito, por medio del desarrollo de la fecundación *in vitro* (FIV) [Gadea *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998; Selles *et al.*, 2003 (citados en Gadea *et al.*, 2004b)], o de métodos que imitan parcialmente los procesos necesarios para llevar a cabo la fecundación en el aparato reproductor de la hembra (unión a explantos tubáricos, unión a la zona pelúcida, contaje de espermatozoides accesorios, penetración de ovocitos, etc.) [Rodríguez-Martínez, 2006].

En los últimos años, el desarrollo tecnológico ha posibilitado la aparición o el perfeccionamiento de sistemas como el análisis seminal computarizado, conocidos como sistemas CASA (*Computer-Assisted Semen Analysis*), o la citometría de flujo; esta última permite realizar valoraciones simultáneamente (Graham, 2001; Rodríguez-Martínez, 2003; Colenbrander *et al.*, 2003; Guillan *et al.*, 2005), así como efectuar en un corto intervalo de tiempo el análisis a un número de células mucho más elevado que el permitido por las técnicas habituales, proporcionando con ello una mayor fiabilidad y exactitud en los resultados. Los sistemas CASA, por su parte, además de aportar información sobre nuevas características de los espermatozoides, como su cinemática o su morfometría, han conseguido estandarizar el método de valoración y reducir notablemente, tanto la subjetividad característica de ciertas valoraciones, como el tiempo empleado en su ejecución, aparte de que su incorporación, gracias a la evaluación individual de las células espermáticas, ha cambiado la línea de pensamiento actual, pasando a basar las valoraciones en la presencia de subpoblaciones espermáticas diferenciadas a partir de una amplia batería de pruebas analíticas (Soler *et al.*, 2006).

De todas formas, la valoración de parámetros funcionales de forma individual siempre nos proporcionará únicamente datos parciales sobre la capacidad funcional del espermatozoide, por lo que el estudio combinado de varios de estos parámetros por medio de un análisis de regresión múltiple nos posibilitará una mayor aproximación al conocimiento del estado funcional real de los espermatozoides, resultando, hoy por hoy, la vía más fiable y eficaz, tanto para la determinación de animales subfértiles como para la estimación del nivel de fertilidad de los eyaculados (Rodríguez-Martínez, 2003). Esto es lógico, si tenemos en cuenta que las células espermáticas necesitan poseer distintas cualidades para llevar a cabo la fecundación de forma correcta, como

son (Graham, 1996):

- Motilidad progresiva.
- Morfología normal.
- Metabolismo energético activo.
- Capacidad para desarrollar una motilidad hiperactivada.
- Integridad estructural y funcional de la membrana.
- Funcionalidad de las enzimas asociadas con la fecundación.
- Capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético.

Aunque la valoración de todas y cada una de estas cualidades nos aproximaría mucho al conocimiento de la capacidad fecundante del semen, a nivel práctico esto no resulta factible, ya que además de las premisas de objetividad, repetitividad y exactitud que todo análisis seminal ideal debe cumplir (Rodríguez-Martínez, 2003), hay otras que también son importantes, como la sencillez, la rapidez y por supuesto la rentabilidad (González-Urdiales *et al.*, 2006), y es muy difícil que todas se cumplan simultáneamente.

No obstante, conseguir dictaminar que una determinada técnica o que un grupo de técnicas nos aproxima realmente a la capacidad fecundante, depende en gran medida del diseño de los experimentos efectuados ya que, en muchos casos, la variabilidad observada en las correlaciones con la fertilidad puede ser consecuencia de las diferencias existentes entre estudios, bien por una variación en la época del año, en las técnicas empleadas, etc. Un diseño experimental ideal debe emplear, tanto un número de inseminaciones suficientemente grande para que la estimación de la fertilidad sea fiable, como un número de verracos representativo de la población (Pace, 1980), y también ha de tener en cuenta el número de espermatozoides inoculados en la inseminación, puesto que se ha de emplear un número que permita detectar variaciones en la calidad cuando éstas existan; por ello, Pace (1980) considera que muchos de los estudios efectuados deberían ser reevaluados, ya que al haber utilizado un número de células superior al óptimo, habrían quedado enmascaradas las posibles deficiencias de calidad de las muestras, por lo que los resultados obtenidos no serían concluyentes.

## **2.2.2. Técnicas de contrastación seminal.**

### **2.2.2.1. Valoración macroscópica del eyaculado.**

La valoración macroscópica del eyaculado es la primera valoración que se ha de realizar tras la recolección del mismo y en ella procederemos a determinar su volumen, así como a efectuar una evaluación subjetiva de su aspecto, color y olor. El eyaculado ha de presentar un color blanquecino, lechoso o claro, en función de la concentración espermática, y un olor *sui generis*; la presencia de cualquier coloración diferente a ésta o de un olor anormal pueden ser debidos a la presencia de alteraciones patológicas del tracto genital, como hemorragias (color



rojizo) o infecciones piógenas (tonalidad parda), o bien a la contaminación del material seminal en el momento de la eyaculación, generalmente con orina o con secreciones prepuciales (color amarillento y olor característico a orina) [Martín-Rillo *et al.*, 1996].

### 2.2.2.2. Cálculo de la concentración espermática.

En 1961, Salisbury y Vandermark (citado en Flowers, 2002), propusieron un modelo en el que, mediante una curva asintótica entre el número de espermatozoides viables presentes en una dosis seminal y la fertilidad que se obtiene de ella, se observaba que la fertilidad aumenta a medida que se incrementa el número de estos espermatozoides, hasta llegar a un nivel óptimo a partir del cual el incremento de células espermáticas inseminadas ya no representaba un aumento de la fertilidad. La determinación de este punto óptimo es uno de los aspectos más determinantes a la hora de rentabilizar el trabajo en un Centro de Inseminación comercial, puesto que permite conseguir la máxima fertilidad y rentabilidad posibles; por ello es muy importante disponer de un método de cálculo de concentración muy exacto, que nos permita elaborar el mayor número de dosis posible sin que disminuya ese valor óptimo (González-Urdiales *et al.*, 2006).

Actualmente existen numerosos procedimientos para este fin, siendo los más utilizados en la práctica los hematocitómetros o cámaras de recuento celular y los espectrofotómetros o fotocolorímetros (Hafez, 2000; González-Urdiales *et al.*, 2006), y en menor medida, pero cada vez con más frecuencia, los sistemas basados en el análisis de imagen, como los módulos de concentración de los sistemas CASA o el sistema recientemente introducido Nucleocounter<sup>®</sup>, y ya con un uso muy reducido, limitado exclusivamente a la investigación debido al elevado coste de los aparatos, se encuentran los citómetros de flujo y los contadores electrónicos de partículas (Woelders, 1990; Hafez, 2000; González-Urdiales *et al.*, 2006).

En la superficie de los hematocitómetros están grabadas una serie de líneas que delimitan una cuadrícula cuyas divisiones presentan diferentes superficies, todas ellas, al igual que la altura de la cámara, conocidas. A partir del número de espermatozoides contabilizados en el interior de los cuadrados seleccionados, y sabiendo el factor de dilución empleado en la muestra, resulta muy sencillo conocer la concentración de la misma a partir de la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ espermatozoides}/\mu\text{l} = \frac{\text{Células contabilizadas}}{\text{Superficie}(\text{mm}^2) \times \text{Prof. Cámara} \times \text{Dilución}}$$

Este método, si bien es uno de los que más difusión ha tenido, debido a su bajo coste y a que sólo requiere la supresión de la movilidad espermática de la muestra, para lo cual se emplea una solución fijadora, presenta algunos inconvenientes, como son el elevado tiempo requerido para la valoración o la escasa repetitividad entre duplicados, mostrando coeficientes de variación de hasta el 12 %, mucho mayores que los de otros sistemas como el espectrofotómetro (2,9 %) o la citometría de flujo (2,3 %) [Paulenz y Hofmo, 1996], a pesar de lo cual, los hematocitómetros siguen siendo utilizados como referencia para comparar los resultados del resto de técnicas.

Existen en el mercado numerosas cámaras de recuento celular, siendo las más usadas la Neubauer, Neubauer improved, Bürker y Makler.

Los espectrofotómetros y fotocolorímetros miden, en porcentaje, la cantidad de luz que atraviesa (transmitancia) o que queda retenida (absorbancia), al incidir un haz de luz sobre una muestra situada en una cubeta transparente. Se trata de un método de valoración indirecto, por lo que la densidad óptica obtenida se ha de contrastar con una recta patrón, realizada previamente con diluciones de semen de concentración conocida. Los resultados presentan una alta correlación con el recuento directo en cámara (Foote *et al.*, 1978; Tejerina *et al.*, 2006b), y una mayor repetitividad que éste, siendo también un método mucho más rápido y práctico (Boixo *et al.*, 1987). No obstante, también presenta algún inconveniente, ya que tanto la aglutinación espermática como la precipitación de algunas proteínas del plasma seminal proporcionan una cierta heterogeneidad óptica a las muestras y pueden interferir en la medición (Peláez *et al.*, 1999).

En cuanto a los sistemas basados en la tecnología de análisis de imagen, nos encontramos fundamentalmente con los sistemas CASA, cuyos módulos de cálculo de concentración presentan en su mayoría resultados con una baja correlación con respecto a los obtenidos por los hematocitómetros, constatándose diferencias significativas entre ambos métodos en diversos estudios (Chan *et al.*, 1990; Iguer-ouada y Verstegen, 2001; Tejerina *et al.*, 2006b). Esto podría deberse, según varios autores, a una sobreestimación motivada por las colisiones producidas entre espermatozoides (Coetzee *et al.*, 2001), lo que conlleva a la contabilización repetida de varias células. Para solventar este error, se aconseja eliminar la capacidad mótil de los espermatozoides mediante la fijación de las muestras de forma previa al análisis o, con el fin de reducir el número de colisiones, incrementar el factor de dilución de la muestra, aunque este último procedimiento no corrige completamente dicha sobrestimación (England, 1992) y además puede producir un incremento del coeficiente de variación de los resultados obtenidos que tampoco es deseable (Verstegen *et al.*, 2002). Por otra parte, la presencia de ciertos elementos del tamaño de las células espermáticas en algunas muestras, como por ejemplo partículas de yema de huevo en el semen criopreservado, también puede dar lugar a una sobreestimación del cálculo de concentración; para resolver esta circunstancia, la utilización de tinciones de ADN, como el Hoescht 33342, se convierte en una alternativa más que interesante en la discriminación de los espermatozoides (Boyers *et al.*, 1989; Farrell *et al.*, 1996). Con base en esta idea, han aparecido sistemas como el Nucleocounter<sup>®</sup> que, combinando la tecnología de análisis de imagen de forma similar a los sistemas CASA, pero identificando las células por medio de otra tinción de ADN, el yoduro de propidio, proporcionan resultados similares desde el punto de vista estadístico y claramente correlacionados con los recuentos de las cámaras (Tejerina *et al.*, 2006b).

### 2.2.2.3. Evaluación de la movilidad espermática.

La movilidad espermática ha sido el parámetro más utilizado habitualmente para definir la calidad de un eyaculado y su idoneidad para ser usado en la IA, si bien su relación con la fertilidad no está muy clara, como se deriva del amplio rango de correlaciones ( $r=0,15-0,83$ ) descritas en los diferentes trabajos publicados (Rodríguez-Martínez, 2003); estos valores se encuentran en muchos casos condicionados por la realización de estimaciones visuales del porcentaje de movili-

dad espermática, como queda de manifiesto cuando, al utilizar sistemas CASA, que aportan una mayor objetividad y repetitividad en los resultados, se reduce esta variabilidad y se incrementan los coeficientes de correlación al combinar los resultados obtenidos con otros parámetros de calidad seminal (Farrell *et al.*, 1998). La falta de repetitividad habitual en estas valoraciones puede ser consecuencia de una mala estandarización del protocolo, ya que la movilidad espermática es extremadamente sensible a ciertos factores, como la temperatura de la muestra en el momento de la valoración, el diluyente utilizado, el tiempo empleado en la realización del análisis e incluso, el volumen de muestra que empleamos en la valoración (profundidad) [Hafez, 2000], si bien, hay que tener en cuenta que todos estos factores afectan por un igual tanto a las valoraciones visuales como a las realizadas por medio de sistemas computarizados, como se detallará posteriormente.

A pesar de que el desarrollo de los sistemas computarizados de análisis seminal haya permitido que cada vez estén más presentes en los Centros de Inseminación comerciales de las diferentes especies zootécnicas, hoy por hoy, la valoración subjetiva sigue siendo el método empleado por la mayoría de aquellos destinados a la IA porcina.

A partir de la valoración visual (subjetiva) de la movilidad espermática se pueden determinar dos tipos de motilidad en un eyaculado: la motilidad masal y la motilidad individual.

La motilidad masal refleja el movimiento de las células espermáticas en su conjunto; para llevarla a cabo, depositaremos una gota de semen puro sobre un portaobjetos atemperado, observándola a continuación al microscopio óptico bajo un objetivo de 40 aumentos. Se trata de una valoración claramente subjetiva, que clasifica a los eyaculados en una escala de 0 a 5 en función del número, densidad y velocidad de movimiento de las ondas o remolinos que se forman en la superficie de la gota de semen y que requiere una elevada concentración espermática precisamente para que éstos puedan observarse con facilidad y sea posible clasificar a los eyaculados en esas seis categorías, por lo que su utilización práctica queda reducida a aquellas especies que presentan eyaculados con una concentración espermática alta, como sucede en el caso de los rumiantes (Hafez, 2000; González-Urdiales *et al.*, 2006).

La motilidad individual es definida por algunos autores como una valoración semi-cuantitativa o cuali-cuantitativa (Martín-Rillo *et al.*, 1996; González-Urdiales *et al.*, 2006), ya que, por un lado, se determina el porcentaje de espermatozoides móviles y por otro, se evalúa, de forma subjetiva, la calidad del movimiento de los mismos, si bien a nivel práctico la valoración del porcentaje de espermatozoides con movilidad se realiza de una forma puramente subjetiva, ya que en realidad no se efectúa un cómputo de las células, sino que se estima un porcentaje tras observar varios campos de la preparación. Para su realización hemos de diluir previamente una muestra de semen y depositar una gota entre un portaobjetos y un cubreobjetos debidamente atemperados; la observación se efectúa bajo microscopía óptica a 100 ó 200 aumentos y, tras estimar el porcentaje de células móviles, se establece la calidad del movimiento espermático con base en una escala arbitraria (de 0 a 5) en función de la rapidez y la progresividad de los mismos (Martín-Rillo *et al.*, 1996; González-Urdiales *et al.*, 2006).

#### 2.2.2.4. Evaluación de la morfología espermática.

La evaluación de la morfología espermática es un componente importante del espermiograma, y junto con la valoración de la movilidad, resulta la prueba más determinante a la hora de establecer la calidad del semen en las valoraciones rutinarias de los Centros de IA comerciales.

Dado que la morfología espermática puede ser indicativa de desviaciones en la espermatogénesis y en la maduración epididimaria, sus resultados convenientemente utilizados pueden emplearse para establecer pautas de manejo apropiadas, así como para eliminar reproductores con semen de baja calidad si las alteraciones celulares indican patologías genitales mayores (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2000). Pero cuando los parámetros morfológicos están dentro de unos límites aceptables, la morfología de la muestra seminal *per se* ya no nos proporciona, por desgracia, la información suficiente para determinar el nivel esperado de fertilidad (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2000; González-Urdiales *et al.*, 2006), apareciendo oscilaciones similares a las observadas con la movilidad seminal (0,06 - 0,86) en las correlaciones con la fertilidad (Rodríguez-Martínez, 2003).

Se han establecido numerosas clasificaciones de las anomalías morfológicas de los espermatozoides; así, nos encontramos con metodologías que los encuadran en función de la localización de la alteración (Martín-Rillo, 1982), dividiéndolos en alteraciones de cabeza, de cola o del tracto intermedio, en función de la capacidad fecundante del espermatozoide que la presente, clasificándolas en alteraciones mayores (aquellas asociadas con la infertilidad) y menores (las que no lo están) [Bloom, 1972 (citado en Catena y Cabodevila, 1999)], en función de si es compensable el efecto deletéreo sobre la fertilidad mediante el incremento del número de espermatozoides en la dosis seminal, definiendo así dos tipos, alteraciones compensables o no compensables (Saacke, 1994). Otros autores se decantan por una clasificación etiológica, que divide a las anomalías morfológicas en tres grupos:

- Anomalías primarias: aquellas que se producen por alguna deficiencia producida en la espermatogénesis; se dividen en específicas o no específicas, siendo las primeras de origen genético, mientras que las segundas, las más frecuentes, son de etiología diversa.
- Secundarias: aquellas que se producen a nivel del epidídimo; suelen manifestarse mediante alteraciones a nivel de la cola (colas enrolladas, en “látigo”, etc.), o incluso por la falta de ésta.
- Terciarias: aquellas que se originan por mal manejo del semen en el laboratorio; pueden ser mecánicas (aparición de cabezas desprendidas de la cola por mala realización de extensiones sobre portaobjetos) o físicas/químicas (por descenso brusco de la temperatura, la composición del diluyente, o por variaciones de pH o de la presión osmótica).

Aunque no se trate de una alteración morfológica, la presencia en un eyaculado de espermatozoides con gotas citoplasmáticas ha de tenerse muy en cuenta a la hora de realizar los espermiogramas a los sementales, ya que su aparición, que es muy frecuente, puede motivar una reducción en el porcentaje de fertilidad. La gota citoplasmática es un residuo de la espermatogénesis que se sitúa en la zona de conexión entre la cabeza y la pieza intermedia (gota

citoplasmática proximal) y que va deslizándose hasta el anillo de Jensen o zona de unión de la pieza intermedia con la sección principal de la cola (gota citoplasmática distal), desde donde acabará desprendiéndose posteriormente (Bonet *et al.*, 1994). Su presencia se relaciona con una inadecuada maduración de los espermatozoides (Hafez, 2000; Martín-Rillo *et al.*, 1996; Leidl, 1983), si bien, no todas deben considerarse *a priori* anormales, si no que resulta interesante hacer una distinción entre gotas citoplasmáticas proximales y distales, ya que, se ha determinado que eyaculados con más de un 5% de gotas citoplasmáticas proximales provocan un descenso de la fertilidad, y, en cambio, no se ha obtenido una correlación directa entre ese mismo parámetro y el porcentaje de gotas citoplasmáticas distales (Leidl, 1983).

Existen varios métodos para la valoración morfológica de los espermatozoides. Desde hace años se vienen utilizando con este fin diferentes tinciones espermáticas, ya sean simples (azul de metileno, rosa de bengala, hematoxilina, etc.), que proporcionan una distribución homogénea del colorante en el interior de la célula, permitiéndonos así diferenciar el contorno de la misma al tener un buen contraste con el fondo del campo de visión, o tinciones dobles que lo que buscan es visualizar o resaltar partes específicas del espermatozoide (William, Giemsa, Karras, etc.) [García-Artiga *et al.*, 1994]; no obstante, la utilización de este tipo de técnicas puede resultar lenta y engorrosa.

También se pueden emplear, previa tinción de las muestras, sistemas informatizados de análisis morfométrico, conocidos por su acrónimo en inglés como ASMA (*Automated Semen Morphology Analysis*), aunque su uso queda relegado al ámbito de la investigación como consecuencia del elevado costo de los aparatos y de la lentitud en el proceso (Casey *et al.*, 1997; Tejerina *et al.*, 2005; García-Herreros *et al.*, 2006).

La microscopía de contraste de fases o, en menor medida, la de contraste diferencial de interferencia (DIC), son otros dos métodos ampliamente utilizados para realizar estas valoraciones, dado que permiten observar con nitidez la morfología espermática, siendo necesario únicamente fijar de forma previa la muestra seminal, y además presentan la ventaja de la limpieza y rapidez del proceso, por lo que resultan los recomendables para los Centros de IA comerciales (González-Urdiales *et al.*, 2006).

#### **2.2.2.5. Evaluación de la integridad de la membrana plasmática (vitalidad espermática).**

La membrana plasmática recubre toda la estructura celular del espermatozoide, delimitando su extensión y manteniendo las diferencias esenciales entre el contenido del interior de la célula y el medio extracelular, para lo cual se encarga, principalmente, de mantener el gradiente iónico y de regular la entrada y salida de sustancias de la célula.

Las funciones del plasmalema son varias, puesto que además de ser considerado como un filtro altamente selectivo que controla la entrada de sustancias o nutrientes, como la glucosa o la fructosa (necesarios para la formación de energía en forma de ATP) y la salida de productos de desecho, actúa como sensor de señales externas, permitiendo con ello la modificación de las características celulares en función de las condiciones del medio externo (concentración de deter-

minados iones, presión osmótica, etc.), e incluso establece la intercomunicación con otras células, por lo que ejerce un papel fundamental para la fecundación, al interactuar con las células del aparato reproductor femenino y, posteriormente, con el ovocito (Rodríguez-Martínez, 2001, 2005).

La alteración, ya sea estructural o funcional, de la membrana plasmática supone la pérdida de la permeabilidad selectiva de la misma, imposibilitando al espermatozoide para mantener las concentraciones intracelulares de iones, solutos, enzimas y coenzimas, provocando la supresión del metabolismo energético, lo que conlleva la supresión de la movilidad y, posteriormente, de todas las funciones vitales (Woelders, 1990), de ahí que a las pruebas que evalúan la integridad de esta membrana se las denomine también de “vitalidad celular” o pruebas vitales.

Debido a esta importancia que tiene la membrana plasmática en el correcto funcionamiento de la célula, se han desarrollado multitud de pruebas para determinar su estado, y ello desde dos perspectivas diferentes, la estructural y la funcional (Peláez, 2003; González-Urdiales *et al.*, 2006).

### **Valoración de la integridad estructural del plasmalema.**

Se han desarrollado numerosos estudios con el objetivo de analizar la integridad de la membrana plasmática desde un punto de vista estructural, recurriendo incluso a su evaluación morfológica bajo microscopía electrónica de barrido (Bonet *et al.*, 1994) o con técnicas indirectas de medida, mediante la estimación de la concentración de ATP o de otras enzimas intracelulares en el medio extracelular (Woelders, 1990). No obstante, ninguno de estos dos métodos ha sido ampliamente utilizado, ya que el primero implica realizar valoraciones tediosas, lentas y con un coste muy elevado (González-Urdiales *et al.*, 2006), y aun aportando una información detallada acerca de los daños inflingidos a la membrana, éstos, a menos que sean muy severos, no siempre van a estar correlacionados con la fertilidad (Rodríguez-Martínez, 2005); por su parte, los métodos indirectos de valoración se basan en el hecho de que la ruptura de la membrana supone la pérdida de sustancias intracelulares, por lo que su cuantificación proporcionaría información relativa a la severidad del daño, pero los resultados recogidos dependerán en gran medida de las condiciones experimentales utilizadas (Woelders, 1990), además de que no van a permitir diferenciar qué células están dañadas y cuáles no (Watson, 1990).

Las técnicas empleadas para este fin que han presentado un mayor interés son, con total seguridad, las técnicas de tinción, que pueden ser, en función del tipo de colorante utilizado, convencionales o fluorescentes.

Las técnicas convencionales, comúnmente denominadas tinciones de “vivos/muertos”, se basan en el principio de que los espermatozoides que presentan una membrana plasmática intacta (vivos) no captan el colorante al impedirlo los mecanismos de permeabilidad selectiva que ésta ejerce, mientras que las células con ruptura en su plasmalema (muertos), al carecer de ellos, no pueden evitar que el colorante se introduzca, apareciendo por ello teñidas (Watson, 1990). Los colorantes empleados para realizar estas tinciones son diversos (García-Artiga *et al.*, 1994), destacando la Eosina y el Tripán Azul, por su sencillez y eficacia y por la amplia difusión que

han tenido.

La utilización de este tipo de técnicas presenta una serie de inconvenientes:

- La aparición de espermatozoides parcialmente teñidos, lo cual complica la determinación de su *status* (Watson, 1990); algunos autores (Bamba, 1988) proponen que, dado que la inclusión de algo de colorante en el interior de la célula sería indicativo de un estado inicial de alteración que, con el tiempo, conllevará una pérdida total de la permeabilidad selectiva de la membrana, resulta más apropiado considerarlos como “muertos”.
- El incremento de la permeabilidad de membrana con la adición de glicerol, que resulta clave en la valoración de semen criopreservado, ya que puede incrementar artificialmente el porcentaje de espermatozoides dañados [(Mixner y Saroff, 1954) citados en Peláez, 2003].
- Las concentraciones excesivas de Eosina pueden resultar citotóxicas, con lo que se podría estar subestimando la proporción de espermatozoides vivos (Woelders, 1990).

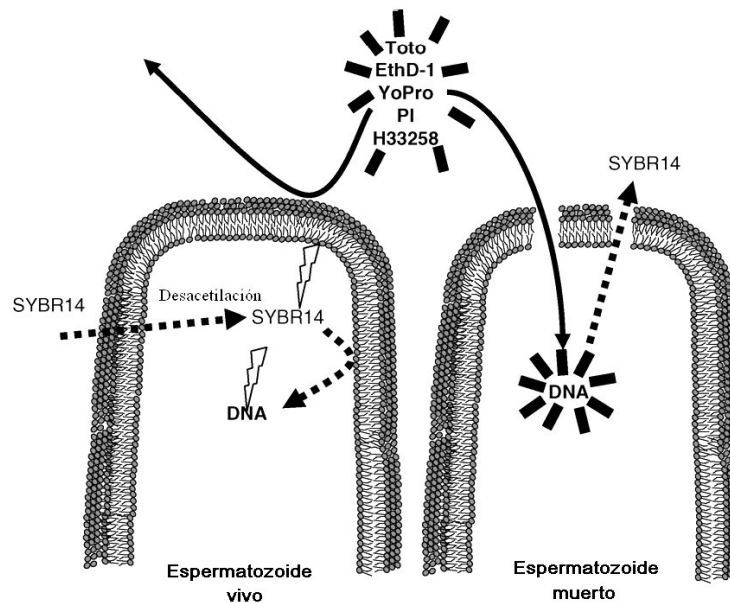
La utilización de técnicas fluorescentes para la evaluación del plasmalema ha eliminado muchos de estos inconvenientes, proporcionando una mayor objetividad a este tipo de valoraciones (Woelders, 1990). Se han desarrollado una gran variedad de protocolos a partir de esta clase de sustancias (tablas 2.2 y 2.3), que pueden dividirse en dos grupos teniendo en cuenta su mecanismo de acción: técnicas de membrana impermeable y de membrana permeable.

Las primeras son las más empleadas en la evaluación estructural de la membrana plasmática y se basan en un principio similar al de las tinciones convencionales, ya que los fluorocromos penetran únicamente en aquellas células que presentan un daño en el plasmalema (Silva y Gadella, 2006). Hoy en día suele emplearse fluorocromos con una alta afinidad por el ADN, como por ejemplo, el yoduro de propidio (IP), el Hoechst 33258, el YoPro-1, el homodímero de etidio (HE), etc.

Las técnicas de membrana permeable utilizan fluorocromos que atraviesan la membrana de los espermatozoides y, una vez en su interior, van a sufrir una desacetilación por esterasas intracelulares, lo cual va a impedir que salgan de nuevo al medio extracelular, acumulándose en el citoplasma; éste es el caso del Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF) y sus derivados (Gillan *et al.*, 2005). Otra sustancia fluorescente empleada en este tipo de técnicas es el SYBR-14, que tiene gran difusión, si bien su mecanismo de acción difiere del expuesto para el DCF, ya que penetra únicamente en aquellas células cuyas bombas de iones de la membrana se encuentren activas, para posteriormente, unirse al ADN celular (Garner *et al.*, 1994).

La utilización de forma combinada de fluorocromos de membrana impermeable y permeable, que emitan una coloración diferente al incidir sobre ellos un haz de luz con una determinada longitud de onda, simplifica la diferenciación del *status* de membrana. Se han descrito varios procedimientos para la evaluación combinada en muchas especies, y en concreto en la porcina se han utilizado combinaciones como el IP y el DCF (Garner *et al.*, 1986; Harrison y Vickers, 1990), el SYBR-14 y el IP (Garner *et al.*, 1994; Garner y Johnson, 1995), o el éster de acetilmetilcalceína (CAM) y el HE (Althouse y Hopkins, 1995).

La utilización de fluorocromos no sólo permite determinar la integridad de la membrana plasmática sino que posibilita conocer incluso su organización interna; tanto el Annexin-V como el Ro-09-0198, marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), mediante su unión a la fosfatidilserina dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Silva y Gadella, 2006) o a la fosfatidiletanolamida (Gadella y Harrison, 2002), respectivamente, permiten detectar lesiones en el plasmalema de forma temprana como consecuencia de la exteriorización de estas dos sustancias en los estadios iniciales de la lesión. Con la utilización del Annexin-V se han podido determinar los primeros episodios acaecidos en los cambios en la integridad de la membrana tras el proceso de congelación-descongelación tanto en el toro (Januskauskas *et al.*, 2003) como en el verraco (Peña *et al.*, 2003a), debido a que este marcador resulta mucho más sensible que otros a todos los cambios que se producen en la membrana como consecuencia de la criopreservación, desde la aparición de translocaciones de fosfatidilserina a la pérdida total de su integridad durante la degeneración celular (Rodríguez-Martínez, 2003). No obstante, las correlaciones observadas entre los resultados obtenidos con esta técnica y la fertilidad son muy variables ( $r=0,30-0,56$ ) entre los diferentes estudios (Anzar *et al.*, 2002; Januskauskas *et al.*, 2003).



**Figura 2.7:** Mecanismo de acción de diversas sustancias fluorescentes empleadas en la valoración de la integridad de la membrana citoplasmática (tomado de Silva y Gadella, 2006).

Sustancias empleadas en valoraciones de membrana impermeable: Homodímero de etidio (EthD-1), YoPro-1, yoduro de propidio (PI) y el Hoechst H33258.

Sustancias empleadas en valoraciones de membrana permeable: SYBR14.

### Valoración de la integridad funcional del plasmalema.

Las células eucariotas presentan una serie de mecanismos para adaptarse y resistir a condiciones adversas del medio que las rodea, por ejemplo, mediante las vías metabólicas relacionadas con los canales iónicos del tipo ATPasa dependiente o el intercambiador  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$  presentes en la membrana plasmática (Rodríguez *et al.*, 2006) y que regulan parte del intercambio de sustancias entre el exterior y el interior de la célula. Partiendo de este mecanismo de actuación, las pruebas funcionales de integridad de membrana evalúan la respuesta de la célula espermática a un estrés



osmótico estableciendo, en función de cual sea ésta, su capacidad funcional.

Entre las diversas técnicas desarrolladas con este fin, destacan dos por su gran difusión: el Test de Endósmosis Positiva y el Test de Resistencia Osmótica.

El Test de Endósmosis Positiva, también llamado test de hinchamiento osmótico o celular, y más comúnmente conocido por sus siglas en inglés como HOST (*Hypoosmotic Swelling Test*), se basa en el principio de que los espermatozoides, como cualquier célula eucariota, cuando se ven sometidos a un medio hiposmótico ( $< 300$  mOsm/Kg) reaccionan captando agua del medio extracelular hacia su interior. Esta captación, regulada por las bombas de intercambio hídrico e iónico, provocará un hinchamiento de las células, que en el caso de los espermatozoides, como consecuencia de su morfología, se verá reflejado en un enrollamiento de los flagelos. En esta prueba se asume que la capacidad de los espermatozoides para retorcer la cola en presencia del medio hiposmótico es un signo de que el transporte de agua a través de la membrana ocurre correctamente, por lo que se les presupone tanto integridad de la misma como una actividad funcional normal (Jeyendran *et al.*, 1984).

Esta técnica fue desarrollada por Jeyendran *et al.* (1984), en semen humano y posteriormente se ha adaptado a numerosas especies como la porcina (Vázquez *et al.*, 1997; Pérez-Llano *et al.*, 1999), la bovina (Correa y Zavos, 1994), la equina (Rowley *et al.*, 1997), la canina (England y Plummer, 1993; Rodríguez-Gil *et al.*, 1994), la ovina (Söderquist *et al.*, 1997) e incluso para el semen de trucha (Cabrita *et al.*, 1999). Para su ejecución se procede a incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  una muestra seminal en un medio hiposmótico (50-150 mOsm/Kg) durante 30-60 minutos y, una vez transcurridos, se calcula el promedio de espermatozoides que han sufrido la torsión de la cola. Pérez-Llano *et al.* (1998c) redujeron el tiempo de incubación a 5 minutos con el fin de adaptar la técnica a la rutina de los Centros de IA comerciales y obtuvieron resultados interesantes en cuanto a su relación con la fertilidad *in vivo* (Pérez-Llano *et al.*, 2001).

La correlación existente entre la valoración estructural de la membrana mediante tinciones y el HOST resulta bastante alta, pero éstas no muestran resultados coincidentes, posiblemente porque evalúan aspectos muy diferentes de la célula (Jeyendran *et al.*, 1984; Vázquez *et al.*, 1997); como el test de endósmosis positiva siempre presenta valores inferiores a la valoración estructural, Vázquez *et al.* (1997) consideran que esta técnica es más sensible que la otra, resultando una buena herramienta para detectar espermatozoides “subviables” si se efectúa en combinación con una tinción estructural. Se han descrito buenas correlaciones con la calidad seminal (Vázquez *et al.*, 1997), con la fertilidad *in vitro* ( $r=0,90$ ) mediante el test de penetración de ovocitos de hamster (Chan *et al.*, 1985), o con la fertilidad *in vivo* (Takahasi *et al.*, 1990), por lo que parece ser un método bastante efectivo en la evaluación de la capacidad fecundante del semen; además, ciertos autores como Watson (1995) y Petzoldt *et al.* (1996) lo consideran un buen indicador de la capacidad de criopreservación de los espermatozoides.

El Test de Resistencia Osmótica, más conocido como ORT (*Osmotic Resistance Test*), es una prueba que desarrollaron Schilling *et al.* (1984) con el fin de encontrar una técnica que predijese la pérdida de la integridad acrosómica tras el proceso de congelación/descongelación o, simple-

mente, tras el almacenamiento en refrigeración, demostrando que tiene relación con la capacidad fecundante del semen, llegando a convertirse en una de las pruebas de mayor importancia en la evaluación de la calidad seminal del verraco (Quintero-Moreno *et al.*, 2004).

Esta técnica se basa en el sometimiento de los espermatozoides a un estrés hiposmótico, de forma similar al HOST, pero en este caso evaluando la integridad de la vesícula acrosómica. Para su ejecución se procede a incubar a 37 °C dos muestras del mismo material seminal en dos soluciones, una isosmótica (300 mOsm/Kg), durante 15 minutos y otra hiposmótica (50-150 mOsm/Kg), durante un tiempo variable comprendido entre los 60 y los 120 minutos, y a continuación se calcula el porcentaje de acrosomas morfológicamente normales en ambas para establecer una media de las dos muestras; lógicamente, cuanto mayor sea este promedio, mayor calidad tendrá la muestra.

Aplicando esta prueba al semen porcino se ha conseguido estimar tanto su capacidad fecundante (Schilling *et al.*, 1986) como la capacidad de conservación de un eyaculado (Schilling *et al.*, 1984; Schilling y Vengust, 1985). Al igual que en el HOST, se ha desarrollado un ORT de corta duración con el fin de incorporarlo a los Centros de IA comerciales (Pérez-Llano *et al.*, 1998b).

Otra técnica desarrollada para la evaluación funcional de la membrana plasmática en el Test de Resistencia Hiperosmótica o HRT (*Hyperosmotic Resistance Test*), que se basa en este mismo principio de aclimatación de la célula a un cambio osmótico, aunque en este caso empleando una solución hiperosmótica como medio de estrés. Se ha establecido que la capacidad de resistencia de los espermatozoides a los cambios súbitos de osmolaridad de esta prueba están relacionados con la calidad seminal determinada en otras pruebas tanto *in vitro* como *in vivo* (Rodríguez *et al.*, 2006).

#### 2.2.2.6. Evaluación de la integridad de la membrana acrosómica y del *status* de capacitación.

Los espermatozoides de los mamíferos deben experimentar un proceso de exocitosis denominado “reacción acrosómica” (RA) para tener la capacidad de fecundar a los ovocitos, proceso que requiere, a su vez, una serie de transformaciones previas, conocidas con el nombre de “capacitación espermática”, que tienen lugar generalmente durante el recorrido por el tracto reproductor femenino y que son producidas por la influencia de determinados estímulos sobre las células espermáticas.

**Reacción acrosómica.** Es un proceso, observado por primera vez en 1958 por Austin y Bishop, que experimentan los espermatozoides capacitados como consecuencia de la acción de determinados inductores adecuados; en él se produce la fusión de la membrana plasmática y la acrosomal externa, conformando una serie de vesículas que se desprenden permitiendo la liberación del material enzimático del interior del acrosoma y dejando expuesta a la membrana acrosomal interna (Langlais y Roberts, 1985; Senger, 2005).

Hay que tener en cuenta dos premisas: en primer lugar, para que tenga lugar la RA es im-

prescindible que exista la integridad estructural del acrosoma (Yanagimachi, 1988), y en segundo lugar, la RA de espermatozoides capacitados puede ocurrir de forma espontánea o bajo la acción de inductores específicos (Yanagimachi, 1988), por lo que su efectividad depende, en gran medida, de que el espermatozoide se encuentre en las proximidades del ovocito.

Teniendo en cuenta estas dos premisas, podemos enfocar el estudio de la integridad acrosómica a través de dos vías:

- Estableciendo el porcentaje de espermatozoides que poseen algún daño en el acrosoma y que están, por ello, incapacitados para la fecundación.
- Evaluando la capacidad que presentan las células espermáticas de experimentar la RA ante estímulos externos. Este tipo de estudios aportan una mayor información sobre la capacidad funcional de la vesícula acrosómica (Colenbrander *et al.*, 2003), presentando un índice de correlación de 0,6 entre el grado de inducibilidad de las muestras y la fertilidad (Rodríguez-Martínez, 2005). Para la inducción de la RA *in vitro* se han utilizado numerosos agentes como, por ejemplo, progesterona, empleada en varias especies como en porcino (Melendrez *et al.*, 1994), en humano (Brucker *et al.*, 1994), en ratón (Yogev *et al.*, 1995) o en caballo (Meyers *et al.*, 1995), ionóforos de Calcio (Januskauskas *et al.*, 2000b), glicosaminoglicanos (Januskauskas *et al.*, 2000a), lisofosfatidilcolina (Way y Killian, 2002), o derivados de la ZP como, ZP homólogas (Berger *et al.*, 1989), ZP solubilizada (Mattioli *et al.*, 1996), proteínas de la ZP (Harkema *et al.*, 1998), etc. (Rodríguez-Martínez, 2003; 2005).

Con el fin de determinar el daño estructural del acrosoma se han desarrollado multitud de protocolos, como la observación bajo microscopio óptico de transmisión, que aunque muestra con detalle la morfología acrosómica, presenta inconvenientes similares a los ya descritos en la evaluación de la membrana plasmática, además de que se corre el riesgo de que los tratamientos químicos de fijación que se requieren en estos procedimientos provoquen la RA en aquellos espermatozoides previamente capacitados, lo que conduciría a la sobreestimación del porcentaje de acrosomas reaccionados (Yanagimachi, 1988).

Otros métodos de valoración del estado acrosomal como la microscopía de contraste de fases (Pursel y Johnson, 1974; Cross y Meitzel, 1989; Woelders, 1990) o la de contraste diferencial de interferencia (Bleil y Wassarman, 1986; Aalseth y Saacke, 1986; Steinholt *et al.*, 1991), resultan ser mucho más sencillos en su ejecución y presentan un coste muy inferior, por lo que se han convertido, sobre todo el primero de ellos, en la opción de la mayoría de los Centros de IA comerciales que evalúan el estado de la vesícula acrosómica con asiduidad. No obstante, aunque los resultados obtenidos sean completamente fiables al ser sencilla su valoración en aquellas especies que presentan un acrosoma de grandes dimensiones, como el cobaya o el hamster, resultan menos apropiadas para aquellas otras en las que el acrosoma es muy pequeño o no resalta del contorno de la cabeza espermática, como en el conejo, el verraco o el perro, en los que su valoración resulta algo más dificultosa (Cross y Meitzel, 1989).

Para solventar este inconveniente se suele recurrir a técnicas tintoriales, que se clasifican nuevamente en convencionales o fluorescentes.

Las técnicas convencionales permiten detectar diferentes grados de lesión del acrosoma (Pe-láez, 2003); son sencillas y generalmente rápidas, por lo que resultan apropiadas para condiciones de campo y en protocolos de investigación elemental. Algunas de las técnicas y/o colorantes más utilizados son: la técnica de Wells-Awa, que emplea el verde rápido FCF y la eosina B (Wells y Awa, 1970), giemsa (Watson, 1975), eosina y nigrosina (Bamba, 1988), amarillo naftol S y eritrosina B (Steinholt *et al.*, 1991), amarillo naftol S y anilina azul (Christensen *et al.*, 1994), Spermac<sup>®</sup> (Paulenz *et al.*, 1995), Coomassie azul G-250 (Larsson y Miller, 1999), ...

La utilización de combinaciones de colorantes, generalmente con aquellos empleados en tinciones vitales, hace que la ejecución sea más complicada, pero se desarrollaron con el fin de diferenciar entre la reacción acrosómica verdadera (la experimentada por los espermatozoides vivos tras la capacitación) y la falsa (aquella que se produce a consecuencia de la autodigestión enzimática producida por la activación del contenido acrosomal de espermatozoides muertos o moribundos). Algunos autores resaltan la importancia de realizar este clase de combinaciones, puesto que las lesiones a nivel del acrosoma no tienen por qué implicar lesión del plasmalema (Holt, 2000b), y en cambio, una lesión en el plasmalema sí puede coincidir e incluso originar una alteración del acrosoma (Woelders, 1990), por lo este tipo de técnicas resultan mucho más discriminantes que aquellas que realizan las valoraciones de estas dos estructuras por separado. Son ejemplos de ellas: la combinación de tripán azul y giemsa (Didion *et al.*, 1989), de eosina-nigrosina y giemsa (Tamuli y Watson, 1994b; Ramesha *et al.*, 2000), de tripán azul, rojo neutro y giemsa (Kovács y Foote, 1992; Kovács *et al.*, 2000), o de tripán azul, marrón Bismarck y rojo Bengala (Vázquez *et al.*, 1992).

Dentro las técnicas fluorescentes se han utilizado un elevado número de sustancias para la evaluación de la integridad de la vesícula acrosómica, entre las cuales destacan, por su amplia difusión, las lectinas; las más importantes son:

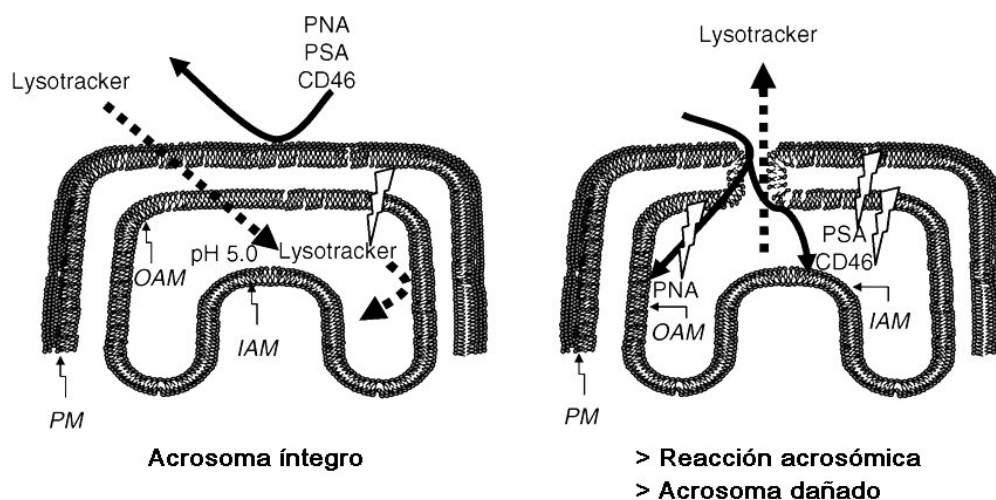
- La aglutinina de *Ricinus communis* (en desuso por su acción tóxica sobre las células espermáticas).
- La aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), procedente de la planta de PEA, actúa uniéndose a residuos de  $\alpha$ -manosa y de  $\alpha$ -galactosa de la matriz acrosomal (Farlin *et al.*, 1992; Flesch *et al.*, 1998; Guillan *et al.*, 2005); en aquellos espermatozoides que presentan el acrosoma intacto no es capaz de penetrar, permaneciendo la célula sin teñir (Topfer-Petersen *et al.*, 1984; Cross *et al.*, 1986; Graham, 2001).
- La aglutinina de *Arachis hypogaea* (PNA) es una lectina procedente de la planta del cacahuete que se une a residuos de  $\beta$ -galactosa asociados a la membrana acrosomal externa (Cheng *et al.*, 1998a; Flesch *et al.*, 1998; Szasz *et al.*, 2000); del mismo modo que en el PSA, las células con el acrosoma íntegro permanecerán sin teñir por la imposibilidad del PNA de penetrar en él; en cambio, el PNA presenta menos puntos de unión no específicos en otras áreas del espermatozoide que el PSA, por lo que resulta una técnica más precisa que ésta (Graham, 2001).

■ Otras lectinas son:

- La aglutinina de *Triticum vulgaris* (WGA), específica del ácido siálico y de residuos de N-acetilglucosamina.
- La aglutinina de *Concanavalia ensiformis* (ConA), específica para residuos de D-manosa y D-glucosa.
- La aglutinina de *Ulex europaeus* (UEA), específica para L-fructosa.

Este tipo de sustancias se utilizan con marcadores fluorescentes, entre los que destaca, por su amplia difusión, el isotiocianato de fluoresceína (FITC), que ha sido combinado con todas las lectinas citadas; también se han empleado otras asociaciones como el isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC) o la ficoeritrina (RPE), ambas con el PNA (Silva y Gadella, 2006).

Otro método que evalúa la integridad del acrosoma es el LysoTracker<sup>®</sup> Green DND; se trata de una tinción acidotrópica diseñada para poner de manifiesto tanto los lisosomas como otros orgánulos de carácter ácido, como el acrosoma (pH=5), y que permite identificar espermatozoides vivos con acrosomas intactos por medio de la coloración verde que deja en estas estructuras (Thomas *et al.*, 1998). Este método puede utilizarse con éxito en la valoración de la vesícula acrosómica, ya que se ha determinado que presenta fuertes correlaciones ( $r=0,97$ ) con el porcentaje de espermatozoides que muestra el borde apical intacto en la evaluación morfológica del mismo por microscopía óptica (Thomas *et al.*, 1997).



**Figura 2.8:** Mecanismo de acción de diferentes sustancias empleadas en la evaluación de la integridad acrosomal, como el PNA, el PSA, anticuerpos (CD46) y el LysoTracker; así como sus lugares de unión: Membrana Acrosomal Externa (MAE) y Membrana Acrosomal Interna (MAI) [tomado de Silva y Gadella, 2006].

**Capacitación espermática.** Podemos definir la capacitación espermática como el conjunto de modificaciones a nivel molecular que ocurren en el espermatozoide tras la maduración en el

epidídimo y que le confieren la capacidad de fertilizar al ovocito (Matás, 1997).

Aunque aún no se han podido identificar en su totalidad los mecanismos que conducen a la capacitación, se sabe que durante ésta se producen fenómenos como los siguientes:

- Cambios en la arquitectura de la membrana espermática a través de modificaciones lipoproteicas (Williamson *et al.*, 1983; Cheng *et al.*, 1998b; Gadella y Harrison, 2000; 2002; Gadella *et al.*, 2001), que permiten exteriorizar receptores de membrana imprescindibles para la interacción con los de la membrana del ovocito en la fecundación (Yanagimachi, 1994).
- Modificación del funcionamiento de los canales iónicos que intervienen en el mecanismo de transducción, alterando la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$  (Matás *et al.*, 2006), la fosforilación y desfosforilación de las proteínas o elevando la síntesis del AMP cíclico (AMP<sub>c</sub>) mediante la estimulación de la actividad adenilciclase y la inhibición de la actividad fosfodiasterásica (White y Aitken, 1989), provocando con ello, un aumento de la concentración de calcio intracitoplasmático (Coronel y Lardy, 1987; Fraser, 1989; Matás *et al.*, 2006).
- Modificación del metabolismo energético, que conduce, por un lado, a la desestabilización de la membrana plasmática a nivel del acrosoma, lo que permitirá al espermatozoide responder a inductores específicos para experimentar la RA y por otro, a la hiperactivación del movimiento flagelar, movimiento que es necesario para permitir que los espermatozoides se desplacen por el fluido viscoso del oviducto y penetren en la zona pelúcida (Yanagimachi, 1988), y que se caracteriza por amplios batidos flagelares y una escasa progresividad (Yanagimachi, 1970; Mortimer, 1997).

El estudio de la capacitación espermática puede realizarse, al igual que ya se expuso en la RA, mediante dos enfoques diferentes (Colenbrander *et al.*, 2003); uno de ellos sería el cálculo del porcentaje de células que han sufrido una capacitación prematura, estableciendo con ello la proporción de células no aptas para la fecundación, y el otro emplearía agentes inductores de la capacitación para determinar el porcentaje de espermatozoides que sí pueden sufrir este proceso indispensable para la fecundación.

**Determinación del porcentaje de células capacitadas prematuramente.** Se han intentado encontrar evidencias del fenómeno de la capacitación mediante la utilización de marcadores de membrana (lectinas, anticuerpos, neoglucoconjugados o sondas de merocianina), clorotetraciclinas u otros compuestos.

Los marcadores de membrana más utilizados han sido las lectinas, que permiten localizar cambios en la distribución de los azúcares en la membrana espermática y, a través de ellas, ya en 1979 Schwarz y Koehler pudieron determinar que los lugares de fijación de las mismas se modificaban durante el proceso de capacitación. Por su parte, los neoglucoconjugados, carbohidratos

específicos capaces de reconocer proteínas receptoras en las membranas espermáticas, permiten detectar la evolución que experimentan éstas en la capacitación.

La clortetraciclina (CTC) es un quelato fluorescente de cationes divalentes, por lo que se une al  $\text{Ca}^{2+}$  para posteriormente, unirse a zonas hidrófobas de la membrana provocando un aumento de su fluorescencia (Gillan *et al.*, 2005). Este marcador permite analizar las variaciones del estado de la membrana, y para este fin se utiliza en numerosas especies, incluida la porcina (Mattioli *et al.*, 1996). En función del estado de la célula se definen tres patrones (Saling y Storey, 1979; Ward y Storey, 1984; Colenbrander *et al.*, 2003; Gillan *et al.*, 2005; Silva y Gadella, 2006):

- F: presencia de una fluorescencia uniforme en toda la cabeza; representa a un espermatozoide no capacitado con el acrosoma intacto.
- B: disminución de la intensidad de la fluorescencia en la zona posterior de la cabeza; representa a un espermatozoide capacitado con el acrosoma intacto.
- AR: disminución de la fluorescencia en la zona apical de la cabeza; representa a un espermatozoide que ha sufrido la RA.

La CTC, aunque es sin duda la técnica más empleada en la evaluación del *status* de capacitación, sólo es capaz de detectar los cambios tardíos del proceso (Rodríguez-Martínez, 2003; 2006), por lo que, en los últimos años, ha sido paulatinamente desplazada por otras, como la merocianina 540, que sí detecta los cambios prematuros asociados a este proceso, tanto en la capacitación propiamente dicha como en la criocapitación o capacitación “*like changes*” (Müller *et al.*, 1999; Harrison y Gadella, 2005); este compuesto es un indicador de la fluidez de la membrana (Harrison *et al.*, 1996; Colenbrander *et al.*, 2003) y aumenta su fluorescencia en función del aumento de los desordenes lipídicos de la misma (Gadella y Harrison, 2002).

Se han empleado otros métodos con el fin de identificar a los espermatozoides que sufren este proceso de capacitación, como por ejemplo los sistemas CASA, que permiten determinar los espermatozoides capacitados mediante la utilización de las características cinéticas de los espermatozoides hiperactivados, o la utilización de otras sustancias como el Annexin-V o el Ro-09-0198 como medio de detección de alteraciones de membrana características de este proceso (Rodríguez-Martínez, 2006).

**Determinación de aquellos espermatozoides que tienen la capacidad de sufrir el proceso.** Partiendo del hecho de que para que tenga lugar la RA es necesario que los espermatozoides sufran la capacitación, estudios realizados sobre la reacción acrosómica podrían ser utilizados como técnicas de evaluación de la propia capacitación; así, si consideramos que la capacitación es un proceso necesario para que el espermatozoide reaccione frente a agonistas naturales, como la progesterona o la zona pelúcida, podremos establecer el éxito de la capacitación determinando el número de reacciones acrosómicas verdaderas que se producen en una

determinada población espermática, tras el estímulo de un agonista apropiado.

Es preciso destacar que la utilización de la FIV resulta un inmejorable indicador del proceso de capacitación, puesto que aquellos espermatozoides capaces de penetrar en un ovocito, necesariamente han tenido que experimentar, de forma correcta, la capacitación; en consecuencia, se considerará que aquellas poblaciones espermáticas que presenten unos resultados óptimos en la FIV, han sufrido de forma óptima este proceso.

**Otras técnicas para la valoración de la capacitación espermática.** Matás *et al.* (2006) recogen con detalle otras técnicas de laboratorio que pueden ser utilizadas para evaluar la capacitación espermática en ganado porcino, entre ellas se encuentran:

- Medición del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediante espectrofotometría con el fluorocromo Fura2.
- Medición del incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediante citometría de flujo con los fluorocromos Fura3 e Ioduro de propidio.
- Medición de la modificación de los grupos sulfhidrilo de las proteínas presentes en la membrana plasmática mediante citometría de flujo con los fluorocromos 5-IAF e Ioduro de propidio.
- Medición de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante citometría con el fluorocromo H2DFCDA.

#### 2.2.2.7. Valoración de la función mitocondrial.

Las mitocondrias, que en el espermatozoide están distribuidas helicoidalmente alrededor de la parte principal del flagelo a nivel de la pieza intermedia, se encargan de la producción de ATP mediante fosforilación oxidativa, que resulta de crucial importancia en el desarrollo de la movilidad (Marín *et al.*, 2003). De esta forma, el estudio de la funcionalidad de este orgánulo puede resultar un indicador de la capacidad mótil de los espermatozoides (Colenbrander *et al.*, 2003; Silva y Gadella, 2006).

Para realizar este estudio se han empleado varias técnicas, si bien, la práctica totalidad de ellas se basan en la utilización de fluorocromos; éstos generalmente son sustancias catiónicas y lipofílicas, características que les permiten difundir a través de la membrana plasmática para almacenarse en la matriz mitocondrial que presenta una carga positiva (Pinart *et al.*, 2006).

Algunas de estas sustancias son:

- Rodamina: la rodamina 123 (R123) ha sido empleada como tinción selectiva de la funcionalidad de la mitocondria (Evenson *et al.*, 1982; Graham *et al.*, 1990); esta sustancia sólo



penetra en aquellas mitocondrias que presentan actividad respiratoria, mostrando una fluorescencia verde (Graham, 2001; Gillan *et al.*, 2005), pero no permite establecer la intensidad de la misma.

- JC-1: Thomas *et al.* (1998) resolvieron esta circunstancia empleando el 5,5,6,6'- tetracloro-1,1,3,3' ioduro tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1), consiguiendo así diferenciar a los espermatozoides en función de su baja o su alta funcionalidad mitocondrial. Esta sustancia, en su estado monomérico, es transportada, al igual que la rodamina, al interior de las mitocondrias funcionales donde va a mostrar una fluorescencia verde en aquellos casos en los que el potencial de membrana sea bajo, pero si éste es alto, la concentración de esta sustancia en el interior de la mitocondria se eleva apareciendo una fluorescencia naranja (Garner y Thomas, 1999; Thomas *et al.*, 1998).
- Mitotracker<sup>®</sup>: son una familia de tinciones comerciales específicas para mitocondrias (ver Silva y Gadella, 2006); una de ellas, el Mitotracker<sup>®</sup> Green FM, ha sido empleado en la valoración combinada de la vitalidad, de la integridad acrosómica y de la actividad mitocondrial mediante citometría de flujo en el cerdo (Pinart *et al.*, 2006).

#### 2.2.2.8. Valoración de la integridad del ADN.

La integridad del ADN de la célula espermática es de vital importancia para el completo desarrollo del embrión (Silva y Gadella, 2006). Se ha establecido que el grado del daño está claramente correlacionado con el desarrollo embrionario pudiendo llegar a provocar incluso, si la alteración es muy severa, la infertilidad masculina (Seli *et al.*, 2004).

De todos modos, la presencia de alteraciones en el ADN no interfiere en la capacidad fecundante del espermatozoide, sino que ejerce su efecto sobre el desarrollo embrionario, avocando al embrión formado a un proceso de apoptosis generalmente en el estadio en el que presenta de cuatro a ocho células (Bordignon y Smith, 1999; Graham, 2001; Fatehi *et al.*, 2006), y precisamente por esta independencia con el proceso de fecundación, la evaluación del estado del ADN paterno ha de ser entendida como una valoración complementaria al resto, aunque no deja de ser una herramienta de gran valía en la predicción de la fertilidad de una determinada muestra seminal (Evenson *et al.*, 2002).

El estado del ADN puede ser evaluado a diferentes niveles; en el ADN espermático se suelen utilizar tres tipos de valoraciones, que analizan el estado de su condensación, la presencia de lesiones o rupturas en su estructura y la fragmentación nuclear.

**Estado de la condensación del ADN.** La condensación del ADN sucede en la espermatogénesis, a nivel de la espermátida, donde tiene lugar el proceso de diferenciación celular con el fin de adaptar la estructura celular para las funciones que se le requieren (Senger, 2005). El método de condensación empleado por las células espermáticas de los mamíferos difiere del que utilizan el resto de las células somáticas, presentando una eficacia mucho mayor, como demuestra

la diferencia tan grande que hay entre el tamaño del núcleo espermático y el de cualquier célula somática (Ward y Coffey, 1991). Esta condensación, aparte de facilitar el movimiento espermático, probablemente contribuya a la estabilización del ADN, haciéndolo además menos susceptible a un daño oxidativo (Dadoune, 2003).

El estudio del estado de compactación del ADN espermático se ha realizado por diferentes métodos, como la utilización de microscopios de transmisión de electrones (Dooher y Bennet, 1973 citado por Silva y Gadella, 2006) o de Cromomicina A3 (Bianchi *et al.*, 1993; Sakkas *et al.*, 1995), pero posiblemente el más difundido sea la utilización de un gel simple de electroforesis (COMET-assay), con el que aquellos núcleos con una condensación correcta del ADN presentarán una migración en el gel de agarosa mínima, a diferencia de aquellos deficientemente compactados (Silva y Gadella, 2006).

**Detección de daños y roturas en el ADN.** Para efectuar el estudio del ADN de los espermatozoides maduros, hay que proceder a liberar a la cadena de ADN de su forma compactada, para lo cual se suelen emplear determinadas enzimas, así como tratamientos con calor o ácidos, de forma que, una vez liberada, se pueda evidenciar mediante tinciones la presencia de puntos de ruptura (García *et al.*, 2006).

Para establecer la presencia de lesiones en el ADN se emplean diversas técnicas, como el *nick translation*, el *COMET-assay*, donde la visualización de migraciones en el gel será indicativo de la presencia de lesiones en las cadenas de ADN (Silva y Gadella, 2006; Jiang *et al.*, 2007), el *SCSA* (*Sperm Chromatin Structure Assay*), basado en las propiedades metacromáticas del naranja de Acridina (si este colorante se une a una cadena doble de ADN [íntegro] emitirá una fluorescencia verde, mientras que si la unión se efectúa con cadenas sencillas [dañadas], el color de la fluorescencia emitida resultará naranja [Silva y Gadella, 2006]), o el *TUNEL-assay*, que identifica las zonas dañadas por medio de la unión de nucleótidos marcados a zonas que presenten una cadena sencilla (García *et al.*, 2006; Silva y Gadella, 2006).

Los resultados obtenidos con las dos últimas pruebas (el *SCSA* y el *TUNEL-assay*) han sido correlacionados significativamente con la fertilidad (Ballachey *et al.*, 1988; Evenson *et al.*, 1994; Benchaib *et al.*, 2003).

**Fragmentación del ADN.** Otra opción para detectar la presencia de núcleos con ADN fragmentado, es la denominada *Sperm Chromatin Dispersion* (SCD), que determina, mediante una tinción convencional (Wright) o una fluorescente, la presencia de un halo periférico de dispersión del material genético en aquellos espermatozoides que contengan fragmentado su ADN tras un tratamiento de lisis. Esta técnica fue inicialmente desarrollada para semen humano (Fernández *et al.*, 2003) y ha sido empleada en la evaluación de semen de toro (García-Macías *et al.*, 2007) y de verraco (Enciso *et al.*, 2006). Este método resulta más rápido y sencillo que los anteriores, por lo que resulta adecuado para ser utilizado en los laboratorios convencionales (García *et al.*, 2006).

### 2.2.3. Citometría de flujo.

La citometría de flujo consiste en el análisis rápido de células individualizadas y organelos subcelulares cargados con marcadores fluorescentes sobre los que, suspendidos en un flujo laminar, incide un rayo láser (Peña y Rodríguez, 2006). Se basa fundamentalmente en dos principios, la dispersión de la luz y la fluorescencia (tipo e intensidad) que emiten los diferentes fluorocromos con los que se puede marcar a los espermatozoides.

La dispersión de la luz se basa, a su vez, en un principio físico según el cual cuando un haz de luz choca contra una célula, ésta cambia de dirección pero no de longitud de onda. Las características celulares que contribuyen a esta dispersión son, la forma y el tamaño celular, el material granular intracelular, la membrana y el núcleo de la célula, así como la rugosidad de su superficie (Orfao y González de Buitrago, 1995).

La fluorescencia se caracteriza porque los compuestos fluorescentes absorben energía luminosa a una determinada longitud de onda; esta absorción hace que un electrón suba a un nivel energético superior para, posteriormente, caer a su estado normal emitiendo un fotón y liberando energía. En la citometría de flujo se emplea, como haz de luz incidente, un rayo láser generalmente a una longitud de onda de 488 nm (luz azul) o entre 515 y 535 nm (luz verde); existen varios tipos, diferenciándose entre ellos por el medio que emplean para la amplificación de la luz, que puede ser un gas (Argón, Helio-Neón o Helio-Cadmio), un medio sólido (NdYAG) o un semiconductor (Gillan *et al.*, 2005).

Aunque las ventajas que aporta la utilización de estos sistemas son numerosas, también presenta algunas desventajas importantes, como son el coste del equipo, tanto en la inversión inicial como en el mantenimiento del mismo, o la necesidad de personal especializado en su utilización (Gillan *et al.*, 2005; Peña y Rodríguez, 2006). Algunas de esas ventajas son las siguientes:

- Proporciona información sobre características físicas del espermatozoide como tamaño y/o complejidad interna (Gillan *et al.*, 2005; Peña y Rodríguez, 2006).
- Realiza valoraciones objetivas y repetibles (Graham, 2001; Gillan *et al.*, 2005; Peña y Rodríguez, 2006).
- Precisa de muestras seminales muy pequeñas y permite analizar entre 8000 y 20000 espermatozoides por segundo (Gillan *et al.*, 2005).
- La utilización de fluorocromos conlleva, como ya se ha mencionado, ventajas adicionales sobre las tinciones clásicas, pero además la utilización de la citometría de flujo permite estudiar de una forma sencilla, mediante el uso de varios fluorocromos, diversas estructuras celulares de forma simultánea (Graham, 2001; Peña y Rodríguez, 2006).

Las aplicaciones de la citometría de flujo en el análisis de las células espermáticas son numerosas; así, Gillan *et al.* (2005) recogen una serie de pruebas que se emplean con relativa asiduidad, como la viabilidad espermática, la integridad acrosómica, la integridad o actividad mitocondrial, la fluidez de la membrana plasmática o el *status* de capacitación y el estado del ADN espermático.

No obstante, las posibilidades de este sistema en relación con el análisis de los espermatozoides no terminan aquí, sino que constantemente se están desarrollando análisis, como la monitorización de cambios tempranos en la permeabilidad de la membrana o la detección de la transposición de fosfolípidos, en relación con las modificaciones que sufre la membrana en la capacitación o criocapitación, o la determinación de caspasas activas o especies reactivas de oxígeno (ROS), tan importantes en el deterioro de las células seminales *in vitro* (Peña y Rodríguez, 2006).

El hecho de que un mismo sistema ofrezca la posibilidad de realizar múltiples análisis y que los ejecute de una forma más objetiva y precisa que los métodos que se vienen utilizando habitualmente en laboratorio, así como el desarrollo constante de nuevos fluorocromos o combinaciones de ellos, de anticuerpos o de inhibidores específicos marcados, etc., que amplían el estudio de los espermatozoides, hace suponer que estamos ante un sistema que será de utilización generalizada en los próximos años, ayudando a mejorar de forma significativa el valor predictivo del análisis seminal y permitiendo establecer mejores criterios de selección de los eyaculados en función de su destino final (Peña y Rodríguez, 2006).

## **2.3. Análisis de la movilidad espermática mediante sistemas computarizados.**

### **2.3.1. Introducción.**

A pesar de los grandes avances tecnológicos que ha experimentado la valoración de la calidad seminal en las últimas décadas, los métodos empleados de forma rutinaria en la mayoría de los casos, tanto en los Centros de IA de las diferentes especies de interés zootécnico, como en las clínicas andrológicas humanas, se reducen a simples valoraciones manuales de ciertas características espermáticas, algunas de las cuales presentan una gran subjetividad, como demuestra el hecho de que se produzcan fuertes variaciones en los resultados obtenidos cuando estos análisis son realizados por diferentes técnicos, y también incluso cuando los lleva a cabo el mismo técnico en diversas ocasiones. Debido a esta falta de similitud en las valoraciones de la movilidad efectuadas a una misma muestra, que ha sido puesta de manifiesto en numerosos estudios (Amann, 1989; Dunphy *et al.*, 1989; Neuwinger *et al.*, 1990; Woelders, 1990; Davis y Katz, 1993; Versteegen *et al.*, 2002; Cooper *et al.*, 2002; Soler *et al.*, 2006), no es posible comparar los análisis realizados en diferentes momentos, a distintas muestras o por diversos laboratorios, y en consecuencia, las características de estas valoraciones distan mucho de las propuestas por Rodríguez-Martínez (2003) para el análisis seminal ideal, al no reunir los requisitos de objetividad, repetibilidad y exactitud.

Por otra parte, este tipo de técnicas sólo permite evaluar las características espermáticas estableciendo promedios para el conjunto de la población de espermatozoides de una muestra, obviando la estructura real que presenta el material seminal, en la que las diferentes células espermáticas se encuadran en diferentes subpoblaciones celulares con características diferenciadas entre sí.

Esta situación ha llevado a la comunidad científica a desarrollar nuevos métodos para intentar

SUSTANCIA	CARACTERÍSTICAS	λ DE ABSORCIÓN/ EMISIÓN
Hoechst 33258	Tinción de membrana impermeable, atraviesa el plasmalema cuando éste se encuentra dañado, uniéndose al ADN nuclear. Se puede combinar con aglutininas marcadoras de daño acrosómico.	358/488
Ioduro de propidio	Tinción de membrana impermeable, atraviesa el plasmalema cuando éste se encuentra dañado uniéndose al ADN nuclear. Se puede combinar con aglutininas marcadoras de daño acrosómico, con el diacetato de carboxifluoresceína (y sus derivados) y con el SYBR-14.	488/620
Homodímero de etidio 1	Propiedades similares a las del ioduro de propidio, y con las mismas combinaciones que el citado compuesto.	528/617
Yo-Pro 1	Sonda semipermeable, indicadora de daño temprano en la membrana, se usa combinada con el Homodímero de etidio y con el SNARF-1 para medir el daño progresivo en la membrana.	491/509
Diacetato de fluoresceína y derivados.	Sustancias que atraviesan la membrana citoplasmática, siendo deacetiladas por esterazas intracelulares y se acumulan en el citoplasma. Se pueden usar combinadas con el ioduro de propidio y el homodímero de etidio.	494/518
SYBR-14	Atraviesa la membrana citoplasmática sólo si están activas las bombas de iones, es desacetilado y se une al ADN nuclear. Se combina con el ioduro de propidio y el homodímero de etidio.	488-515
SNARF-1	Es un indicador de pH intracelular, tras ser metabolizado por esterazas se acumula en el citoplasma.	488/575
PSA	Aglutinina originaria del guisante, marcadora de daño acrosómico, se une a residuos de α-manosa y α-galactosa de la matriz mitocondrial. Se puede utilizar en combinación con el ioduro de propidio y el homodímero de etidio.	Conjugada con: FITC: 488/515
ConA	Aglutinina marcadora de daño acrosómico proveniente de la planta <i>Concavalia ensiformis</i> , se une a residuos de D-Manosil y D-Glucosil.	Conjugada con: FITC:488/515
PNA	Aglutinina originaria de la planta del cacahuete, marcadora de daño acrosómico, se une a residuos de β-galactosa, siendo específica de la membrana acrosomal externa. Se puede usar combinada con el ioduro de propidio y el homodímero de etidio.	Depende de la sustancia con que se conjugue: FITC: 488/515 TRITC: 568/590 RPE:488/620

**Tabla 2.2:** Sustancias fluorescentes empleadas en la valoración seminal (Tejerna, 2008).

SUSTANCIA	CARACTERÍSTICAS	λ DE ABSORCIÓN/ EMISIÓN
WGA	Aglutinina marcador de daño acrosómico proveniente de la planta del trigo, se une a residuos de N-acetilglucosaminil y ácido siálico.	Conjugada con: FITC: 488/515
Lisotracker Green TM	Tinción fluorescente comercial específica para orgánulos con contenido ácido, como los lisosomas o el acrosoma.	488/515
Anticuerpo AntiCD46	Anticuerpo desarrollado contra la proteína CD46, situada en la membrana acrosómica interna. Técnica de inmunofluorescencia.	En función de la sustancia con que se conjugue el anticuerpo
Rodamina 123	Sustancia catiónica y lipofílica que se acumula en la matriz mitocondrial al presentar carga negativa.	503/527
JC-1	Compuesto metacromático, atraviesa selectivamente las membranas mitocondriales, si el potencial de membrana es bajo mantiene su forma monomérica y emite fluorescencia verde, si es alto se agrega y emite fluorescencia roja.	514/529 /585-590
Mitotracker Green FM	Se difunde por la membrana plasmática uniéndose específicamente a los lípidos de membrana de las mitocondrias funcionales.	490/516
CTC	Antibiótico fluorescente que es inmovilizado en la membrana cuando la concentración de $Ca^{2+}$ supera un determinado nivel crítico, originando 3 patrones. F: espermatozoide no capacitado, B: espermatozoide capacitado y AR: espermatozoide que ha sufrido la reacción acrosómica.	392/536
Merocianina	Tinción hidrofóbica, encargada de monitorizar el desorden lipídico temprano en la membrana al poderse intercalar entre los fosfolípidos de la misma. Detección de daños anterior a la CTC.	555/578
Annexin-V	Es un indicador temprano de daño en la membrana, poniendo de manifiesto la translocación de la fosfatidilserina. Uso combinado con el yoduro de propidio.	Conjugada con: FITC: 488/515
Ro-09-0198	Al igual que el Annexin-V, es un indicador temprano de daño en la membrana, en este caso pone de manifiesto la translocación de la fosfatidiletanolamina.	Conjugada con: FITC: 488/515
C <sub>11</sub> BODIPY	Marcador de daño por acción de las ROS. Análogo de los ácidos grasos insaturados, cambia sus propiedades fluorescentes cuando sufre la peroxidación lipídica.	581/591
Cromomicina A3	Sustancia fluorescente utilizada como marcador de la compactación del ADN con las protaminas.	345/455
Naranja de Acridina	Sustancia metacromática, se une al ADN y emite fluorescencia verde si éste se encuentra íntegro y naranja si se halla desnaturalizado.	488/525 -630

Tabla 2.3: Sustancias fluorescentes empleadas en la valoración seminal (Continuación).

minimizar la subjetividad de las valoraciones seminales y a estandarizar la medida de la movilidad espermática (Davis y Katz, 1993; Ombelet *et al.*, 1995; Cooper *et al.*, 1999; 2002; Verstegen *et al.*, 2002).

### **2.3.2. Desarrollo, evolución y comercialización de los sistemas CASA.**

#### **2.3.2.1. Introducción.**

Ya en el siglo pasado, en la década de los 40, un grupo de científicos de Universidades norteamericanas reconocieron la necesidad de recoger datos objetivos, tanto del porcentaje de espermatozoides móviles como de su velocidad, y a partir de entonces, dedicaron su esfuerzo a establecer estándares que fuesen de interés no sólo a nivel científico, ampliando así el estudio de la funcionalidad espermática, sino también a nivel comercial, ya que se creía que una valoración más precisa del porcentaje de espermatozoides móviles iba a permitir, tanto la predicción de la capacidad fecundante de un determinado macho, como el establecimiento del mejor protocolo de preparación de dosis seminales, venciendo de esta forma la subjetividad de la valoración visual, que poco había evolucionado desde la primera observación realizada por von Leeuwenhoek en 1678 (Amann y Katz, 2004). Así se asentó la base teórica sobre la que tendría lugar el nacimiento, en la década de los 80, de los sistemas de análisis computarizado de semen o sistemas CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*).

#### **2.3.2.2. Influencia de la electrónica en el desarrollo de los sistemas CASA.**

En los años 50, VanDemark *et al.* (citado por Amann y Katz, 2004) establecieron que la electrónica podía ser utilizada para el desarrollo de técnicas de valoración de la movilidad espermática, quedando desde entonces ligada permanentemente a la estimación de la movilidad seminal por medio de diferentes propuestas, bien de valoración indirecta (turbidometría, velocimetría Láser-Doppler) o de valoración directa (fotomicrografía de tiempo-exposición, fotomicrografía de exposición múltiple, microcinematografía, videocinematografía):

- **Turbidometría:** Este procedimiento consiste en medir el ratio de migración de los espermatozoides diluidos en un medio artificial, mediante la estimación de los cambios de densidad óptica producidos por el desplazamiento de los espermatozoides en el interior del recipiente que los contiene [Van Duijin y Rikmenspoel, 1960 (citado por Amann y Katz, 2004); Sokoloski *et al.*, 1977; Levin *et al.*, 1980].

Atherton *et al.* (1979) determinaron que la estimación de la movilidad por medio de este sistema está correlacionada significativamente con el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva. A partir de este método se desarrolló el Sperm Quality Analyser<sup>®</sup> (Unitec Medical Systems Inc, CA, EEUU).

- **Velocimetría Láser-Doppler:** Este método se basa en la determinación de las frecuencias generadas, de acuerdo con el efecto Doppler, en una dispersión espermática sobre la que

se ha hecho incidir un haz láser monocromático; el espectro de frecuencias originadas va a depender de las características cinéticas de los espermatozoides de la muestra (Jouannet *et al.*, 1977).

Los parámetros determinados por esta técnica son, además del número y porcentaje de espermatozoides móviles, la distribución y determinación de las características tridimensionales de la velocidad (Dubois *et al.*, 1974).

- **Fotomicrografía de tiempo-exposición:** Esta técnica fue introducida por Lord Rothschild y Swam en 1949 (citado por Amann y Katz, 2004), siendo la primera que permitió reconstruir la trayectoria espermática de forma individual. Su ejecución consiste en la realización de una sola fotografía, con un tiempo de exposición prolongado (generalmente 1 segundo), en un microscopio de campo oscuro. De esta forma, el recorrido trazado por cada espermatozoide queda reflejado en blanco sobre el fondo oscuro del negativo.

Este procedimiento ha sido empleado tanto en el análisis seminal de semen humano (Janick y McLeod, 1970; Overstreet *et al.*, 1979) como en el de toro (Eliott *et al.*, 1973), y ha sido la base sobre la que se desarrollaron numerosas e interesantes evoluciones hasta que, en los años 80, se vio desplazado por la aparición de los sistemas CASA (Mortimer, 1997).

- **Fotomicrografía de exposición múltiple:** Este método consiste en realizar, en un microscopio con luz estroboscópica, seis microfotografías durante un segundo, determinando con ello la posición de los espermatozoides en seis puntos de su recorrido, a partir de los cuales se reconstruye la trayectoria trazada por cada célula, ya sea mediante técnicas manuales o semiautomáticas (Makler *et al.*, 1980, 1984).

La mayor desventaja que presenta esta técnica radica en el escaso número de imágenes capturadas, no permitiendo con ello calcular determinados parámetros, como la velocidad curvilínea, la amplitud lateral de la cabeza o la frecuencia de batido.

- **Microcinematografía:** Método similar al anterior, pero que se efectúa mediante la grabación del movimiento de los espermatozoides en una película cinematográfica, de forma que a partir de la posición que ocupa cada célula en los fotogramas de dicha película se reconstruyen sus trayectorias (Mortimer, 1997). El desarrollo de esta técnica permitió el estudio en profundidad del movimiento espermático, estableciendo con ello los parámetros que actualmente calculan los sistemas computarizados (David *et al.*, 1981; Serres *et al.*, 1984; Freund y Oliveira, 1987).

El número de imágenes capturadas por segundo oscila entre un valor inferior a veinte y varios cientos, con lo que permite estudiar con detalle las características del movimiento tanto de la cabeza como de la cola del espermatozoide, pudiendo determinar todos los parámetros cinéticos derivados de ellos.

- **Videocinematografía:** Como la técnica anterior presentaba importantes carencias, como el alto coste y el elevado tiempo en el procesado de las imágenes, se recurrió a este método, que realizaba la grabación de las mismas en cinta de video. La reducción del coste y, sobre



todo, del tiempo de procesado de las imágenes tras su captura determinó, a partir de este método, el desarrollo de los sistemas semiautomáticos de análisis de la movilidad (Mortimer, 1997). No obstante, esta técnica presenta una clara desventaja respecto a la anterior, ya que al ser la frecuencia de captura de las imágenes bastante inferior, no permite obtener una imagen clara del flagelo y, por lo tanto, realizar un análisis preciso de las características de movimiento de esta estructura.

### 2.3.2.3. Evolución y comercialización de los sistemas CASA.

En 1973 Jecht y Russo (citados por Amann y Katz, 2004) emplearon en semen humano un sistema desarrollado por la NASA (*National Aeronautics and Space Administration*) para realizar el seguimiento y mostrar los parámetros cinéticos de los cohetes tras su lanzamiento. Este experimento fue llevado a cabo en el JPL (*Jet Propulsion Laboratory*), calculando los parámetros diseñados para el seguimiento de los cohetes y, aunque no se le dio ningún uso práctico, en la correspondiente publicación ya se hacía referencia a conceptos que se siguen empleando hoy en día, como la determinación de los centroides de los espermatozoides y la de la velocidad y del desplazamiento lineales y angulares.

En esta misma época, los investigadores Amann y Hammerstedt, ante la necesidad de realizar una medición cuantitativa y automatizada del porcentaje total de espermatozoides móviles, iniciaron, con la colaboración de Centros de IA de ganado vacuno del Estado de Pennsylvania, que buscaban el establecimiento de un protocolo estándar para el análisis seminal, una serie de trabajos, que concluyeron en 1978 con el desarrollo del primer equipo que permitía identificar las trayectorias individuales, así como realizar el cálculo del porcentaje de espermatozoides móviles y de su velocidad. Este trabajo resultó, a la postre, la primera aplicación de este tipo de sistemas en la andrología veterinaria (Amann y Katz, 2004).

Sin embargo, el primer sistema con arquitectura similar a la de los equipos actuales no se desarrolló hasta 1985, cuando Katz *et al.* presentan, gracias al desarrollo de los microprocesadores y de las tarjetas digitalizadoras, el Expert Vision<sup>®</sup> (comercializado por Motion Analyzers Corporation), que resultó ser el origen de la familia de modelos conocidos como CellTrack<sup>®</sup>. Estos equipos, a pesar de presentar una cierta superioridad tecnológica con respecto a sus competidores, no tuvieron una gran difusión.

El siguiente sistema comercializado en 1985, el CellSoft<sup>®</sup> (CRYO Resources Ltd.), fue el primer equipo desarrollado específicamente para el análisis de la movilidad de las células espermáticas, y se empleó de forma generalizada en semen humano, bovino y de animales de laboratorio, como ratas y ratones (Working y Hurtt, 1987; Mack *et al.*, 1988). A partir de su utilización se empezó a reconocer el potencial que presentaban este tipo de sistemas para la detección de cambios ambientales y la determinación de riesgos laborales sobre la función espermática.

El segundo sistema diseñado en exclusiva para el análisis de la movilidad espermática, y sin duda el más conocido a nivel mundial, fue el HTM-2000<sup>®</sup> de Hamilton-Thorne Research; éste apareció un año más tarde que los dos anteriores (1986) y, a diferencia de sus derivados modernos, que utilizan luz visible y contraste de fases, empleaba una iluminación próxima al infrarrojo y una óptica de campo oscuro (Amann y Katz, 2004). Fue el primer equipo comercializado bajo la denominación que luego englobaría a todos los sistemas computarizados de análisis seminal: CASA.

A partir de los años 90 y hasta nuestros días, se ha incrementado la frecuencia de aparición de nuevos equipos en el mercado, destacando entre ellos al SM-CMA (Stroemberg-Mika Cell Motion Analysis<sup>®</sup>), que apareció a principios de los 90, y que, a día de hoy sigue siendo el único sistema conocido que emplea al tracto intermedio de la cola como factor secundario a la hora de discernir si los elementos detectados por el software son partículas o espermatozoides inmóviles. Otros equipos son el Hobson Sperm Tracker<sup>®</sup> (Hobson Tracking Systems), el Integrated Semen Analysis System<sup>®</sup> (PROISER R+D), el Qualisperm<sup>®</sup> (Biophos GmbH), el SpermVision<sup>®</sup> (Minitüb GmbH), el CEROS<sup>®</sup> de Hamilton-Thorne y los derivados del sistema IVOS<sup>®</sup> de este mismo fabricante, diseñados específicamente para el análisis de semen de caballo, de verraco y para el análisis toxicológico.

### 2.3.3. El sistema CASA.

#### 2.3.3.1. Componentes y funcionamiento.

Los sistemas CASA generalmente están formados por dos mecanismos principales, uno de captura de imágenes, que corresponde a la cámara de video, y otro de procesamiento de las mismas, para el que se dispone de una computadora con un software apropiado. Hay un tercer elemento que resulta imprescindible en aquellos casos en los que la cámara utilizada no es digital, que es la tarjeta digitalizadora (*video frame grabber card*), que se encarga de convertir las imágenes a un formato digital para que puedan ser analizadas por el citado software.

Estos elementos han de trabajar estrechamente con otros que de forma habitual se utilizan para la valoración convencional de la motilidad, como son un microscopio equipado con un sistema de contraste de fases y una pletina calefactada, que permite la obtención del movimiento natural de las células espermáticas.

Una de las particularidades del análisis de la movilidad, que además lo diferencia de otros tipos de análisis computarizado de imágenes celulares, es la complejidad del seguimiento de la trayectoria de cada uno de los espermatozoides que son recogidos por la cámara de video, para lo cual ésta ha de capturar una serie de imágenes consecutivas o *frames* para, posteriormente, y una vez digitalizada la información, proceder por medio del software a la identificación de las células, a realizar su seguimiento y a efectuar todos los cálculos necesarios para presentar los datos relativos al movimiento de las mismas.

**Cámara de vídeo.** Las cámaras de vídeo utilizadas pueden clasificarse en función de varios criterios; así, según el sistema de captura de imágenes, nos encontramos con cámaras de captura discontinua o de captura continua y, según la naturaleza de la señal de salida, con cámaras digitales o analógicas.

Las cámaras de captura discontinua son las que se han empleado tradicionalmente con esta finalidad y se caracterizan por realizar, en el mismo instante, una captura parcial de cada imagen o *frame*, efectuando por separado la grabación de las líneas identificadas con números pares e impares, para a continuación combinarlas obteniendo el *frame*. Los fabricantes de este tipo de cámaras optaban entre dos estándares, en función del país de que se tratase, el PAL (*Phase Alternating Line*) que empleaba una frecuencia de captura de 25 ó 50 *frames*/segundo, o el NTSC (*National Television Standards Comitee*) que proporcionaba una frecuencia de 30 ó 60 *frames*/segundo (Mortimer, 2000).

En la actualidad, el desarrollo experimentado por este sector ha posibilitado la aparición de numerosas mejoras con respecto a aquel método de captura de imágenes, permitiéndonos grabar la totalidad de cada *frame* en un mismo instante por medio de las cámaras de captura continua; además, la frecuencia de captura ya no sólo depende del estándar utilizado en un determinado país, sino que en algunos equipos es posible seleccionarla entre un rango determinado, para trabajar así con la frecuencia requerida, dada la gran variación que produce la utilización de diferentes frecuencias sobre los valores cinemáticos (Mortimer, 2000).

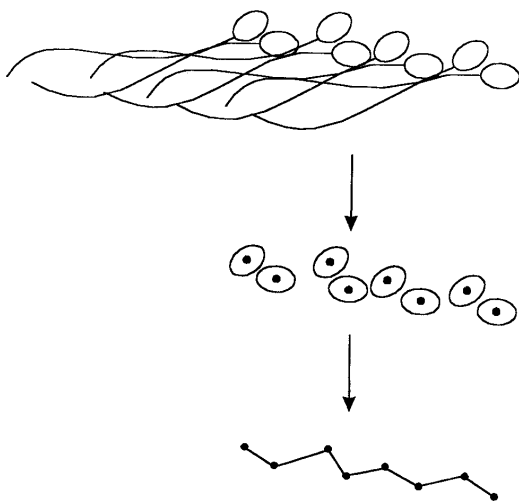
Las cámaras digitales proporcionan una señal de salida digital y, por tanto, nos permiten trabajar con la imagen digital directamente en el ordenador, sólo mediante la conexión de la cámara por medio del USB (*Universal Serial Bus*) o del *Firewire*. Por su parte, las cámaras analógicas proporcionan una señal analógica que precisa de su digitalización, por medio de la tarjeta digitalizadora para convertirla en una matriz numérica (imagen digital) sobre la que se aplican diferentes operaciones que determinan el procesamiento digital de la imagen.

Las cámaras para realizar la captura poseen una matriz de elementos semiconductores sensibles a la luz o CCD (*Charge Coupled Device*) que determina su resolución, ya que crea una imagen con tantos píxeles como elementos fotosensibles tenga la matriz; cuando la luz incide sobre éstos, se genera una señal eléctrica proporcional a la cantidad de luz que ha incidido, que posteriormente se cuantifica en un valor comprendido entre 0 y 255, correspondiendo, el 0 al negro y el 255 al blanco, para las imágenes en escala de grises; en el caso de que la imagen requerida sea en color real, este proceso se realizará para los tres colores básicos (rojo, verde y azul).

Una vez obtenida la imagen digital, nos encontramos con un mosaico de valores sobre el cual se pueden aplicar operaciones que permiten mejorar la imagen, preprocesarla y a continuación realizar una segmentación, que determinará, en función de los diferentes valores de los píxeles, la identificación de las células espermáticas.

**Software.** El software, en primer lugar, ha de establecer, del total de píxeles de la imagen, cuáles corresponden a espermatozoides, tomando generalmente la cabeza como referencia; para ello, el programa ha de trabajar con un rango de píxeles que se considera apropiado para la cabeza espermática y, dada la variación de tamaño de ésta según la especie, es el técnico el que tiene que introducir un mínimo y un máximo, de forma que el programa reconocerá a todos los objetos que estén dentro de este rango como espermatozoides, cuando esto no siempre es así. Para solventar este inconveniente, el sistema SM-CMA<sup>®</sup> requería la presencia de una porción de la cola para identificar como espermatozoides a aquellos objetos con unas proporciones determinadas (Neuwinger *et al.*, 1990) y posteriormente, Hamilton-Thorne ideó el sistema IDENT<sup>®</sup>, que empleaba la tinción fluorescente Hoechst, por medio de su unión al ADN celular, para identificar a las células espermáticas (Zinaman *et al.*, 1996).

Una vez determinados los espermatozoides, con la mayor fiabilidad posible, se procede a reducirlos a un solo punto, denominado centroide, que normalmente resulta ser el centro del grupo de píxeles que definen la cabeza de un espermatozoide, método empleado por equipos como el CellTrack<sup>®</sup> o el CellSoft<sup>®</sup>, o bien el punto más brillante de la cabeza espermática, como en el sistema IVOS<sup>®</sup> (figura 2.9).



**Figura 2.9:** Reconstrucción de una trayectoria a partir de la posición de la cabeza espermática en la secuencia de imágenes. El centro de la cabeza del espermatozoide se toma como punto de referencia (centroide) y es seguido a través de la secuencia de imágenes uniéndose los distintos puntos para crear la trayectoria recorrida (Mortimer, 2000).

A partir de este momento el programa identificará a cada centroide y establecerá su posición en los sucesivos *frames* reconstruyendo así la trayectoria de cada espermatozoide, para lo cual se establece una zona de probabilidad en forma de circunferencia alrededor de éste, utilizando como radio la distancia máxima que se puede esperar que recorra un espermatozoide en el intervalo de tiempo transcurrido entre dos imágenes capturadas, distancia que ha de ser incorporada en los parámetros de configuración del programa, pues varía tanto en función de la especie a analizar como del medio empleado; el círculo resultante va a constituir

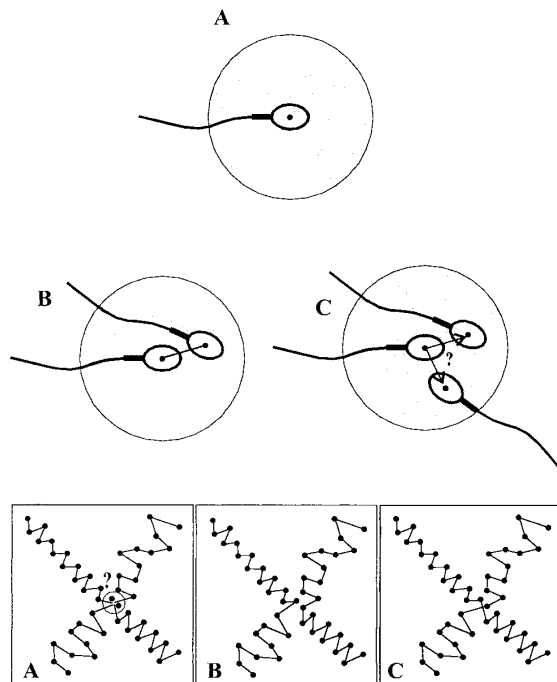
el área donde es más probable que se encuentre el espermatozoide en la siguiente imagen.

Este procedimiento puede dar lugar a errores de cálculo como consecuencia de la presencia, en el siguiente *frame*, de dos centroides en una misma zona de probabilidad; el software puede confundirlos y realizar una reconstrucción incorrecta de las trayectorias de ambos (figura 2.10). Para minimizar este efecto se recomienda emplear muestras con concentraciones no muy elevadas, para así reducir el número de cruces entre espermatozoides (Mortimer *et al.*, 1995; ESHRE, 1998).

### 2.3.3.2. Cuantificación del movimiento espermático.

Los parámetros cinéticos han sido definidos como aspectos geométricos de la movilidad, dependientes del tiempo, que se diferencian mediante cálculos de masa y fuerza (Drobnis *et al.*, 1988).

Se han desarrollado métodos para cuantificar tanto el movimiento de la cabeza como el del flagelo de los espermatozoides; aunque al primero se le ha prestado, por motivos técnicos, más atención, por lo que su desarrollo ha sido mayor, no hay que olvidar que el movimiento flagelar es el que define el desplazamiento de la célula, y por lo tanto se ha de tener muy en cuenta en el análisis cinemático (Mortimer, 1997).



**Figura 2.10:** Imagen superior: Representación de la célula y su radio de búsqueda (A), y el trazado de su trayectoria en la siguiente imagen (B); la posible confusión sucede cuando un segundo espermatozoide irrumpe en la zona de probabilidad del primero (C). Imagen inferior: reconstrucción de las trayectorias cuando dos espermatozoides comparten la misma zona de probabilidad (A), pudiendo originar un trazado erróneo (B) o correcto (C) de las mismas (Imágenes extraídas de Mortimer, 2000).

**Análisis del movimiento flagelar.** Las trayectorias de los espermatozoides que se mueven libremente están dictaminadas por las características del batido flagelar, de forma que diferentes patrones de movimiento del flagelo van a determinar diferentes trayectorias de los espermatozoides (Suárez *et al.*, 1983).

El análisis del movimiento flagelar se inició en la década de los años 50, cuando mediante principios dinámicos se pretendía estudiar el movimiento de varios puntos establecidos a lo largo del eje longitudinal del flagelo, determinando así una serie de índices:

- Longitud de la onda de batido flagelar: la distancia entre dos picos consecutivos a lo largo

del flagelo (Katz *et al.*, 1978; Ishijima *et al.*, 1986); se suele calcular como el doble de la mitad de la longitud de la onda, que es la distancia existente entre el pico y la inflexión de la misma (figura 2.11).

- Velocidad de propagación de la onda flagelar: el pico de onda es calculado mediante el método del *midpoint* (figura 2.11) y la distancia recorrida por este pico a lo largo del flagelo se determina mediante la medición del incremento de la distancia entre el cuello y el punto medio en imágenes sucesivas (Gibbons y Gibbons, 1980b; Serres *et al.*, 1984).
- Frecuencia de batido flagelar: es el número de batidos del flagelo por segundo.
- Amplitud del batido flagelar: se considera, bien como la anchura máxima del batido flagelar (Burkman, 1984), o bien como el desplazamiento máximo del flagelo con respecto a una línea imaginaria central (Overstreet *et al.*, 1979).
- Radio de curvatura flagelar (FCR): Suárez *et al.* (1983) definieron este parámetro para aquellas ocasiones en las que no es posible determinar la longitud completa del flagelo, lo que ocasiona problemas en el cálculo del parámetro anterior; resulta de dividir la distancia en línea recta desde el cuello del espermatozoide al primer punto de inflexión de la cola entre la distancia curvilínea del flagelo entre esos dos mismos puntos (figura 2.11).
- Radio de curvatura: es una cuantificación de la curvatura flagelar (figura 2.11); se calcula ajustando circunferencias de radio conocido a las inflexiones originadas por el flagelo (Drobnis *et al.*, 1988).
- Ángulo de inflexión flagelar: este valor es el ángulo suplementario que se forma en la intersección de dos tangentes trazadas en la onda flagelar (figura 2.11).
- Otros: eficiencia de batido, eficacia cinética, velocidad angular de la onda flagelar, ... (Mortimer, 1997).

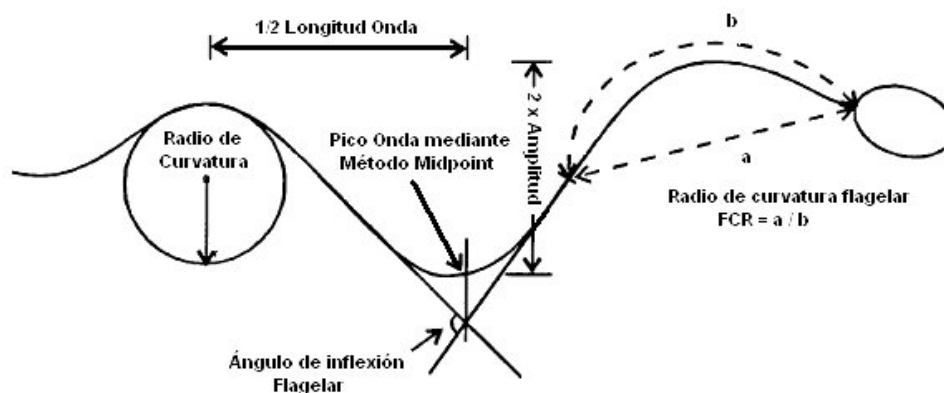


Figura 2.11: Métodos comunes de análisis del movimiento flagelar (Mortimer, 1997).

No obstante, este tipo de parámetros, aun teniendo una gran importancia en el estudio del movimiento espermático, se establecieron mediante técnicas de cartografía manual y su adaptación a los sistemas computarizados no resulta sencillo, debido a que la alta frecuencia de batido flagelar de los espermatozoides (unos 80 batidos por segundo para las células humanas) no se recoge de forma eficiente por los equipos actuales, que presentan frecuencias de captura de en torno a 25-50 *frames*/segundo, cuando Mortimer *et al.* (1997) determinaron que para poder realizar un correcto seguimiento del movimiento del flagelo sería necesario capturar al menos 200 imágenes por segundo. Mientras tanto, y debido a la relación existente entre el patrón de movimiento de la cabeza y el de la cola del espermatozoide (este último dirige al primero), se realizan estimaciones indirectas utilizando la cabeza espermática como referencia para los sistemas computarizados.

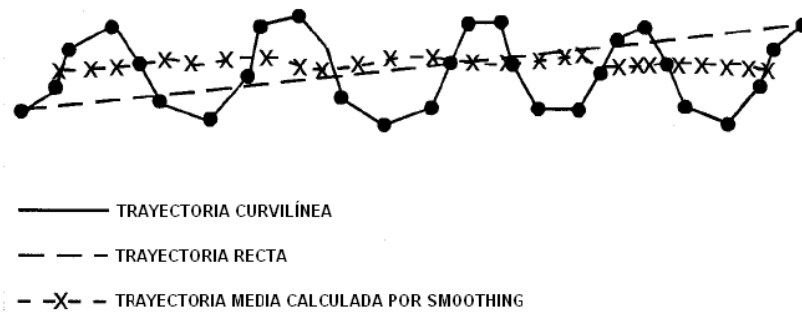
**Análisis del movimiento del centroide.** Antes de 1988, los estudios realizados por los diferentes investigadores ya se referían a índices cinemáticos calculados a partir de las trayectorias descritas por los centroides, si bien los términos empleados variaban notablemente entre ellos. A partir de este año, y tras dos congresos realizados con el fin de consensuar la terminología a emplear, quedaron concretados una serie de parámetros cinéticos básicos que definen el movimiento espermático y cuyo cálculo ha sido incorporado por todos los sistemas computarizados utilizados en la actualidad.

Estos parámetros se podrían agrupar en los siguientes apartados:

### 1. **Velocidad.**

Para describir los diferentes aspectos de la progresión de los espermatozoides se recurre a tres parámetros, que son la velocidad curvilínea (VCL), la velocidad rectilínea (VSL) y la velocidad media (VAP). Todas ellas se miden en  $\mu\text{m/s}$  (Mortimer y Mortimer, 1990).

- Velocidad Curvilínea (VCL): hace referencia a la distancia total que recorre la cabeza del espermatozoide en el tiempo de captura; la distancia recorrida se refiere a la proyección bidimensional de la trayectoria tridimensional real que describe (Mortimer, 1997); el resultado es siempre mayor o igual que las otras dos velocidades (figura 2.12).
- Velocidad Rectilínea (VSL): indica la ganancia neta de espacio por parte del espermatozoide, determinada por la línea recta que une el primer punto y el último de la trayectoria (Mortimer, 1997).
- Velocidad Media (VAP): velocidad del espermatozoide en su trayectoria media durante el periodo de observación, siendo esta trayectoria un indicativo de la dirección media de la célula espermática analizada (Mortimer, 1997); su determinación se puede realizar bien de forma manual, mediante interpolación visual o efectuando un cálculo geométrico, o bien de forma matemática, por medio de diferentes métodos algebraicos recogidos bajo el nombre genérico de *smoothing* (figura 2.13).



**Figura 2.12:** Distancias utilizadas para el cálculo de los diferentes parámetros de velocidad analizados (Mortimer, 1997).

La interpolación visual realiza el cálculo de esta trayectoria media dibujando una línea a lo largo de la trayectoria real del espermatozoide en cuestión, mientras que el cálculo geométrico traza una serie de líneas primarias que van desde la parte más alejada de uno de los picos de la trayectoria a la más alejada del pico consecutivo; el punto medio de cada una de estas líneas determinará el lugar por donde se ha de trazar la trayectoria media.

Por su parte, los sistemas CASA han incorporado la vía matemática, estableciendo la trayectoria media a partir del valor promedio de las coordenadas de los puntos de la trayectoria circular adyacente (*smoothing*). Este método de cálculo presenta el problema de que los puntos iniciales y finales no pueden ser incluidos en los cálculos matemáticos, por lo que algunos investigadores establecieron dos modificaciones en el método, denominadas “Reflexión” (Katz y Davis, 1987) y “*Window smoothing*” (Mortimer y Swan, 1995), con el fin de establecer de una forma más correcta los puntos de trazada de la trayectoria media.

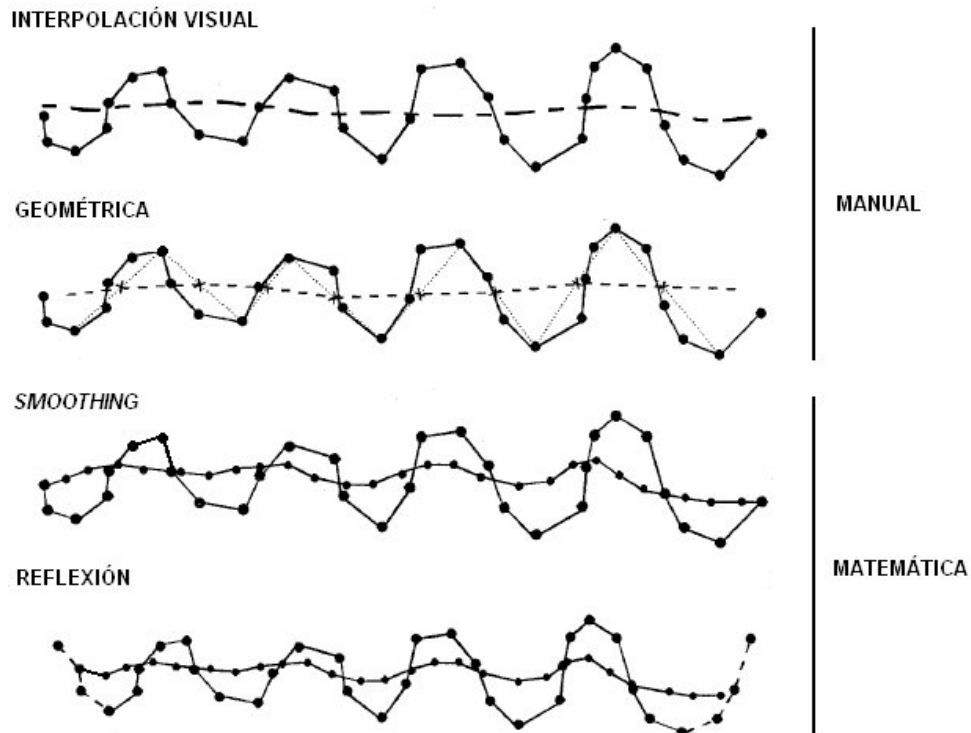
## 2. Ratios de velocidad.

Para definir de una forma más completa la trayectoria descrita por un espermatozoide, se han desarrollado tres índices que establecen la relación entre las tres velocidades analizadas: el índice de linealidad (LIN), el índice de rectitud (STR) y el índice de oscilación (WOB).

- **Índice de Linealidad (LIN):** es la relación porcentual entre la VSL y la VCL; indica lo próxima que es la trayectoria circular del espermatozoide a una línea recta. Aquellas trayectorias que presenten recorridos circulares presentarán un bajo LIN, como consecuencia de que el espacio neto ganado será mucho menor que la distancia total recorrida por el espermatozoide; en el caso contrario, un espermatozoide que describa una trayectoria curvilínea con una baja amplitud de desplazamiento lateral presentará un alto LIN, ya que la distancia neta ganada estará próxima a la real recorrida por el espermatozoide (Mortimer, 1997).

$$LIN(\%) = \frac{VSL}{VCL} \times 100$$





**Figura 2.13:** Métodos utilizados en la derivación de la trayectoria media para el cálculo de la VAP. Los dos primeros métodos se emplean comúnmente en el análisis manual o semi-automatizado de la trayectoria, mientras que los otros dos, que utilizan el denominado "smoothing", son los que suelen emplearse en los sistemas CASA (Mortimer, 1997).

- Índice de Rectitud (STR): establece la relación porcentual entre la VSL y la VAP, indicándonos lo próxima que es la trayectoria media a una recta. Aquellas trayectorias curvilíneas alejadas de una línea recta presentarán, del mismo modo que en el LIN, unos valores bajos, mientras que trayectorias sin grandes oscilaciones laterales y con una gran distancia entre los puntos de trazada mostrarán índices de rectitud altos (Mortimer, 1997).

$$STR(\%) = \frac{VSL}{VAP} \times 100$$

- Índice de Oscilación (WOB): indica el grado de oscilación de la trayectoria real de la cabeza del espermatozoide con respecto a la trayectoria media (Blanco-Palau, 1998), por medio de la relación porcentual existente entre la VAP y la VCL. Sus valores serán bajos en aquellos casos en los que la trayectoria descrita presente valores de la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza elevados y altos en el caso de que ésta sea circular, estando en este caso la VCL próxima a la VAP.

$$WOB(\%) = \frac{VAP}{VCL} \times 100$$

### 3. Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza espermática (ALH).

Aun no pudiéndose considerar, en sentido estricto, una amplitud, puesto que no se mide entre el pico de onda y el punto de inflexión de la curva (Mortimer, 2000), este parámetro se encarga de determinar, en  $\mu m$ , el desplazamiento efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de uno a otro lado de la trayectoria media (Quintero-Moreno, 2003). Su cálculo resulta de gran interés, ya que se emplea como una aproximación para describir el batido flagelar; para realizarlo es necesario efectuar el trazado de la trayectoria media para, a continuación, establecer la distancia entre ésta y cada uno de los puntos de la trayectoria real, distancia a la que se denomina “*riser*” (Boyers *et al.*, 1989), y se considera a la ALH en cada punto como el doble de la misma. Existen dos vías para el cálculo de la ALH, la ALH máxima y la ALH media; la primera corresponde al valor máximo que adquiere la ALH en el transcurso de la trayectoria analizada, mientras que la segunda es el promedio establecido de todos los valores calculados a lo largo de la trayectoria. La utilización de una u otra depende del equipo en cuestión, por lo que resulta de gran interés conocer cuál estamos empleando en las valoraciones que realizamos. En una trayectoria regular, el *riser* es perpendicular a cada punto de la trayectoria media, si bien esta afirmación no se confirma si el recorrido espermático resulta muy irregular, originando una disminución en la exactitud de los resultados obtenidos tras los cálculos matemáticos (Mortimer, 1997).

#### 4. Frecuencia de batido (BCF).

Se desarrolló como indicador de la frecuencia de batido flagelar y equivale al número de veces, expresado en Hz, que la cabeza del espermatozoide cruza la dirección del movimiento (trayectoria media). Su cálculo resulta muy útil en la valoración de fuertes cambios en los patrones del movimiento del flagelo (Mortimer, 1997), si bien su aplicación para el análisis de trayectorias muy irregulares puede originar errores en los cálculos matemáticos, del mismo modo que sucedía en la ALH (Mortimer, 1997).

Existen otros parámetros derivados de estos descritos que también se emplean en la descripción del movimiento de las células espermáticas (recogidos en la tabla 2.4), aunque no todos los equipos están programados para determinarlos y su utilización es poco frecuente.

Por otra parte, a finales del siglo pasado surgieron un nuevo tipo de parámetros cinéticos para el análisis de espermatozoides humanos capacitados (Mortimer *et al.*, 1996; Mortimer y Swam, 1999b), con el fin de facilitar la comparación de los análisis realizados, mediante equipos que utilizan diferentes algoritmos o bien distintas frecuencias de captura, así como de reducir los inconvenientes en la valoración de los espermatozoides hiperactivados, si bien su utilización no está extendida.

Con independencia de los métodos empleados, la utilización de sistemas CASA determina los patrones cinemáticos de cada espermatozoide y su combinación puede ser empleada para clasificar su patrón de movimiento (Mortimer, 2000).

PARÁMETRO	Unidad	DEFINICIÓN
Velocidad curvilínea (VSL)	$\mu m/s$	Velocidad media de la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria real.
Velocidad rectilínea (VCL)	$\mu m/s$	Velocidad media de la cabeza espermática a lo largo de una línea recta que une la primera y última posición de la trayectoria curvilínea.
Velocidad media (VAP)	$\mu m/s$	Promedio de velocidad de la cabeza del espermatozoide en su trayectoria media.
Índice de linealidad (LIN)	%	Linealidad de la trayectoria curvilínea. $LIN(\%) = \frac{VSL}{VCL} \times 100$
Índice de rectitud (STR)	%	Rectitud de la trayectoria media. $STR(\%) = \frac{VSL}{VAP} \times 100$
Índice de oscilación (WOB)	%	Grado de oscilación de la trayectoria real de la cabeza espermática respecto a la trayectoria media. $WOB(\%) = \frac{VAP}{VCL} \times 100$
Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALHmean)	$\mu m$	Desplazamiento medio efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media.
Amplitud máxima del desplazamiento lateral de la cabeza (ALHmáx)	$\mu m$	Máximo desplazamiento efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media.
Dance (DNC)	$\mu m$	( $VCL \times ALH$ )
Índice de hiperactividad o Dance medio (DNMf)	$\mu m$	ALHmed/LIN
Índice de angularidad (AV)	%	Valor porcentual de los ángulos menores formados por los segmentos que definen la trayectoria curvilínea.
Velocidad angular media (AV)	$\mu m/s$	$(VCL \times AI) \times 100$
Desplazamiento angular medio absoluto (MADAbs)	o	Ángulo que toma la dirección de un segmento de la trayectoria y el siguiente en valor absoluto.
Desplazamiento angular medio algebraico (MADAlg)	o	Ángulo que toma la dirección de un segmento de la trayectoria y el siguiente, teniendo en cuenta su signo, siendo positivo al sentido contrario de las agujas del reloj.
Frecuencia de batido (BCF)	Hz	Frecuencia con la que la trayectoria real se cruza con la trayectoria media.
Menor oscilación armónica de la cabeza del espermatozoide (HLO)	$\mu m$	Menor valor de la amplitud de la trayectoria curvilínea respecto a la trayectoria media.
Mayor oscilación armónica de la cabeza del espermatozoide (HHI)	$\mu m$	Mayor valor de la amplitud de la trayectoria curvilínea respecto a la trayectoria media.
Oscilación media de la cabeza del espermatozoide (HME)	$\mu m$	Valor medio de la amplitud de la trayectoria curvilínea respecto a la trayectoria media.
Máxima amplitud de la oscilación de la cabeza espermática (HMX)	Hz	Frecuencia máxima entre dos cruces sucesivos con la trayectoria media.
Armónico básico de la oscilación de la cabeza espermática (HBS)	Hz	Frecuencia media entre dos cruces sucesivos con la trayectoria media.
Amplitud del armónico (H_Y)	Hz	Frecuencia mínima entre dos cruces sucesivos con la trayectoria media.

Tabla 2.4: Parámetros cinéticos medidos por los sistemas CASA.

#### 2.3.4. Fuentes de variación de los resultados en los sistemas CASA.

La incorporación de los sistemas computarizados al análisis de la movilidad espermática no estuvo exenta de problemas. Las expectativas creadas en torno a la utilización de estos equipos, que pronosticaban la obtención de resultados objetivos sin variaciones e incluso excelentes correlaciones con la fertilidad, pronto se vinieron abajo al comprobar que los resultados obtenidos no proporcionaban una mejora sustancial en la eficacia de predicción de la capacidad fecundante de una determinada muestra seminal, aparte del inconveniente, desde un punto de vista económico, que suponía la adquisición de uno de estos sistemas, así como la necesidad de incorporar personal capacitado para operar con estos equipos, hechos que han ralentizado su difusión en la andrología veterinaria (ESHRE, 1998; Verstegen *et al.*, 2002; Amann y Katz, 2004).

No obstante, el mayor inconveniente que nos encontramos en la utilización de estos sistemas es que los resultados van a estar condicionados también por multitud de factores (Vantman *et al.*, 1988), por lo que se echa por tierra el principal fin para el que fueron ideados, la obtención de resultados objetivos que permitan su comparación. Se comprobó que los resultados recogidos eran inexactos (Mortimer y Mortimer, 1988) y que la comparación de los mismos entre distintos sistemas era, cuanto menos, problemática (Gill *et al.*, 1988; Amann, 1988), ya que estaban claramente influenciados por las condiciones en las que cada laboratorio realizaba los análisis.

Este tipo de errores son de carácter técnico y, por lo tanto, salvables mediante una correcta validación y estandarización, tanto de los sistemas como de las condiciones de medida, así como con una adecuada formación del personal encargado, por lo que, en la década de los 90, se intensificaron los trabajos de identificación de las fuentes de variación, para así poder establecer las condiciones óptimas que las minimizaran (Neuwinger *et al.*, 1990; Anzar *et al.*, 1991; Wetzels *et al.*, 1993; Holt *et al.*, 1994; Kraemer *et al.*, 1998).

En definitiva, es indispensable conocer las fuentes de variación que pueden afectar a los resultados recogidos de la valoración cinética mediante los sistemas computarizados de análisis.

##### 2.3.4.1. Fuentes de variación originadas por los equipos de captura y análisis de imágenes.

###### Diseño del software.

Las diferencias existentes en el diseño del software entre los distintos equipos de análisis cinético hace que los resultados obtenidos para una misma muestra varíen de forma sustancial (Mortimer y Mortimer, 1988; Davis *et al.*, 1992; Davis y Katz, 1992; Davis y Katz, 1993), lo que conlleva la imposibilidad de comparar datos recogidos por equipos diferentes. Estas diferencias se presentan principalmente en cuatro puntos:

- El método de identificación de los espermatozoides.
- La zona de la célula empleada como referente en el trazado de las trayectorias.
- Los parámetros de configuración.

- Los algoritmos empleados en el cálculo de las características del movimiento; este punto afecta sobre todo a aquellos parámetros que precisan del *smoothing* para su determinación, como la ALH y la VAP (Holt *et al.*, 1994; Mortimer y Swam, 1999a; Mortimer y Swam, 1999b).

### Parámetros de configuración.

1. Umbral de identificación de espermatozoides: el establecimiento de un correcto umbral de tamaño, dentro del cual todas las partículas detectadas serán consideradas espermatozoides, es de extrema importancia, ya que si el umbral mínimo es demasiado alto y/o el máximo es demasiado bajo, puede determinar la exclusión de células espermáticas, alterando el número total de espermatozoides presentes, que resultará inferior, y si el umbral mínimo es muy bajo y/o el máximo es muy alto, dará lugar a la indentificación como espermatozoides de numerosos restos celulares, incrementando el porcentaje de “espermatozoides inmóviles”, lo que provocará una reducción artificial del porcentaje de movilidad (Vantman *et al.*, 1988).
2. Radio de búsqueda: al igual que ocurría en el anterior parámetro de configuración, una incorrecta elección del radio de búsqueda provocará la aparición de un mayor número de trayectorias calculadas erróneamente, de forma que si el radio establecido es muy pequeño, no aparecerán en él aquellos espermatozoides que presenten una velocidad muy alta, por lo que se incrementará la presencia de trayectorias incompletas, y si es demasiado grande, se originarán numerosos cruces con otras células, lo que determinará un aumento de trayectorias calculadas incorrectamente (Holt y Palomo, 1996; Holt *et al.*, 1996). El valor de este parámetro varía en función del equipo utilizado; así, en el Hobson Sperm Tracker<sup>®</sup> se considera óptimo para el verraco el de 13  $\mu\text{m}$  (Holt *et al.*, 1996) y en el sistema SCA<sup>®</sup> el de 11  $\mu\text{m}$  (Blanco-Palau, 1998).
3. Número de puntos de la trayectoria analizados: corresponde al número de imágenes capturadas en la secuencia y repercute de forma directa en la determinación de la VCL, el LIN y la ALH (Mack *et al.*, 1988; Vantman *et al.*, 1988), así como en la del porcentaje de movilidad. El empleo de valores altos no permite a los espermatozoides con un movimiento muy rápido permanecer el tiempo necesario en el campo de captura, originando numerosas trayectorias incompletas y, como consecuencia de ello, provocando una reducción ficticia en el porcentaje de espermatozoides móviles (Davis y Katz, 1992). Algunos autores aconsejan la utilización de un mínimo de veinte puntos en el cálculo de una determinada trayectoria (Mack *et al.*, 1988; Yeung y Nieschlag, 1993).
4. Frecuencia de captura: el número de imágenes capturadas por segundo influye de forma sustancial en la trayectoria calculada (figura 2.14); cuanto mayor sea la frecuencia de captura, más se aproximará la trayectoria trazada a la real del espermatozoide (Mortimer, 2000), modificándose todos los parámetros analizados, con la lógica salvedad de la VSL (Mortimer y Mortimer, 1988; Mortimer y Swam, 1999b). Al aumentar la frecuencia de captura se incrementan los valores calculados para la VCL, la VAP, la BCF y el STR, mientras que disminuyen los del LIN, el WOB y la ALH.

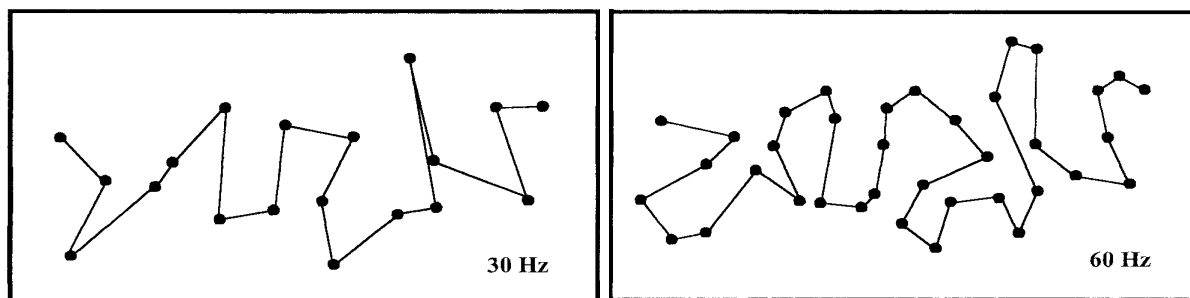


Figura 2.14: Efecto de la frecuencia de captura en el trazado de la trayectoria (Mortimer, 2000).

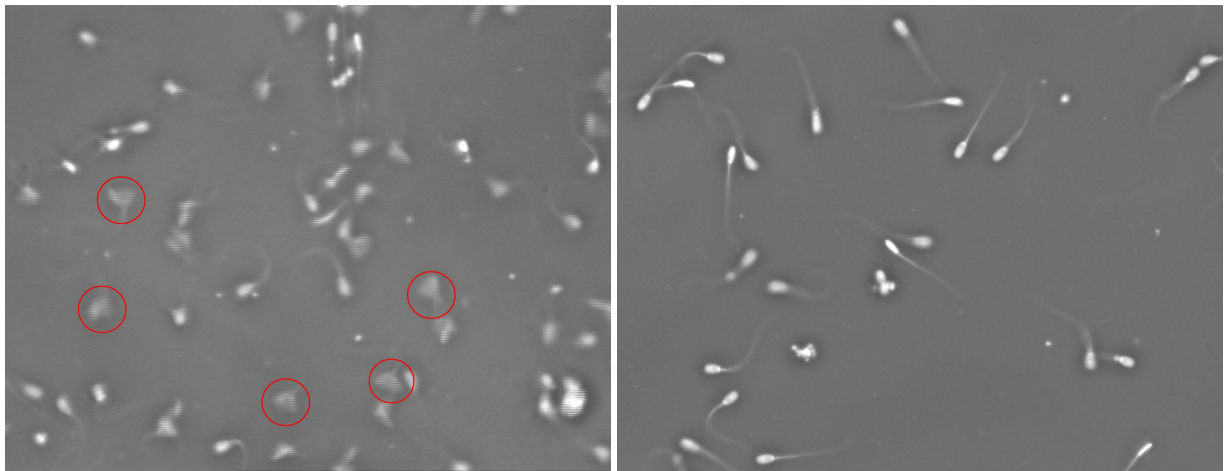
### Equipo óptico y de captura.

1. Óptica: la realización de una correcta segmentación de las imágenes depende en gran medida de la obtención de un buen contraste entre los espermatozoides y el fondo del campo de captura. Para ello se necesita que la iluminación tenga la intensidad y el color adecuado, así como que permanezca constante durante el tiempo de la valoración. El aumento empleado debe ser el mismo en todas las valoraciones, siendo 100x la óptica recomendada para el análisis de la movilidad (ESHRE, 1998).

Las ópticas de contraste de fase utilizadas pueden ser de dos tipos, positivo o negativo; las de contraste positivo proporcionan una imagen en la que los espermatozoides se muestran de un color oscuro sobre fondo claro, mientras que en las de contraste negativo esto se invierte, apareciendo los espermatozoides de color claro, sobre un fondo oscuro. La utilización de estas últimas proporciona una reconstrucción más fiable de las trayectorias espermáticas (Yeung y Nieschlag, 1993), ya que permite obtener una imagen más definida de la cabeza del espermatozoide, no apareciendo así artefactos como ocurre en las de contraste positivo, donde la rotación de la cabeza del espermatozoide puede alterar su tamaño y luminosidad y un enfoque agudo puede provocar un halo que interfiera en el reconocimiento de la misma.

2. Cámara de captura: la elección de la cámara de captura también va a condicionar los resultados obtenidos, así Tejerina *et al.* (2006a) observaron diferencias significativas en prácticamente todos los parámetros valorados al analizar una misma muestra con dos cámaras diferentes, una de captura continua y otra discontinua. En este estudio, los resultados proporcionados por la cámara de captura discontinua eran superiores en los parámetros VCL, VSL, VAP, WOB y ALH, mientras que en la BCF y el STR eran inferiores, y sólo el LIN mostraba valores estadísticamente similares en ambas valoraciones.

Las trayectorias calculadas con las cámaras de captura discontinua resultan menos “reales” que con la utilización de las continuas, debido a la aparición de “cabezas fantasma” (Tejerina, 2008), fenómeno que se produce como consecuencia de una mala coincidencia entre la imagen aportada por las líneas pares y por las impares al combinarlas para formar la imagen definitiva (figura 2.15).



**Figura 2.15:** Comparación de imágenes capturadas por cámaras de captura continua y de captura discontinua. Izquierda: imagen obtenida con una cámara de captura discontinua (Pulnix PE2015), donde se aprecia la aparición de “cabezas fantasma” dentro de los círculos rojos. Derecha: imagen obtenida con una cámara de captura continua (Basler A312-F).

#### 2.3.4.2. Factores de variación derivados de las condiciones del análisis.

1. Temperatura: el efecto de la temperatura sobre la movilidad espermática es bien conocido, ya que condiciona incluso al porcentaje de espermatozoides móviles totales, lo cual se viene observando desde hace mucho tiempo en los análisis subjetivos tradicionales realizados mediante estimación visual. Con el análisis computarizado también queda de manifiesto este efecto, habiéndose observado, en semen canino, incrementos de todos los parámetros cinéticos al elevar la temperatura de las muestras hasta valores corporales (Iguer-ouada y Verstegen, 2001). Para minimizar este tipo de variaciones (ESHRE, 1998) recomienda realizar el análisis de las muestras a la temperatura corporal de la especie analizada, estipulando la idónea para las muestras de semen porcino en 39 °C.
2. Diluyente: la elección del medio en el que se van a diluir las muestras modifica de forma notable los resultados recogidos en los diferentes parámetros cinéticos (Farrell *et al.*, 1996; Rijsselaere *et al.*, 2003), por lo que las comparaciones sólo serán correctas entre muestras diluidas en un mismo medio.
3. Cámara de recuento: el tipo de cámara utilizado también puede influir sobre los patrones cinéticos mostrados por los espermatozoides; un factor clave es la profundidad de la misma y resulta recomendable la utilización de cámaras con valores entre 10 y 20  $\mu\text{m}$  (ESHRE, 1998), por lo que hay que descartar el empleo, tanto de un portaobjetos y un cubreobjetos, que proporcionan profundidades altas y enormemente variables entre muestras, como de hematocitómetros tipo Bürker, Neubauer o Thoma, cuya profundidad es de 100  $\mu\text{m}$ , lo que motivará que los espermatozoides se sitúen en varias capas de fluido, pudiéndose enfocar con nitidez sólo aquellos presentes en una de ellas, además de que al desplazarse entre capas se dificulta de forma considerable su seguimiento (Verstegen *et al.*, 2002).

Tradicionalmente se ha empleado la cámara Makler, que presenta una profundidad de 10  $\mu\text{m}$ , para la valoración computarizada de la movilidad espermática; así mismo, existen en el mercado otros modelos, como la Microcell<sup>®1</sup> que está entre 12 y 20  $\mu\text{m}$ , la Cell-vu<sup>®2</sup> con 20  $\mu\text{m}$  de profundidad y la cámara Leja<sup>®3</sup>, también con 20  $\mu\text{m}$ . No obstante, a la hora de comparar resultados es necesaria la utilización de la misma cámara, ya que no sólo se han observado diferencias en los resultados de cámaras de distinta profundidad (Le Lannou *et al.*, 1992), sino que éstas también se han detectado entre cámaras con la misma profundidad pero de diferentes fabricantes (Iguer-ouada y Verstegen, 2001), posiblemente por la interacción de algún componente de las mismas con el metabolismo espermático.

Otro factor a evitar es el sobrellenado de las cámaras (en general se realiza con 4 ó 5  $\mu\text{l}$ ), ya que igualmente origina variaciones en el porcentaje de movilidad, así como en la concentración de espermatozoides por campo de captura (Mack *et al.*, 1989; Yanagida *et al.*, 1990).

4. Concentración de la muestra: se ha descrito como uno de los parámetros que más condiciona las características cinéticas de los espermatozoides (Vantman *et al.*, 1988; Wetzels *et al.*, 1993; Verstegen *et al.*, 2002); así, Pedigo *et al.* (1989) determinaron que el uso de concentraciones elevadas está inversamente relacionado con la variabilidad de los resultados, si bien y en contrapunto con ello, Wetzels *et al.* (1993) establecieron una correlación positiva entre la concentración y el porcentaje de movilidad de una muestra, sobre todo si el porcentaje real de la misma era medio o bajo, ya que como consecuencia de la mayor probabilidad de que se produzcan colisiones de las células móviles con las inmóviles, se origina un movimiento ficticio de estas últimas.

La concentración no sólo determina variaciones en el porcentaje de movilidad de una muestra, sino que en algunos estudios realizados, se observó una disminución de la VCL y de la VSL a medida que se aumentaba la concentración (Vantman *et al.*, 1988; Wetzels *et al.*, 1993). Este hecho posiblemente se deba a la exclusión de las trayectorias de los espermatozoides más rápidos, por colisiones con células vecinas y/o al descenso de la VCL media provocado por la toma en consideración del movimiento ficticio de los espermatozoides inmóviles, que presenta un valor más bajo de este parámetro. El aumento de colisiones también origina que las trayectorias sean más sinuosas, lo que conlleva una disminución del LIN y un aumento de la ALH.

La concentración recomendada se situaría en el rango que va de los 25 a los 50 millones de espermatozoides por ml, siendo éste el más utilizado en los trabajos publicados.

5. Número de espermatozoides analizados: El número de espermatozoides necesarios para caracterizar a la población de una determinada muestra ha sido siempre discutido; en general, se observan menores coeficientes de variación en los resultados al analizar un mayor número de células espermáticas, por lo que si se aumenta este número se obtendrá una valoración

---

<sup>1</sup>Conception Technologies.

<sup>2</sup>Millennium Sciences, Inc.

<sup>3</sup>Leja Products .



más precisa (Verstegen *et al.*, 2002). Para semen humano se recomienda el análisis de al menos 200 células (ESHRE, 1998), mientras que para toro o para caballo esta cifra aumenta a 300 (Budworth *et al.*, 1987; 1988 citados en Verstegen *et al.*, 2002) o a un rango entre 300 y 500 espermatozoides (Varner *et al.*, 1991). No obstante, se ha aceptado un mínimo de 100 células analizadas, siendo el intervalo entre 100 y 200 el más utilizado en la mayoría de los laboratorios.

Para Holt *et al.* (1996), la determinación del número óptimo depende del propósito para el que se recojan los datos; así, si lo que se pretende es establecer las medias de los diferentes parámetros para realizar un muestreo estadístico, el número mínimo va a depender de los límites de tolerancia y de la desviación estándar de las medidas, de forma que para verraco, empleando el sistema Hobson Sperm Tracker<sup>®</sup>, establecen que no existe una variación significativa en la media de la VAP analizando un valor superior a 25 espermatozoides, si bien los límites de confianza no se alcanzan hasta que se haya valorado un número mayor. En cambio, si el propósito es realizar un análisis más detallado de los resultados, el número mínimo para conseguir resultados representativos asciende a 60 células.

6. Variabilidad intra-técnico: A pesar de que los sistemas CASA surgieron con el fin de vencer la subjetividad que presentaban los análisis por visualización directa, los resultados obtenidos con ellos evidencian que siguen existiendo variaciones en función del técnico que realice la valoración. Así queda demostrado en el trabajo de Holt *et al.* (1994), donde una misma muestra era analizada por varios técnicos, con diverso grado de experiencia, con cinco modelos diferentes de sistemas CASA, constatándose que para todos los parámetros analizados, la variabilidad existente entre los análisis de los diferentes técnicos dentro de cada modelo fue mayor que la observada entre los diferentes modelos. Por ello, hay que tener muy en cuenta que, tanto la especialización como la experiencia del personal encargado de realizar las valoraciones es uno de los aspectos más determinantes a la hora de conseguir una correcta utilización de estos sistemas (ESHRE, 1998; Krause y Viethen, 1999; Verstegen *et al.*, 2002).



## Capítulo 3

# MATERIAL Y MÉTODOS



### 3.1. Productos y soluciones.

La tabla 3.1 muestra la relación de los productos empleados en la realización de la parte experimental de esta tesis doctoral.

Los datos de interés relativos a los modelos de los diferentes aparatos utilizados serán indicados a pie de página.

PRODUCTO	PRODUCTO CATÁLOGO	REFERENCIA CATÁLOGO	PROVEEDOR
Yoduro de Propidio	Propidium iodide	P4170	Sigma Aldrich Co.
Diacetato de Carboxifluoresceína	5(6) Carboxyfluorescein Diacetate	C8166	Sigma Aldrich Co.
Cafeína	Caffeine	C0750	Sigma Aldrich Co.
PBS	Phosphate Buffered Saline Solution	P4244	Sigma Aldrich Co.
PNA	Lectin for Arachis Hypogaea Fluorescein Isothiocyanate labelled	L7381	Sigma Aldrich Co.
Glutaraldehído	Glutaraldehyde	G6257	Sigma Aldrich Co.
Formaldehído	Formaldehyde Solution	F1635	Sigma Aldrich Co.
Lactosa	$\alpha$ - Lactose	L8783	Sigma Aldrich Co.
Fructosa	D-Fructose	F0127	Sigma Aldrich Co.
Bicarbonato Sódico	Sodium Bicarbonate	S5761	Sigma Aldrich Co.
Glicerol	Glicerina	14691	Acofarma
Glucosa	Glucosa Anhidra	14372	Acofarma
Citrato Sódico	Tri-Sodio Citrato 2-Hidrato	131655	Panreac Química S.A.
Suero Salino Fisiológico	Fisiológico Braun	346821	B.Braun Medical.S.A.
Diluyente seminal	MR-A		Kubus S.A.
Diluyente seminal	BTS	13525/0001	Minitüb GmbH
Equex Paste	Dodecil- sulfato sódico	13560/0008	Minitüb GmbH

**Tabla 3.1:** Proveedores y referencias de los productos utilizados.

Todas las soluciones utilizadas en el desarrollo del trabajo experimental, y que se exponen en las siguientes tablas (de la 3.2a la 3.10), han sido preparadas con agua ultrapura (Milli-Q), obtenida mediante una doble purificación, primero con un sistema de purificación de agua Milli-RX 75<sup>1</sup>, basado en la ósmosis inversa y la electrodesionización en continuo, que proporciona valores

<sup>1</sup>Millipore Corporation, Bedford, EEUU.

de resistividad en el agua purificada, de  $15\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$  y porcentajes de rechazo iónico entre el 97 y el 99 % y, posteriormente, mediante una unidad de producción de agua ultrapura Milli-Q Síntesis A10,<sup>2</sup> con la que se obtiene ya el agua definitiva, con valores de resistividad siempre superiores a  $17\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$  y niveles de Carbono Orgánico Total (COT) inferiores a 5 ppb.

Para el pesaje de los diversos reactivos se utiliza una balanza de precisión AB 204-S<sup>3</sup>, empleando un termoagitador magnético Basicmagmix<sup>4</sup> para lograr una perfecta dilución de los mismos.

■ **Soluciones no elaboradas en el día de su utilización:**

- Soluciones mantenidas a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización:

Formaldehído al 35 % v/v	0,857 % v/v
Solución NaCl 0,9 %	c.s.

**Tabla 3.2:** *Solución salina formolada 0,3 %.*

Inicialmente se procede a preparar una solución A con:

Citrato Sódico	1 % p/v
Glucosa anhidra	2,9 % p/v
Bicarbonato sódico	0,2 % p/v
Agua Milli - Q	c.s.

Preparación de la solución final con:

Glutaraldehído al 25 %	8 ml
Solución A	92 ml

**Tabla 3.3:** *Solución de glutaraldehído al 2 %.*

- Soluciones mantenidas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización (almacenadas en alícuotas y en condiciones de oscuridad):

Yoduro de Propidio (IP)	0,5 mg/ml
Solución NaCl 0,9 %	c.s.

**Tabla 3.4:** *Solución stock de Yoduro de Propidio.*

Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF)	0,46 mg/ml
Dimetil-sulfóxido (DMSO)	c.s.

**Tabla 3.5:** *Solución stock de Diacetato de Carboxifluoresceína.*

<sup>2</sup>Millipore Corporation, Bedford, EEUU.

<sup>3</sup>Mettler Toledo, Nueva York, EEUU.

<sup>4</sup>Lovango S.L., Barcelona, España.

Solución isosmótica inicial de Citrato de Sodio:

Citrato Sódico	3,6 % p/v
Agua milli - Q	c.s.

Solución isosmótica inicial de Fructosa:

Fructosa	5,2 % p/v
Agua milli - Q	c.s.

Preparación de la solución final con:

Solución isosmótica inicial de Citrato de Sodio	50 %
Solución isosmótica inicial de Fructosa	50 %

**Tabla 3.6:** *Solución isosmótica para la realización del HOST.*

Citrato Sódico	3,7 % p/v
Agua destilada Milli-Q	c.s.

**Tabla 3.7:** *Solución isosmótica para la realización del ORT.*

Citrato Sódico	1 % p/v
Agua destilada Milli-Q	c.s.

**Tabla 3.8:** *Solución hiposmótica para la realización del ORT.*

■ **Soluciones elaboradas en el día de su utilización:**

- Almacenada a 15 °C hasta su utilización:

Lactosa 1-Hidrato	11 %p/v
Yema de huevo	20 %p/v
Agua Milli-Q	c.s.

**Tabla 3.9:** *Diluyente de refrigeración.*

- Almacenada a 5 °C hasta su utilización:

Diluyente de refrigeración	89,55 % v/v
Glicerol	8,95 % v/v
Dodecil-sulfato sódico	1,50 % v/v

**Tabla 3.10:** *Diluyente de congelación.*

## 3.2. Material biológico.

### 3.2.1. Animales empleados.

Para la práctica totalidad de las pruebas experimentales se utilizan muestras seminales obtenidas a partir de 40 eyaculados, procedentes de 8 verracos escogidos al azar de un total de 80

animales de dos razas diferentes, Large White (LW) y Landrace (LD). Los verracos, se dividen, en función de su raza, en dos grupos de cuatro animales cada uno, procediendo a realizarse cinco extracciones a cada animal entre los meses de noviembre de 2005 y febrero de 2006 (tabla 3.11).

Verraco	Raza	1ª Extrac.	2ª Extrac.	3ª Extrac.	4ª Extrac.	5ª Extrac.
L437	LD	04/01/06	10/01/06	17/01/06	24/01/06	08/02/06
R5487	LD	11/11/05	18/11/05	30/11/05	16/12/05	27/12/05
R3846	LD	22/12/05	28/12/05	03/01/06	10/01/06	17/01/06
R4052	LD	02/12/05	09/12/05	13/12/05	20/12/05	27/12/05
G2552	LW	20/12/05	04/01/06	11/01/06	18/01/06	24/01/06
T475	LW	02/12/05	16/12/05	22/12/05	28/12/05	03/01/06
G6328	LW	11/01/06	20/01/06	25/01/06	30/01/06	08/02/06
G5223	LW	11/11/05	18/11/05	30/11/05	06/12/05	13/12/05

**Tabla 3.11:** Fechas en las que se realizaron las extracciones de los diferentes eyaculados.

Estos animales proceden del Centro Tecnológico de Inseminación Artificial S.A. (CENTRO-TEC), localizado en Campo de Villavidel (León), en cuyas instalaciones se desarrolla toda la parte experimental de esta tesis doctoral, y son utilizados asiduamente en la elaboración de dosis seminales frescas/refrigeradas con fines comerciales. En el momento del experimento contaban con una edad comprendida entre los 12 y los 22 meses, y estaban siendo sometidos a una extracción seminal a la semana. Los verracos están alojados en corrales individuales de 6,25 m<sup>2</sup> de superficie contando con suministro de agua *ad libitum* y una alimentación de en torno a 2,5 - 3 Kg de pienso compuesto C7 de Uvesa (figura 3.1) administrado en una sola toma al día. La ración se ajusta individualmente, cada quince días, tratando de mantener una condición corporal constante entre 2,5 y 3 grados en una escala de 1 a 5. Las condiciones ambientales en el recinto donde se alojan los animales están controladas, manteniendo una temperatura prácticamente invariable durante todo el año (entre 18 y 23 °C) y con un fotoperiodo constante de 12 horas de luz al día.

Los cuidados sanitarios preventivos de los animales consisten en la realización de desparasitaciones periódicas cada tres meses con Moxidectina y en la administración de un probiótico lácteo una vez al mes durante cinco días y de un complejo vitamínico cada dos meses, a excepción de la época estival en la que se suministra una vez al mes.

### 3.2.2. Recolección seminal.

La recolección del semen se realiza en salas de extracción higiénicas, sobre maniqués de colección fijos de acero recubiertos de un material plástico<sup>5</sup>. La recolección se realiza mediante la técnica de la mano enguantada (Hancock y Howell, 1959), previo vaciado de la cavidad prepucial y limpieza de la zona prepucial externa con una solución de cloruro de benzalconio al 2%. Se

<sup>5</sup>Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania.



aprovechó solamente la fracción rica del eyaculado, recogiéndola mediante bolsas US-Bag<sup>6</sup>, con un filtro incorporado que retiene las secreciones gelatinosas de las glándulas accesorias (fracción glerosa o “tapioca”), y desechando las otras fracciones del eyaculado (fundamentalmente la prostática). Dichas bolsas se colocan dentro de una jarra termo<sup>6</sup> con 100 ml de diluyente MR-A a 37 °C, permaneciendo a esta temperatura en una estufa Function Line<sup>7</sup> hasta el momento de la extracción. Tras la recogida, se desecha el filtro, permaneciendo la fracción rica con los 100 ml de diluyente en el interior de la bolsa de recogida, pasando ésta, acto seguido, al laboratorio para su valoración.


PIENSOS COMPUESTOS			
Fabricados por			
<b>Fórmula C7</b>			
PIENSO COMPLETO PARA CERDOS REPRODUCTORES MACHOS			
<b>CONSTITUYENTES ANALÍTICOS</b>		<b>ADITIVOS</b>	
Proteína Bruta	14,89%	Vitamina A	15000 U.I.
Materias Grasas Brutas	2,51%	Vitamina D-3	2500 U.I.
Celulosa Bruta	5,36%	Vitamina E (Alfa-Tocoferol)	70 mg/ Kg
Cenizas Brutas	5,19%	Cobre (Sulfato cúprico pentahidr	10 mg/kg
		Propión 50	o y ácido propiónico
		Etioxiquin	
<b>MATERIAS PRIMAS PARA LA ALIMENTACIÓN ANIMAL</b>			
Cebada(59,97%), harina de extracción de soja tostada (a partir de soja modificada genéticamente)(10,40%), salvado de trigo(17,51%), harina de extracción de semilla de girasol(1,14%), fosfato bicálcico(1,46%), carbonato cálcico(0,60%), Centeno(7,43%), Manteca(0,37%), Sal(0,46%).			
<b>MODO DE EMPLEO</b>			
Suministrar a los verracos a libre disposición.			

Figura 3.1: Composición del pienso administrado a los verracos.

### 3.3. Contrastación seminal.

#### 3.3.1. Valoración rutinaria *in vitro* de la calidad seminal.

Una vez en el laboratorio, los eyaculados permanecen a una temperatura constante de 32,5 °C durante unos diez minutos mediante su inmersión en un baño termostático de agua Precisdig<sup>8</sup>. En este tiempo se procede a realizar la valoración de la calidad seminal empezando por el cálculo del volumen mediante el pesaje del contenido de la bolsa de colección con la ayuda de una báscula de precisión BL-6<sup>9</sup>, y al cálculo de la concentración espermática por medio de un espectrofotómetro SDM-5<sup>6</sup>, para lo cual, se depositan 60 µl del contenido de la bolsa de extracción en una cubeta con 3 ml de diluyente seminal MR-A y, tras homogeneizar correctamente la muestra, se realiza la medición. Tras obtener estos dos valores, disponemos 60 µl de semen en 1 ml de diluyente seminal MR-A a 37 °C y valoramos la movilidad individual en gota plana a 200

<sup>6</sup>Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania.

<sup>7</sup>Heraeus Holding GmbH, Hanau, Alemania.

<sup>8</sup>J.P. Selecta S.A., Abrera, España.

<sup>9</sup>Sartorius AG, Goettingen, Alemania.

aumentos mediante la utilización de un microscopio de campo claro Eclipse E400<sup>10</sup>, equipado con condensador de contraste de fases y con platina térmica. Para ello, procedemos a depositar 10 µl de la muestra diluida de semen entre un portaobjetos y un cubreobjetos debidamente atemperados en una placa termocalefactada HT200<sup>11</sup> y, tras observar varios campos de la preparación, determinamos un porcentaje de movilidad (considerando como móviles aquellos espermatozoides que presentan algún tipo de movimiento flagelar), así como una valoración subjetiva de la calidad de movimiento, estableciendo una clasificación, en función de la actividad flagelar y del desplazamiento de la mayoría de los espermatozoides, de 0 a 5 conforme a los siguientes criterios (Martín-Rillo *et al.*, 1996):

- 0: Ausencia de movimiento en el flagelo.
- 1: Ausencia de movimiento progresivo, girando sobre si mismos.
- 2: Movimientos anormales o eventualmente progresivos.
- 3: Movimiento progresivo lento.
- 4: Movimiento progresivo rápido.
- 5: Movimiento progresivo muy rápido.

Posteriormente realizamos en un microtubo eppendorf una dilución (1:100) de la muestra seminal en una solución salina formolada (tabla 3.2) y, tras depositar 5 µl de dicha solución entre portaobjetos y cubreobjetos, se procede a valorar la morfología celular del eyaculado en un microscopio con contraste de fases, similar al utilizado para la valoración de la motilidad a 400 aumentos. Los espermatozoides se dividen en 5 grupos, normales, alteración de cola, alteración de cabeza y presencia de gota citoplasmática proximal o distal, estableciéndose los porcentajes para cada uno de ellos. Tras esta valoración, se consideran eyaculados aptos para los experimentos a realizar aquellos que presenten motilidades superiores al 75 % y morfología normal en, al menos, un 70 % de los espermatozoides.

#### 3.3.2. Otras valoraciones seminales.

Una vez estimado un eyaculado como apto, se procede a la valoración espermática del porcentaje de integridad de la membrana plasmática, a la evaluación del estado del acrosoma y al estudio computarizado de la movilidad de las muestras mediante la utilización de un sistema CASA.

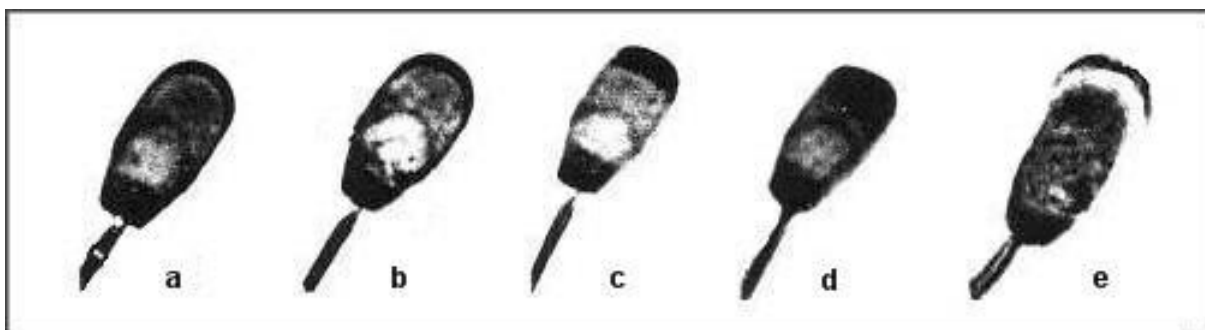
---

<sup>10</sup>Nikon, Tochigi, Japón.

<sup>11</sup>Sartorius AG, Goettingen, Alemania.

### 3.3.2.1. Valoración de la integridad acrosómica.

Para la valoración del *status* acrosomal diluimos 60  $\mu\text{l}$  del semen de la bolsa de extracción con 1 ml de diluyente seminal (MR-A) en un microtubo eppendorf de 1,5 ml para, posteriormente, fijar la muestra mediante la adición de 0,5 ml de una solución de glutaraldehído al 2 % (tabla 3.3) en el mismo microtubo. Colocamos 5  $\mu\text{l}$  de la muestra fijada entre portaobjetos y cubreobjetos y lo observamos a 1000 aumentos en un microscopio con contraste de fases (Ph3), con la ayuda de una pequeña gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos. Posteriormente se procede a clasificar por duplicado 100 espermatozoides por valoración dividiéndolos en dos clases, espermatozoides con acrosoma normal (NAR), aquellos que presentan en su borde apical una semiluna negra con bordes perfectamente regulares y nítidos, y espermatozoides con acrosoma alterado, aquellos que presentan alguno de los otros cuatro estadios descritos por Pursel *et al.* (1972a).



**Figura 3.2:** Imágenes bajo contraste de fases de diferentes estados de la vesícula acrosómica, en función de su morfología (Pursel *et al.*, 1972a): a: Borde apical normal (NAR); b: Borde apical normal con partículas; c: Borde apical dañado; d: Borde apical perdiéndose; e: Acrosoma perdido.

En el caso de que las muestras a analizar ya estén diluidas a 50 millones spz/ml, como ocurre en alguno de los experimentos posteriores, la forma de proceder es similar a la expuesta, con la excepción de que la dilución inicial de los 60  $\mu\text{l}$  de semen en 1 ml de diluyente seminal no tiene lugar y se procede a fijar la muestra diluida con la solución de glutaraldehído a una proporción de 2:1.

### 3.3.2.2. Análisis de la integridad de la membrana plasmática.

El procedimiento para la valoración de la integridad de membrana se basa en la técnica descrita por Harrison y Vickers (1990); en primer lugar, se realiza una solución stock previa de Diacetato de Carboxifluoresceína (tabla 3.5) y una de Yoduro de propidio (tabla 3.4), manteniendo ambas en alícuotas a una temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y en condiciones de oscuridad; seguidamente, se realiza a un la solución espermática para la valoración de la integridad de la membrana plasmática se realiza de la siguiente forma: en un microtubo eppendorf de 1,5 ml se mezclan 500  $\mu\text{l}$  de la muestra seminal ajustada a 50 millones de espermatozoides por mililitro con 5  $\mu\text{l}$  de una solución salina formolada (tabla 3.2), 10  $\mu\text{l}$  de la solución DCF y 10  $\mu\text{l}$  de la solución IP.

Inmediatamente se incuba la preparación durante 8 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un baño termostático

Precisdig<sup>12</sup>, a continuación se procede a depositar 5  $\mu$ l de la muestra sobre un portaobjetos y, tras la colocación cuidadosa del cubreobjetos encima de la muestra, se valora por duplicado 200 células con un microscopio óptico de epifluorescencia Nikon eclipse E600<sup>13</sup> a 400 aumentos, con la utilización de dos filtros de forma alternativa para cada campo, el B-2A y el G-2A<sup>14</sup>, clasificando a los espermatozoides en función de la penetración o exclusión del IP, teniendo en cuenta que aquellos con la membrana dañada se muestran con la cabeza de color rojo, por la unión del colorante al ADN del espermatozoide y aquellos con la membrana intacta de color verde, por el acúmulo del DCF en el acrosoma, las mitocondrias y el citoplasma (González-Chabbarri y Martín-Rillo, 1994).

#### 3.3.2.3. Metodología general del análisis computarizado de la movilidad de los espermatozoides.

##### Equipo utilizado.

El análisis computarizado de la motilidad se realiza utilizando el software ISAS<sup>®</sup> (Integrated Semen Analysis Sistem<sup>®</sup>, versión 1.0.10)<sup>15</sup>, instalado en un equipo informático (AMD Athlon 2400) que posee una tarjeta digitalizadora Matrox Meteor II<sup>16</sup> de 512x512x8 bits y 256 niveles de gris, que se encarga de la digitalización de las imágenes tomadas a través de una cámara de captura discontinua en blanco y negro Pulnix PE2015<sup>17</sup> conectada a un microscopio Nikon Eclipse E400, equipado con una óptica de contraste de fases negativo (objetivo 20x) y con una platina atemperada conectada a una placa termocalefactada HT 200<sup>18</sup> a 39 °C. Sobre dicha placa se atempera una cámara Makler<sup>19</sup>, que nos sirve de soporte para las muestras a analizar.

##### Procesado de la muestra.

Para la realización de la valoración computarizada de la movilidad partimos de muestras con concentraciones de 50 millones de spz/ml que debemos ajustar a 25 millones, para lo cual se procede a tomar 500  $\mu$ l de la muestra inicial y a depositarlos en un microtubo eppendorf con el mismo volumen de diluyente MR-A atemperado. Para las muestras analizadas con cafeína se realiza el mismo procedimiento pero utilizando el diluyente enriquecido con una concentración de cafeína de 2 mM (concentración final de cafeína: 1mM). Estos microtubos con 1 ml de las diferentes soluciones espermáticas se incuban en un baño termostático a 39 °C durante 6 minutos para, posteriormente, tras una correcta homogeneización de las mismas, depositar 4  $\mu$ l en la cámara Makler, que permanece atemperada sobre la placa termocalefactada a la misma temperatura (ESHRE, 1998).

Las muestras descongeladas se obtienen a partir de 3 pajuelas elegidas al azar de cada uno

---

<sup>12</sup>J.P. Selecta S.A., Abrera, España.

<sup>13</sup>Nikon, Tochigi, Japón.

<sup>14</sup>B-2A: Filtro de excitación (paso de banda): 450-490 nm; filtro de cierre (paso largo): 515 nm.

G-2A: Filtro de excitación (paso de banda): 510-560 nm; filtro de cierre (paso largo): 590 nm.

<sup>15</sup>PROISER R+D, Paterna, España.

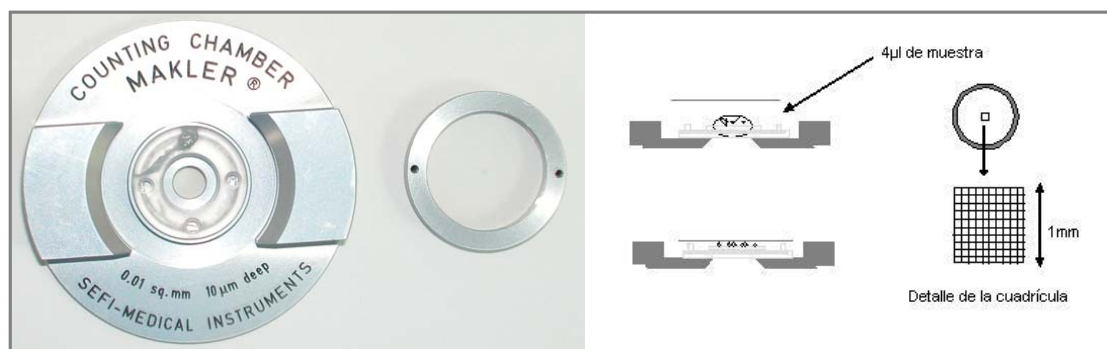
<sup>16</sup>Matrox Electronic Systems Ltd., Québec, Canadá.

<sup>17</sup>Pulnix, Basingstoke, Reino Unido.

<sup>18</sup>Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania.

<sup>19</sup>Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel.

de los eyaculados. Una vez descongeladas son diluídas en BTS, ajustando la concentración a 50 millones de spz/ml, en un tubo falcon de 15 ml. Dicho tubo permanece durante 10 minutos a una temperatura de 32,5 °C en un baño termostático, y una vez transcurridos se procede a tomar de él los 500  $\mu\text{l}$  de muestra necesarios para realizar las valoraciones, tanto en presencia como en ausencia de cafeína, de la forma indicada anteriormente.



**Figura 3.3:** Imagen de la cámara Makler y procedimiento de llenado de la misma.

#### Método empleado para el procesamiento de las imágenes.

Los parámetros de configuración utilizados para todas las valoraciones realizadas en los experimentos son los que se reflejan en la tabla 3.12.

Se procede a capturar cuatro campos de la zona pericentral de la cámara Makler, evitando aquellos que no presenten características óptimas para el movimiento espermático, ya sea por suciedad u otros motivos similares. El número de espermatozoides capturados asciende a unos 120-160 por muestra.

---

Número de imágenes analizadas: 25 imágenes.
Frecuencia de adquisición: 25 frames/ segundo.
Tiempo de captura: 1 segundo.
Umbral mínimo/máximo del área de partículas para ser consideradas como espermatozoides: 20/80 $\mu\text{m}^2$ .
Radio de búsqueda: 11 $\mu\text{m}$ .
Número mínimo de imágenes por espermatozoide para el cálculo de ALH: 7 imágenes.

---

**Tabla 3.12:** Parámetros de configuración empleados para las muestras analizadas.

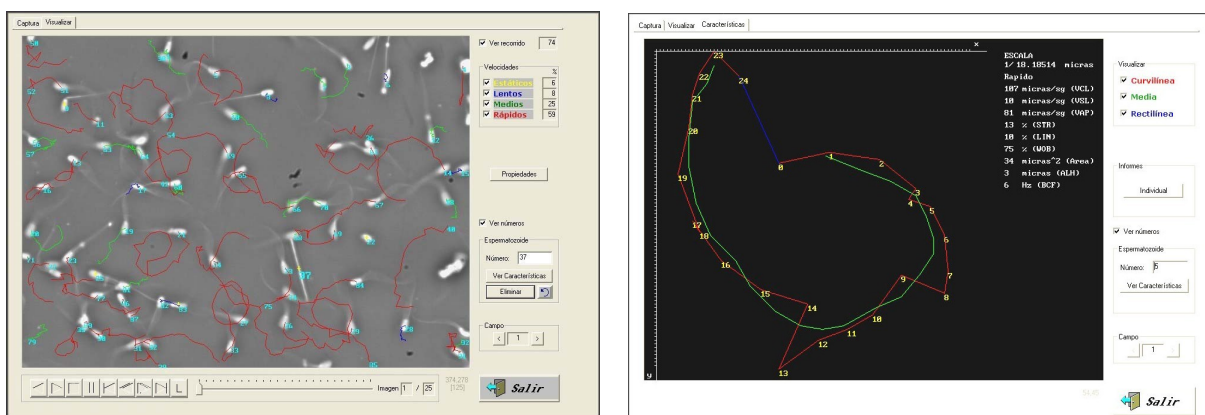
Aunque el cómputo de los espermatozoides y sus trayectorias se efectúa automáticamente por el software del sistema, la posibilidad de almacenaje de las imágenes permite realizar, *a posteriori*, una corrección manual, revisando una por una las diferentes secuencias, a fin de eliminar partículas no espermáticas, espermatozoides erróneamente detectados, bien como móviles o inmóviles, o espermatozoides con trayectorias descritas por el software incompletas o equivocadas

debido al cruce con otras células espermáticas, procediendo para ello a la visualización de las trayectorias correspondientes a las velocidades lineal, curvilínea y media del espermatozoide que resulte dudoso (figura 3.4). Todas estas correcciones se tienen en cuenta en el cálculo final del porcentaje de movilidad.

El sistema muestra una serie de datos relativos a la movilidad, de los cuales utilizamos para este trabajo, el número total de espermatozoides analizados y el número y porcentaje de espermatozoides móviles. Por último, sobre las imágenes binarias, el programa realiza los cálculos y proporciona los parámetros cinemáticos a partir de la trayectoria descrita por los espermatozoides. Estos parámetros fueron los siguientes:

1. VCL: Velocidad Circular ( $\mu m/s$ ).
2. VSL: Velocidad Rectilínea ( $\mu m/s$ ).
3. VAP: Velocidad de la trayectoria media ( $\mu m/s$ ).
4. LIN: Índice de Linealidad (%).
5. STR: Índice de Rectitud (%).
6. WOB: Índice de Oscilación (%).
7. ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza ( $\mu m$ ).
8. BCF: Frecuencia de batido ( $Hz$ ).

Para los cálculos referentes a los parámetros cinemáticos, se filtra la base de datos obtenida para eliminar trayectorias con menos de siete segmentos y se almacenan en el ordenador para su posterior tratamiento estadístico.



**Figura 3.4:** A la izquierda se muestra el aspecto de una pantalla con todas las trayectorias analizadas y a la derecha se representan las trayectorias correspondientes a las tres velocidades calculadas para la trayectoria analizada de un determinado espermatozoide.

### 3.4. Congelación y descongelación seminal.

Realizadas las valoraciones pertinentes para determinar la aptitud de los eyaculados una vez que llegan al laboratorio, se procede a congelar una fracción de aquellos considerados como aptos. Para ello, se sigue la técnica descrita por Bwanga *et al.* (1990), basada en el protocolo de congelación en pajuelas de Westendorf *et al.* (1975), esquematizada en la figura 3.5.

Se diluye (1:2) el semen en un vaso de precipitados con diluyente MR-A atemperado (32,5 °C) y, tras cubrir el vaso con parafilm<sup>®</sup>M<sup>20</sup>, se deja incubando, en oscuridad y a temperatura ambiente (20 °C) durante una hora; una vez transcurrida, pasa a una cámara refrigerada a 15 °C por espacio de 3 horas. Durante estas cuatro horas de incubación se realizan, aproximadamente cada quince minutos, suaves movimientos rotatorios del vaso de precipitados para evitar que los espermatozoides sedimenten en el fondo del mismo. Tras las tres horas de incubación dentro de la cámara refrigerada, se reparte el contenido seminal en tubos falcon de 50 ml con fondo cónico, atemperados también a 15 °C y se colocan en el interior de una centrífuga refrigerada Heraeus Megafuge 1.0R<sup>21</sup> a la misma temperatura, realizando una centrifugación durante 10 minutos a una velocidad de 800 g. Una vez concluida, de vuelta en la cámara refrigerada, se desecha el sobrenadante y se diluyen las pastillas resultantes de la sedimentación de los espermatozoides en el medio de refrigeración (tabla 3.9), pasando todo el contenido a un solo tubo falcon, donde se concluye la dilución con el mismo medio hasta obtener una concentración final de  $1,5 \times 10^9$  spz/ml. Posteriormente, para intentar evitar un daño celular por una bajada de temperatura brusca en aquellos espermatozoides más próximos a las paredes del tubo falcon, se procede a introducir éste, debidamente cerrado, en un vaso de precipitados con agua a 15 °C, manteniendo este conjunto en otra cámara frigorífica DELTA 1.2<sup>22</sup> a 5 °C por un espacio de 2 horas. Transcurridas estas dos horas se realiza otra dilución (2:1) con el medio de congelación (tabla 3.10), obteniendo con ello un porcentaje final del 3% de glicerol (v/v) y una concentración de  $1 \times 10^9$  spz/ml, envasándose seguidamente, en la misma cámara, en pajuelas de 0,25 ml, con la ayuda de un equipo de envasado automático MPP 133<sup>23</sup>. Estas pajuelas son previamente impresas con el número del verraco, la raza, la fecha y el número de congelación correspondiente al macho en cuestión, mediante la impresora de pajuelas Easy Coder<sup>23</sup>. Tras el envasado, se procede a colocar las mismas en los *racks* correspondientes, evitando en todo momento provocar un aumento de la temperatura del semen con el contacto de nuestras manos.

Tras el llenado de las pajuelas y su colocación en los *racks*, se pasan éstos a la cámara de un biocongelador programable Ice Cube 1810<sup>24</sup>, que previamente se ha refrigerado manteniendo una temperatura de 5 °C. Una vez en el biocongelador se le aplica una curva de congelación de régimen trifásico, con una meseta inicial de estabilización a 5 °C (figura 3.6):

1. De 5 °C a -6 °C se utiliza una velocidad de descenso térmico de 3 °C/min.

---

<sup>20</sup>Pechiney Plastic Paackaging, Menasha, Wisconsin.

<sup>21</sup>Heraeus Holding GmbH, Hanau, Alemania.

<sup>22</sup>Arcaboa Industria del Frío. Fânzeres. Gondomar. Portugal.

<sup>23</sup>Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania.

<sup>24</sup>Sy-Lab, Purkersdork, Austria.

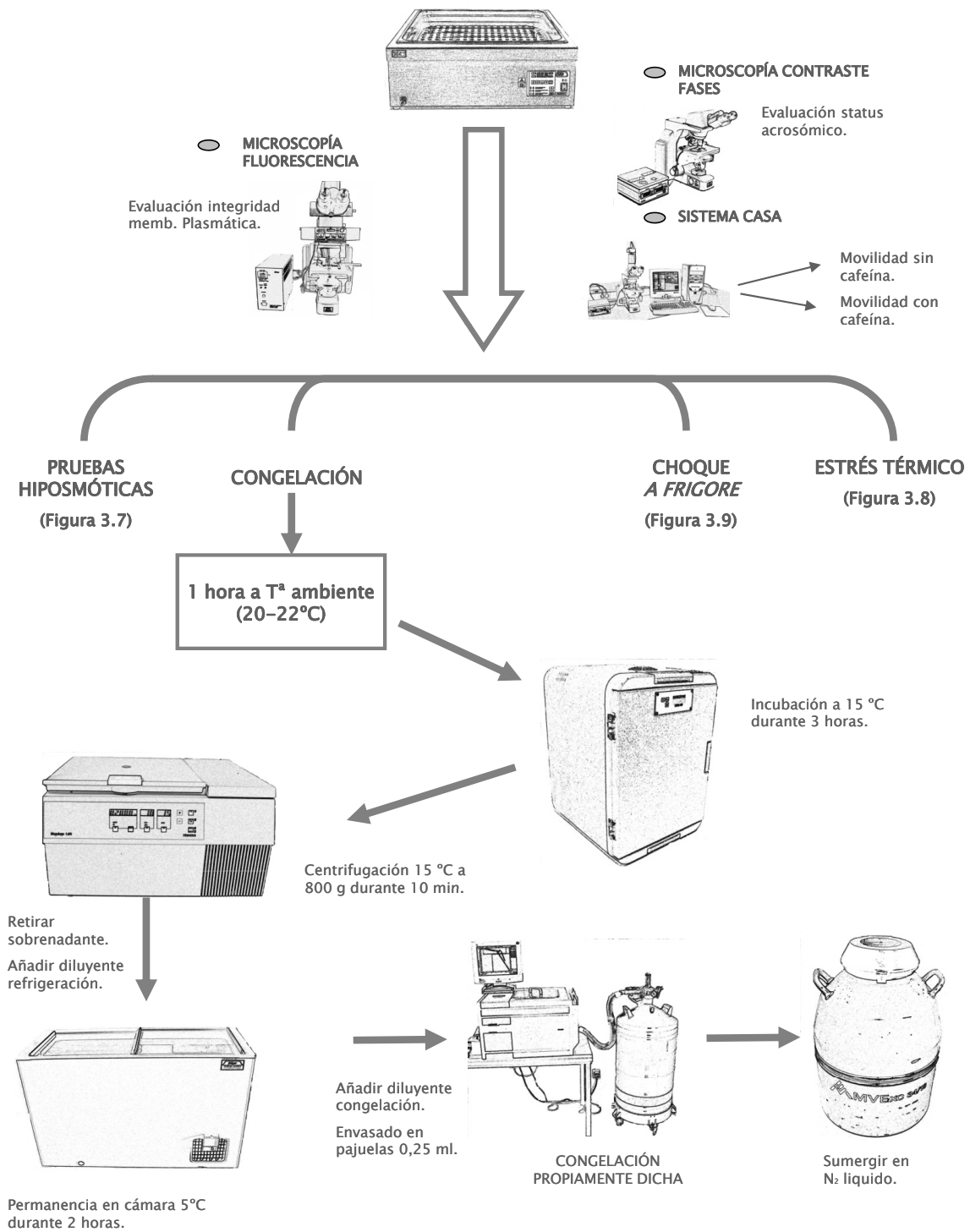
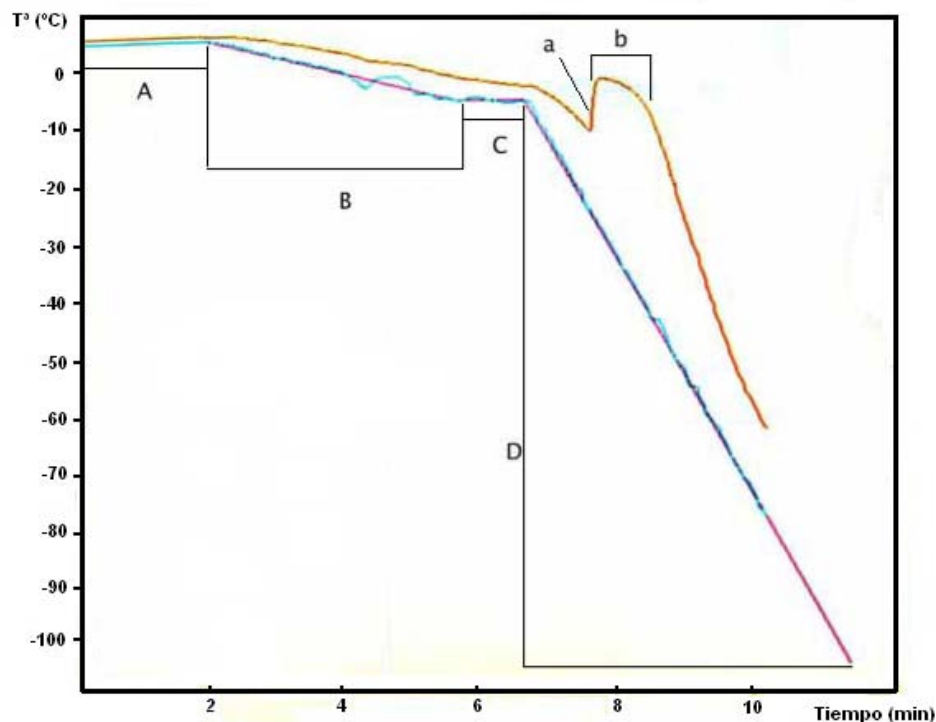


Figura 3.5: Esquema del proceso de congelación realizado.



2. Mantenimiento a  $-6^{\circ}\text{C}$  durante un minuto (meseta térmica).
3. De  $-6^{\circ}\text{C}$  a  $-100^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de  $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

Una vez alcanzados los  $-100^{\circ}\text{C}$ , se recogen las pajuelas y se sumergen inmediatamente en un contenedor de nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), quedando almacenadas allí, hasta su descongelación, que se realiza aproximadamente un mes después de producirse la congelación, mediante la inmersión de las pajuelas en un baño termostático de agua a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 12 segundos (Bwanga *et al.*, 1990).



**Figura 3.6:** Régimen de enfriamiento utilizado en la congelación del semen.

La línea morada indica la temperatura prefijada de la cámara de congelación (A: Meseta de estabilización de la temperatura de la cámara a  $5^{\circ}\text{C}$ ; B: Descenso de temperatura a  $-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  desde  $5^{\circ}\text{C}$  a  $-6^{\circ}\text{C}$ ; C: Meseta térmica a  $-6^{\circ}\text{C}$  durante 1 min; D: Descenso de temperatura a  $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  desde  $-6^{\circ}\text{C}$  hasta  $-100^{\circ}\text{C}$ ). La línea azul indica la temperatura real de la cámara de congelación. La línea roja representa la temperatura en el interior de una pajuela de congelación, donde podemos observar el rebote térmico producido por la disipación del calor latente de fusión (a) y la meseta del punto de congelación (b).

### 3.5. Grupos de calidad establecidos.

Los eyaculados se clasifican en grupos de calidad en función de su aptitud para la congelación, basándonos en los valores obtenidos en los siguientes parámetros analizados posdescongelación:

- El porcentaje de espermatozoides móviles bajo estimulación con cafeína.
- El porcentaje de espermatozoides que presentaban integridad de la membrana plasmática.

- El porcentaje de espermatozoides que presentaban integridad del acrosoma.

Se realiza un análisis de *cluster* mediante el software SPSS para Windows (versión 15.0)<sup>25</sup>, con el que, al desconocer el número de *clusters* existentes *a priori*, se efectúa una clasificación jerárquica de los datos mediante la utilización de la vinculación de Ward, para la cual se aplica como medida de disimilaridad la distancia euclídea al cuadrado; tras esta clasificación, se concluye que el número de clases apropiado es de tres.

Para establecer de qué forma se reparten los eyaculados en estos tres grupos, se emplea el procedimiento de las *K-means*, por el cual se agrupan los casos en función de las distancias existentes entre sus centroides. Una vez clasificados los cuarenta eyaculados en estos tres grupos, procedemos a asignarles un nombre, en función de los valores observados en los centros de los conglomerados finales para cada una de las variables empleadas en la clasificación; así, se denominan:

- “Grupo de Buenos Congeladores” (BC): Aquel grupo que posee el valor del conglomerado final más alto en los tres parámetros.
- “Grupo de Malos Congeladores” (MC): Aquel que posee el valor más bajo en los tres parámetros.
- “Grupo de Congeladores Medios” (CM): Aquel que tiene unos valores intermedios entre los otros dos grupos.

### 3.6. Análisis estadístico.

Para la realización del análisis estadístico se utilizan dos programas informáticos distintos; por un lado, se emplea el entorno estadístico R (R: *A language and environment for statistical computing*)<sup>26</sup> para el análisis y estudio de las subpoblaciones espermáticas a partir de los parámetros cinéticos calculados con el sistema ISAS<sup>®</sup> y, por otro lado, el paquete estadístico SPSS para Windows (version 15.0) para la realización del resto de determinaciones y contrastes estadísticos.

De forma previa a todas las comparaciones efectuadas, se realizan las pruebas de Shapiro-Wilk o Kolmogorov-Smirnov (en función de las características de los datos a analizar) para comprobar si se cumplen o no las condiciones de normalidad, pudiendo así ir definiendo la elección entre contrastes paramétricos o no paramétricos. Para la comprobación de la premisa de homocedasticidad (igualdad de varianzas), se realiza el contraste de Levene con el fin de admitirla o rechazarla, para lo cual se elige un nivel de significación de un 15 %.

Las comparaciones se realizan a partir de variables que recogen el promedio de las valoraciones efectuadas a las muestras en cada uno de los análisis realizados.

---

<sup>25</sup> SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU.

<sup>26</sup> R: foundation for statistical computing, Viena, Austria.

Cuando se procede a la comparación de dos muestras relacionadas (aquellas en las que para cada observación tenemos una segunda observación asociada en el segundo grupo) se utiliza la prueba de la “t-student (t-test) para muestras relacionadas” en el caso de que los datos a analizar cumplan la condición de normalidad y el contraste no paramétrico de Wilcoxon en el caso de que no sea así.

Para el contraste de dos muestras independientes (cuando puede suponerse que los integrantes de un grupo han sido extraídos independientemente de los del otro) se emplea la prueba “t-student para muestras independientes” siempre que se cumpla alguna de las siguientes tres condiciones:

- Que las varianzas sean similares y las observaciones de cada muestra normales.
- Que las varianzas sean similares y los tamaños muestrales grandes.
- Que, aunque haya una diferencia notable entre las varianzas de cada grupo, el tamaño de las muestras sean similares y, además, o sean grandes o sigan una distribución normal.

En los supuestos en que no se cumpla ninguna de las tres condiciones expuestas, se procede a utilizar la prueba de Mann-Whitney dentro de las pruebas no paramétricas.

Cuando tenemos que identificar posibles diferencias de una determinada variable entre varios grupos procedemos a realizar un análisis de la varianza (ANOVA de un factor) para aquellos casos en los que se cumplan una serie de condiciones (de mayor a menor importancia):

1. Que la variabilidad de todas las muestras sea similar.
2. Que las muestras tengan una distribución normal.
3. Que los tamaños de las muestras no sean muy dispares.

Cuando, tras realizar la prueba ANOVA, se obtienen diferencias significativas, se procede a identificar entre qué grupos se producen éstas, mediante el test de la Diferencia Honestamente Significativa de Tukey (HSD de Tukey) en los supuestos en que éstos son equilibrados y con varianzas similares y el test de Games-Howell cuando los grupos son desequilibrados o con varianzas no similares en todos ellos.

En el caso de no cumplir las condiciones descritas, sobre todo las dos primeras, se recurre a la prueba de Kruskal-Wallis, que puede realizarse independientemente de cuál sea la distribución de los datos.

Realizamos modelos factoriales de análisis de la varianza (ANOVA factorial) para evaluar el efecto individual y conjunto de dos o más factores sobre una variable determinada. Si alguno de los estadísticos F asociados a los efectos principales resulta significativo, procedemos, al igual que en el ANOVA de un factor, a emplear el test de Tukey o el de Games-Howell en función de la condición de homocedasticidad de los datos.

A la hora de estudiar la relación existente entre dos variables, empezamos realizando correlaciones simples bivariadas entre ellas, empleando los coeficientes de correlación de Pearson o de Spearman según se cumpla o no, respectivamente, el supuesto de normalidad para los conjuntos de datos. Posteriormente, y para una aproximación más certera a la predicción de la capacidad de congelación, procedemos a realizar un análisis de regresión múltiple, utilizando las distintas variables analizadas en cada grupo de pruebas de laboratorio. De esta forma intentamos encontrar un modelo de regresión que explicase, con el mínimo número de variables independientes, la mayor parte posible de la varianza de la congelabilidad de un eyaculado. Como en muchos casos existe un elevado número de variables independientes, se procede a ejecutar un método de selección de variables por pasos (*stepwise*) hacia delante, en el que se selecciona en primer lugar la mejor variable, a continuación la mejor de las restantes, y así sucesivamente hasta que no queden variables que cumplan los criterios de selección en cada grupo. Los criterios estadísticos en los que se basa la selección de variables son dos:

- Criterio de significación: Implica que sólo se incorporen al modelo de regresión aquellas variables que contribuyan de forma significativa al ajuste del modelo; esto se establece contrastando, a partir del coeficiente de correlación parcial, la hipótesis de independencia entre la variable determinada y la congelabilidad.
- Criterio de tolerancia: Superado el anterior, sólo se incorporan al modelo aquellas variables que presentan un nivel de tolerancia mayor a 0,0001 y si, además, aun con un coeficiente de correlación parcial significativamente distinto de cero, su incorporación al modelo hace que alguna de las variables previamente seleccionadas pase a tener un nivel de tolerancia inferior al establecido.

Se consideran significativos los contrastes cuando la significación resulte inferior a un 5 %.

## 3.7. Diseño experimental.

Se han desarrollado tres experimentos:

- Estudio de las pruebas de laboratorio como indicadoras de la congelabilidad seminal.
- Estudio cinético mediante un sistema de análisis computarizado de semen (CASA) y su importancia como indicador de la congelabilidad.
- Estudio de diferentes aspectos asociados con el choque *a frigore*.

### 3.7.1. Experimento 1: Estudio de las pruebas de laboratorio como indicadoras de la congelabilidad seminal.

Teniendo en cuenta la distinta respuesta al proceso de congelación/descongelación de los diferentes machos empleados para la reproducción en la especie porcina (Larsson y Einarsson, 1976) y, teniendo siempre en mente la posibilidad de la aplicación a nivel comercial de este método de conservación en un futuro, sería de gran importancia establecer qué pruebas de laboratorio

son las más eficaces para realizar una apropiada selección de animales, y así poder determinar aquellos machos o eyaculados que presenten una mayor capacidad de congelación o, simplemente, poder descartar aquellos otros en los que se prevea que la calidad seminal va a descender notablemente tras el proceso y, por lo tanto, no van a ser adecuados para su utilización en la IA.

En este experimento se evalúa la eficacia para la predicción de la congelabilidad de un eyaculado mediante sencillas pruebas que se pueden desarrollar en la mayoría de los laboratorios convencionales en los que se preparan dosis seminales de forma comercial. Para ello, se utilizan los 40 eyaculados seleccionados (página 87), dividiendo el experimento en cuatro partes:

- Valoración convencional del semen.
- Determinación de la respuesta de los eyaculados frente a la realización de pruebas de estrés osmótico.
- Determinación de la respuesta de los eyaculados ante la realización de un estrés por calor (termorresistencia).
- Determinación de la respuesta de los eyaculados frente a un choque *a frigore*.

En todas ellas se utiliza la misma estructura en el análisis de los datos: se empieza por realizar un enfoque descriptivo de los mismos, incidiendo en la posible influencia de la raza o el verraco en la respuesta a las diferentes pruebas; a continuación, se analizan los resultados obtenidos encuadrando los eyaculados en los tres grupos de calidad establecidos en función de su aptitud para la congelación, y se evalúa, para cada uno de estos grupos de calidad, la variación de los parámetros analizados en las cuatro partes del experimento.

Con posterioridad, se establecen las correlaciones existentes, bien mediante la prueba de Pearson o la de Sperman, dependiendo de las características que presenten los diferentes grupos de datos, entre los parámetros calculados y el índice de “congelabilidad”, basado en el aguate de la membrana plasmática al proceso de congelación/descongelación, determinado por la fórmula descrita por Peña *et al.* (2007):

$$\text{Congelabilidad}(\%) = \frac{\% \text{ Integridad Memb. Plasmática Posdescongelado } \times 100}{\% \text{ Integridad Memb. Plasmática Precongelado}}$$

De igual forma, se determina el coeficiente de correlación con el índice de resistencia a la criopreservación del acrosoma y el del porcentaje de movilidad, con y sin cafeína, que son calculados de forma similar al anterior.

A continuación, procedimos a realizar un análisis de regresión multivariante para intentar definir un modelo que explicase, con el mínimo número de variables independientes, el mayor porcentaje posible de la varianza del índice de congelabilidad; para ello, empleamos un sistema de análisis por pasos o *stepwise*, en el cual se van incorporando, una a una, las distintas variables,

de forma que, tras establecer la influencia de cada una de ellas, el modelo resultante contenga exclusivamente aquellas que sean relevantes.

#### 3.7.1.1. Valoración convencional del semen.

El objetivo de esta parte es determinar la eficacia de las pruebas que se utilizan normalmente en los Centros de IA para la contrastación seminal, con el propósito de discernir entre eyaculados que van a presentar una buena supervivencia espermática tras el proceso de congelación/descongelación y aquellos que no lo van a hacer.

Con esta finalidad, se utilizan los resultados obtenidos en las siguientes valoraciones:

- Volumen del eyaculado.
- Concentración del eyaculado.
- Movilidad subjetiva.
- Movilidad determinada con sistema CASA (con adición o no de cafeína).
- Morfología celular.
- Integridad acrosómica.
- Integridad de la membrana plasmática.

Todas estas pruebas se realizan en los primeros momentos de estancia del eyaculado en el laboratorio, después de su extracción, y la mayoría forman parte del análisis rutinario que se realiza en CENTROTEC S.A. a los eyaculados con los que se elaboran las dosis seminales frescas/refrigeradas que posteriormente se comercializan.

**Análisis estadístico.** Las comparaciones realizadas entre las dos razas analizadas en todos los parámetros estudiados se efectúan mediante un t-test para muestras independientes o mediante la prueba de Mann-Whitney, en función de si se puede asumir o no la condición de normalidad para los diferentes conjuntos de datos. Siguiendo la misma premisa, se realizan, por medio de un ANOVA de un factor o mediante el test de Kruskal-Wallis, las comparaciones en la respuesta de los distintos verracos, determinando, en caso de ser ésta diferente, entre cuales varía por medio de un test HSD de Tukey o de Games-Howell, si los conjuntos de datos siguen una distribución normal o, en caso de no ser así, por medio de comparaciones pareadas mediante la prueba de Mann-Whitney.

La determinación de posibles diferencias entre los tres valores de movilidad analizados (movilidad subjetiva y movilidad determinada con sistema CASA, con y sin cafeína) se efectúa por

medio de un test de Friedman, realizando, a continuación, contrastes pareados entre ellos mediante el test de Wilcoxon.

Para la comparación de la respuesta observada para cada grupo de calidad establecido en función de la aptitud para la congelación de cada eyaculado, se procede a realizar un ANOVA de un factor, determinando el lugar donde aparecen las diferencias entre los grupos mediante el test HSD de Tukey o mediante el test de Games-Howell en función de si se puede asumir o no la homocedasticidad de los datos.

Para determinar la correlación existente entre los valores de los diferentes parámetros analizados y la variable congelabilidad, por un lado, y los índices calculados de resistencia del acrosoma y del porcentaje de movilidad, con y sin cafeína, por otro, empleamos el coeficiente de correlación de Pearson o de Spearman, en función de si se cumple o no la premisa de normalidad en la distribución de los datos.

A la hora de realizar un modelo de regresión lineal incorporamos las variables de volumen, concentración, porcentaje de movilidad con y sin cafeína, integridad de membrana y de acrosoma, así como el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales. Se efectúa un análisis multivariante de regresión por el método denominado “por pasos”, determinando diferentes modelos en función del número de variables incorporadas, entre los cuales se opta por aquel que presente una mejor explicación de la varianza del índice de congelabilidad.

#### 3.7.1.2. Realización de pruebas hiposmóticas (HOST y ORT).

La evaluación funcional de las membranas, tanto plasmática como acrosómica, es una de las vías más eficaces para aproximarnos a la capacidad fecundante de un eyaculado en diversas especies (Nascimento *et al.*, 2001), de hecho, los test hiposmóticos se han utilizado ampliamente para determinar la calidad seminal en especies como la humana o la porcina.

Mediante el Test de Endósmosis o HOST (*Hypoosmotic Swelling Test*) se puede establecer la calidad de un determinado eyaculado, debido a la correlación directa que existe entre los espermatozoides que presentan un enrollamiento de la cola, como respuesta a un medio hiposmótico, y la fertilidad mostrada por el semen (Van Der Ven *et al.*, 1986). No obstante, esta correlación parece ser más elevada si se procede a valorar la integridad acrosómica tras una incubación en esas condiciones (Vázquez, 1980, Schilling *et al.*, 1986), por lo que el Test de Resistencia Osmótica, conocido como ORT (*Osmotic Resistance Test*), podría ser más determinante en la selección de eyaculados. Schilling *et al.* (1984) propusieron el ORT como método alternativo a las pruebas que se estaban empleando para realizar la valoración convencional del semen fresco, ya que éstas se encontraban lejos de predecir con fiabilidad la calidad del semen, tanto tras un almacenamiento prolongado en refrigeración, como tras el proceso de congelación/descongelación.

Por ello, nos propusimos realizar este experimento, en el que sometimos a los 40 eyaculados

al test HOST y al ORT, con el objetivo principal de comprobar la respuesta de éstos y así poder determinar la importancia de ambas pruebas en la predicción de la aptitud para la congelación de un determinado eyaculado. Por otra parte, procedimos a estudiar la relación existente entre el HOST y el ORT y, a su vez, a determinar la influencia del tiempo de incubación en la respuesta de los espermatozoides a ambas pruebas.

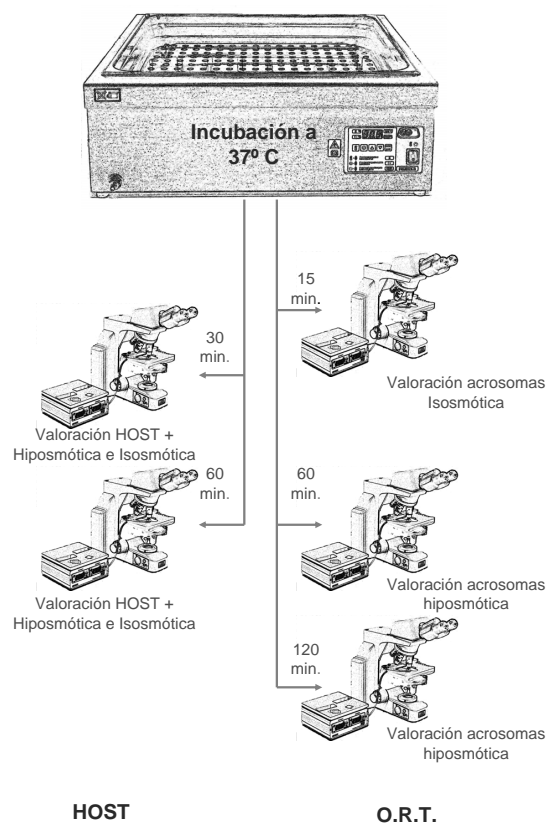
Para la realización del Test de Endósmosis (HOST) se utiliza el método descrito por Vázquez *et al.* (1997), basado en la técnica desarrollada por Jeyendran *et al.* (1984) para la especie humana. Para ello, se emplean dos soluciones preparadas con fructosa y con citrato sódico en agua destilada a 300 mOsm/kg, que son mezcladas a proporciones iguales para obtener una solución isosmótica (tabla 3.6), a partir de la cual, mediante la adición de más agua destilada, se obtiene una solución hiposmótica (100 mOsm/kg); de ambas se forman alícuotas de 900  $\mu$ l, que son almacenadas a -20 °C en microtubos eppendorf de 1,5 ml hasta el momento de su utilización, momento en el que, previa descongelación, van a permanecer a 37 °C. Recogemos cuatro muestras de 100  $\mu$ l del eyaculado y diluimos dos de ellas, en sendos microtubos que contienen 900  $\mu$ l de solución hiposmótica (100 mOsm/Kg) y las otras dos en otros dos microtubos con 900  $\mu$ l de solución isosmótica (300 mOsm/Kg). A continuación, se sumergen todos ellos en un baño termostático a 37 °C. A los 30 minutos de incubación se extraen dos microtubos, uno de cada solución y, tras fijar las muestras con una gota de glutaraldehído al 2 % (tabla 3.3), se depositan 15  $\mu$ l entre un portaobjetos y un cubreobjetos, procediendo a valorarlas, con ayuda de un microscopio óptico de contraste de fases a 400 aumentos; este análisis se realiza mediante el cómputo de un total de 400 espermatozoides por muestra (200 por valoración), estableciendo el porcentaje de espermatozoides positivos a la prueba de HOST, que serán aquellos que, por poseer una membrana bioquímicamente activa, presenten un enrollamiento en la cola, debido a la entrada de agua en la célula, lo que se considera indicativo de integridad funcional de la membrana plasmática (Vázquez *et al.*, 1997). Una vez obtenidos los resultados de ambas muestras, se procede a realizar la necesaria corrección, descontando del número de espermatozoides positivos de la muestra hiposmótica, los que se contabilizaron en la muestra isosmótica (muestra control). La valoración de las muestras alojadas en los otros dos microtubos se realiza del mismo modo, pero tras una incubación de 60 minutos a 37 °C (figura 3.7).

Para realizar el Test de Resistencia Osmótica (ORT) se emplea el método utilizado por Rodríguez-Gil y Rigau (1995) basado en el test de Schilling *et al.* (1984). Las soluciones empleadas fueron realizadas a base de citrato de sodio y agua destilada ajustando a 300 mOsm/kg la isosmótica (tabla 3.7) y a 100 mOsm/kg la hiposmótica (tabla 3.8); de ambas se realizan alícuotas de 900  $\mu$ l que se almacenan a -20 °C hasta el momento de su utilización, para lo que se descongelan y se atemperan a 37 °C. Para la realización de la prueba procedemos de forma similar a la descrita en el HOST, tomando tres muestras de 100  $\mu$ l del semen llegado al laboratorio y diluyendo dos de ellas, cada una en un microtubo eppendorf con 900  $\mu$ l de la solución hiposmótica (100 mOsm/Kg) y la tercera en otro microtubo con 900  $\mu$ l de la solución isosmótica (300 mOsm/Kg); acto seguido, se sumergen en un baño termostático a 37 °C. A los 15 minutos se procede a interrumpir la incubación de la muestra isosmótica y, tras realizar la



fijación de la misma con una gota de la solución de glutaraldehído al 2 %, se valora el estado del acrosoma de un total de 200 espermatozoides (100 por valoración), con ayuda de un microscopio óptico de contraste de fases a 1000 aumentos. A continuación, se realiza la valoración de las dos muestras hiposmóticas interrumpiendo la incubación a los 60 minutos en una y a los 120 en la otra (figura 3.7). El valor del ORT es calculado para ambos tiempos de incubación empleando la siguiente fórmula, descrita por Sánchez (1991), en la que *INAR* son los acrosomas íntegros presentes en el medio isosmótico y *HNAR* los del medio hiposmótico:

$$ORT(\%) = \frac{(\%INAR + \%HNAR)}{2}$$



**Figura 3.7:** Representación esquemática de las pruebas de estrés osmótico realizadas.

**Análisis estadístico.** Todos los conjuntos de datos obtenidos, tanto en el total de los mismos como en los parciales analizados por raza o verraco, cumplen la premisa de normalidad, por lo que se procede a realizar un t-test para muestras relacionadas, a fin de determinar si existen diferencias en los valores obtenidos entre los diferentes tiempos de incubación de cada prueba.

En la búsqueda de posibles variaciones en la respuesta entre razas y entre verracos recurrimos a un t-test para muestras independientes en el primer caso y a un ANOVA de un factor en el segundo, determinando, en este último, mediante el test Games-Howell, qué verracos muestran diferencias entre ellos en las distintas pruebas.

La comparación de los resultados obtenidos para cada grupo de calidad establecido en función de la aptitud para la congelación de cada eyaculado, se realiza por medio de un ANOVA de un factor, estableciendo el lugar donde aparecen las diferencias entre los grupos mediante el test de Games-Howell para las dos pruebas del HOST y mediante el test HSD de Tukey para las dos pruebas del ORT, debido a que sólo en estas últimas se puede asumir la homocedasticidad de los datos.

La correlación entre los diferentes tiempos de incubación de cada prueba (HOST y ORT) y entre los valores obtenidos en ambas, tras una incubación de 60 minutos a 37 °C, se expresa mediante el coeficiente de correlación de Pearson, que también se utiliza para establecer la correlación existente entre los dos tiempos de incubación de cada prueba y los índices de congelabilidad y de resistencia al proceso de criopreservación, tanto del acrosoma como del porcentaje de movilidad, con y sin cafeína.

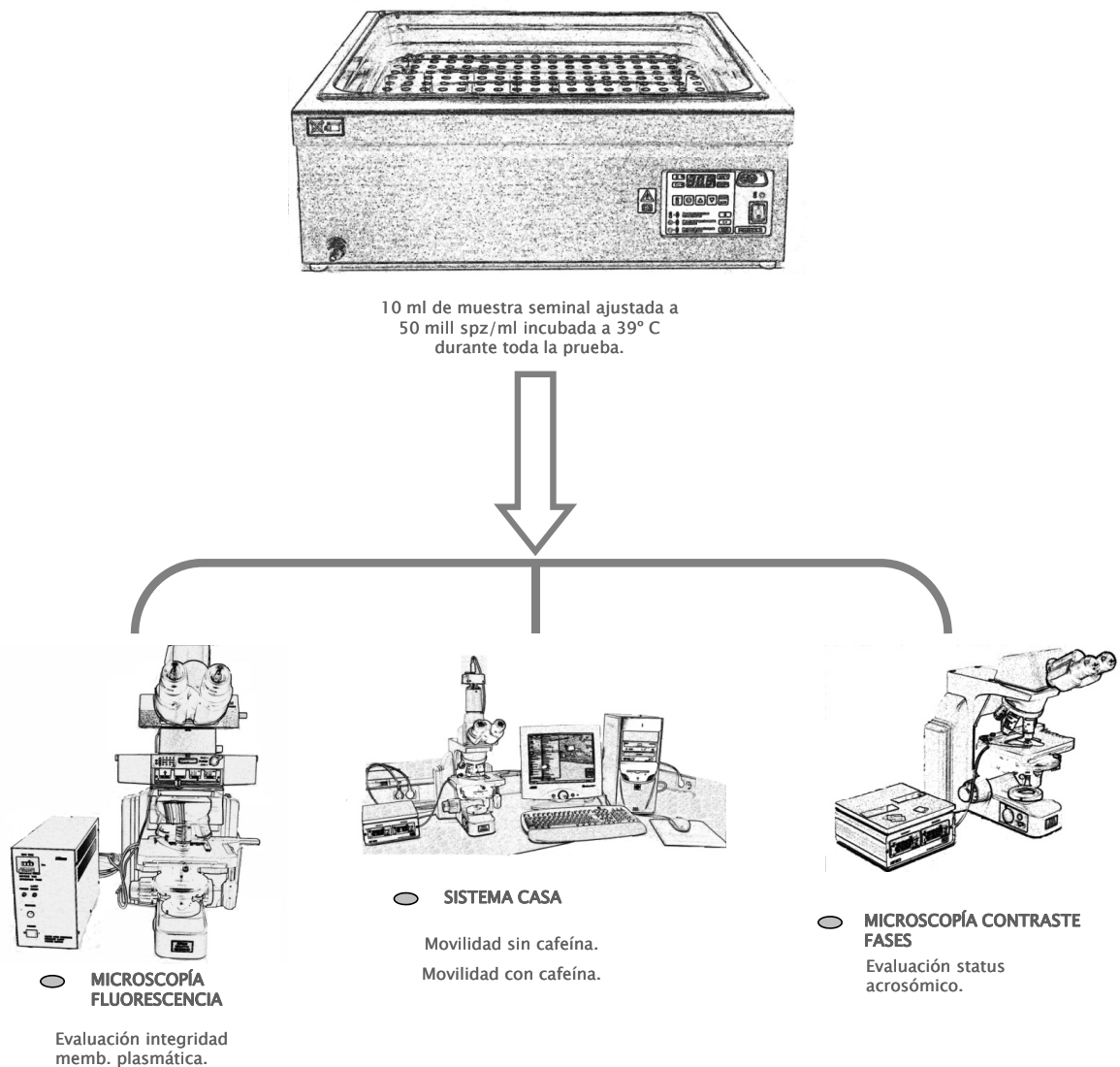
Finalmente, realizamos el análisis multivariante de regresión por pasos para el índice de congelabilidad, al cual incorporamos las cuatro variables resultantes de las pruebas de estrés osmótico para establecer el modelo de regresión más apropiado.

#### **3.7.1.3. Evaluación de la resistencia de las células espermáticas a un estrés por calor (termorresistencia).**

La realización de un test de estrés térmico al semen fue concebida para medir la capacidad de supervivencia de los espermatozoides en el tracto reproductivo femenino (King y MacPherson, 1967; Fiser *et al.*, 1991) y, de esta forma, intentar acercarse a una predicción más fiable sobre su capacidad fecundante. Dicha técnica ha sido utilizada por varios autores (Kozumplík y Sosnová, 1985; Kozumplík y Roubal, 1990; Tardif *et al.*, 1999), tanto en semen fresco como en descongelado, como paso previo a la valoración de los parámetros convencionales del semen, tales como movilidad total, movilidad progresiva, prueba de endósmosis, vitalidad, integridad acrosómica..., obteniendo, en muchas de estas valoraciones, una mayor correlación con la fertilidad que en los casos en los que no se ha realizado. En concreto, Fiser *et al.* (1991) determinaron que la realización de un test de termorresistencia al semen descongelado de porcino sacaba a la luz daños tenues en las membranas de los espermatozoides, acaecidos en el proceso de la congelación que, de otra manera, no se detectaban.

Con base en esto, el objetivo principal de este experimento fue determinar la eficacia del estrés por calor en la predicción de la capacidad de congelación de los diferentes eyaculados, mediante el análisis de la evolución de la movilidad (con y sin adición de cafeína) y de la integridad de las membranas plasmática y acrosómica a lo largo de 7 horas de incubación a 39 °C. Para ello, realizamos, a partir de los 40 eyaculados, alícuotas de 10 ml diluídas en MR-A con una concentración de 50 millones de spz/ml en tubos falcon de 15 ml, que se sumergen en un baño termostático a esa temperatura. La valoración seminal de cada uno de los cuatro parámetros citados se realiza, con 250  $\mu$ l de muestra, dentro de esas 7 horas en cuatro etapas: a la hora y

media de empezar la incubación a 39 °C (T1,5), a las tres horas (T3), a las cuatro horas y media (T4,5) y a las siete horas (T7) [figura 3.8].



**Figura 3.8:** Representación esquemática de la prueba de termorresistencia.

**Análisis estadístico.** Con el objetivo de determinar las posibles variaciones, para los cuatro parámetros analizados, entre las diferentes etapas establecidas en la termorresistencia, procedemos a realizar el test de Friedman entre ellas. En los casos en los que se observan diferencias significativas, se realizan comparaciones dos a dos, mediante la prueba de Wilcoxon, para determinar en qué puntos aparecen dichas diferencias. De la misma forma, se trata de analizar por raza y por verraco el mismo efecto, mediante un análisis de la varianza de un factor, realizando a continuación las comparaciones entre los grupos mediante un t-test para muestras relacionadas.

Para establecer las diferencias en el comportamiento de ambas razas o de los distintos verracos empleamos, respectivamente, un t-test para muestras independientes o un ANOVA de

un factor, procediendo, mediante el test HSD de Tukey o el de Games-Howell, a determinar los puntos donde aparecían éstas. Se emplea un t-test para muestras relacionadas a fin de establecer posibles diferencias entre el porcentaje de movilidad de las muestras incubadas con cafeína y aquellas que se incubaron sin el citado estimulante.

Para analizar el comportamiento de los grupos de calidad en la congelación estipulados y determinar posibles diferencias entre ellos empleamos un ANOVA de un factor seguido de un test HSD de Tukey, debido a la condición de normalidad y homocedasticidad de los diferentes datos analizados.

El cálculo del coeficiente de correlación entre los cuatro parámetros analizados a lo largo de la incubación a 39 °C (integridad de la membrana plasmática, integridad del acrosoma y porcentaje de movilidad, con y sin cafeína) y los índices de resistencia a la criopreservación establecidos, se realiza mediante los índices de correlación de Pearson o de Sperman; y, de igual forma que en apartados anteriores, recurrimos al análisis multivariante de regresión por pasos para establecer los modelos de regresión más apropiados en cada uno de los tiempos empleados para la valoración de las muestras.

#### **3.7.1.4. Evaluación de la resistencia de las células espermáticas a un choque *a frigore*.**

En la mayoría de los mamíferos, el sometimiento de las muestras seminales a un descenso brusco de temperatura, a niveles en torno a 0 °C, provoca cambios irreversibles en la fisiología y morfología de los espermatozoides (Watson y Plummer, 1985; De Leeuw *et al.*, 1990b; White, 1993). La susceptibilidad de éstos a un choque *a frigore* varía con la especie, siendo los espermatozoides de verraco, como ya hemos indicado, especialmente sensibles, debido sobre todo a la composición de sus membranas. Durante el proceso de criopreservación también se observa una reducción ostensible en la integridad de las membranas plasmática y acrosómica, y aunque al descenso de temperatura producido antes de la congelación se le atribuye una sustancial parte de los cambios acaecidos en ellas (Maxwell y Johnson, 1997b), existen además otros factores que van a incidir en este proceso.

El objetivo principal de este experimento es, de forma similar a las pruebas anteriores, determinar la eficacia de la resistencia de los espermatozoides al choque *a frigore* en la predicción de su viabilidad posdescongelado. Para ello, a partir de los 40 eyaculados mencionados, preparamos en tubos falcon de 15 ml con fondo cónico, alícuotas de 10 ml ajustadas a una concentración de 50 millones de spz/ml, mediante la dilución del semen en MR-A, que son almacenadas durante toda la prueba a una temperatura de 20 °C en una nevera termoajustable DTC-17<sup>27</sup>. A partir de los 10 minutos de permanencia en la citada nevera, tiempo necesario para unificar la temperatura de inicio para todas las muestras, se realizan 5 choques *a frigore*: choque a los 10 minutos de la incubación (S0), a la hora (S1), a las 2 horas (S2), a las 3 horas (S3) y a las 5 horas de incubación

---

<sup>27</sup>Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania.

(S5). Para la realización de los mismos se procede de la siguiente manera: se toma 1 ml de la muestra seminal y se deposita en un microtubo eppendorf de 1,5 ml, acto seguido se sumerge en una solución compuesta por agua y etanol a una temperatura constante de 0 °C y permanece en ella durante 5 minutos, transcurridos los cuales se retira, derivando 250  $\mu$ l para la valoración de la movilidad espermática sin cafeína y otros 250  $\mu$ l para la valoración con incubación previa en una solución 0,1 M de la citada sustancia. Los 500  $\mu$ l restantes se reparten equitativamente para la valoración de la integridad de la membrana plasmática y acrosómica (figura 3.9).

El segundo objetivo de esta prueba es determinar la evolución de la resistencia espermática a lo largo del tiempo de incubación a 20 °C en los cuatro parámetros mencionados: el porcentaje de movilidad (con y sin cafeína), la integridad de la membrana plasmática y la del acrosoma.

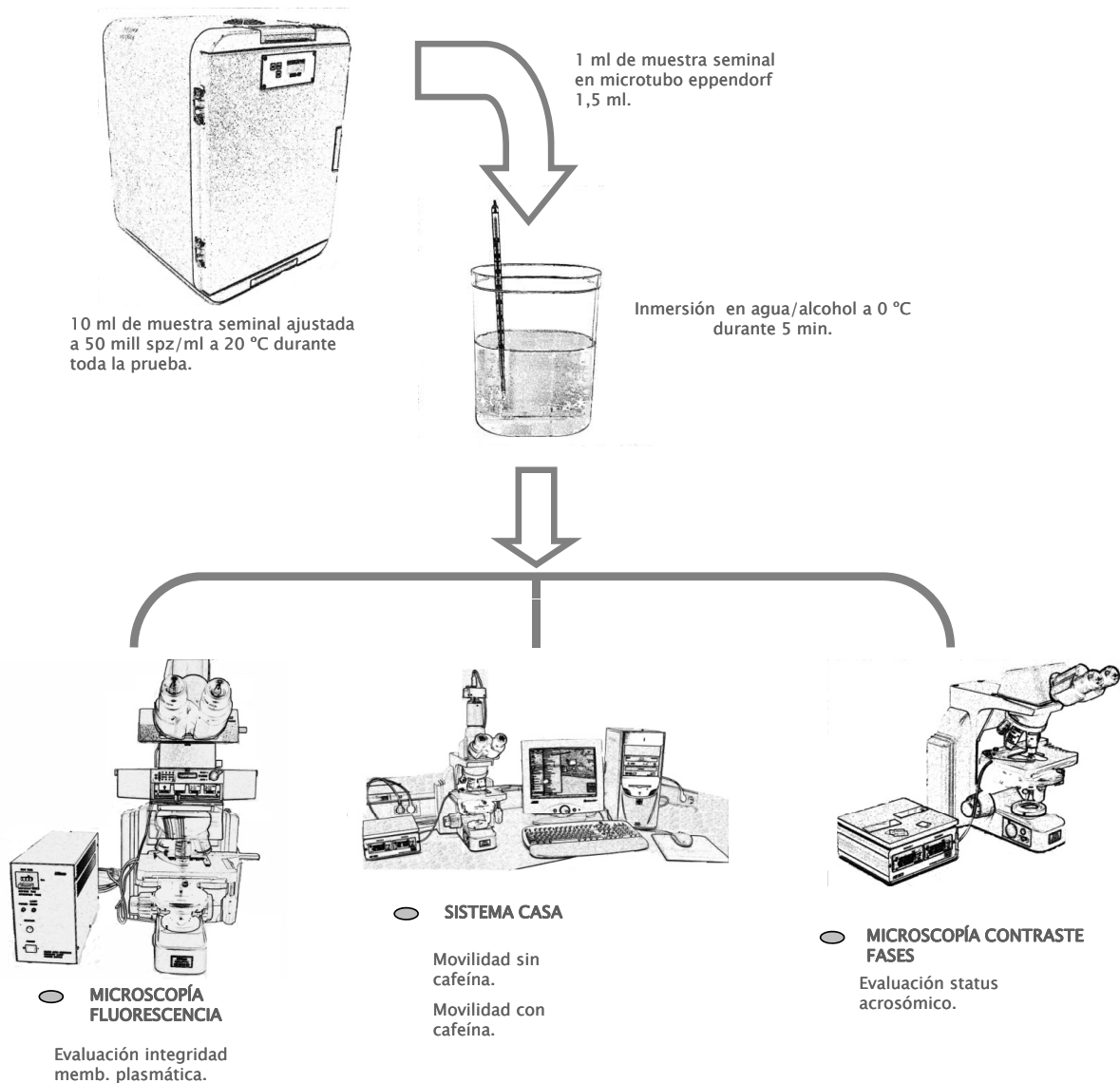


Figura 3.9: Representación esquemática de la prueba del choque a frigore.

**Análisis estadístico.** Para establecer si existen diferencias en cada uno de los parámetros analizados entre los diferentes tiempos de incubación utilizados, tanto para el total del conjunto de datos como para cada raza o para cada verraco en particular, realizamos un ANOVA de un factor, empleando, en caso de aparecer diferencias significativas, un t-test para muestras relacionadas en comparaciones pareadas entre tiempos. A la hora de determinar posibles diferencias en el comportamiento de ambas razas, realizamos un t-test para muestras independientes. Por medio de un ANOVA de un factor buscamos diferencias, para cada parámetro analizado, entre los verracos empleados en la prueba, procediéndose a determinar entre qué machos existen mediante el test de Games-Howell, dado que los conjuntos de datos no cumplen la condición de homocedasticidad. La búsqueda de variaciones entre los valores observados en el porcentaje de movilidad en las diferentes muestras, con o sin adición de cafeína, se efectúa mediante un t-test para muestras relacionadas.

Con el fin de determinar la influencia del grupo de calidad establecido empleamos de nuevo ANOVA de un factor, para cada uno de los parámetros, estableciendo posteriormente las diferencias entre ellos mediante el test HDS de Tukey o el de Games-Howell en función de la condición de homocedasticidad de los datos.

Para establecer el coeficiente de correlación entre los cuatro parámetros analizados tras cada choque y los índices calculados posdescongelación se emplea, en función de si los datos cumplen o no la premisa de normalidad, el índice de correlación de Pearson o de Spearman. Realizamos el análisis multivariante de regresión por pasos, incorporando los cuatro parámetros analizados en cada uno de los tiempos empleados en los diferentes choques, para determinar los modelos de regresión más apropiados para la variable congelabilidad.

#### **3.7.2. Experimento 2: Estudio cinético mediante un sistema de análisis computarizado de semen (CASA) y su importancia como indicador de la congelabilidad.**

La movilidad de los espermatozoides es uno de los parámetros más empleados en la valoración seminal y su patrón de movimiento está modulado por numerosos factores, bien extrínsecos, como la composición del medio externo (Serres *et al.*, 1984; Mortimer, 2000), o intrínsecos a la célula, como la estructura flagelar, la actividad enzimática de la dineína o el metabolismo celular, en particular la gestión del metabolismo energético (Rigau *et al.*, 2001). A partir de esta premisa, y suponiendo que la modificación de las condiciones del entorno de los mismos pudiera desencadenar variaciones en sus parámetros cinéticos, el objetivo de este experimento fue, en primer lugar, describir estos cambios, tanto tras el proceso de congelación/descongelación, como tras la realización de las pruebas de termorresistencia y del choque *a frigore* descritas con anterioridad. En segundo lugar, y como objetivo principal, se trató de determinar la relación de estas variaciones tras las citadas pruebas, con los resultados de supervivencia espermática después de la descongelación.

Este experimento consta de dos partes diferenciadas: el estudio de las variaciones observadas en los parámetros cinéticos analizados individualmente y el análisis de la distribución de las subpoblaciones cinéticas presentes en los eyaculados. Para ello, resulta imprescindible la utilización del sistema CASA, que nos permite realizar el estudio del movimiento de cada espermatozoide de forma individual.

En total se analizan los parámetros cinéticos de 75338 células, distribuyéndose, en las diferentes pruebas, de la siguiente forma:

	Precongelado (tiempo 0)	Posdescongelado	Total
Sin Cafeína	5185	5308	10493
Con Cafeína (1 mM)	5140	7718	12858
<b>Total</b>	10325	13026	23351

**Tabla 3.13:** Número de espermatozoides analizados antes y después del proceso de congelación/descongelación.

	Sin Cafeína	Con Cafeína (1 mM)	Total
<b>T1,5</b>	5061	5572	10633
<b>T3</b>	4966	5303	10269
<b>T4,5</b>	4112	5184	9296
<b>T7</b>	1856	4435	6291
<b>Total</b>	15995	20494	36489

**Tabla 3.14:** Número de espermatozoides analizados en la prueba de la termorresistencia.

	Sin Cafeína	Con Cafeína (1mM)	Total
<b>S0</b>	541	826	1367
<b>S1</b>	1113	1329	2442
<b>S2</b>	1560	1951	3511
<b>S3</b>	1803	2067	3870
<b>S5</b>	1952	2356	4308
<b>Total</b>	6969	8529	15498

**Tabla 3.15:** Número de espermatozoides analizados en la prueba del choque a frigore.

### 3.7.2.1. Descripción y análisis de los parámetros cinéticos de los espermatozoides.

En primer lugar, realizamos un análisis individualizado de los ocho parámetros calculados con la pretensión de caracterizar, a partir de ellos, el movimiento de los espermatozoides, tanto en semen recién extraído como en semen descongelado. Así mismo, determinamos las diferencias existentes entre uno y otro, para cada parámetro y, a su vez, entre las muestras incubadas con y sin cafeína, mediante el t-test para muestras relacionadas o el test de Wilcoxon. Además, se procede a realizar comparaciones entre las dos razas mediante los tests para muestras independientes (el t-test o el test de Mann-Whitney) y entre los ocho verracos utilizados en el experimento mediante un ANOVA de un factor o el test Kruskal-Wallis.

Posteriormente, y siguiendo la misma estructura que en el experimento anterior, procedemos a tratar de identificar posibles diferencias en los valores de los distintos parámetros, en ausencia o presencia de cafeína, a lo largo de los diversos puntos de toma de muestras, tanto en la prueba de la termorresistencia como en la del choque *a frigore*. Para ello procedemos a realizar un ANOVA de un factor o un test de Friedman en función de si se puede suponer una distribución normal para los datos o no. En caso de aparecer diferencias, se procede a realizar comparaciones pareadas mediante un t-test para muestras relacionadas o mediante un test de Wilcoxon. Estos mismos tests son los que se utilizan para determinar las posibles diferencias entre las muestras incubadas con y sin cafeína.

Así mismo, se emplean el t-test para muestras independientes o la prueba de Mann-Whitney para comprobar la existencia de diferencias en la respuesta de las dos razas empleadas, y un ANOVA de un factor o el test de Kruskal-Wallis para determinar si existen éstas en función del verraco utilizado.

La correlación existente, en los distintos tiempos y pruebas realizadas, entre los valores de los diversos parámetros y los índices posdescongelación determinados se efectúa nuevamente mediante los test de Pearson o de Spearman, en función del cumplimiento o no de la premisa de normalidad por parte de los diferentes grupos de datos. Por otro lado, el análisis multivariante de regresión para la congelabilidad se realiza de forma similar a la descrita con anterioridad para otros experimentos, incorporando como variables independientes el valor medio de los ocho parámetros cinéticos calculados por el sistema CASA, en semen fresco y en los diferentes tiempos de toma de muestras para la prueba de termorresistencia y para la del choque *a frigore*. En todos ellos, al calcular el modelo de regresión más apropiado y al establecer las correlaciones pertinentes, se diferencian los análisis en función de si las muestras han sido incubadas o no con cafeína.

#### 3.7.2.2. Identificación y distribución de subpoblaciones cinéticas.

Abaigar *et al.* (1999) determinaron que el comportamiento cinético de los espermatozoides no es homogéneo, por lo que resulta interesante realizar una clasificación de los diferentes espermatozoides encuadrándolos en subpoblaciones determinadas en función de sus características cinéticas. Para proceder a la identificación de estas subpoblaciones tuvimos que definir un procedimiento estadístico que nos permitiese agrupar a los diferentes espermatozoides en función de los parámetros determinados por el sistema ISAS<sup>®</sup>. Para ello utilizamos los datos obtenidos del movimiento espermático, sin incubación con cafeína a tiempo cero (T0), y así comprobar la variación resultante en las diferentes pruebas: la adición del citado estimulante, el proceso de crioconservación, la prueba de termorresistencia y la de los diferentes choques *a frigore*.

Para el desarrollo del procedimiento estadístico aplicamos las funciones programadas por Ciampi *et al.* (2007) bajo el entorno estadístico R. Este procedimiento se caracteriza por no asumir *a priori* que los datos recogidos sigan algún modelo de distribución en particular y realiza una clasificación no supervisada o de *clusters* en dos etapas:



- 1ª etapa: Su objetivo es la obtención de una clasificación previa de los datos, empleando el algoritmo *K-means* (MacQueen, 1967) con el fin de reducir la cardinalidad del conjunto de datos, y que así nos permita construir un árbol jerárquico en un etapa posterior; como resultado de esta primera etapa obtuvimos una clasificación previa de los datos, organizándose éstos en cuarenta “bins” o *pre-clusters*.
- 2ª etapa: Clasificación jerárquica aglomerativa (HAC); el segundo paso del enfoque adoptado utiliza los *bins* obtenidos en la etapa anterior empleándolos como elementos a partir de los cuales se construye el árbol jerárquico aglomerativo.

A partir de este punto se emplearon técnicas de análisis discriminante (clasificación supervisada) para poder verificar la bondad de los resultados obtenidos. Para ello, mediante el índice de Fowlkes-Mallows (Fowlkes y Mallows, 1983), y a partir de la comparación entre la asignación de clases realizada en el análisis cluster y la predicción de clases realizada por el análisis discriminante, bien lineal (LDA) o cuadrático (QDA), se valoró en qué medida los resultados obtenidos con el análisis cluster son reproducibles con fidelidad mediante el análisis discriminante.

Una vez corroborada la validez del método, se determinó el número de subpoblaciones idóneo para clasificar los datos, que resultó ser tres, y empleamos las características de las mismas para encuadrar los valores recogidos en las diferentes pruebas.

En la comparación del tamaño de cada subpoblación, tanto en presencia como en ausencia de cafeína, en los diferentes puntos de toma de valores de las pruebas de termorresistencia y de choque *a frigore*, se emplea el test de Friedman. Posteriormente, si la prueba anterior detecta diferencias significativas entre los tiempos, se procede a realizar comparaciones pareadas entre ellos mediante un t-test de muestras relacionadas o un test de Wilcoxon en función de si los datos siguen una distribución normal o no. Estos últimos tests son los que se emplean a su vez para comprobar la variación producida en la prueba de congelación/descongelación.

Dentro de cada punto de toma de muestras y de forma independiente para los supuestos con y sin presencia de cafeína, se determinan, por un lado, las diferencias existentes en el tamaño subpoblacional entre razas mediante el test de Mann-Whitney o el t-test para muestras independientes y, por otro lado, entre los diferentes verracos empleados en el estudio mediante el test de Kruskal-Wallis. A su vez, también se comprueba, en cada tiempo, la existencia de posibles diferencias entre el tamaño subpoblacional de las muestras que son incubadas con cafeína y aquellas en que no es así mediante el test de Wilcoxon o el t-test para muestras relacionadas.

Tanto el análisis del coeficiente de correlación como el cálculo del modelo de regresión para la congelabilidad se efectúan de igual forma que en el apartado anterior, referido a los parámetros cinéticos individuales, utilizando en este caso el tamaño calculado para las diferentes subpoblaciones en cada momento.

### 3.7.3. Experimento 3: Estudio de la resistencia al choque *a frigore*.

El estudio de la resistencia espermática al choque *a frigore* se realizó con la intención de ahondar en aquellos aspectos que pueden modificarla, para lo cual procedimos a desarrollar tres pruebas: en las dos primeras se pretende arrojar algo más de luz sobre la influencia de la maduración espermática, el plasma seminal y el diluyente comercial empleado en la dilución de las muestras, y con la tercera se busca determinar la influencia del tiempo de incubación previo sobre la supervivencia espermática a la criopreservación.

#### 3.7.3.1. Influencia de la inmadurez espermática en la resistencia celular al choque *a frigore*.

Ya en 1944, Lasley y Bogart observaron que aquellos espermatozoides extraídos directamente del epidídimo del verraco eran menos susceptibles al choque *a frigore*, y de forma similar ocurre en los espermatozoides de toro y de morueco (Watson, 1981a). La menor resistencia de los espermatozoides eyaculados podría deberse a cambios en la composición lipídica de la membrana plasmática que tienen lugar en la maduración espermática durante su estancia en el epidídimo, cambios que producirían una mayor susceptibilidad del espermatozoide al frío (White, 1993; Simpson *et al.*, 1987; Watson y Plummer, 1985). Por otro lado, en el recorrido a lo largo del epidídimo, también se produce el traslado de la gota citoplasmática (GC) de la región del cuello al anillo de Jensen, e incluso su liberación (Sancho *et al.*, 2004; Bassols *et al.*, 2005), por lo que cuando en los eyaculados se observan espermatozoides con gotas citoplasmáticas en su estructura, se considera un indicador de inmadurez en la mayoría de las ocasiones, aunque se desconoce si la permanencia de la GC está directamente relacionada con la ausencia de los citados cambios en la composición de la membrana.

Teniendo en cuenta estas apreciaciones, los propósitos de esta prueba son:

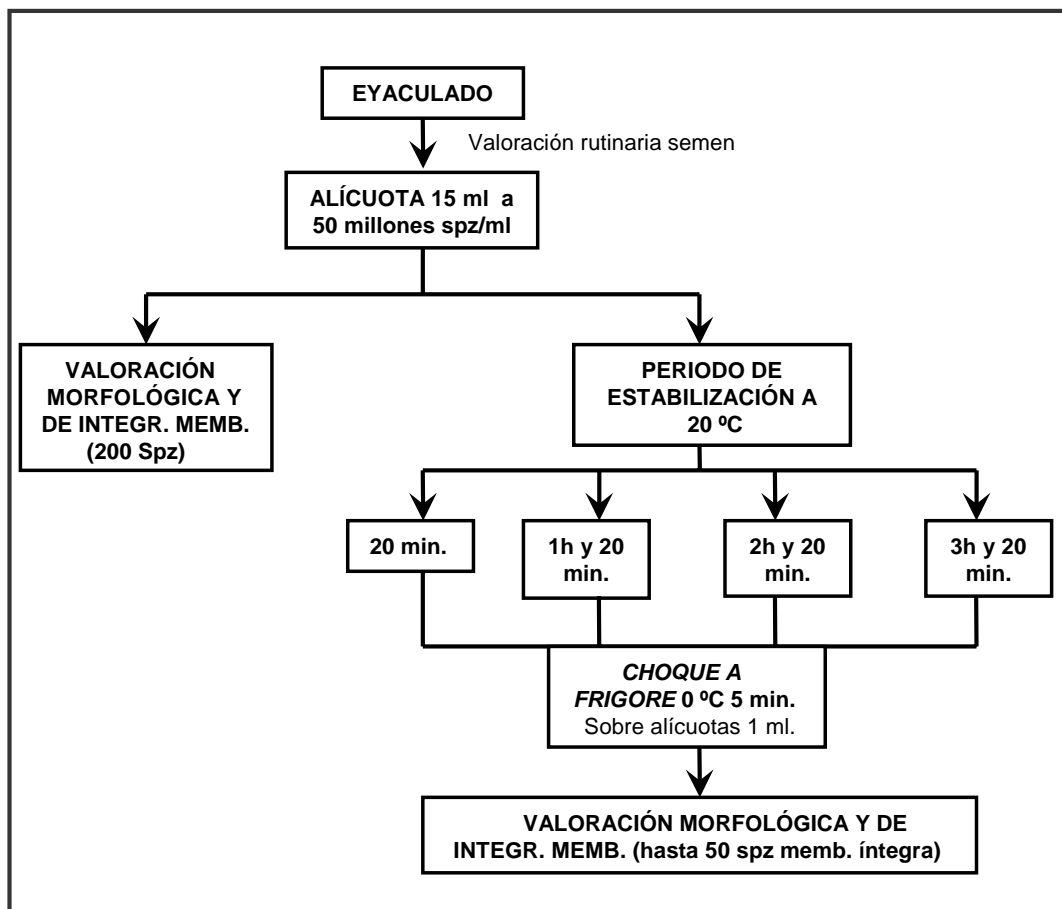
- Comprobar si aquellos espermatozoides que mantienen la GC son menos susceptibles a un descenso brusco de temperatura.
- Determinar si existe una mayor o menor resistencia en función de la región del espermatozoide en la que se localice la GC.
- Establecer si la evolución de la resistencia al choque *a frigore* a lo largo de la incubación previa se produce de forma similar en los espermatozoides que presentan la GC en su estructura y en aquellos en que no es así.

Para determinar la influencia del estado de inmadurez espermática, se utiliza la fracción rica de 6 eyaculados de diferentes verracos tomados al azar de entre un total de 150 presentes en CENTROTEC S.A. Se diluye una fracción de los eyaculados en MR-A, ajustando a una concentración final de 50 millones spz/ml, para posteriormente incubar la solución espermática a 20 °C durante 4 horas en tubos falcon de 15 ml y fondo cónico. Una vez transcurridos los primeros diez minutos a la citada temperatura, se analiza la integridad de la membrana plasmática mediante

la utilización de la tinción fluorescente combinada de yoduro de propidio y diacetato de carboxifluoresceína (Harrison y Vickers, 1990), ya descrita, clasificando 200 espermatozoides en dos clases, membrana íntegra y membrana dañada, y a su vez, determinando la morfología celular de los diferentes espermatozoides para encuadrar porcentualmente los resultados en seis categorías:

- Morfológicamente normales.
- Presencia de gota citoplasmática proximal (GCP).
- Presencia de gota citoplasmática distal (GCD).
- Alteración de cabeza.
- Alteración de cola.
- Alteración de cola con presencia de GCD.

A continuación, se preparan en microtubos eppendorf de 1,5 ml alícuotas de 1 ml y se sumergen en una solución formada por agua y etanol a 0 °C durante cinco minutos, una vez que han transcurrido diferentes tiempos de incubación a 20 °C: tras 20 minutos (S0), y después de una (S1), dos (S2) y tres horas (S3) desde la primera inmersión. Una vez realizado cada uno de los choques *a frigore*, se analiza la morfología de 50 espermatozoides que presenten la membrana plasmática íntegra y se procede a analizar los resultados. En la figura 3.10 se representa esquemáticamente el proceso que se lleva a cabo en esta prueba.



**Figura 3.10:** Representación esquemática de la prueba realizada para la determinación de la resistencia de los espermatozoides con GC al choque a frigore.

**Análisis Estadístico.** Como los diversos grupos de datos de que disponemos para comparar en este experimento no cumplen la condición de normalidad tras la realización de la prueba de Shapiro-Wilk, para la determinación de si existen variaciones o no en la distribución de las diversas categorías morfológicas tras la realización de los distintos choques, realizamos el test de Friedman, determinando posteriormente, cuando existieron diferencias significativas dentro de los grupos, mediante la prueba de Wilcoxon, la existencia de posibles diferencias entre cada uno de los tiempos de incubación.

### 3.7.3.2. Efecto del diluyente comercial y de la presencia de plasma seminal en la resistencia al choque *a frigore*.

En esta prueba se estudia el efecto que ejerce la presencia del plasma seminal, durante el tiempo de la incubación y en el mismo momento del choque, en la variación de la resistencia espermática, tanto a nivel de la membrana plasmática como del acrosoma, una vez que son sometidas las muestras a un descenso brusco de temperatura. Paralelamente, se pretende también determinar la influencia que puede ejercer el tipo de diluyente comercial empleado para la dilución del semen en la susceptibilidad al choque *a frigore*.

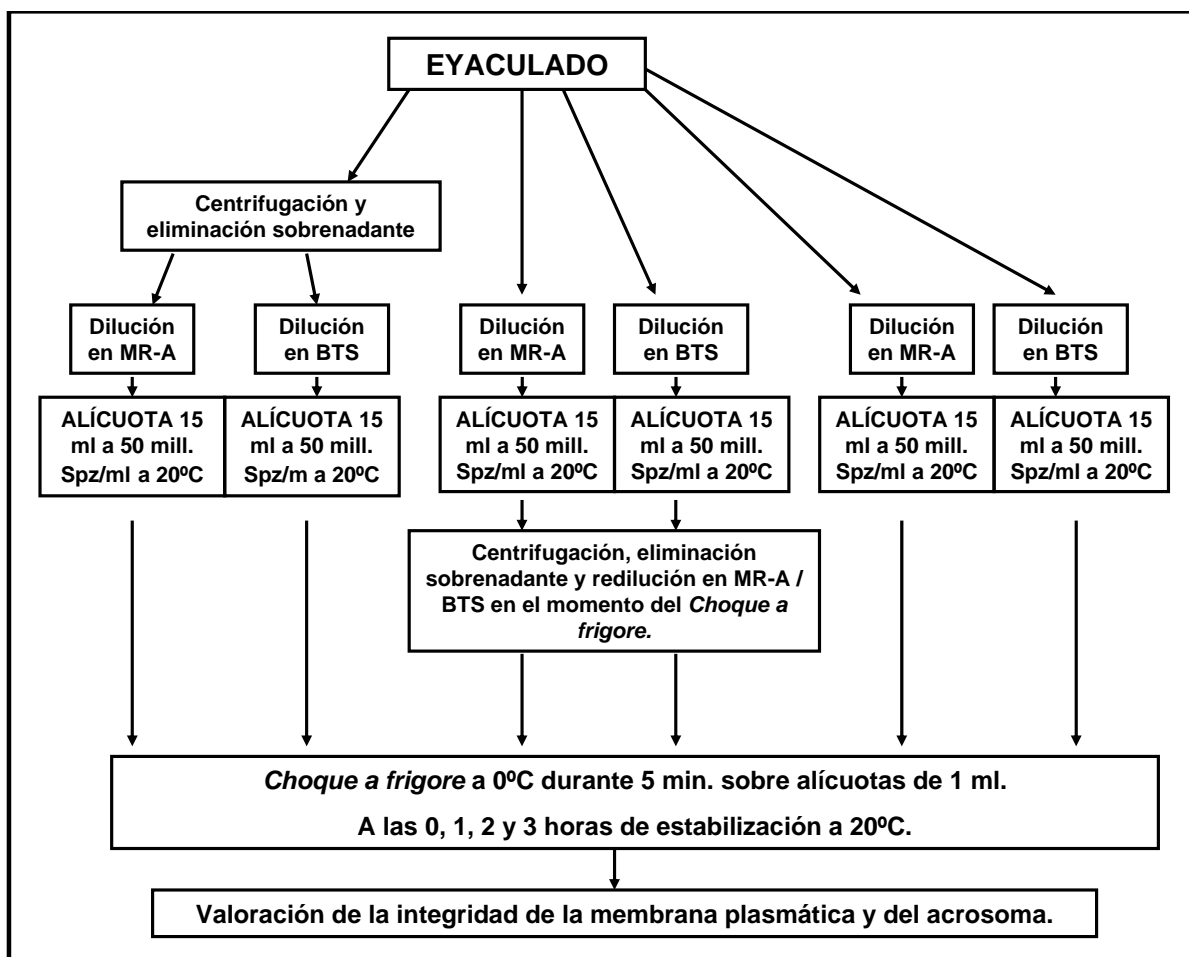
Para ello, se utiliza la fracción rica de 16 eyaculados procedentes de otros tantos verracos, tomados al azar, de un total de 150 animales presentes en CENTROTEC S.A. Se emplea el mismo método de recogida seminal descrito con anterioridad (pág. 88), con la excepción de que ésta se realiza directamente y no sobre diluyente comercial. Estos eyaculados, tras las valoraciones rutinarias pertinentes, se dividen en seis partes iguales en tubos falcon de 15 ml, formando 3 grupos:

- “Grupo Centrifugación Inicial” (CI): corresponde a dos de las seis muestras seminales, a las que se les retira el plasma seminal desde un primer momento, para lo cual, se centrifugan a 800g durante 10 minutos y, tras eliminar el sobrenadante, se rediluyen, ajustando la concentración a 50 millones spz/ml, una en diluyente MR-A y otra en BTS.
- “Grupo Centrifugación en el Momento” (CMto): formado por otras dos muestras a las que se les va a eliminar el plasma seminal mediante el mismo procedimiento que en el grupo anterior, pero en este caso solamente en el instante antes de realizar el choque *a frigore*. Hasta ese momento permanecen diluidas en esos dos diluyentes comerciales, a la misma concentración que el grupo anterior.
- “Grupo Sin Centrifugar” (SC): formado por las dos muestras seminales restantes, que van a permanecer en contacto con el plasma seminal durante toda la prueba, incluyendo el momento del choque *a frigore*. Éstas también permanecen diluidas a la concentración indicada, en ambos diluyentes comerciales.

Las seis muestras se almacenan, desde el momento de su dilución, en una nevera ajustada a 20 °C, de la que se extraen alícuotas de un mililitro para ser sometidas al choque *a frigore* en

cuatro tiempos diferentes: en el mismo momento en el que se separaron las muestras en grupos (S0), a la hora (S1), a las dos (S2) y a las tres horas de incubación (S3) a la citada temperatura.

En el grupo CMto, 10 minutos antes de la realización de cada choque, se procede a recoger una alícuota de tres mililitros de las muestras diluidas en cada uno de los diluyentes y, tras realizar la centrifugación en una centrifuga atemperada a 20 °C para que no haya ninguna variación térmica, se procede a la eliminación del sobrenadante y la redilución posterior de la misma manera que en el grupo CI. De estas nuevas muestras seminales rediluidas se extraen las alícuotas de 1 ml que, junto con las otras cuatro obtenidas de los otros dos grupos, se sumergen en una solución de agua y etanol a 0 °C durante 5 minutos. A continuación, se procede a la valoración del porcentaje de integridad de la membrana plasmática y del acrosoma mediante las técnicas ya descritas, contabilizando un total de 200 células por valoración y muestra. La figura 3.11 representa esquemáticamente el procedimiento seguido en esta prueba.



**Figura 3.11:** Representación esquemática de la prueba realizada para la determinación de la influencia del diluyente comercial y del plasma seminal en la resistencia espermática al choque a frigore.

**Análisis estadístico.** Tras la comprobación de que todos los conjuntos de datos cumplen las premisas de normalidad y homocedasticidad, realizamos modelos factoriales de análisis de la

varianza (ANOVA factorial) para evaluar el efecto individual y conjunto, tanto del diluyente como del momento en el que se priva a las muestras del contacto con el plasma seminal, sobre la integridad de la membrana plasmática y la del acrosoma, tras los choques *a frigore*. Si alguno de los estadísticos F asociados a los efectos principales resulta significativo, procedemos a emplear el test de Tukey para determinar dónde se encuentran las diferencias entre grupos. Para la identificación de posibles diferencias entre ambos diluyentes utilizamos un t-test para muestras relacionadas y recurrimos a un ANOVA de un factor para tratar de identificar, en cada uno de los grupos mencionados, diferencias entre los valores medios recogidos tras los diferentes choques, determinando con posterioridad, entre qué tiempos aparecen éstas mediante un t-test para muestras relacionadas.

#### **3.7.3.3. Influencia del tiempo de incubación previo sobre la congelabilidad espermática.**

Habida cuenta de que el tiempo de incubación previo puede modificar la resistencia espermática al choque *a frigore*, procedimos a valorar la influencia del mismo en la supervivencia espermática posdescongelación, para lo cual efectuamos modificaciones en el protocolo de congelación habitual, incrementando dicho tiempo.

Para realizar esta prueba utilizamos la fracción rica de ocho eyaculados procedentes de ocho animales diferentes tomados al azar del total de verracos presentes en CENTROTEC S.A., todos ellos con valoraciones por encima de los criterios de calidad establecidos anteriormente para aceptar un eyaculado como apto para la congelación (pág. 90). Tras las valoraciones y su posterior dilución (1:2) en diluyente comercial MR-A, procedemos a separarlos en cuatro fracciones, depositando el mismo volumen de muestra seminal en cuatro vasos de precipitados de 200 ml, cuya abertura tapamos con parafilm. Una vez realizado esto, se continúa con el protocolo habitual descrito anteriormente (pág. 95), con la diferencia de que sólo una de las muestras (grupo control) permanece las 3 horas establecidas a 15 °C, mientras que cada uno de los otros tres grupos experimentales permanecen a dicha temperatura durante 6, 12 y 24 horas, respectivamente. A su vez, se realiza, transcurrido el tiempo de incubación establecido para cada grupo, un choque *a frigore*, en las mismas condiciones que los realizados hasta el momento en esta tesis doctoral; para ello, se prepara una alícuota de 1 ml en un microtubo eppendorf de 1,5 ml y se introduce, en la solución de agua y etanol a 0 °C durante 5 minutos. A continuación, se procede a valorar el estado de la membrana plasmática y de la vesícula acrosómica, así como el porcentaje total de movilidad espermática mediante un sistema CASA. Una vez realizada la congelación propiamente dicha, empleando la misma curva de descenso térmico especificada con anterioridad (pág. 97), se sumergen las pajuelas en nitrógeno líquido, permaneciendo en el tanque de almacenamiento durante 10 días hasta su descongelación, que se realiza sumergiéndolas en un baño termostático a 50 °C durante 12 segundos. Se descongelan tres pajuelas por cada eyaculado criopreservado y grupo, realizándose un *pool* heterospérmico mediante la dilución del contenido de las mismas en 15 ml de BTS en un tubo falcon. Acto seguido, se realiza la valoración de los mismos parámetros

descritos para el choque *a frigore*.

Los objetivos de esta prueba son:

- Comprobar la influencia del tiempo de incubación, a lo largo de las primeras 24 horas, en la resistencia espermática durante la realización del choque.
- Establecer si se produce una mayor resistencia al proceso de criopreservación cuando incrementamos el tiempo de incubación. Esto determinará la importancia del periodo de espera sobre el proceso de congelación y nos permitirá averiguar qué tiempo de los analizados es el idóneo para el protocolo de congelación.

**Análisis estadístico:** Todos los grupos de datos a comparar en este experimento cumplen las condiciones de normalidad tras la comprobación con la prueba de Shaphiro-Wilk. Para la valoración del incremento de la resistencia, tanto al choque *a frigore* como al proceso de congelación, a medida que transcurre el tiempo de incubación, se utiliza un ANOVA de un factor, a fin de determinar si existen diferencias entre los cuatro tiempos analizados. Cuando se obtienen diferencias significativas para alguno de los parámetros valorados, se procede a analizarlas mediante el t-test para muestras relacionadas, realizando contrastes pareados entre todos los tiempos de incubación determinados.





## Capítulo 4

# RESULTADOS



## 4.1. Análisis de las muestras descongeladas.

### 4.1.1. Valores obtenidos para los parámetros estudiados en las muestras descongeladas.

Los tres parámetros que se valoran tras la descongelación de las muestras seminales son la integridad de la membrana plasmática, la integridad de la vesícula acrosómica y el porcentaje de movilidad espermática, tanto en ausencia como en presencia de cafeína, mediante la utilización de un sistema de análisis computarizado de semen.

#### Integridad de la membrana plasmática.

La técnica fluorescente utilizada en la valoración de la integridad de la membrana plasmática revela dos clases de espermatozoides: los que presentan en la cabeza una intensa fluorescencia roja (yoduro de propidio) y aquellos que muestran en toda su estructura una fluorescencia de color verde (diacetato de carboxifluoresceína). La exclusión del IP del interior del espermatozoide se utiliza como indicador de integridad de membrana en todos aquellos espermatozoides que la presentan, apareciendo éstos con la coloración verde característica del DCF, mientras que su inclusión, y la consecuente presencia de fluorescencia roja en toda o en parte de la cabeza, se considera como alteración en la integridad de la membrana.

Los resultados de las diferentes descongelaciones muestran los siguientes valores de integridad de membrana plasmática:

% INTEGRIDAD DE MEMB. PLASMÁTICA EN MUESTRAS DESCONGELADAS													
		1ª CONGEL.		2ª CONGEL.		3ª CONGEL.		4ª CONGEL.		5ª CONGEL.		TOTAL	
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
VERRACO	G2552	48,00	2,83	38,00	,71	39,75	3,89	48,25	1,06	34,50	1,41	41,70	6,06
	G5223	52,75	1,06	64,25	3,18	48,75	1,06	47,50	,00	58,25	3,89	54,30	6,80
	G6328	67,75	3,18	54,00	5,66	62,00	2,83	61,75	1,06	65,50	3,54	62,20	5,60
	T475	58,75	1,77	58,00	8,49	62,50	3,54	63,25	,35	54,75	,35	59,45	4,53
	L437	29,50	6,36	38,25	1,06	36,75	,35	34,50	,71	36,00	1,41	35,00	3,87
	R3846	56,00	2,12	55,50	2,12	53,00	3,54	49,75	7,42	52,00	2,83	53,25	3,91
	R4052	61,75	3,18	63,00	,00	67,50	1,41	70,50	7,07	66,75	6,01	65,90	4,70
	R5487	69,50	2,12	70,75	1,06	71,00	1,41	58,50	,71	67,75	,35	67,50	4,99
	TOTAL	55,50	12,53	55,22	11,76	55,16	12,40	54,25	11,35	54,44	12,90	54,91	11,82

Tabla 4.1: Porcentaje de integridad de membrana obtenido en los eyaculados de los diferentes verracos tras el proceso de congelación/descongelación.

Los valores de los eyaculados oscilan entre un  $29,5 \pm 6,4$  % (L437[1<sup>a</sup>]<sup>1</sup>) y un  $71,0 \pm 1,4$  % (R5487[3<sup>a</sup>]) de espermatozoides con la membrana íntegra, obteniéndose una media del  $54,9 \pm 11,8$  %. Si bien no se observan diferencias significativas entre las dos razas analizadas (tabla 4.2), promediando valores similares tanto para la Landrace como para la Large White ( $55,4 \pm 13,8$  % y  $54,4 \pm 9,6$  %, respectivamente), sí se aprecian al analizar los valores obtenidos en cada verraco, diferencias que determinan la clasificación de los animales en tres subconjuntos homogéneos, en función de las medias obtenidas para cada uno de ellos, de forma que los verracos de cada subconjunto no presentan diferencias significativas entre sí, pero sí las muestran ( $p < 0,05$ ) con

<sup>1</sup>Entre corchetes queda indicado el número ordinal de la congelación.

aquellos verracos que no pertenecen al mismo subconjunto. En la tabla 4.3 queda reflejado que, de los ocho verracos utilizados, el L437 y el G2552 presentan, una vez realizada la descongelación pertinente, los porcentajes medios más bajos, mientras que los más altos corresponden al R5487 y al R4052.

		% INTEGR. DE LA MEMBR. PLASMÁTICA TRAS LA DESCONGELACIÓN			
		Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
RAZA	LW	54,41 <sup>a</sup>	9,57	34,50	67,75
	LD	55,41 <sup>a</sup>	13,80	29,50	71,00

**Tabla 4.2:** Integridad de la membrana plasmática tras la descongelación en función de la raza. Diferentes superíndices revelarían diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

VERRACO	N	Subconjunto para alfa = ,05		
		1	2	3
L437	5	35,00		
G2552	5	41,70		
R3846	5		53,25	
G5223	5		54,30	
T475	5		59,45	59,45
G6328	5		62,20	62,20
R4052	5			65,90
R5487	5			67,50
Sig.		,37	,09	,17

**Tabla 4.3:** Grupos homogéneos establecidos en función de las diferencias obtenidas en el porcentaje de integridad de membrana tras el descongelado.

La ausencia de un cierto verraco en un determinado subconjunto revela diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con los integrantes del mismo.

### Integridad de la membrana acrosómica.

Una vez realizada la descongelación de las muestras, procedemos a determinar los porcentajes de integridad acrosómica de cada uno de los eyaculados, empleando para ello el criterio utilizado por Pursel *et al.* (1972a). En la tabla 4.4 quedan reflejadas las oscilaciones observadas entre eyaculados, que van de un 4,0 % de la muestra del G2552 [3<sup>a</sup>] a un 51,0 % de la del R5487 [3<sup>a</sup>].

		% INTEGRIDAD DE MEMB. ACROSÓMICA EN MUESTRAS DESCONGELADAS											
		1ª CONGEL.		2ª CONGEL.		3ª CONGEL.		4ª CONGEL.		5ª CONGEL.		TOTAL	
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
VERRACO	G2552	32,50	13,44	10,00	3,54	4,00	1,41	16,00	1,41	4,50	,71	13,40	12,01
	G5223	17,50	6,36	27,50	3,54	20,00	7,07	15,50	3,54	25,00	7,07	21,00	6,46
	G6328	30,00	21,21	13,50	4,95	27,50	3,54	25,00	7,07	15,00	7,07	22,20	10,73
	T475	9,00	5,66	29,00	1,41	26,00	5,66	25,00	7,07	31,00	12,73	24,00	9,92
	L437	13,75	5,30	6,00	1,41	10,00	2,83	12,50	,71	5,00	,00	9,50	4,30
	R3846	20,00	,00	26,00	1,41	19,00	1,41	30,00	7,07	7,50	,00	20,50	8,42
	R4052	17,00	1,41	29,00	8,49	39,00	1,41	50,00	21,21	17,50	3,54	30,50	15,46
	R5487	50,00	14,14	47,50	10,61	51,00	1,41	50,00	7,07	46,50	3,54	49,00	6,72
TOTAL	23,75	14,99	23,56	13,50	24,56	14,88	27,94	15,80	19,00	14,77	23,76	14,62	

**Tabla 4.4:** Porcentaje de integridad del acrosoma obtenido en los eyaculados de los diferentes verracos tras el proceso de congelación/descongelación.

El valor medio calculado para todos los eyaculados es de un  $23,8 \pm 14,6$  %, siendo éste, claramente inferior al  $54,9 \pm 11,8$  % que presentan en la valoración de la integridad de la membrana plasmática.

El análisis estadístico tampoco revela en este caso diferencias significativas entre las dos razas evaluadas, aunque la raza Landrace presenta valores medios ligeramente más elevados que la Large White (tabla 4.5); donde sí aparecen éstas ( $p < 0,05$ ) es al realizar la comparación entre los porcentajes medios de acrosomas intactos mostrados por los diferentes verracos. En la tabla 4.6, podemos observar cómo el L437, al igual que sucedía al analizar la vitalidad de las muestras descongeladas, resulta ser el verraco que presenta un porcentaje de integridad del acrosoma inferior al resto de animales ( $9,5 \pm 3,9$  %); en el lado opuesto nos encontramos con el R5487 que, con un  $49,0 \pm 1,9$  %, muestra el valor medio más alto de los ocho verracos.

		% INTEGR. ACROSÓMICA TRAS LA DESCONGELACIÓN			
		Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
RAZA	LW	20,15 <sup>a</sup>	8,92	4,00	32,50
	LD	27,38 <sup>a</sup>	16,85	5,00	51,00

**Tabla 4.5:** Integridad de la membrana acrosómica tras la descongelación en función de la raza. Diferentes superíndices revelarían diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

		% INTEGRIDAD ACROSÓMICA TRAS LA DESCONGELACIÓN			
		Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
VERRACO	G2552	13,40 <sup>ab</sup>	11,73	4,00	32,50
	G5223	21,00 <sup>a</sup>	5,18	15,00	27,50
	G6328	22,20 <sup>a</sup>	7,49	13,50	30,00
	T475	24,00 <sup>a</sup>	8,72	9,00	31,00
	L437	9,50 <sup>b</sup>	3,94	5,00	14,00
	R3846	20,50 <sup>a</sup>	8,54	7,50	30,00
	R4052	30,50 <sup>ac</sup>	14,20	17,00	50,00
	R5487	49,00 <sup>c</sup>	1,90	46,50	51,00

**Tabla 4.6:** Integridad de la membrana acrosómica tras la descongelación en función del verraco. Diferentes superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### Movilidad espermática postdescongelación.

La tabla 4.7 muestra el porcentaje de espermatozoides móviles resultantes tras la descongelación de las muestras, tanto sin la estimulación con cafeína como con ella. Cuando se incuban sin la presencia de cafeína, los valores oscilan entre un 21,9 %, observado en el tercer eyaculado del G2552, y un 71,8 % del primer eyaculado del R5487, dejando un porcentaje medio total de un  $47,8 \pm 13,2$  %. Dichos resultados se incrementan de forma notable al incubar las muestras en una solución 1mM de cafeína, pasando a valores que oscilan entre el 43,8 % del L437 [4<sup>a</sup>] y el 84,5 % del R4052 [5<sup>a</sup>] y con un porcentaje medio significativamente más alto ( $p < 0,01$ ), de un  $68,6 \pm 10,8$  %.

Este aumento del porcentaje de movilidad para las muestras incubadas con cafeína, no sólo se observa en el promedio total calculado para los 40 eyaculados, sino que queda reflejado en todos y cada uno de ellos ( $p < 0,05$ ).

% MOVILIDAD (CON Y SIN CAFEÍNA) EN MUESTRAS DESCONGELADAS													
	1 <sup>a</sup>		2 <sup>a</sup>		3 <sup>a</sup>		4 <sup>a</sup>		5 <sup>a</sup>		TOTAL		
	CONGELACIÓN		CONGELACIÓN		CONGELACIÓN		CONGELACIÓN		CONGELACIÓN		TOTAL		
	% MOV.	% MOV. (CAF)	% MOV.	% MOV. (CAF)	% MOV.	% MOV. (CAF)	% MOV.	% MOV. (CAF)	% MOV.	% MOV. (CAF)	% MOV.	% MOV. (CAF)	
VERRACO	G2552	38,91	58,91	33,88	57,35	21,92	54,15	22,12	52,40	22,93	44,15	27,95	53,39
	G5223	53,67	76,12	23,11	61,98	48,31	58,51	54,07	73,28	57,82	65,85	47,39	67,15
	G6328	40,74	67,19	39,32	63,84	50,97	68,64	53,02	79,71	58,75	76,86	48,56	71,25
	T475	64,76	77,33	51,34	67,81	46,55	75,48	47,02	74,78	50,68	76,97	52,07	74,47
	L437	40,74	52,32	53,13	59,52	39,63	53,15	36,39	43,84	31,37	63,07	40,25	54,38
	R3846	50,46	72,28	51,05	65,94	53,11	78,41	54,93	70,80	33,86	65,23	48,68	70,53
	R4052	71,35	83,42	39,44	75,86	68,35	79,95	69,25	82,59	53,96	84,52	60,47	81,27
	R5487	71,82	74,53	45,21	70,45	56,35	79,88	62,02	80,88	50,00	74,27	57,08	76,00
	TOTAL	54,06	70,26	42,06	65,34	48,15	68,52	49,85	69,78	44,92	68,87	47,81	68,56

Tabla 4.7: Porcentaje de movilidad espermática (con y sin cafeína) obtenido por los eyaculados de los diferentes verracos tras el proceso de congelación/descongelación.

Dentro de cada una de las incubaciones realizadas se observan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores medios de los verracos (tabla 4.8), que oscilan desde el  $28,0 \pm 7,9$  % del G2552 hasta  $60,5 \pm 13,6$  % del R4052 para la incubación sin la adición del inhibidor de la fosfodiesterasa, y desde el  $53,4 \pm 5,8$  % hasta el  $81,3 \pm 3,5$  % en esos mismos verracos para las muestras incubadas con él. En cambio, una vez más, el análisis estadístico no revela diferencias significativas para las medias de las dos razas estudiadas (tabla 4.9).

	% MOVILIDAD DESCONGELADO SIN CAFEÍNA				% MOVILIDAD DESCONGELADO CON CAFEÍNA				
	Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	
	VERRACO	G2552	27,95 <sup>a</sup>	7,92	21,92	38,91	53,39 <sup>a,*</sup>	5,77	44,15
G5223		47,39 <sup>ab</sup>	13,99	23,11	57,82	67,15 <sup>b,*</sup>	7,43	58,51	76,12
G6328		48,56 <sup>b</sup>	8,31	39,32	58,75	71,25 <sup>bc,*</sup>	6,73	63,84	79,71
T475		52,07 <sup>b</sup>	7,41	46,55	64,76	74,47 <sup>bc,*</sup>	3,87	67,81	77,33
L437		40,25 <sup>ab</sup>	8,07	31,37	53,13	54,38 <sup>a,*</sup>	7,40	43,84	63,07
R3846		48,68 <sup>b</sup>	8,47	33,86	54,93	70,53 <sup>bc,*</sup>	5,35	65,23	78,41
R4052		60,47 <sup>b</sup>	13,62	39,44	71,35	81,27 <sup>c,*</sup>	3,46	75,86	84,52
R5487		57,08 <sup>b</sup>	10,41	45,21	71,82	76,00 <sup>bc,*</sup>	4,32	70,45	80,88

Tabla 4.8: Porcentaje de movilidad espermática tras la descongelación en función del verraco. Diferentes superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). \* Indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre valores incubados con cafeína y sin ella.

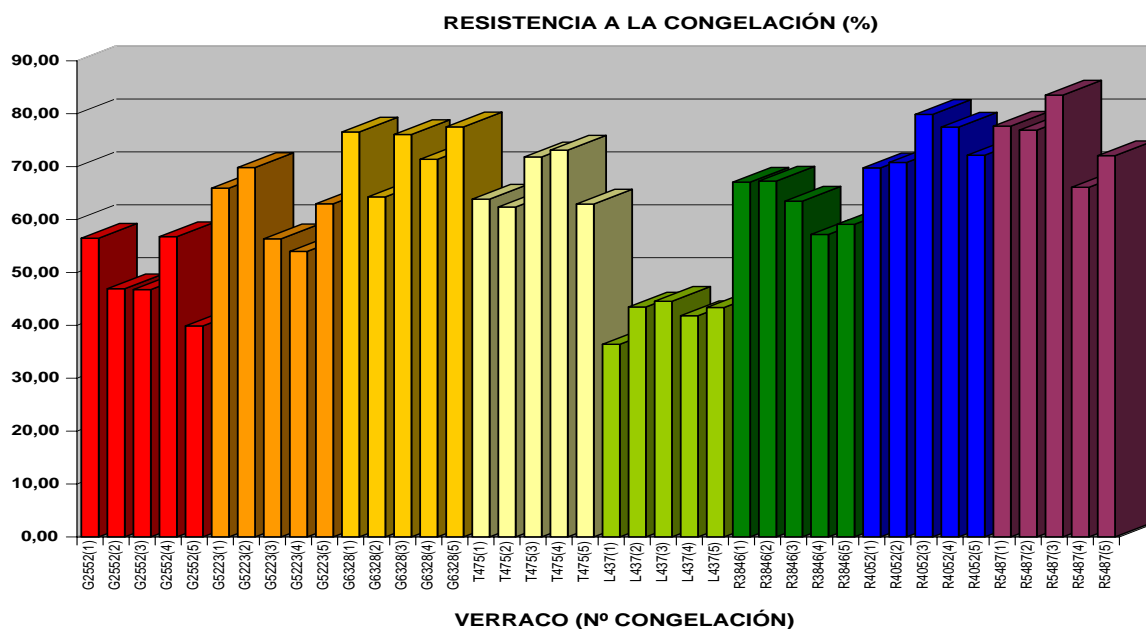
#### 4.1.2. Resistencia de los diferentes eyaculados al proceso de criopreservación.

Una vez descritas y analizadas las variaciones observadas en los diferentes parámetros tras la descongelación, procede abordar el tema de la resistencia de los distintos eyaculados al proceso de congelación/descongelación. Para ello, hay que partir de los valores obtenidos en el análisis

realizado en el semen fresco, para así establecer el porcentaje de espermatozoides que, habiendo presentado en aquel momento un correcto estado para un determinado parámetro, lo mantienen tras la descongelación de la muestra, y así poder realizar una corrección de los porcentajes mostrados posdescongelación, aplicando a cada parámetro las fórmulas mencionadas en la página 3.7.1.

		% MOVILIDAD DESCONGELADO SIN CAFEÍNA				% MOVILIDAD DESCONGELADO CON CAFEÍNA			
		Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo
RAZA	LW	44,00 <sup>a</sup>	13,19	21,92	64,76	66,57 <sup>a,*</sup>	9,97	44,15	79,71
	LD	51,62 <sup>a</sup>	12,47	31,37	71,82	70,55 <sup>a,*</sup>	11,44	43,84	84,52

**Tabla 4.9:** Porcentaje de movilidad espermática tras la descongelación en función de la raza. Diferentes superíndices revelarían diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre razas. \* Indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre valores incubados con cafeína y sin ella.



		CONGELABILIDAD											
		1ª CONGEL.		2ª CONGEL.		3ª CONGEL.		4ª CONGEL.		5ª CONGEL.		TOTAL	
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
VERRACO	G2552	55,98	1,84	45,78	0,50	45,95	2,38	57,78	0,14	40,23	1,52	49,15	7,21
	G5223	63,94	1,03	70,22	2,84	56,03	1,18	54,29	0,31	63,32	3,33	61,56	6,49
	G6328	77,21	1,90	64,29	4,76	75,61	1,98	70,77	0,25	75,72	1,14	72,71	5,65
	T475	64,56	0,66	62,70	6,15	70,03	4,57	73,33	0,50	62,22	0,42	66,57	5,89
	L437	36,09	5,17	43,97	1,37	44,68	0,44	40,35	0,83	44,04	0,55	41,82	4,30
	R3846	66,27	0,99	65,88	3,15	61,81	1,29	58,53	4,80	60,12	1,27	62,52	4,38
	R4052	69,38	2,14	70,99	0,20	78,49	2,53	77,90	5,09	72,36	4,80	73,82	5,35
	R5487	77,22	1,24	76,90	0,82	82,32	0,03	65,55	1,11	71,50	0,30	74,70	6,08
TOTAL		63,83	13,02	62,59	11,87	64,37	14,27	62,31	11,99	61,19	12,76	62,86	12,46

**Figura 4.1:** Porcentajes medios de resistencia de la membrana plasmática al proceso de congelación/descongelación.

**Resistencia de la membrana plasmática.**

En la figura 4.1 se muestran las medias y desviaciones típicas obtenidas en las diferentes congelaciones de cada verraco. Estos valores oscilan desde el 36,1 % (L437[1<sup>a</sup>]) hasta el 82,3 % (R5487[3<sup>a</sup>]), obteniéndose una media total de un  $62,9 \pm 12,5$  %.

Al analizar los valores por raza, resulta una media para los eyaculados de la raza Large White del  $62,5 \pm 10,5$  % y para la raza Landrace del  $63,2 \pm 14,2$  %, no siendo significativa la diferencia entre ambas tras realizar el análisis estadístico. Sin embargo, al calcular las medias obtenidas por cada animal sí se aprecian diferencias entre ellos, que permiten dividir a los verracos en cuatro subconjuntos homogéneos, de forma análoga a los anteriormente citados. En estos subconjuntos figuran los machos L437 y G2552 con la peor congelabilidad, presentando valores medios del 41,8 % y del 49,1 %, respectivamente, y los machos R5487 y R4052 con la mejor resistencia al proceso de criopreservación, con resultados medios respectivos de un 74,7 % y un 73,8 % (tabla 4.10).

VERRACO	N	Subconjunto para alfa = ,05			
		1	2	3	4
L437	5	41,82			
G2552	5	49,15			
G5223	5		61,56		
R3846	5		62,52	62,52	
T475	5		66,57	66,57	66,57
G6328	5			72,72	72,72
R4052	5				73,82
R5487	5				74,70
Sig.		0,41	0,82	0,09	0,28

**Tabla 4.10:** Subconjuntos homogéneos establecidos en función de las diferencias de resistencia de la membrana al proceso de congelación/descongelación.

La ausencia de un cierto verraco en un determinado subconjunto revela diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con los integrantes del mismo.

**Resistencia de la membrana acrosómica.**

Tras realizar la corrección establecida para los valores de integridad del acrosoma, se expresa una resistencia media de dicha estructura al proceso de congelación de un  $24,3 \pm 14,9$  %, oscilando entre un mínimo de un  $4,3 \pm 1,6$  %, observado en el tercer eyaculado del G2552, y un máximo de un  $50,8 \pm 7,5$  %, determinado en el cuarto eyaculado del R5487 (tabla 4.11).

Si bien ninguna de las razas mostró una mayor resistencia al proceso de criopreservación respecto a la otra (tabla 4.12), una vez más sí hubo diferencias ( $p < 0,05$ ) entre los distintos animales utilizados (tabla 4.13), siendo el L437 el verraco con peor resistencia del acrosoma, con un porcentaje medio del  $9,9 \pm 4,1$  %, y el R5487 el que mejor resistencia ofrece, con una media de un  $49,7 \pm 2,1$  % de acrosomas intactos.



RESISTENCIA DEL ACROSOMA AL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN													
		1ª CONGEL.		2ª CONGEL.		3ª CONGEL.		4ª CONGEL.		5ª CONGEL.		TOTAL	
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
VERRACO	G2552	33,04	13,88	10,24	3,55	4,27	1,57	16,41	1,33	4,71	,71	13,73	12,19
	G5223	17,74	6,33	27,93	3,79	20,33	7,32	15,40	3,01	25,15	7,29	21,31	6,54
	G6328	31,83	22,69	13,72	5,12	28,51	3,87	26,48	7,68	15,36	7,14	23,18	11,52
	T475	9,16	5,81	29,75	1,67	26,92	5,66	25,67	7,44	32,51	13,57	24,80	10,41
	L437	14,64	5,82	6,15	1,41	10,73	3,27	12,69	,81	5,21	,08	9,88	4,49
	R3846	20,31	,15	26,67	1,64	19,70	1,61	31,77	7,72	7,94	,18	21,28	8,86
	R4052	17,26	1,56	29,12	8,32	39,60	1,72	51,02	21,65	17,68	3,57	30,94	15,79
	R5487	50,20	13,86	47,70	10,32	52,31	1,83	50,79	7,54	47,20	3,25	49,64	6,72
	TOTAL	24,27	15,23	23,91	13,54	25,30	15,14	28,78	16,12	19,47	15,06	24,35	14,87

Tabla 4.11: Porcentajes medios de resistencia del acrosoma al proceso de criopreservación.

% RESISTENCIA ACROSOMA A LA CRIOPRESERVACIÓN					
		Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
RAZA	LW	20,76 <sup>a</sup>	10,92	3,16	47,87
	LD	27,94 <sup>a</sup>	17,53	5,16	66,33

Tabla 4.12: Resistencia del acrosoma al proceso de congelación/descongelación en función de la raza. Diferentes superíndices revelarían diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

RESISTENCIA INTEGRIDAD ACROSOMA AL PROCESO CONGELACIÓN / DESCONGELACIÓN (%)					
		Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
VERRACO	G2552	13,73 <sup>ab</sup>	11,85	4,26	32,99
	G5223	21,30 <sup>a</sup>	5,17	15,38	27,92
	G6328	23,16 <sup>a</sup>	8,11	13,71	31,75
	T475	24,79 <sup>a</sup>	9,13	9,14	32,46
	L437	9,88 <sup>b</sup>	4,10	5,21	14,66
	R3846	21,27 <sup>a</sup>	8,95	7,94	31,75
	R4052	30,94 <sup>a</sup>	14,53	17,26	51,02
	R5487	49,65 <sup>c</sup>	2,14	47,21	52,31

Tabla 4.13: Resistencia del acrosoma al proceso de congelación/descongelación en función del verraco. Diferentes superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### Resistencia de la movilidad espermática.

Al realizar el cálculo de la resistencia de este parámetro al proceso de criopreservación, resulta que el  $52,2 \pm 14,0\%$  de los espermatozoides del total de los eyaculados resiste al proceso, puesto que muestra algo de movilidad, incrementándose este valor ( $p < 0,01$ ) al ser incubados con cafeína hasta un  $74,6 \pm 11,2\%$ . Al igual que sucedía con la resistencia de la membrana plasmática y del acrosoma, se observan variaciones ostensibles en los valores de unos eyaculados respecto a otros (tabla 4.14), con un porcentaje medio mínimo de un  $26,3\%$  (G2552[5<sup>a</sup>]) y máximo de un  $77,0\%$  (R5487 [1<sup>a</sup>]), para las muestras incubadas sin cafeína y con unos porcentajes mínimo y máximo del  $47,9\%$  (L437[4<sup>a</sup>]) y del  $92,2\%$  (R4052[1<sup>a</sup>]), respectivamente, en las muestras que contienen el estimulante.

Del mismo modo que ocurre con los otros dos parámetros analizados en las muestras descongeladas, se observan diferencias ( $p < 0,05$ ) en los valores obtenidos entre los diferentes verracos (tabla 4.15), tanto para las muestras con cafeína como sin ella, y en cambio, no se observa una mayor resistencia de la movilidad en una raza respecto a la otra (tabla 4.16).

Nuevamente, en todos los casos se producen aumentos estadísticamente significativos en las medias observadas para las incubaciones con cafeína con respecto a aquellas no estimuladas.

RESISTENCIA DEL % MOVILIDAD AL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN													
	1 <sup>a</sup>		2 <sup>a</sup>		3 <sup>a</sup>		4 <sup>a</sup>		5 <sup>a</sup>		TOTAL		
	CONGELACIÓN		CONGELACIÓN		CONGELACIÓN		CONGELACIÓN		CONGELACIÓN		%		
	MOV.	% MOV. (CAF)	MOV.	% MOV. (CAF)	MOV.	% MOV. (CAF)	MOV.	% MOV. (CAF)	MOV.	% MOV. (CAF)	MOV.	% MOV. (CAF)	
VERRACO	G2552	44,63	64,23	39,99	67,00	26,81	58,25	25,61	63,17	26,26	48,16	32,66	60,16
	G5223	57,75	79,60	25,65	65,38	52,83	61,08	57,51	77,55	62,87	85,60	51,32	73,84
	G6328	45,48	76,18	43,04	70,87	56,40	75,75	58,16	86,12	62,31	82,26	53,08	78,23
	T475	68,20	79,89	55,10	70,80	50,43	79,24	50,23	77,00	54,45	82,42	55,68	77,87
	L437	44,86	60,71	54,40	62,75	43,76	61,17	38,89	47,87	32,77	72,62	42,94	61,03
	R3846	52,69	74,65	53,16	68,55	58,19	92,19	65,39	75,55	37,13	78,77	53,31	77,94
	R4052	76,54	92,23	45,85	77,13	72,04	87,17	75,87	90,04	56,82	88,14	65,42	86,94
	R5487	77,00	76,06	49,44	75,42	61,91	88,16	74,42	89,15	52,29	75,57	63,01	80,87
	TOTAL	58,39	75,44	45,83	69,74	52,80	75,38	55,76	75,81	48,11	76,69	52,18	74,61

Tabla 4.14: Porcentajes medios de resistencia de la movilidad espermática (con y sin cafeína) al proceso de congelación/descongelación.

	RESISTENCIA MOVILIDAD SIN CAFEÍNA AL PROCESO CRIOPRESERVACIÓN (%)					RESISTENCIA MOVILIDAD CON CAFEÍNA AL PROCESO CRIOPRESERVACIÓN (%)			
	Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	
	VERRACO	G2552	32,66 <sup>a</sup>	8,97	25,61	44,63	60,16 <sup>ab,*</sup>	7,41	48,16
G5223		51,32 <sup>ab</sup>	14,78	25,65	62,87	73,84 <sup>ab,*</sup>	10,24	61,08	85,60
G6328		53,08 <sup>ab</sup>	8,38	43,04	62,31	78,23 <sup>b,*</sup>	5,98	70,87	86,12
T475		55,68 <sup>bc</sup>	7,35	50,23	68,20	77,87 <sup>b,*</sup>	4,40	70,80	82,42
L437		42,94 <sup>ab</sup>	7,99	32,77	54,40	61,03 <sup>ab,*</sup>	8,81	47,87	72,62
R3846		53,31 <sup>ab</sup>	10,39	37,13	65,39	77,94 <sup>b,*</sup>	8,78	68,55	92,19
R4052		65,42 <sup>c</sup>	13,54	45,85	76,54	86,94 <sup>b,*</sup>	5,82	77,13	92,23
R5487		63,01 <sup>bc</sup>	12,51	49,44	77,00	80,87 <sup>b,*</sup>	7,12	75,42	89,15

Tabla 4.15: Resistencia de la movilidad espermática al proceso de congelación/descongelación en función del verraco.

Diferentes superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). \* Indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre valores incubados o no con cafeína.

	RESISTENCIA MOVILIDAD AL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN SIN CAFEÍNA (%)				RESISTENCIA MOVILIDAD AL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN CON CAFEÍNA (%)				
	Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	
	RAZA	LW	48,19 <sup>a</sup>	13,27	25,61	68,20	72,53 <sup>a,*</sup>	10,10	48,16
	LD	56,17 <sup>a</sup>	13,81	32,77	77,00	76,70 <sup>a,*</sup>	12,15	47,87	92,23

Tabla 4.16: Resistencia de la movilidad espermática al proceso de congelación/descongelación en función de la raza.

Diferentes superíndices revelarían diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). \* Indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre valores incubados o no con cafeína.

### 4.1.3. Grupos de calidad establecidos.

Considerando conjuntamente la resistencia al proceso de congelación/descongelación de la membrana plasmática, del acrosoma y del porcentaje de movilidad espermática tras la estimulación con cafeína, el análisis jerárquico determina, tras observar las distancias en los coeficientes de los conglomerados en la vinculación de Ward (tabla 9.1 de los anexos [pág. 356]) y la distribución del dendrograma resultante del mismo (figura 9.1 de los anexos [pág. 355]), que tres es el número de grupos o *clusters* más apropiado para clasificar los eyaculados empleados en este trabajo. Tras esta primera clasificación jerárquica o intuitiva, se procede a realizar un análisis de *cluster* no jerárquico, basado en el algoritmo de las K- medias (*K-means*), con el que encuadramos cada uno de los eyaculados en uno de los tres grupos establecidos (Buen Congelador, Congelador Medio y Mal Congelador ).

La tabla 4.17 muestra los centros finales de estos grupos (valores medios de cada uno para los diferentes parámetros utilizados en la clasificación), englobando en el *cluster* o grupo 2, que presenta unos valores más altos que el resto de los grupos, aquellos eyaculados con una mayor resistencia al proceso de congelación/descongelación, en el *cluster* 3, con los niveles más bajos, los eyaculados que peor congelan y, finalmente, en el *cluster* 1, los que presentan resistencias intermedias al proceso.

En la tabla 4.18 puede apreciarse que los diferentes grupos no presentan homogeneidad en cuanto al número de integrantes, sino que existe una gran mayoría de eyaculados (23) con aptitudes intermedias para la congelación, mientras que sólo unos pocos presentan una mayor (7) o menor (10) resistencia tras la descongelación. Además, podemos observar que el grupo de buenos congeladores (*cluster* 2) está integrado sólo por eyaculados de la raza Landrace, mientras que el grupo de malos congeladores (*cluster* 3) está compuesto por un número igual de eyaculados de la raza Landrace y de la Large White.

	Conglomerado		
	1	2	3
RESIST. DE MEMB. PLASMÁTICA	66,50	75,70	45,49
RESIST. DEL ACROSOMA	22,38	47,73	10,17
RESIST. DE LA MOVILIDAD (CAF.)	78,26	83,08	60,28

**Tabla 4.17:** Centros finales de los conglomerados establecidos tras la clasificación no jerárquica de las K-medias.

		CATEGORÍA CONGELACIÓN			Total
		BUEN CONGELADOR	MEDIO CONGELADOR	MAL CONGELADOR	
RAZA	LW	0	15	5	20
	LD	7	8	5	20
Total		7	23	10	40

**Tabla 4.18:** Número de integrantes de los diferentes grupos en función de la raza.

Si nos fijamos en la clasificación de los eyaculados dentro de los grupos de calidad establecidos

(tabla 4.19), podemos comprobar que los eyaculados de los verracos R5487 y R4052 son los que muestran una mejor capacidad para la congelación, mientras que, en el lado opuesto, los eyaculados de los animales L437 y G2552, son los que peor capacidad de congelación presentan.

VERRACO	RAZA	Nº CONGELACIÓN	GRUPO CALIDAD
R4052	LD	3ª CONGELACIÓN	
R4052	LD	4ª CONGELACIÓN	
R5487	LD	1ª CONGELACIÓN	BUEN CONGELADOR
R5487	LD	2ª CONGELACIÓN	
R5487	LD	3ª CONGELACIÓN	
R5487	LD	4ª CONGELACIÓN	
R5487	LD	5ª CONGELACIÓN	
G2552	LW	1ª CONGELACIÓN	
G5223	LW	1ª CONGELACIÓN	
G5223	LW	2ª CONGELACIÓN	
G5223	LW	4ª CONGELACIÓN	
G5223	LW	5ª CONGELACIÓN	
G6328	LW	1ª CONGELACIÓN	
G6328	LW	2ª CONGELACIÓN	
G6328	LW	3ª CONGELACIÓN	
G6328	LW	4ª CONGELACIÓN	
G6328	LW	5ª CONGELACIÓN	
T475	LW	1ª CONGELACIÓN	CONGELADOR MEDIO
T475	LW	2ª CONGELACIÓN	
T475	LW	3ª CONGELACIÓN	
T475	LW	4ª CONGELACIÓN	
T475	LW	5ª CONGELACIÓN	
R3846	LD	1ª CONGELACIÓN	
R3846	LD	2ª CONGELACIÓN	
R3846	LD	3ª CONGELACIÓN	
R3846	LD	4ª CONGELACIÓN	
R3846	LD	5ª CONGELACIÓN	
R4052	LD	1ª CONGELACIÓN	
R4052	LD	2ª CONGELACIÓN	
R4052	LD	5ª CONGELACIÓN	
G2552	LW	2ª CONGELACIÓN	
G2552	LW	3ª CONGELACIÓN	
G2552	LW	4ª CONGELACIÓN	
G2552	LW	5ª CONGELACIÓN	
G5223	LW	3ª CONGELACIÓN	MAL CONGELADOR
L437	LD	1ª CONGELACIÓN	
L437	LD	2ª CONGELACIÓN	
L437	LD	3ª CONGELACIÓN	
L437	LD	4ª CONGELACIÓN	
L437	LD	5ª CONGELACIÓN	

Tabla 4.19: Clasificación de los eyaculados dentro de los grupos de calidad establecidos.

## 4.2. Experimento 1: Estudio de las pruebas de laboratorio como indicadores de la congelabilidad seminal.

### 4.2.1. Valoración convencional del semen.

#### 4.2.1.1. Análisis de los resultados obtenidos.

Los resultados medios obtenidos de las diferentes valoraciones a las que fueron sometidos los eyaculados utilizados en la realización de este trabajo de investigación aparecen reflejados en los gráficos y tablas mostrados a continuación.

Los eyaculados presentan un volumen medio aproximado de 300 ml y una concentración media de unos 275 millones de espermatozoides por mililitro (incluyendo los 100 ml del diluyente seminal empleado en la extracción). Desde el punto de vista cualitativo, se seleccionan aquellas muestras seminales que, siguiendo criterios de valoración rutinarios, presentan una alta calidad; así, en la tabla 4.20 se muestran mínimos por encima de un 81 % en movilidad, de un 77 % en normalidad morfológica y de un 93 y 81 % en integridad de acrosomas y de membrana plasmática, respectivamente, así como promedios superiores a un 91, 87, 97 y 87 % en cada uno de esos parámetros.

	N	Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo
<b>VOLUMEN (ml.)*</b>	40	<b>296,65</b>	50,41	215,00	407,00
<b>CONCENTRACIÓN (mill. spz./ml.)*</b>	40	<b>274,98</b>	62,88	116,00	416,00
<b>MOTILIDAD SUBJETIVA (%)</b>	40	<b>82,13</b>	3,38	75,00	90,00
<b>MOVILIDAD INICIAL (%)</b>	40	<b>91,33</b>	3,75	81,76	97,66
<b>MOVILIDAD INICIAL CAFEÍNA (%)</b>	40	<b>91,90</b>	4,81	76,92	98,35
<b>MORF. NORMALES (%)</b>	40	<b>87,05</b>	5,13	77,00	99,00
<b>GOTAS CITOPLASM. PROXIMALES (%)</b>	40	<b>2,40</b>	1,88	,00	8,00
<b>GOTAS CITOPLASM. DISTALES (%)</b>	40	<b>7,80</b>	4,19	,00	21,00
<b>ALT. MORF. CABEZA (%)</b>	40	<b>,40</b>	,59	,00	2,00
<b>ALT. MORF. COLA (%)</b>	40	<b>2,43</b>	2,34	,00	10,00
<b>INTEGRIDAD ACROSOMAS (%)</b>	40	<b>97,30</b>	1,68	93,50	99,50
<b>INTEGRIDAD MEMBRANA (%)</b>	40	<b>87,06</b>	3,33	81,75	94,75

**Tabla 4.20:** Resultados medios totales obtenidos en las diferentes pruebas de valoración seminal convencional.

\* Los valores corresponden al eyaculado más los 100 ml. del diluyente añadidos de forma previa a la extracción.

### Volumen y concentración.

Las medias de volumen y concentración de los eyaculados utilizados son, respectivamente, de  $296,7 \pm 50,4$  ml y  $275,0 \pm 62,9$  millones de espermatozoides por mililitro, mostrando grandes variaciones de un eyaculado a otro, sobre todo en la concentración, donde se obtiene un mínimo de 116 (L437 [1]) y un máximo de 416 mill. spz/ml (R4052 [4]).

Se observa uniformidad en ambos parámetros en las dos razas evaluadas, sin diferencias significativas entre ellas ( $p > 0,05$ ) con los 283,9 ml y 272 mill. spz/ml de la raza Large White, y los

309,4 ml y 277,8 mill. spz/ml de la raza Landrace (tabla 4.21).

		n	Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo
<b>VOLUMEN</b>	LW	20	283,90 <sup>a</sup>	46,15	215,00	403,00
	LD	20	309,40 <sup>a</sup>	52,39	230,00	407,00
<b>CONCENTRACIÓN</b>	LW	20	272,20 <sup>a</sup>	54,62	153,00	375,00
	LD	20	277,75 <sup>a</sup>	71,53	116,00	416,00

**Tabla 4.21:** Valores medios obtenidos para el volumen y concentración de los eyaculados en función de la raza.

Diferentes superíndices dentro de cada parámetro revelarían diferencias significativas entre razas ( $p < 0,05$ ).

VOLUMEN (ml.)				CONCENTRACIÓN (mill.spz/ml.)			
VERRACO	n	Subconjunto para alfa = ,05		VERRACO	n	Subconjunto para alfa = ,05	
		2	1			2	3
T475	5	242,60		L437	5	189,40	
R5487	5	245,60		G2552	5	223,40	223,40
G6328	5	284,60	284,60	T475	5	258,20	258,20 258,20
G5223	5	298,40	298,40	G5223	5	279,40	279,40 279,40
G2552	5	310,00	310,00	R5487	5		296,80 296,80
L437	5	320,40	320,40	R3846	5		297,60 297,60
R4052	5		333,40	R4052	5		327,20
R3846	5		338,20	G6328	5		327,80
<b>Sig.</b>		<b>,07</b>	<b>,43</b>	<b>Sig.</b>		<b>,08</b>	<b>,23 30</b>

**Tabla 4.22:** Subconjuntos homogéneos de verracos en función del volumen y la concentración del eyaculado.

La ausencia de un cierto verraco en un determinado subconjunto revela diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con los integrantes del mismo.

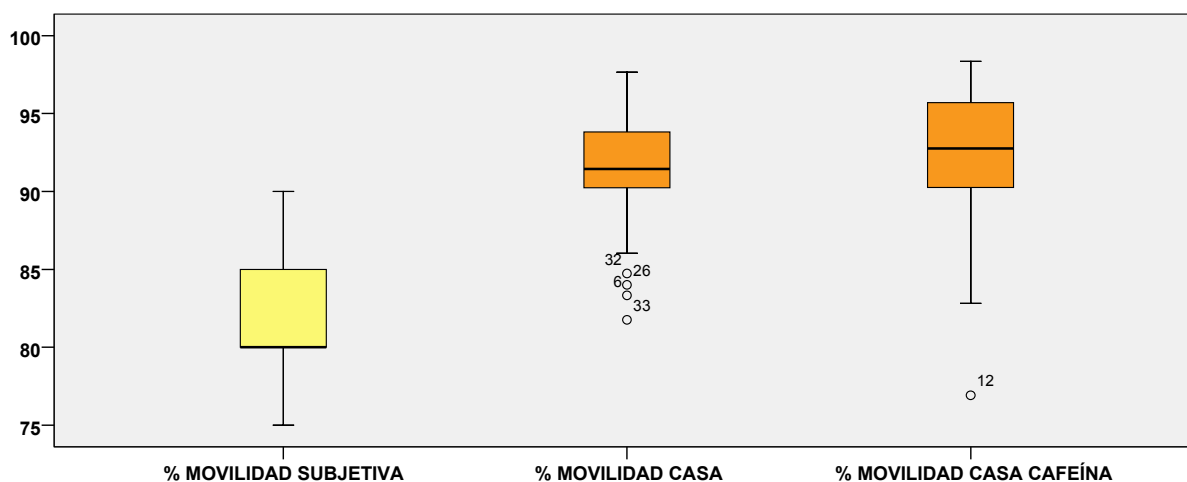
En cambio, al comparar la media de los eyaculados de los diferentes verracos, sí observamos diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre ellos, que posibilitan su distribución en dos subconjuntos homogéneos en función del volumen y en tres si tenemos en cuenta los datos de la concentración (tabla 4.22).

### Movilidad espermática.

Para el cálculo del porcentaje de espermatozoides móviles se realizan tres pruebas de movilidad espermática, una mediante el sistema tradicional de análisis subjetivo de visualización del movimiento bajo un microscopio óptico y las otras dos mediante un sistema de análisis computarizado de semen (CASA), una con incubación previa de las muestras en una solución de 1 mM de cafeína y la otra sin ella.

Los valores obtenidos muestran un promedio, para todos los eyaculados, superior al 82 % en el método subjetivo y al 91 % utilizando el sistema CASA, que revela, por tanto, un claro incremento ( $p < 0,001$ ) respecto al primero (figura 4.2). En cambio, dentro de este segundo método no existen diferencias significativas entre los promedios de motilidad de las muestras con incubación previa

en solución de cafeína y aquellas en las que no se realiza, si bien estas últimas muestran una menor oscilación entre sus valores mínimo y máximo (81,8 - 97,7 %) que las primeras (76,9 - 98,4 %).



	n	Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo
MOVILIDAD SUBJETIVA (%)	40	82,13 <sup>a</sup>	3,38	75,00	90,00
MOVILIDAD CASA (%)	40	91,33 <sup>b</sup>	3,75	81,76	97,66
MOVILIDAD CASA CAFEÍNA (%)	40	91,90 <sup>b</sup>	4,81	76,92	98,35

**Figura 4.2:** Valores medios obtenidos en la valoración de la movilidad espermática según el método utilizado.

Diferentes superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

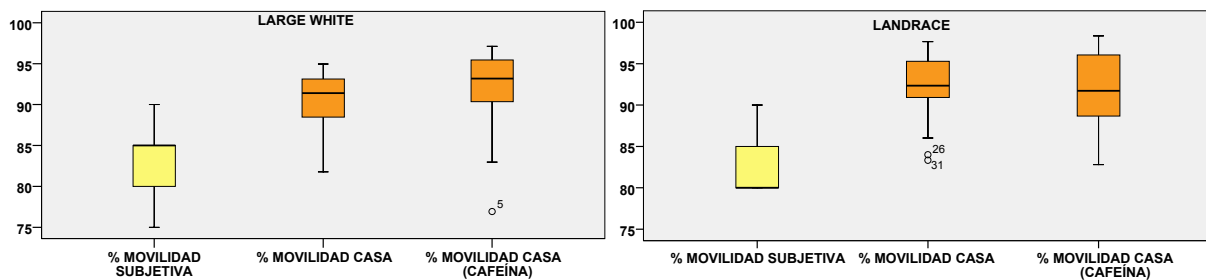
Al comparar los valores de movilidad en las dos razas presentes en el estudio (figura 4.3) se evidencia una tendencia similar a la observada con el total de los datos, encontrándonos valores inferiores ( $p < 0,001$ ) en el método subjetivo a los mostrados con el sistema computarizado, tanto para la raza Landrace (81,8 % frente al 92,1 %) como para la raza Large White (82,5 % frente al 90,6 %). Al igual que en la valoración general, no se observan diferencias entre la prueba con estimulación química de la motilidad y la realizada sin ésta, salvo en la raza Large White, en la que se aprecia un ligero incremento ( $p < 0,05$ ) en el porcentaje total de espermatozoides móviles.

Como refleja la tabla 4.23, no resultan diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios obtenidos para los diferentes verracos en la motilidad subjetiva y en la motilidad analizada con el sistema CASA tras la incubación con cafeína. En cambio, en aquellas muestras que no fueron incubadas con el estimulante de la motilidad, sí se reflejan algunas diferencias ( $p < 0,05$ ) entre unos verracos y otros, siendo el G2552 el que presenta un valor medio más bajo (85,5 %) frente al T475 o al L437 (93,4 y 93,7 %, respectivamente).

Analizando los datos de cada verraco se observan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), en la práctica totalidad de casos, entre la motilidad subjetiva y la valoración con el sistema computarizado, que no se aprecian, al igual que en la comparación entre razas o en el cómputo general

#### 4.2 Experimento 1: Estudio de las pruebas de laboratorio como indicadores de la congelabilidad seminal.

de los datos, en los resultados entre la incubación o no con cafeína, en los que hay uniformidad, solamente quebrada ( $p < 0,05$ ) en los promedios de los verracos T475 y L437.



		n	Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo
MOVILIDAD SUBJETIVA (%)	LW	20	82,50 <sup>a</sup>	3,80	75,00	90,00
	LD	20	81,75 <sup>a</sup>	2,94	80,00	90,00
MOVILIDAD CASA (%)	LW	20	90,59 <sup>b</sup>	3,49	81,76	94,95
	LD	20	92,08 <sup>b</sup>	3,93	83,33	97,66
MOVILIDAD CASA CAFEÍNA (%)	LW	20	91,79 <sup>b</sup>	5,08	76,92	97,12
	LD	20	92,00 <sup>b</sup>	4,65	82,81	98,35

Figura 4.3: Valores medios obtenidos para los tres métodos empleados en la valoración de porcentaje de movilidad en función de la raza.

Diferentes superíndices dentro de cada parámetro revelan diferencias significativas entre razas ( $p < 0,05$ ).

% MOVILIDAD SUBJETIVA			% MOVILIDAD CASA				% MOVILIDAD CASA CAFEÍNA		
VERRACO	n	Subconjunto para alfa = ,05	VERRACO	n	Subconjunto para alfa = ,05		VERRACO	n	Subconjunto para alfa = ,05
		1			1	2			1
R4052	5	80,00	G2552	5	85,47		G2552	5	88,98
T475	5	81,00	R5487	5	90,94	90,94	L437	5	89,27
G6328	5	82,00	G6328	5	91,36	91,36	R3846	5	90,92
L437	5	82,00	R3846	5	91,65	91,65	G6328	5	90,98
R3846	5	82,00	R4052	5		92,08	G5223	5	91,53
G2552	5	83,00	G5223	5		92,08	R4052	5	93,63
R5487	5	83,00	T475	5		93,43	R5487	5	94,20
G5223	5	84,00	L437	5		93,66	T475	5	95,67
Sig.		,62	Sig.		,07	,87	Sig.		,35

Tabla 4.23: Subconjuntos homogéneos de verracos en función de los tres métodos empleados en la valoración del porcentaje de movilidad.

La ausencia de un cierto verraco en un determinado subconjunto revela diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con los integrantes del mismo.

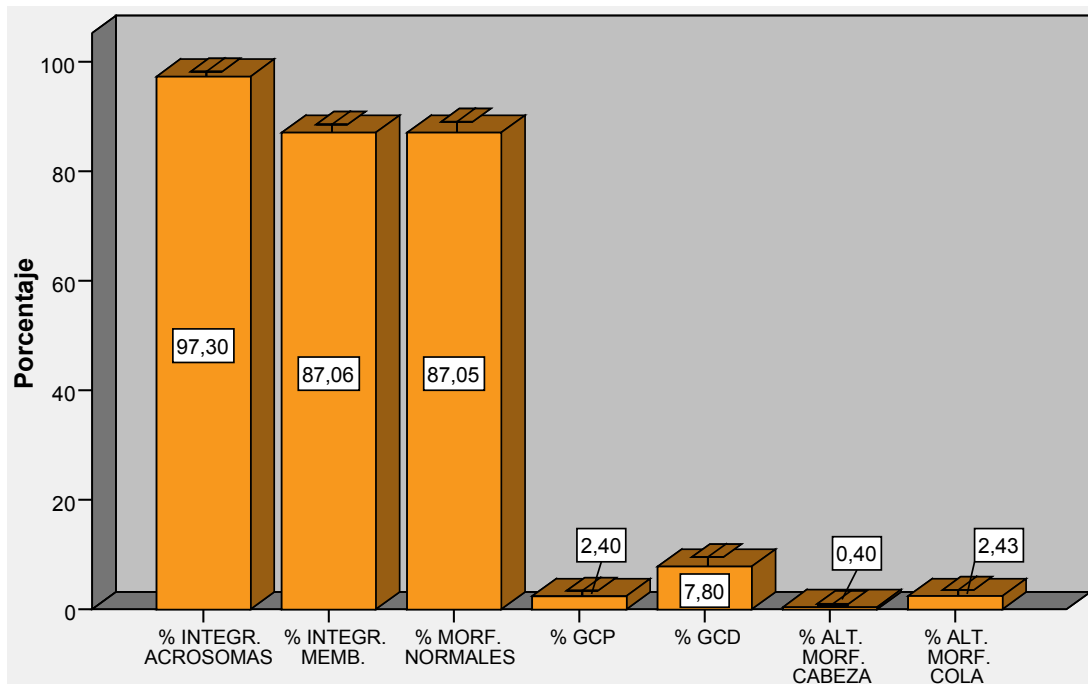
#### Morfología e integridad del acrosoma y de la membrana plasmática.

La calidad de los eyaculados utilizados puede considerarse bastante alta, puesto que, a parte de los buenos resultados de movilidad espermática obtenidos, presentan valores medios más que



aceptables, tanto de morfología normal ( $87,1 \pm 5,1\%$ ) como de integridad de la membrana plasmática ( $87,1 \pm 3,3\%$ ) y del acrosoma ( $97,3 \pm 1,7\%$ ), tal y como se refleja en la figura 4.4.

En cuanto a las anomalías morfológicas existentes en los eyaculados, cabría destacar la presencia de gotas citoplasmáticas distales como la alteración más frecuente, con una media de un  $7,8 \pm 4,2\%$ .



**Figura 4.4:** Resultados medios totales obtenidos en la valoración de la integridad acrosómica, de la membrana plasmática y del análisis morfológico.

Al comparar los resultados para estos parámetros en función de la raza (tabla 4.24), en la mayoría de ellos no se observan diferencias, apareciendo solamente ( $p < 0,01$ ) en los valores de algunas categorías morfológicas; así, la raza Large White presenta un  $3,5\%$  más de espermatozoides morfológicamente normales que la raza Landrace (con un  $88,8\%$  de la primera, frente al  $85,3\%$  de la segunda) y un  $2,7\%$  menos de espermatozoides con presencia de gota citoplasmática distal ( $6,5\%$  frente al  $9,2\%$ ).

La homogeneidad de los resultados de integridad del acrosoma continúa al comparar las medias obtenidas en los eyaculados de cada verraco, donde tampoco se encuentran diferencias significativas, que sí surgen ( $p < 0,05$ ), en cambio, tanto en la integridad de membrana como en la normalidad morfológica (tabla 4.25).

4.2 Experimento 1: Estudio de las pruebas de laboratorio como indicadores de la congelabilidad seminal.

		n	Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo
% MORF. NORMALES	LW	20	88,80 <sup>a</sup>	5,68	78,00	99,00
	LD	20	85,30 <sup>b</sup>	3,92	77,00	90,00
% GOTAS CITOPLASM. PROXIMALES (GCP)	LW	20	1,95 <sup>a</sup>	1,73	,00	5,00
	LD	20	2,85 <sup>a</sup>	1,95	,00	8,00
% GOTAS CITOPLASM. DISTALES (GCD)	LW	20	6,45 <sup>a</sup>	3,73	,00	13,00
	LD	20	9,15 <sup>b</sup>	4,27	4,00	21,00
% ALT. MORF. CABEZA	LW	20	0,20 <sup>a</sup>	,52	,00	2,00
	LD	20	0,60 <sup>b</sup>	,60	,00	2,00
% ALT. MORF. COLA	LW	20	2,75 <sup>a</sup>	2,24	,00	8,00
	LD	20	2,10 <sup>a</sup>	2,45	,00	10,00
% INTEGR. ACROSOMAS	LW	20	97,13 <sup>a</sup>	1,58	94,00	99,50
	LD	20	97,48 <sup>a</sup>	1,80	93,50	99,50
% INTEGR. MEMBRANA	LW	20	86,98 <sup>a</sup>	3,12	82,00	92,50
	LD	20	87,15 <sup>a</sup>	3,60	81,75	94,75

Tabla 4.24: Valores medios obtenidos para la valoración de la integridad acrosómica, de la membrana plasmática y del análisis morfológico en función de la raza.

Diferentes superíndices dentro del mismo parámetro revelan diferencias significativas entre razas ( $p < 0,05$ ).

% MORF. NORMALES			% INTEGR. MEMBRANA				% INTEGR. ACROSOMAS		
VERRACO	n	Subconjunto para alfa = ,05	VERRACO	n	Subconjunto para alfa = ,05		VERRACO	n	Subconjunto para alfa = ,05
		1 2			1 2 3			1	
G2552	5	82,80	L437	5	83,65		L437	5	96,20
R5487	5	84,00	G2552	5	84,90 84,90		G6328	5	96,30
R4052	5	85,40	R3846	5	85,20 85,20		R3846	5	96,30
L437	5	85,60	G6328	5	85,50 85,50 85,50		G2552	5	96,60
R3846	5	86,20 86,20	G5223	5	88,10 88,10 88,10		T475	5	97,10
G5223	5	87,40 87,40	R4052	5	89,30 89,30		G5223	5	98,50
T475	5	90,60 90,60	T475	5	89,40 89,40		R4052	5	98,70
G6328	5	94,40	R5487	5	90,45		R5487	5	98,70
Sig.		,08 ,06	Sig.		,14 ,13 ,07		Sig.		,14

Tabla 4.25: Subconjuntos homogéneos de verracos en función del porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y de la integridad de la membrana plasmática y del acrosoma.

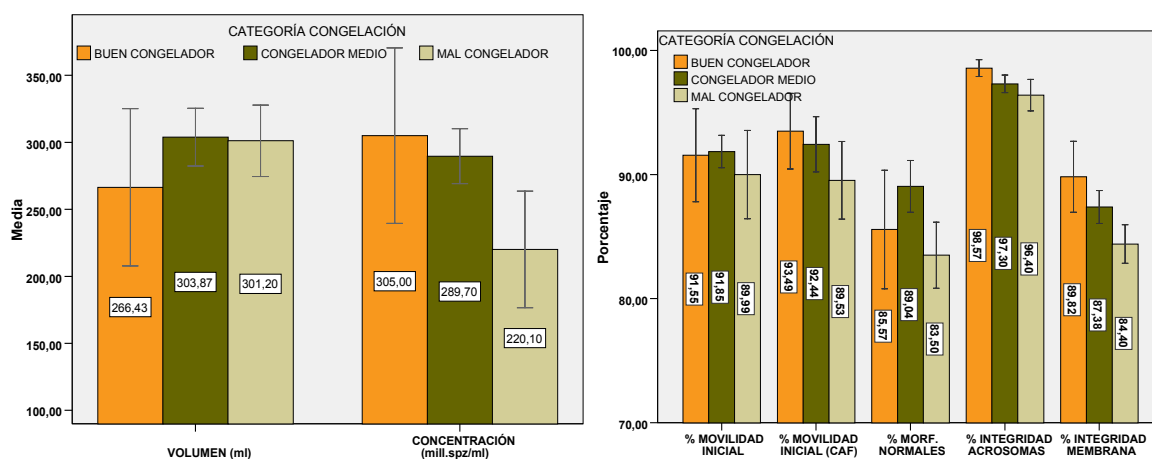
La ausencia de un cierto verraco en un determinado subconjunto revela diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con los integrantes del mismo.

#### 4.2.1.2. Influencia de la aptitud de un eyaculado para la congelación sobre la respuesta a las pruebas rutinarias de contrastación seminal.

En la figura 4.5 aparecen reflejados los valores medios obtenidos, en las valoraciones rutinarias realizadas, para cada uno de los grupos establecidos en función de la aptitud de los eyaculados para la congelación. En cuatro de estas valoraciones (concentración, integridad de la membrana y del acrosoma y movilidad con cafeína) se observa la siguiente tendencia: cuanto mejor congela un eyaculado, más altos son los valores obtenidos. Así, en la concentración analizada, el grupo de Malos Congeladores (MC) presenta una media de  $220,1 \pm 60,8$  mill.spz/ml, que resulta significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) a las de los otros dos grupos, que no difieren entre sí. Con respecto a la integridad del acrosoma, el grupo que destaca estadísticamente ( $p < 0,05$ ) entre los tres, re-

sulta ser el de Buenos Congeladores (BC), que presenta un porcentaje medio de un  $98,6 \pm 0,7\%$ , mientras que los valores resultantes al analizar los datos de integridad de membrana son un poco más homogéneos, difiriendo significativamente ( $p < 0,05$ ) el grupo BC y el MC, y quedando con valores intermedios, sin significación estadística con los otros dos, el grupo de Congeladores Medios (CM). Por su parte, en el porcentaje de movilidad con cafeína, aunque queda reflejada la citada tendencia, no aparecen diferencias estadísticamente significativas tras el análisis de los datos.

En relación con las otras tres valoraciones, ni en el volumen calculado ni en el porcentaje de movilidad sin cafeína aparecen diferencias significativas entre los grupos, y respecto al porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales, sólo se presentan éstas entre los grupos MC y CM, siendo este último el que presenta el valor más alto de los tres, con un  $89,0 \pm 4,8\%$ .



	CATEGORÍA CONGELACIÓN					
	BUEN CONGELADOR		CONGELADOR MEDIO		MAL CONGELADOR	
	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
VOLUMEN (ml.)	266,43 <sup>a</sup>	63,48	303,87 <sup>a</sup>	49,83	301,20 <sup>a</sup>	37,28
CONCENTRACIÓN (mill.spz./ml.)	305,00 <sup>a</sup>	70,76	289,70 <sup>a</sup>	47,42	220,10 <sup>b</sup>	60,80
MOVILIDAD CASA (%)	91,55 <sup>a</sup>	4,05	91,85 <sup>a</sup>	3,03	89,99 <sup>a</sup>	4,97
MOVILIDAD CASA CAFEÍNA (%)	93,49 <sup>a</sup>	3,30	92,44 <sup>a</sup>	5,15	89,53 <sup>a</sup>	4,37
MORF. NORMALES (%)	85,57 <sup>ab</sup>	5,16	89,04 <sup>a</sup>	4,82	83,50 <sup>b</sup>	3,72
INTEGRIDAD ACROSOMAS (%)	98,57 <sup>a</sup>	,73	97,30 <sup>b</sup>	1,64	96,40 <sup>b</sup>	1,78
INTEGRIDAD MEMBRANA (%)	89,82 <sup>a</sup>	3,09	87,38 <sup>ab</sup>	3,06	84,40 <sup>b</sup>	2,17

**Figura 4.5:** Valores medios obtenidos, en las valoraciones rutinarias realizadas, para cada uno de los grupos establecidos en función de la aptitud de los eyaculados para la congelación. Diferentes superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos.

**4.2.1.3. Determinación de la congelabilidad de un eyaculado a partir de los resultados obtenidos en la valoración convencional.**

En la tabla 4.26 se recogen los índices de correlación obtenidos entre los parámetros analizados para las técnicas rutinarias de contrastación seminal y el índice de congelabilidad, basado en la resistencia de la integridad de la membrana plasmática, así como entre dichos parámetros y la resistencia al proceso de congelación/descongelación, tanto del acrosoma como de la movilidad espermática (con y sin cafeína). En ella se puede observar que solamente cuatro parámetros (concentración, integridad de membrana, integridad del acrosoma y porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales) ofrecen correlaciones significativas con alguno de estos índices postdescongelación, siendo los dos primeros los únicos que presentan correlación con todos ellos.

		RESISTENCIA AL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN			
		MEMB. PLASMÁTICA "CONGELABILIDAD"	ACROSOMA	MOVILIDAD	MOVILIDAD (CAFEÍNA)
VOLUMEN	Coef. Correl.	-,163	-,295	-,060	-,021
	Sig. (bilateral)	,314	,065	,713	,897
CONCENTRACIÓN	Coef. Correl.	<b>,677</b>	<b>,352</b>	<b>,325</b>	<b>,431</b>
	Sig. (bilateral)	,000	,026	,041	,006
MOTILIDAD SUBJETIVA	Coef. Correl.	-,091	-,010	-,179	-,145
	Sig. (bilateral)	,575	,953	,268	,372
% MOVILIDAD INICIAL	Coef. Correl.	,198	-,038	,297	,204
	Sig. (bilateral)	,220	,814	,063	,207
% MOVILIDAD INICIAL (CAF)	Coef. Correl.	,305	,256	,225	-,018
	Sig. (bilateral)	,056	,111	,162	,913
% MORF. NORMALES	Coef. Correl.	,294	,063	,305	<b>,407</b>
	Sig. (bilateral)	,065	,699	,055	,009
% INTEGRIDAD ACROSOMAS	Coef. Correl.	<b>,375</b>	<b>,375</b>	<b>,346</b>	,208
	Sig. (bilateral)	,017	,017	,029	,198
% INTEGRIDAD MEMBRANA	Coef. Correl.	<b>,467</b>	<b>,471</b>	<b>,323</b>	<b>,349</b>
	Sig. (bilateral)	,002	,002	,042	,028

**Tabla 4.26:** Coeficientes de correlación entre los parámetros analizados dentro de la valoración rutinaria del semen y los índices calculados postdescongelación.

Los coeficientes subrayados y en negrita presentan significación estadística ( $p < 0,05$ ).

Posteriormente, se procede a establecer la relación existente entre los resultados de los ocho parámetros analizados en el análisis rutinario de los eyaculados y el índice de congelabilidad de cada uno de éstos, por medio de un análisis multivariante de regresión por etapas. En dicho análisis se establecen varios modelos de regresión lineal, siendo aquel formado por la concentración, el porcentaje de integridad de membrana y el de espermatozoides morfológicamente normales, el que explica una mayor proporción de la varianza de la variable congelabilidad, con un 55,6 % (tabla 4.27). A partir de los coeficientes resultantes de este modelo se determina la ecuación de regresión para el mismo:

$$\text{Congelabilidad} = -112,48 + 0,11(\text{Conc.}) + 1,03(\% \text{Integr. Memb.}) + 0,63(\% \text{Morf. Norm.})$$

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados			
	B	Error típ.	Beta	t	Sig.	
3	(Constante)	-112,477	42,157		-2,668	,011
	CONCENTRACIÓN	,111	,022	,565	4,968	,000
	% INTEGR. MEMBRANA	1,033	,421	,278	2,450	,019
	% MORF. NORMALES	,631	,257	,262	2,450	,019
n=40	r=0,768	r <sup>2</sup> =0,590	r <sup>2</sup> correg.=0,556	Anova: F=17,283	p<0,001	

**Tabla 4.27:** Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad utilizando los parámetros analizados dentro de la valoración rutinaria del semen.

#### 4.2.2. Evaluación de la resistencia de las células espermáticas a un estrés hiposmótico (HOST Y ORT).

##### 4.2.2.1. Análisis de los resultados obtenidos.

##### Test de endósmosis positiva (HOST).

En la tabla 9.2 de los anexos aparecen reflejados los valores obtenidos tras la realización de la prueba del HOST a los 40 eyaculados empleados en este experimento. En él se puede apreciar una gran variabilidad en la respuesta a esta prueba, dejando, a los 30 minutos de incubación a una temperatura de 37 °C, medias mínimas de un 22,5±3,5 % en el primer eyaculado extraído al T475, y máximas de un 86,5±0,7 %, procedentes del semen empleado en la quinta congelación del R5487. Esta variabilidad se ve nuevamente reflejada en las muestras incubadas a esa misma temperatura durante 60 minutos, donde el mismo eyaculado del T475 marca los valores más bajos, con un promedio de un 24,0±2,1 % y el cuarto del verraco R4052 muestra la media más alta, con un 86,8±1,1 %.

En la tabla 4.28, se observa que en las muestras seminales mantenidas a 37 °C durante una hora se produce un incremento en el porcentaje de espermatozoides HOST positivos (p<0,01) con respecto a aquellas que permanecen solamente 30 minutos. Este efecto se produce en ambas razas, si bien, a partir de esta prueba, se podría concluir que los eyaculados de la raza Landrace presentan una mayor calidad, como queda reflejado en los valores más altos que obtiene (p<0,05) en las dos incubaciones (tabla 4.29).

	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
HOST 30' (%)	58,94 <sup>a</sup>	17,06	22,50	86,50
HOST 60' (%)	61,41 <sup>b</sup>	16,24	24,00	88,25

**Tabla 4.28:** Valores medios obtenidos para las dos incubaciones empleadas en la realización del HOST. Diferentes superíndices revelan diferencias significativas (p<0,05).

Del mismo modo, los verracos presentan, individualmente considerados, una respuesta dispar a la prueba; el G6328 es el animal que presenta una menor resistencia a la incubación en el medio hiposmótico, tanto si ésta es de 30 minutos como si se alarga media hora más, con medias de un 43,0±6,24 % y de un 46,1±6,3 % en cada caso, y en el lado opuesto, el R4052 es el que muestra unos valores más altos, con medias para la incubación durante 30 minutos de un 76,6±13,9 %

y de un  $78,7 \pm 12,7\%$  para la realizada durante una hora (tabla 4.30). Por regla general, en este caso también resultan valores más elevados ( $p < 0,05$ ) tras 60 minutos de incubación, si bien, tres de los ocho verracos utilizados (G5223, T475 y R3846) no muestran significación estadística en este aspecto.

		HOST 30' (%)				HOST 60' (%)			
		Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo
RAZA	LW	53,88 <sup>a</sup>	15,77	22,50	78,00	56,35 <sup>a,*</sup>	14,94	24,00	77,75
	LD	64,00 <sup>b</sup>	17,17	31,00	86,50	66,46 <sup>b,*</sup>	16,27	32,75	88,25

**Tabla 4.29:** Valores medios obtenidos para las dos incubaciones empleadas en la realización del HOST en función de la raza.

Diferentes superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre razas. \* Indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre incubaciones.

		HOST 30' (%)				HOST 60' (%)			
		Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo
VERRACO	G2552	55,60 <sup>abc</sup>	7,58	48,00	64,50	58,55 <sup>abc,*</sup>	5,78	52,25	66,25
	G5223	69,90 <sup>bc</sup>	4,66	64,50	75,00	71,60 <sup>bc</sup>	4,09	66,25	75,50
	G6328	43,00 <sup>a</sup>	6,16	34,00	50,50	46,05 <sup>a,*</sup>	6,28	36,25	53,50
	T475	47,00 <sup>ab</sup>	23,06	22,50	78,00	49,20 <sup>ab</sup>	21,85	24,00	77,75
	L437	46,10 <sup>ab</sup>	10,01	31,00	58,00	49,40 <sup>ab,*</sup>	9,84	32,75	58,25
	R3846	57,70 <sup>abc</sup>	12,94	47,00	77,50	59,60 <sup>abc</sup>	10,82	51,50	76,75
	R4052	76,60 <sup>c</sup>	13,90	52,50	86,00	78,70 <sup>c,*</sup>	12,73	56,75	88,25
	R5487	75,60 <sup>c</sup>	11,09	61,50	86,50	78,15 <sup>c,*</sup>	10,01	65,25	88,25

**Tabla 4.30:** Valores medios obtenidos para las dos incubaciones empleadas en la realización del HOST en función del verraco.

Diferentes superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre animales. \* Indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre incubaciones.

### Test de resistencia osmótica (ORT).

Los valores obtenidos con la realización de la prueba de Resistencia Osmótica (ORT) a los diferentes eyaculados se muestran en la tabla 9.3 de los anexos.

Al igual que sucedía con el HOST, existe una sustancial variabilidad en la respuesta de los eyaculados, si bien, en este caso es inferior a la observada en la prueba de endósmosis positiva. Tras una incubación de 60 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , el valor medio mínimo se recoge en el 2º eyaculado del verraco G6328, con un porcentaje de un  $69,0 \pm 4,2\%$ , y el valor máximo se mantiene en un  $94,0 \pm 0,7\%$  en el material seminal empleado en la 1ª congelación del R5487.

Los valores calculados, al mantener las muestras durante una hora más a  $37^{\circ}\text{C}$ , disminuyen significativamente ( $p < 0,01$ ), como se refleja en la tabla 4.31, quedando en un  $65,3 \pm 1,8\%$  el valor mínimo y en un  $89,5 \pm 2,1\%$  el valor máximo, correspondiendo, respectivamente, al 2º eyaculado del verraco G2552 y al 3º del R5487.

Este efecto tiene lugar en ambas razas por igual, si bien, a partir de esta prueba se podría concluir, de la misma forma que sucedía en el HOST, que los eyaculados de la raza Landrace

tienen una mayor calidad que los de la raza Large White, debido a que presentan valores medios superiores ( $p < 0,05$ ) en ambas incubaciones (tabla 4.32).

Al proceder a realizar la comparación de los resultados obtenidos por los ocho animales del experimento en ambas incubaciones, en todos ellos se observa el incremento mencionado ( $p < 0,05$ ) al aumentar el tiempo de permanencia en el baño termostático. Por otra parte, en las dos incubaciones también se aprecian diferencias ( $p < 0,05$ ) en la respuesta a la prueba en función del verraco, observándose, después de 120 minutos a 37 °C, una menor variabilidad en la respuesta que tras 60 minutos (tabla 4.33).

	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
<b>ORT 60' (%)</b>	<b>85,34<sup>a</sup></b>	6,37	67,75	94,00
<b>ORT 120' (%)</b>	<b>81,86<sup>b</sup></b>	5,75	65,25	89,50

**Tabla 4.31:** Valores medios obtenidos para las dos incubaciones empleadas en la realización del HOST. Diferentes superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

		ORT 60' (%)				ORT 120' (%)			
		Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo
<b>RAZA</b>	<b>LW</b>	<b>83,49<sup>a</sup></b>	6,67	67,75	91,75	<b>80,45<sup>a,*</sup></b>	6,25	65,25	88,50
	<b>LD</b>	<b>87,19<sup>b</sup></b>	5,62	75,75	94,00	<b>83,26<sup>b,*</sup></b>	4,97	72,75	89,50

**Tabla 4.32:** Valores medios obtenidos para las dos incubaciones empleadas en la realización del ORT en función de la raza.

Diferentes superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre razas. \* Indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre incubaciones.

		ORT 60' (%)				ORT 120' (%)			
		Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo
<b>VERRACO</b>	<b>G2552</b>	<b>78,90<sup>a</sup></b>	7,03	67,75	85,75	<b>75,50<sup>a,*</sup></b>	6,65	65,25	81,75
	<b>G5223</b>	<b>89,95<sup>c</sup></b>	1,24	88,50	91,75	<b>86,55<sup>b,*</sup></b>	,96	85,25	87,75
	<b>G6328</b>	<b>80,50<sup>ab</sup></b>	7,02	69,00	86,25	<b>77,25<sup>a,*</sup></b>	5,24	69,75	82,75
	<b>T475</b>	<b>84,60<sup>abc</sup></b>	4,48	79,75	90,25	<b>82,50<sup>ab,*</sup></b>	4,20	78,75	88,50
	<b>L437</b>	<b>80,15<sup>a</sup></b>	3,63	75,75	83,75	<b>77,25<sup>a,*</sup></b>	3,82	72,75	82,00
	<b>R3846</b>	<b>89,25<sup>bc</sup></b>	2,94	86,25	93,00	<b>85,00<sup>b,*</sup></b>	2,16	82,50	88,00
	<b>R4052</b>	<b>85,95<sup>abc</sup></b>	3,22	81,50	90,00	<b>81,75<sup>ab,*</sup></b>	1,99	78,50	83,25
	<b>R5487</b>	<b>93,40<sup>c</sup></b>	,58	92,50	94,00	<b>89,05<sup>b,*</sup></b>	,48	88,25	89,50

**Tabla 4.33:** Valores medios obtenidos para las dos incubaciones empleadas en la realización del ORT en función del verraco.

Diferentes superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre animales. \* Indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre incubaciones.

#### 4.2.2.2. Estudio de la correlación existente entre las distintas pruebas hiposmóticas realizadas.

Las variaciones en el tiempo de incubación de las muestras a 37 °C ha supuesto, en la mayoría de los casos, una respuesta estadísticamente diferente en el HOST y en el ORT, si bien,

después de efectuar en ambos la estimación de los coeficientes de correlación existentes entre los valores obtenidos en las distintas incubaciones (tabla 4.34), observamos que, tanto el test de endósmosis celular como el test de resistencia osmótica, presentan altas correlaciones entre los dos tiempos de incubación establecidos, con coeficientes de un 0,981 y un 0,995, respectivamente.

		HOST 30'	HOST 60'	ORT 60'	ORT 120'
HOST 30'	Coef. Correl.	1	<u>.995</u>	<u>.444</u>	<u>.410</u>
	Sig. (bilateral)		,000	,004	,009
HOST 60'	Coef. Correl.	<u>.995</u>	1	<u>.440</u>	<u>.401</u>
	Sig. (bilateral)	,000		,004	,010
ORT 60'	Coef. Correl.	<u>.444</u>	<u>.440</u>	1	<u>.981</u>
	Sig. (bilateral)	,004	,004		,000
ORT 120'	Coef. Correl.	<u>.410</u>	<u>.401</u>	<u>.981</u>	1
	Sig. (bilateral)	,009	,010	,000	

**Tabla 4.34:** Coeficientes de correlación entre los valores obtenidos en las diferentes pruebas de estrés osmótico (HOST y ORT).

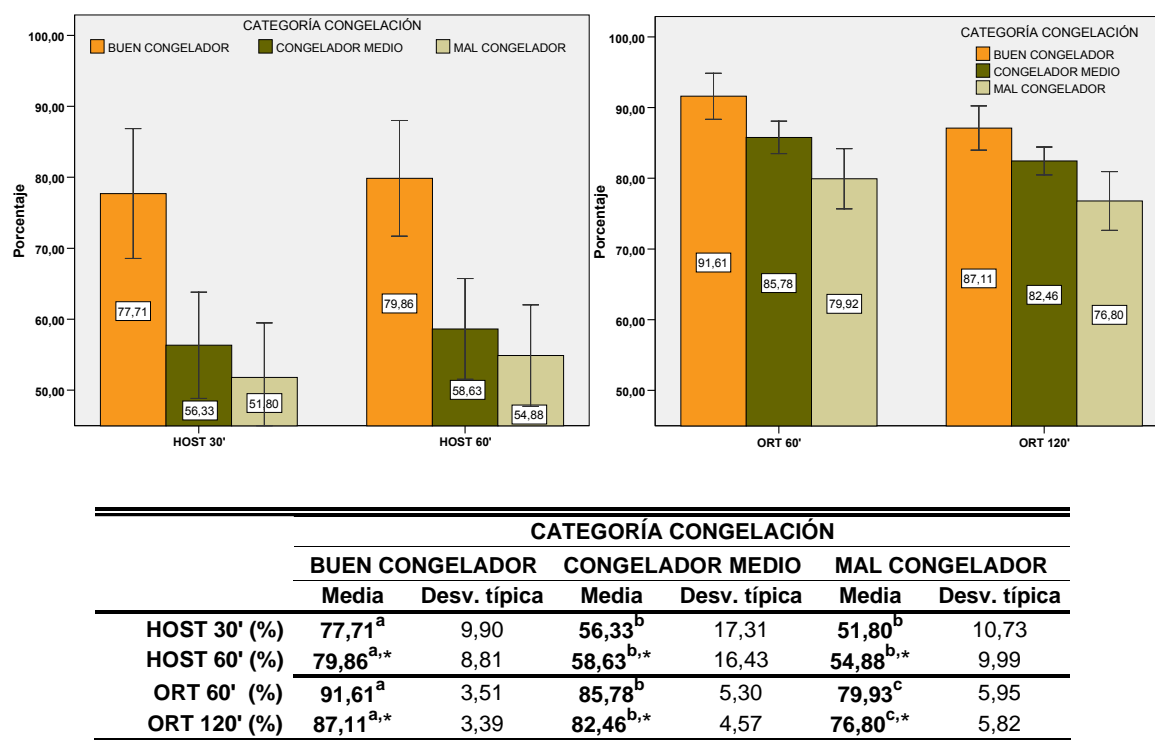
Los coeficientes subrayados y en negrita presentan significación estadística ( $p < 0,05$ ).

Como la esencia de ambas pruebas es prácticamente la misma, ya que pretende estimar la capacidad de adaptación de la membrana plasmática de los espermatozoides a un medio con una presión osmótica muy por debajo de la intracelular, realizamos el cálculo del coeficiente de correlación entre los valores obtenidos en las dos pruebas del HOST y en las del ORT (tabla 4.34), para así establecer la relación existente entre ambas, y se aprecia que los coeficientes de correlación obtenidos no muestran grandes variaciones entre ellos, ya que todos se mantienen entre el 0,401 y el 0,444. En las dos pruebas en las que las muestras permanecieron 60 minutos en incubación y que, *a priori*, sería esperable que mostrasen la mayor correlación de las cuatro, el coeficiente es, sin embargo, de un 0,440.

#### 4.2.2.3. Influencia de la aptitud para la congelación de un eyaculado sobre la respuesta al estrés osmótico.

Al agrupar los resultados en función de los grupos establecidos según la aptitud para la congelación de los diferentes eyaculados (figura 4.6), se observa más o menos el mismo patrón, tanto en el ORT como en el HOST: cuanto mejor sea la capacidad de congelación de un eyaculado, mayor va a ser el valor obtenido en cada una de las pruebas de estrés osmótico. No obstante, aunque la tendencia sea similar entre el HOST y el ORT, la distribución de los resultados no lo es tanto; así, mientras en la prueba de Resistencia Osmótica, la variación mostrada entre los citados grupos de calidad, aparte de ser estadísticamente significativa entre todos ellos ( $p < 0,05$ ), es bastante homogénea en las dos incubaciones, en los dos tiempos de incubación del HOST se observa una diferencia notable ( $p < 0,01$ ) entre el grupo de Buenos Congeladores (BC) y los otros dos, no apreciándose entre éstos últimos diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), si bien los valores medios observados son más elevados para el grupo de Congeladores Medios (CM).





**Figura 4.6:** Valores medios obtenidos para las dos incubaciones empleadas en la realización del ORT y el HOST en función de la aptitud para la congelación de los eyaculados.

Diferentes superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos. \* Indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tiempos de incubación.

En todos los grupos de calidad se incrementan ( $p < 0,01$ ), en el caso de la prueba de Endósmosis Positiva, o se reducen ( $p < 0,01$ ), en el caso del Test de Resistencia Osmótica, los valores medios al incrementar el tiempo durante el que las muestras permanecen a 37 °C.

#### 4.2.2.4. Determinación de la congelabilidad de un eyaculado a partir de la respuesta observada al estrés osmótico.

En la tabla 4.35 aparecen reflejados los índices de correlación obtenidos entre los resultados calculados tras la realización de las diferentes pruebas de estrés osmótico y el índice de congelabilidad, así como entre dichos resultados y la resistencia al proceso de congelación/descongelación, tanto del acrosoma como de la movilidad espermática (con y sin cafeína). En ella se observa que todos, tanto en la prueba del HOST como en la del ORT, presentan correlaciones significativas ( $p < 0,05$ ) con el índice de congelabilidad y con el de resistencia del acrosoma, y únicamente en el Test de Resistencia Osmótica, para ambas pruebas, dichas correlaciones se muestran también con los índices de movilidad.

El modelo elegido, tras el análisis multivariante de regresión para la congelabilidad realizado a partir de la respuesta mostrada por los diferentes eyaculados a las distintas pruebas osmóticas, incluye sólo al ORT efectuado a los 60 minutos de incubación, ya que ésta era, con un 21,6 %, la variable que mayor proporción de la varianza del índice de congelabilidad explicaba. Las otras tres variables introducidas (ORT 120', HOST 30' y HOST 60') son excluidas del modelo debido

a problemas de significación o colinealidad con la elegida (tabla 4.36).

La ecuación de regresión determinada a partir de los coeficientes resultantes en dicho modelo es la siguiente:

$$\text{Congelabilidad} = -17,47 + 0,941(\text{ORT } 60')$$

		RESISTENCIA AL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN			
		MEMB. PLASMÁTICA "CONGELABILIDAD"	ACROSOMA	MOVILIDAD	MOVILIDAD (CAFEÍNA)
HOST 30'	Coef. Correl.	<u>.355</u>	<u>.538</u>	.239	.183
	Sig. (bilateral)	.025	.000	.137	.259
HOST 60'	Coef. Correl.	<u>.353</u>	<u>.552</u>	.247	.191
	Sig. (bilateral)	.025	.000	.125	.239
ORT 60'	Coef. Correl.	<u>.486</u>	<u>.557</u>	<u>.486</u>	<u>.417</u>
	Sig. (bilateral)	.001	.000	.001	.007
ORT 120'	Coef. Correl.	<u>.484</u>	<u>.523</u>	<u>.456</u>	<u>.412</u>
	Sig. (bilateral)	.002	.001	.003	.008

Tabla 4.35: Coeficientes de correlación entre los valores obtenidos en las diferentes pruebas de estrés osmótico y los índices calculados postdescongelación.

Los coeficientes subrayados y en negrita presentan significación estadística ( $p < 0,05$ ).

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados			
	B	Error típ.	Beta	t	Sig.	
1	(Constante)	-17,469	23,527		-,742	,462
	ORT 60'	<u>.941</u>	,275	<u>.486</u>	3,423	,001
n=40	r=0,486	r <sup>2</sup> =0,236	r <sup>2</sup> correg.=0,216	Anova: F=11,720	p<0,01	

Tabla 4.36: Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con las variables obtenidas tras la realización de las pruebas de estrés osmótico.

### 4.2.3. Evaluación de la resistencia de las células espermáticas a un estrés por calor (termorresistencia).

#### 4.2.3.1. Análisis de los resultados obtenidos.

#### Evolución de la integridad de la membrana plasmática a lo largo de la incubación a 39 °C.

Los porcentajes medios relativos a la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides obtenidos en los distintos tiempos de toma de muestras están recogidos en la figura 4.7, en la que queda reflejado que, a medida que aumenta el tiempo de incubación, se produce una disminución clara de la vitalidad espermática, aunque hasta las 3 horas de incubación (T3) no se observan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con el valor inicial.

Considerando independientemente las dos razas empleadas en el estudio, se aprecia que ambas se comportan de forma similar, sin diferencias ( $p > 0,05$ ) entre sus porcentajes medios, si bien, en la raza Large White, hay una aparente mayor resistencia, ya que la disminución de la integridad empieza a quedar patente a partir de las 4,5 horas de incubación (T4,5), mientras que en la raza

Landrace ya se detecta a partir de la 3ª hora (figura 4.8).

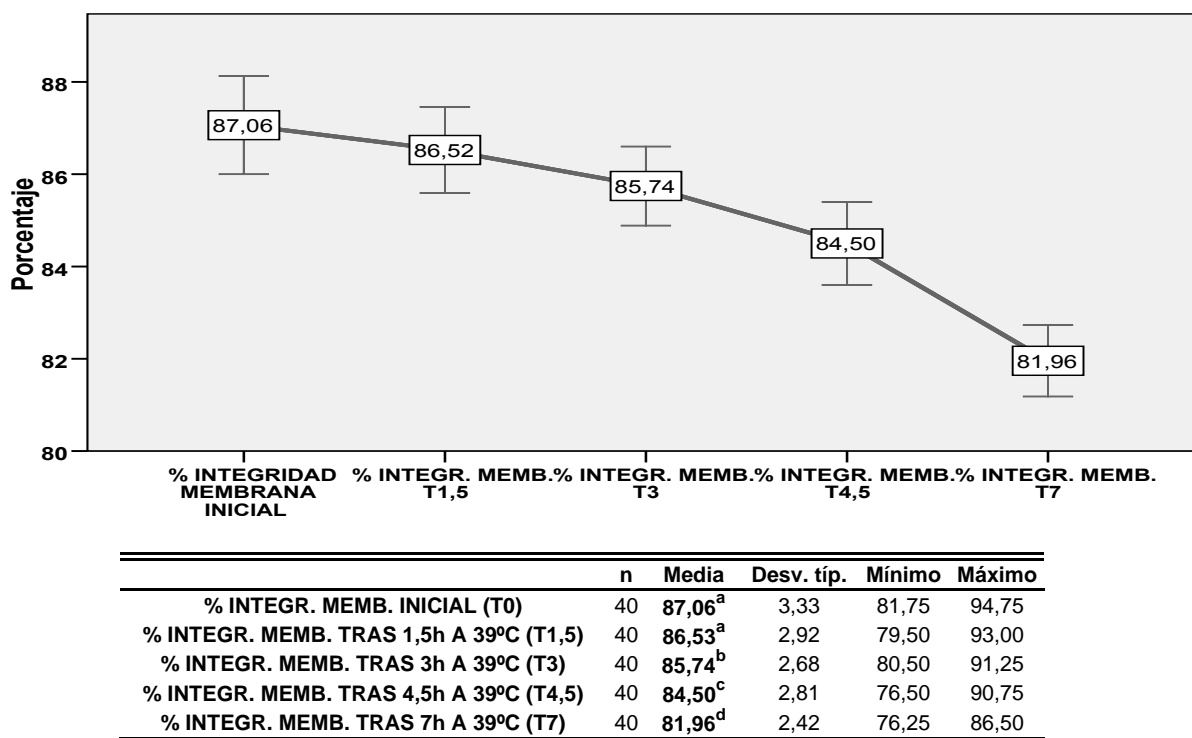


Figura 4.7: Promedios de integridad de la membrana plasmática en la prueba de la termorresistencia. Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

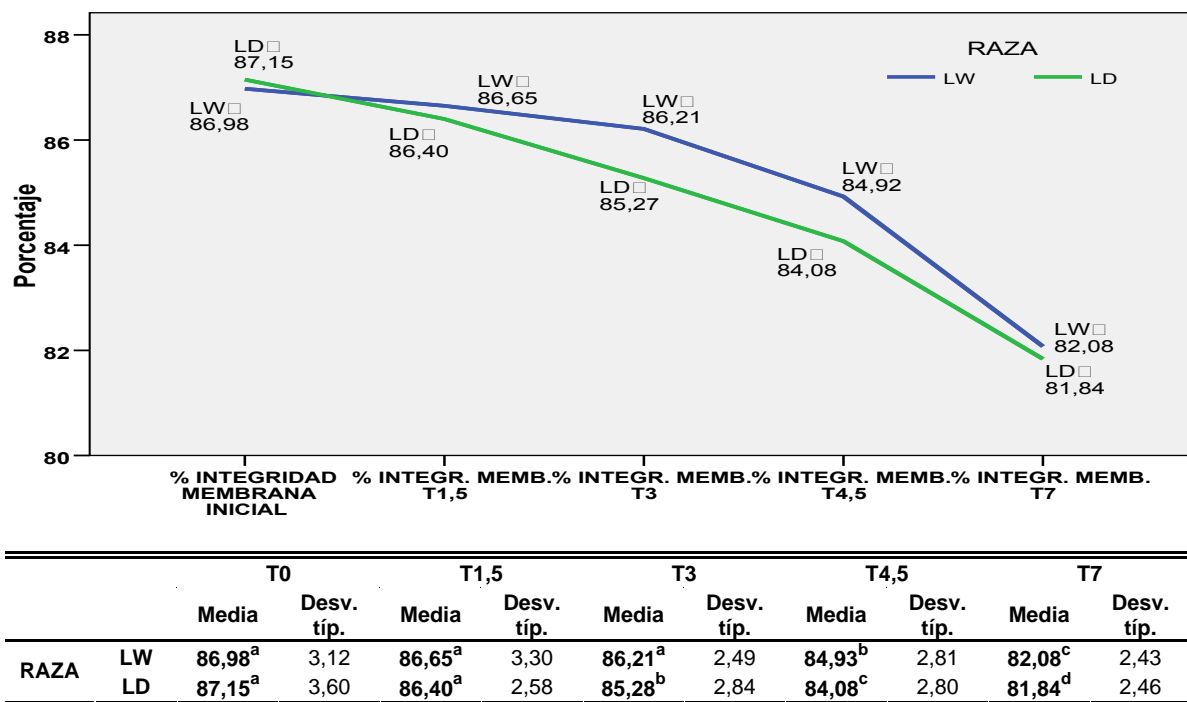
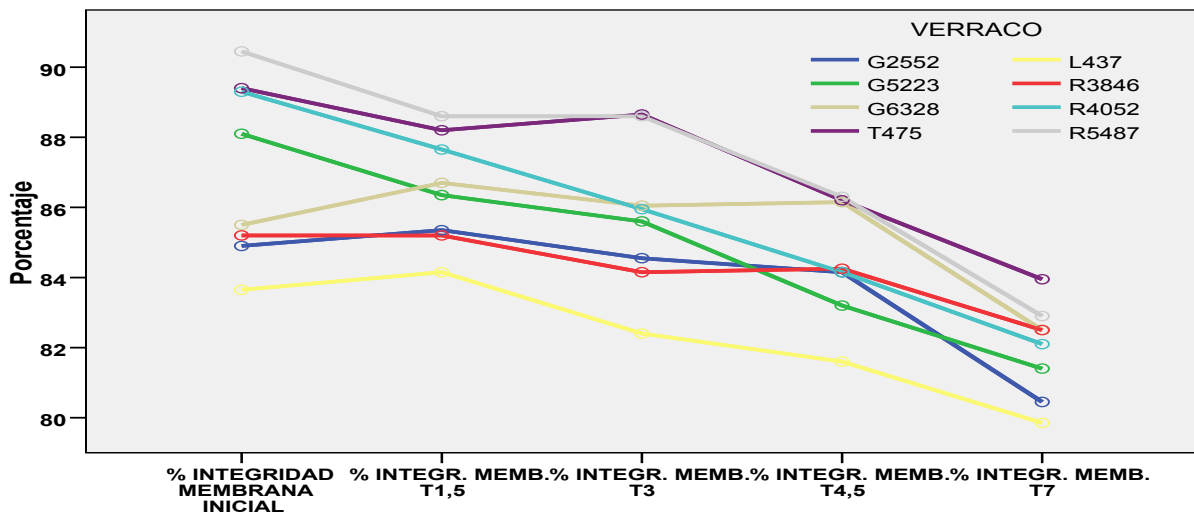


Figura 4.8: Porcentajes medios de integridad de la membrana plasmática, en función de la raza, en la prueba de la termorresistencia.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tiempos y \* las revelaría entre razas..

Al analizar las medias obtenidas para cada animal (figura 4.9) nos encontramos con que prácticamente todos los verracos sufren por igual el efecto de la incubación a 39 °C, en todos ellos se producen descensos similares en los diferentes tiempos. La variabilidad existente entre ellos en el momento inicial ( $p < 0,05$ ) sólo se vuelve a ver reflejada a las tres horas de incubación ( $p < 0,01$ ), no mostrando en el resto de los tiempos de toma de muestras diferencias significativas en sus valores medios.



	T0*		T1,5		T3*		T4,5		T7		
	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	
VERRACO	G2552	84,90 <sup>a</sup>	1,55	85,35 <sup>a</sup>	2,25	84,55 <sup>a</sup>	2,04	84,15 <sup>a</sup>	1,63	80,45 <sup>b</sup>	0,82
	G5223	88,10 <sup>a</sup>	3,86	86,35 <sup>a</sup>	5,96	85,60 <sup>a</sup>	2,65	83,20 <sup>bc</sup>	3,72	81,40 <sup>c</sup>	3,60
	G6328	85,50 <sup>a</sup>	2,43	86,70 <sup>a</sup>	1,46	86,05 <sup>a</sup>	0,76	86,15 <sup>b</sup>	2,00	82,50 <sup>c</sup>	1,93
	T475	89,40 <sup>a</sup>	2,45	88,20 <sup>a</sup>	1,92	88,65 <sup>a</sup>	2,50	86,20 <sup>b</sup>	2,96	83,95 <sup>b</sup>	1,54
	L437	83,65 <sup>ab</sup>	2,44	84,15 <sup>a</sup>	2,20	82,40 <sup>b</sup>	1,40	81,60 <sup>ac</sup>	3,00	79,85 <sup>c</sup>	2,15
	R3846	85,20 <sup>a</sup>	0,93	85,20 <sup>ab</sup>	1,08	84,15 <sup>ab</sup>	2,40	84,25 <sup>ab</sup>	2,05	82,50 <sup>b</sup>	2,89
	R4052	89,30 <sup>ab</sup>	2,31	87,65 <sup>a</sup>	2,89	85,95 <sup>ab</sup>	1,82	84,15 <sup>b</sup>	2,30	82,10 <sup>c</sup>	1,86
	R5487	90,45 <sup>a</sup>	3,17	88,60 <sup>a</sup>	1,04	88,60 <sup>a</sup>	0,98	86,30 <sup>a</sup>	2,21	82,90 <sup>b</sup>	2,31

Figura 4.9: Porcentajes medios de integridad de la membrana plasmática, en función del verraco, en la prueba de la termorresistencia.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas entre tiempos ( $p < 0,01$ ). La presencia de \* revela diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre verracos, para ese tiempo.

### Evolución de la integridad del acrosoma a lo largo de la incubación a 39 °C.

Al igual que sucede con la integridad de la membrana plasmática, la integridad de la vesícula acrosómica también sufre, a lo largo de la incubación y desde un primer momento, una reducción ( $p < 0,05$ ) en su porcentaje medio (figura 4.10), pasando de un  $97,3 \pm 1,7\%$  a un  $92,5 \pm 2,0\%$ .

Ambas razas sufrieron de igual forma el efecto de la incubación sobre el acrosoma, presentando medias similares ( $p > 0,05$ ) en todos los tiempos establecidos para la toma de valores, además de reducciones parecidas entre cada uno de ellos ( $p < 0,05$ ), incluida la aparición de una meseta en el descenso de la integridad entre la T1,5 y la T3 (figura 4.11).

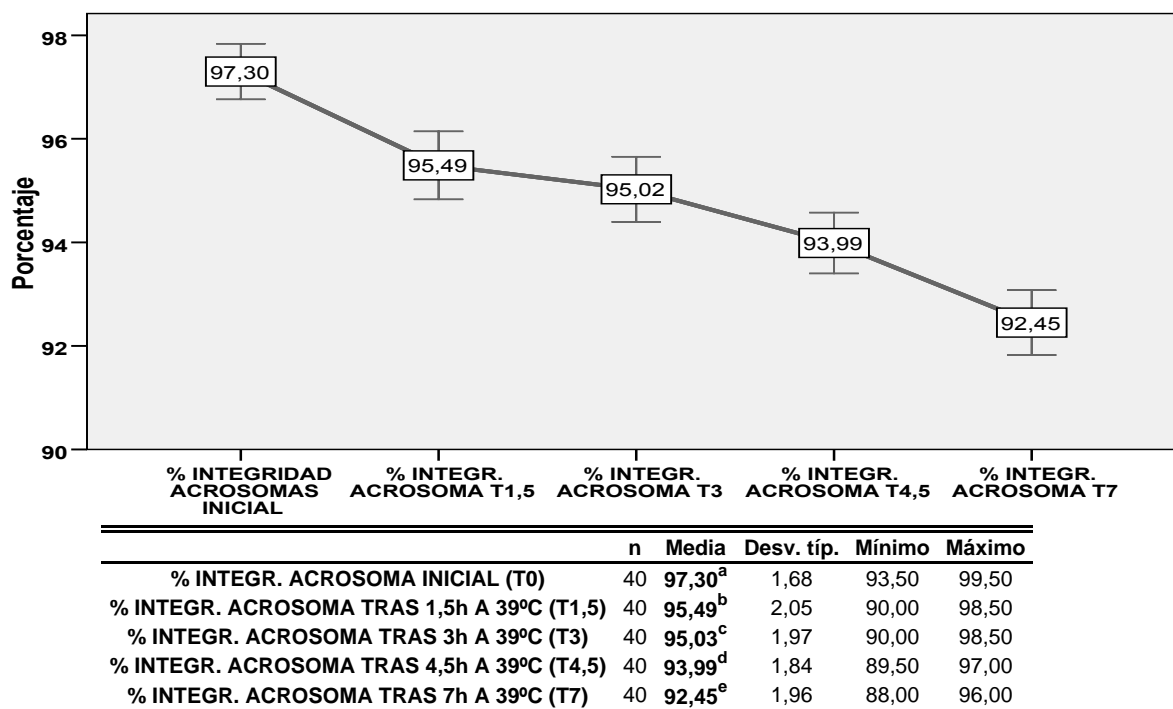


Figura 4.10: Promedios de integridad del acrosoma en la prueba de la termorresistencia. Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,01$ ).

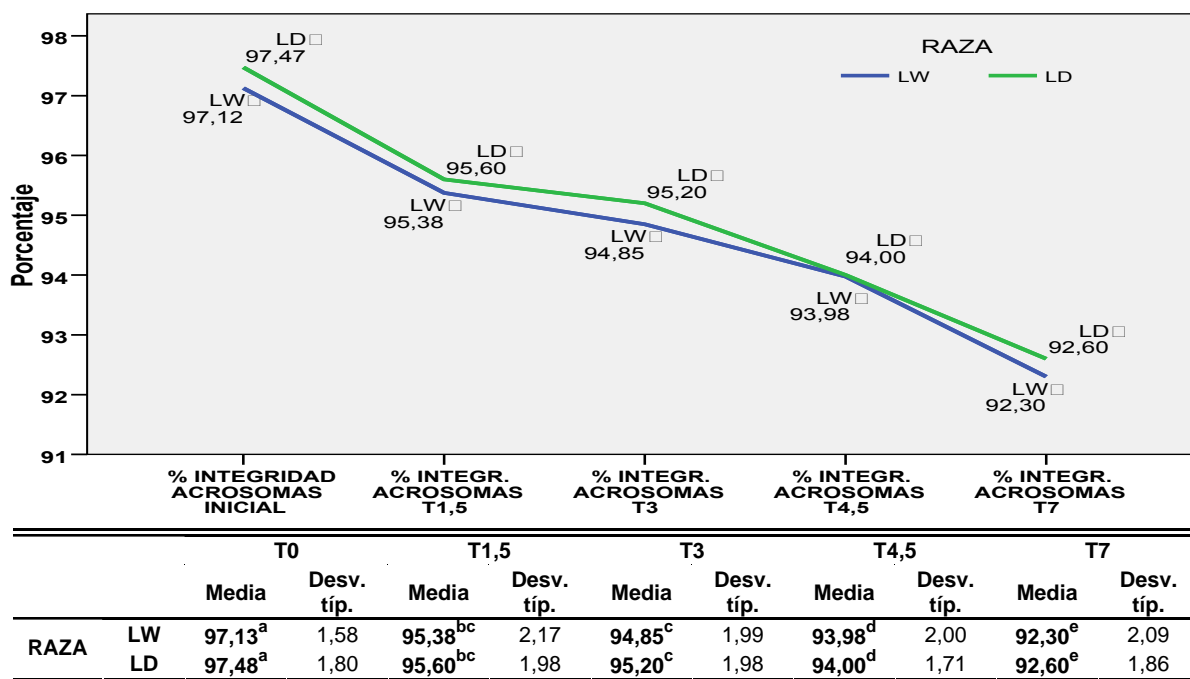


Figura 4.11: Porcentajes medios de integridad del acrosoma, en función de la raza, en la prueba de la termorresistencia. Distintos superíndices revelan diferencias significativas entre tiempos ( $p < 0,05$ ) y \* las revelaría entre razas.

Si nos fijamos en los valores medios obtenidos por cada animal (figura 4.12), comprobamos que la integridad del acrosoma también va disminuyendo a medida que transcurre el tiempo de incubación en todos ellos. La variabilidad inicial ( $p < 0,05$ ) mostrada en el eyaculado desaparece

en los primeros momentos de la incubación, no volviendo a aparecer diferencias ( $p > 0,05$ ) entre los valores medios de los verracos en ningún otro tiempo.

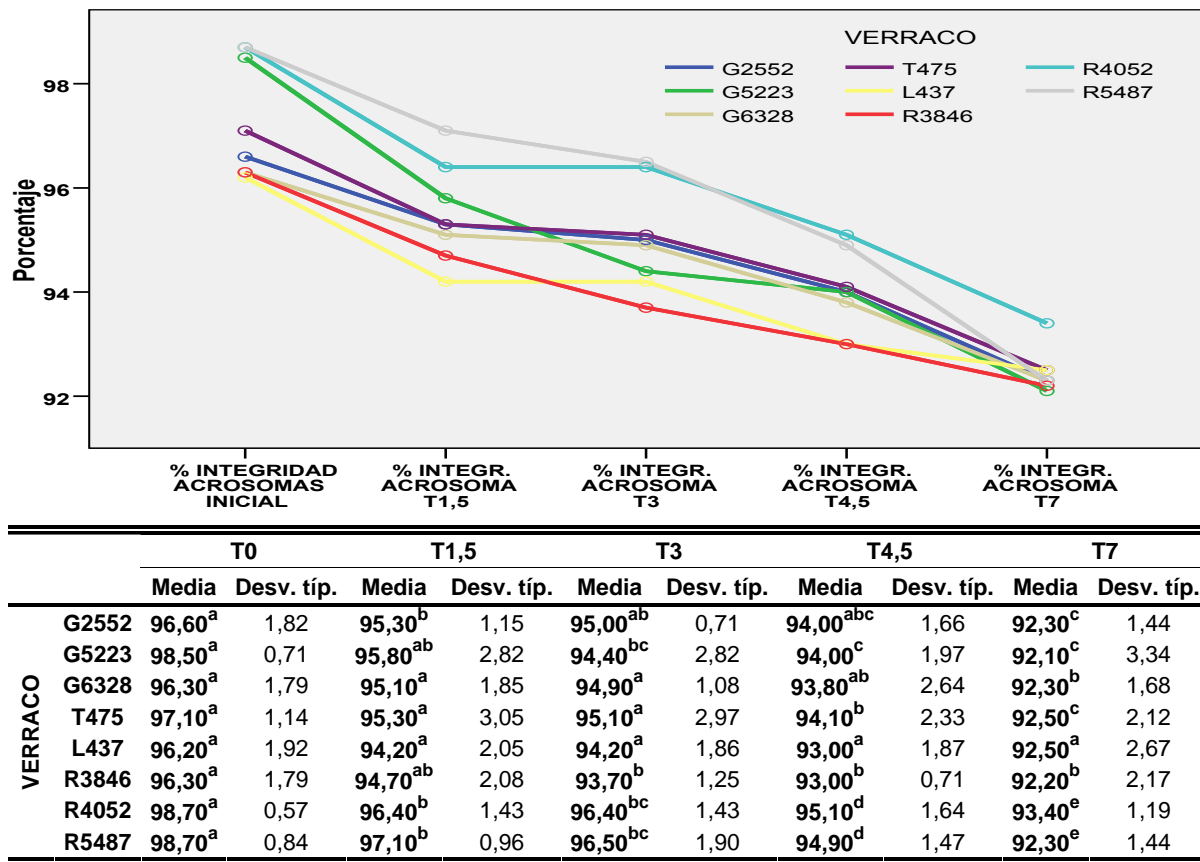


Figura 4.12: Porcentajes medios de integridad del acrosoma, en función del verraco, en la prueba de la termorresistencia.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas entre tiempos ( $p < 0,05$ ). La presencia de \* revelaría diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre verracos, para ese tiempo.

### Evolución de la integridad del porcentaje de movilidad espermática a lo largo de la incubación a 39 °C.

#### Muestras con incubación posterior al estrés por calor en diluyente comercial sin cafeína.

De manera análoga a lo ocurrido con los otros dos parámetros analizados, el porcentaje de movilidad sufre un claro descenso ( $p < 0,05$ ) a lo largo de la incubación, que en el caso de este parámetro se produce de forma brusca ( $p < 0,001$ ) entre el T4,5 y el T7, pasando de una media de un  $81,4 \pm 10,8\%$  a un  $46,0 \pm 15,2\%$  (figura 4.13).

Esta caída en el porcentaje de movilidad se detecta también en cada raza por separado, si bien, en la Large White se produce de forma más progresiva, puesto que a las 4,5 horas de incubación ya presenta un descenso claro, con valores medios de un  $75,6 \pm 11,8\%$ . Es en esta toma en la única en la que se aprecian diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre ambas razas, ya que la Landrace mantiene el porcentaje de movilidad en un  $87,2 \pm 5,6\%$ , para posteriormente caer, una

vez transcurridas las 7 horas de incubación, a poco más del 48 % (figura 4.14).

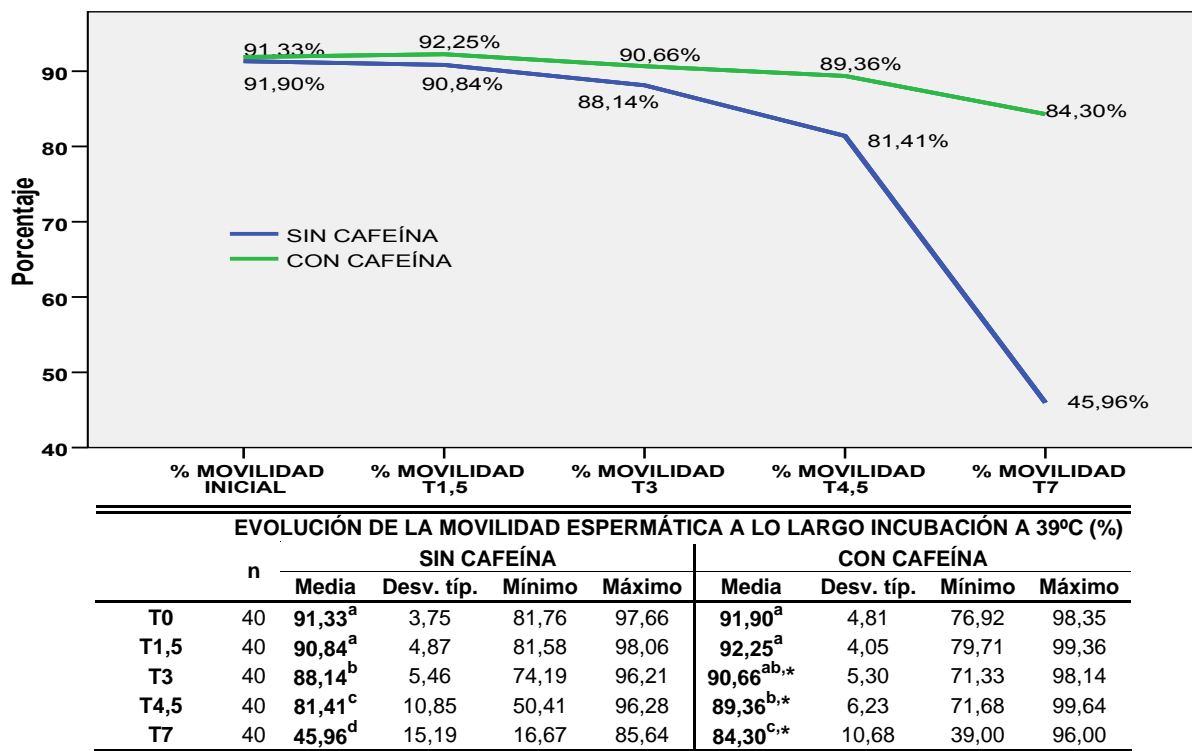


Figura 4.13: Porcentajes medios de movilidad en la prueba de la termorresistencia.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas entre tiempos ( $p < 0,01$ ). La presencia de \* revela diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre muestras con y sin cafeína.

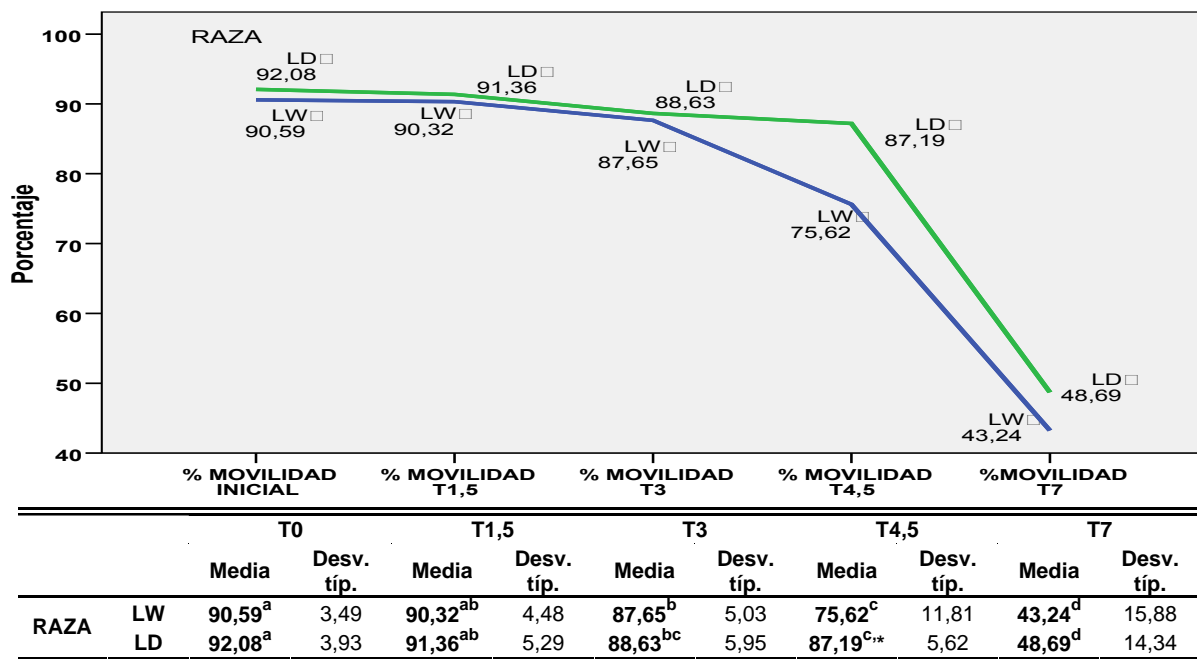
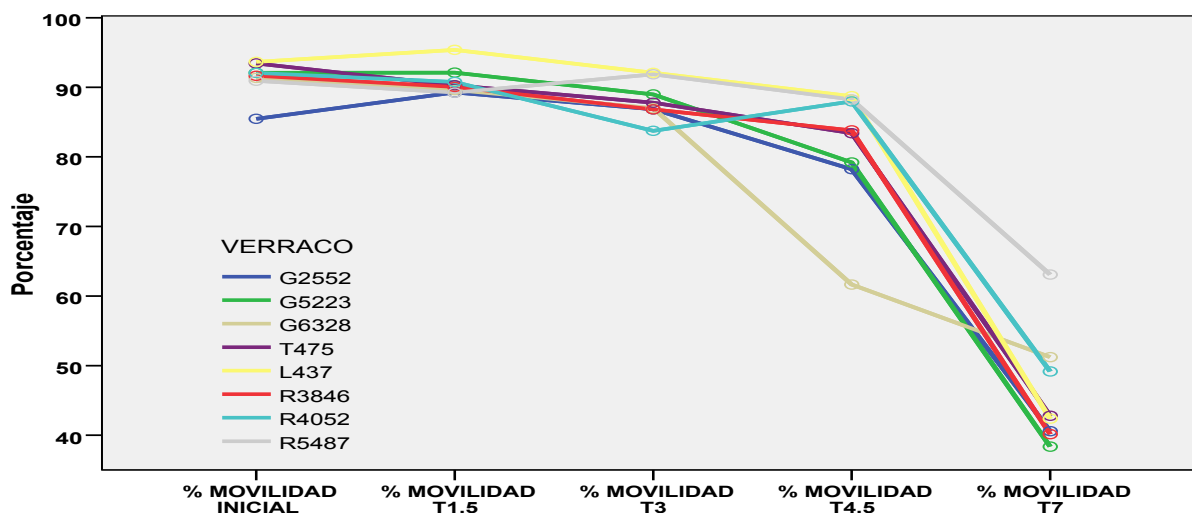


Figura 4.14: Porcentajes de movilidad, en función de la raza, en la prueba de la termorresistencia.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas entre tiempos ( $p < 0,05$ ). La presencia de \* revela diferencias significativas entre razas ( $p < 0,05$ ).

Considerando los valores de cada verraco en particular, al igual que sucede con los otros dos parámetros analizados hasta ahora, su comportamiento es similar a lo largo de la prueba, sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) para los distintos tiempos de incubación en el porcentaje de movilidad entre ellos, salvo en el T4,5, en el que dicho porcentaje para el verraco G6328 cae bastante más que en el resto, hasta un  $61,6 \pm 11,6$  % (figura 4.15).



		T0*		T1,5		T3		T4,5*		T7	
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
VERRACO	G2552	85,48 <sup>a</sup>	2,32	89,26 <sup>ab</sup>	4,13	86,83 <sup>abc</sup>	4,84	78,23 <sup>c</sup>	5,79	40,58 <sup>d</sup>	9,20
	G5223	92,08 <sup>a</sup>	1,49	92,11 <sup>a</sup>	2,71	88,98 <sup>a</sup>	5,25	79,20 <sup>b</sup>	11,75	38,36 <sup>c</sup>	12,82
	G6328	91,36 <sup>a</sup>	1,78	89,60 <sup>a</sup>	5,13	86,99 <sup>a</sup>	7,55	61,66 <sup>b</sup>	11,56	51,27 <sup>b</sup>	15,24
	T475	93,43 <sup>a</sup>	0,97	90,29 <sup>ab</sup>	6,21	87,79 <sup>bc</sup>	2,93	83,40 <sup>c</sup>	3,62	42,79 <sup>d</sup>	24,47
	L437	93,66 <sup>ab</sup>	3,08	95,38 <sup>a</sup>	2,28	92,08 <sup>ab</sup>	3,11	88,72 <sup>b</sup>	3,56	42,37 <sup>c</sup>	9,88
	R3846	91,66 <sup>a</sup>	4,87	90,05 <sup>a</sup>	5,55	86,83 <sup>a</sup>	8,60	83,81 <sup>a</sup>	8,98	40,15 <sup>b</sup>	6,36
	R4052	92,08 <sup>a</sup>	3,70	90,77 <sup>ab</sup>	6,61	83,74 <sup>b</sup>	3,34	87,98 <sup>b</sup>	2,93	49,16 <sup>c</sup>	11,45
	R5487	90,94 <sup>a</sup>	4,62	89,24 <sup>ab</sup>	5,00	91,87 <sup>a</sup>	3,34	88,26 <sup>a</sup>	5,37	63,08 <sup>b</sup>	17,52

Figura 4.15: Porcentajes de movilidad, en función del verraco, en la prueba de la termorresistencia. Distintos superíndices revelan diferencias significativas entre tiempos ( $p < 0,05$ ). La presencia de \* revela diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre verracos, para ese tiempo.

#### Muestras con incubación posterior al estrés por calor en diluyente comercial suplementado con cafeína a una concentración de 1 mM.

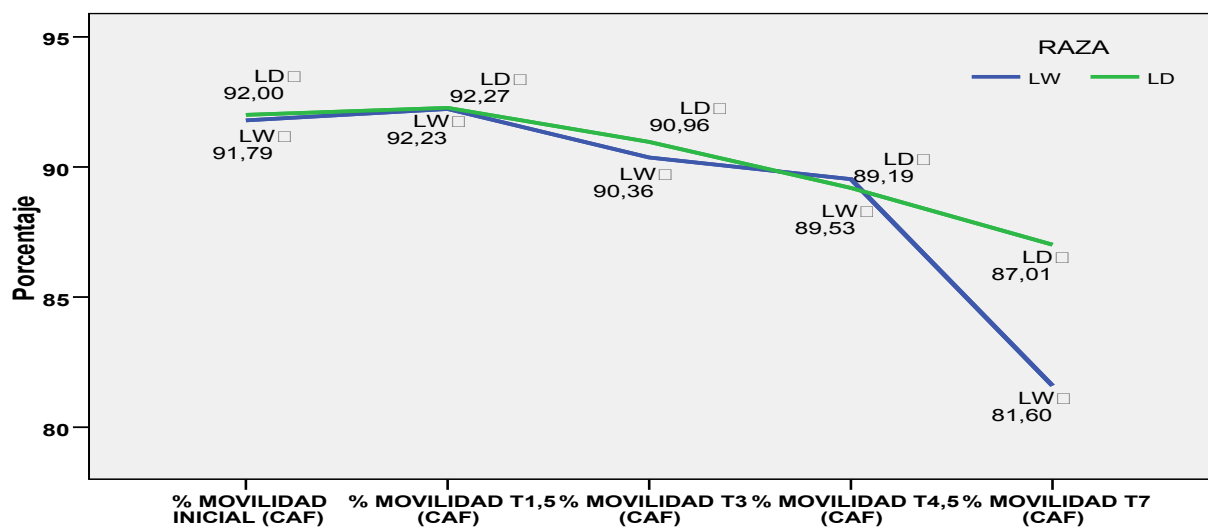
Al hacer el análisis de datos en las muestras incubadas en el diluyente con el estimulante de la movilidad, lo primero que se observa es que a partir de las tres horas de incubación a  $39$  °C el porcentaje de espermatozoides móviles era superior ( $p < 0,05$ ) con respecto a los valores obtenidos en las muestras sin cafeína.

En la figura 4.13, que refleja los porcentajes medios para cada uno de los tiempos de incubación en los que se analizan las muestras, puede apreciarse cómo el descenso no es tan brusco como en el caso de las muestras sin cafeína, ni durante las primeras 4,5 horas, donde no se



producen diferencias significativas con el valor inicial hasta este momento, ni mucho menos se observa aquella caída tan brusca en el porcentaje de movilidad una vez transcurridas 7 horas, manteniéndose, en este caso, con valores medios de un  $84,3 \pm 10,7\%$ .

Es en este último tiempo de toma de muestras (T7) donde podemos apreciar alguna variación en el comportamiento entre razas, ya que aunque no presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ellas en sus valores medios, la raza Landrace va sufriendo una reducción paulatina de los mismos, mientras que en la raza Large White este descenso resulta ser mucho más acentuado entre las 4,5 y las 7 horas de incubación (figura 4.16).

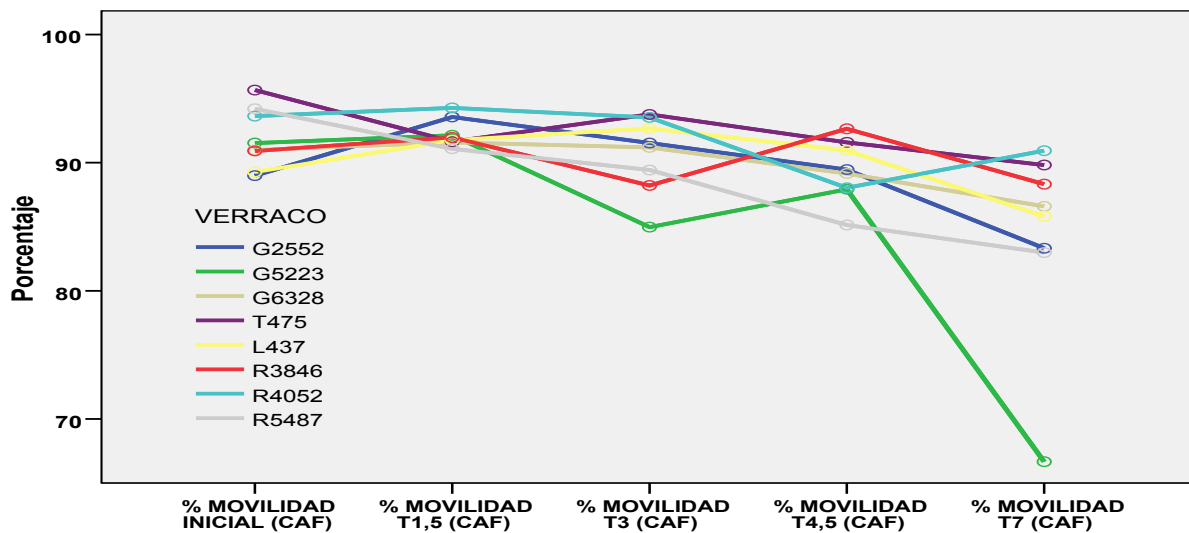


RAZA		T0		T1,5		T3		T4,5		T7	
		Media	Desv. tip.	Media	Desv. tip.	Media	Desv. tip.	Media	Desv. tip.	Media	Desv. tip.
RAZA	LW	91,79 <sup>a</sup>	5,08	92,23 <sup>a</sup>	3,66	90,36 <sup>a</sup>	5,92	89,53 <sup>a</sup>	6,15	81,60 <sup>b</sup>	13,30
	LD	92,04 <sup>a</sup>	4,65	92,27 <sup>a</sup>	4,50	90,96 <sup>a</sup>	4,73	89,19 <sup>ab</sup>	6,46	87,01 <sup>b,*</sup>	6,45

**Figura 4.16:** Porcentajes medios de movilidad (tras incubación con cafeína), en función de la raza, en la prueba de la termorresistencia.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas entre tiempos ( $p < 0,05$ ). La presencia de \* revela diferencias significativas entre razas ( $p < 0,05$ ).

La figura 4.17 revela que el porcentaje de movilidad más o menos se mantiene para todos los animales, tanto a lo largo de la incubación, donde la mayoría presenta valores similares ( $p > 0,05$ ) a los iniciales, como dentro de cada uno de los tiempos, en los que no aparecen diferencias significativas entre los porcentajes medios de cada verraco, a excepción del T7, en el que el valor medio para el verraco G5223 experimenta un descenso brusco.



	T0		T1,5		T3		T4,5		T7*	
	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
<b>G2552</b>	88,98 <sup>a</sup>	4,42	93,57 <sup>a</sup>	3,43	91,53 <sup>a</sup>	2,59	89,46 <sup>a</sup>	7,79	83,32 <sup>a</sup>	8,41
<b>G5223</b>	91,53 <sup>a</sup>	8,18	92,13 <sup>a</sup>	5,36	84,97 <sup>a</sup>	9,68	87,92 <sup>a</sup>	9,36	66,66 <sup>b</sup>	17,95
<b>G6328</b>	90,98 <sup>a</sup>	2,07	91,58 <sup>a</sup>	1,26	91,19 <sup>a</sup>	2,94	89,15 <sup>a</sup>	2,35	86,59 <sup>a</sup>	3,92
<b>T475</b>	95,67 <sup>a</sup>	1,48	91,64 <sup>a</sup>	4,28	93,76 <sup>a</sup>	1,98	91,59 <sup>a</sup>	4,16	89,81 <sup>a</sup>	5,88
<b>L437</b>	89,27 <sup>a</sup>	3,79	91,76 <sup>a</sup>	3,19	92,67 <sup>a</sup>	3,19	90,96 <sup>a</sup>	6,24	85,81 <sup>a</sup>	5,80
<b>R3846</b>	90,92 <sup>a</sup>	6,53	91,97 <sup>a</sup>	4,71	88,22 <sup>a</sup>	4,66	92,64 <sup>a</sup>	2,46	88,32 <sup>a</sup>	4,95
<b>R4052</b>	93,63 <sup>ab</sup>	3,35	94,27 <sup>a</sup>	1,72	93,53 <sup>a</sup>	2,25	88,04 <sup>a</sup>	6,95	90,93 <sup>b</sup>	2,77
<b>R5487</b>	94,20 <sup>a</sup>	3,76	91,08 <sup>a</sup>	7,32	89,43 <sup>ab</sup>	6,71	85,13 <sup>b</sup>	7,98	82,98 <sup>b</sup>	9,38

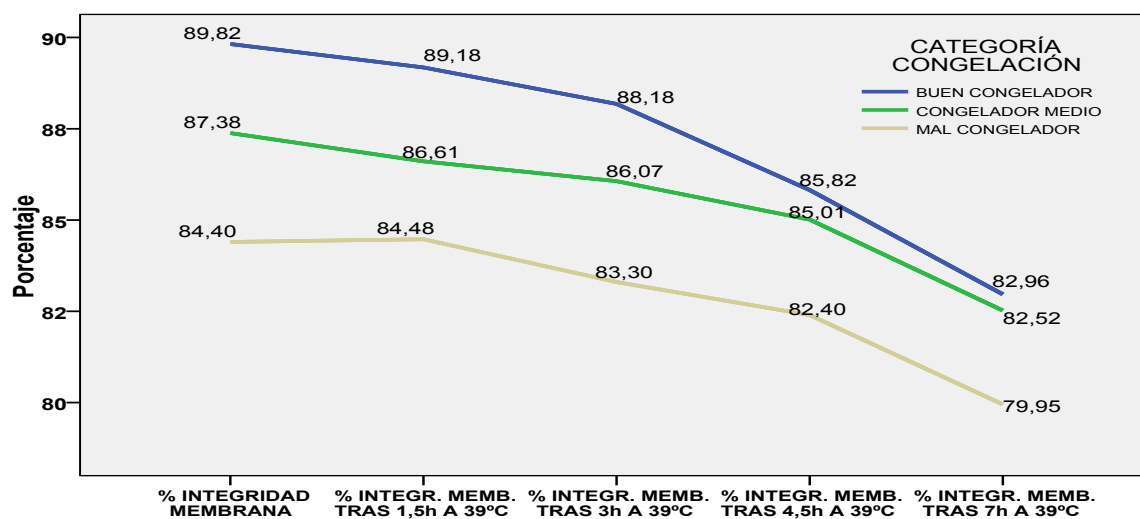
Figura 4.17: Porcentajes medios de movilidad (tras incubación con cafeína), en función del verraco, en la prueba de la termorresistencia.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tiempos. La presencia de \* revela diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre verracos para ese tiempo.

#### 4.2.3.2. Influencia de la aptitud para la congelación de un eyaculado sobre la respuesta al estrés por calor.

En la figura 4.18, que muestra los porcentajes medios de espermatozoides que presentan integridad en su membrana plasmática para las tres categorías establecidas, podemos apreciar que los tres grupos se comportan de manera similar a lo largo de la incubación, produciéndose un descenso en sus valores ( $p < 0,05$ ) a medida que el tiempo discurre.

El grupo que engloba aquellos eyaculados con un buena respuesta a la criopreservación (BC) obtiene valores más altos que las otras dos categorías en todos los puntos de toma de muestras, aunque sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) con el grupo de Congeladores Medios (CM) en toda la prueba. En el lado opuesto nos encontramos al grupo de Malos Congeladores (MC), que en todo momento presenta los porcentajes medios más bajos de integridad de membrana, y además, muestra diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con los del grupo BC durante toda la prueba y con el grupo CM en el T7.



	CATEGORÍA CONGELACIÓN					
	BUEN CONGELADOR		MEDIO CONGELADOR		MAL CONGELADOR	
	Media	Desv. típica	Media	Desv. típica	Media	Desv. típica
% INTEGRIDAD MEMBRANA	89,82 <sup>a</sup>	3,09	87,38 <sup>ab</sup>	3,06	84,40 <sup>b</sup>	2,17
% INTEGR. MEMB. TRAS 1,5h A 39°C	89,18 <sup>a</sup>	1,30	86,61 <sup>ab</sup>	2,94	84,48 <sup>b</sup>	2,15
% INTEGR. MEMB. TRAS 3h A 39°C	88,18 <sup>a</sup>	1,08	86,07 <sup>ab</sup>	2,52	83,30 <sup>b</sup>	1,80
% INTEGR. MEMB. TRAS 4,5h A 39°C	85,82 <sup>a</sup>	2,19	85,01 <sup>ab</sup>	2,64	82,40 <sup>b</sup>	2,65
% INTEGR. MEMB. TRAS 7h A 39°C	82,96 <sup>a</sup>	1,92	82,52 <sup>a</sup>	2,41	79,95 <sup>b</sup>	1,61

**Figura 4.18:** Promedios de integridad de la membrana plasmática, en función del grupo de calidad, en la prueba de la termorresistencia.

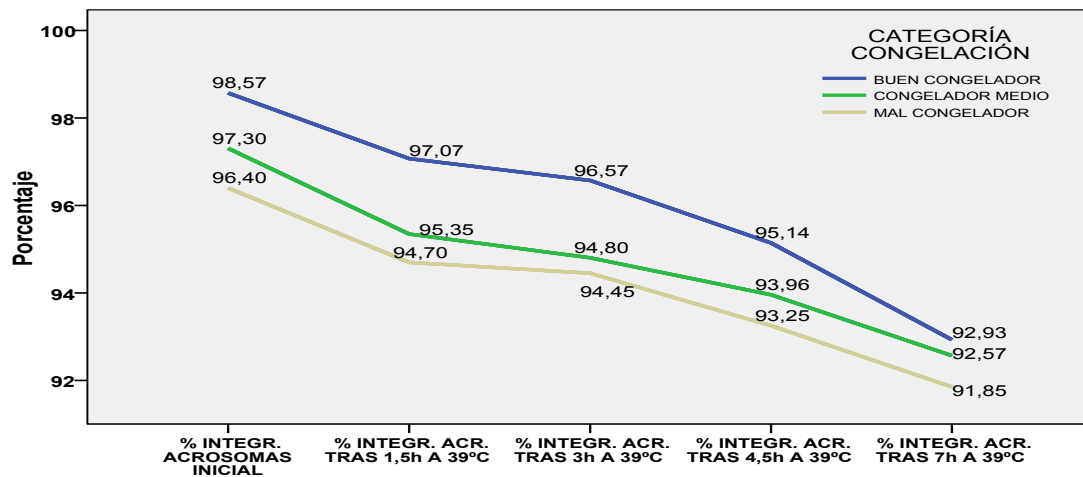
Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos de calidad.

Al analizar los resultados obtenidos en las correspondientes valoraciones del estado del acrosoma, las medias obtenidas para cada grupo de calidad se reflejan en la figura 4.19, en la que, al igual que sucede con los porcentajes referidos a la integridad de membrana, podemos observar cómo se produce un descenso a lo largo de la incubación. Durante las 3 primeras horas, sólo se muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos BC y MC, a los que pertenecen, respectivamente, los porcentajes más altos y más bajos de integridad de la vesícula acrosómica. A partir del T4,5 se produce en el grupo BC un descenso más acusado que en los otros dos grupos, haciendo desaparecer esa diferencia que existía entre ellos.

En cuanto al porcentaje de movilidad, tanto en aquellas muestras con cafeína como en aquellas otras sin el citado estimulante, los tres grupos de calidad establecidos muestran valores similares ( $p > 0,05$ ) en todos los puntos de toma de muestras (figuras 4.20 y 4.21).

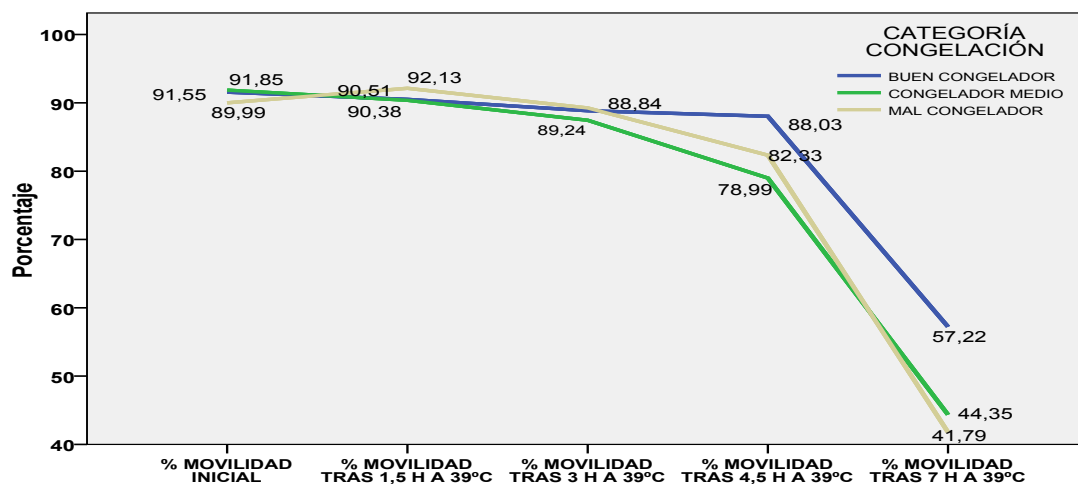
Del mismo modo, todos ellos responden de forma similar en la evolución de este porcentaje a lo largo de la incubación, observándose, en las muestras sin cafeína, que la respuesta mostrada durante las primeras cuatro horas y media, más o menos se mantuvo, para después en el T7 reflejar la reducción brusca en los valores que se ha mencionado con anterioridad, llegando a caer en el grupo MC hasta un  $41,8 \pm 8,9$  %.

4.2 Experimento 1: Estudio de las pruebas de laboratorio como indicadores de la congelabilidad seminal.



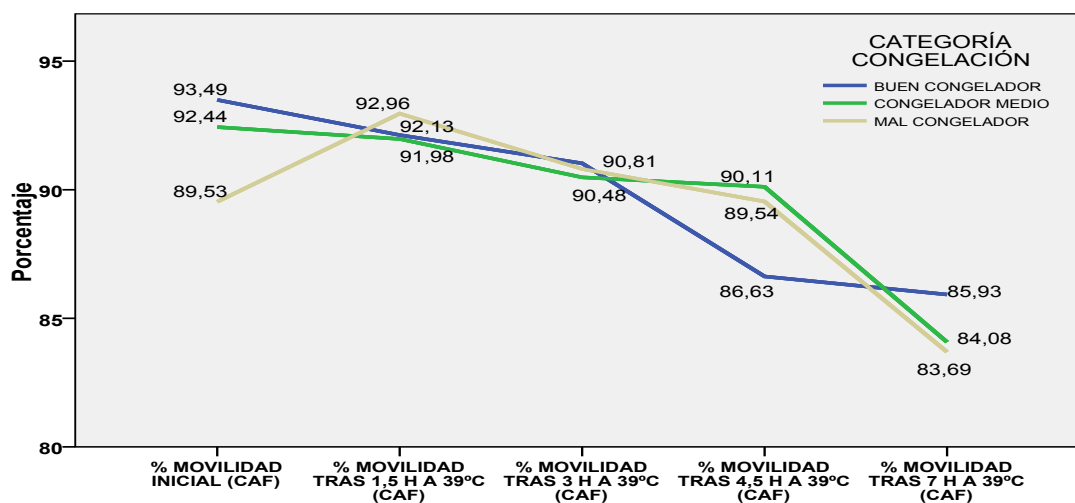
	CATEGORÍA CONGELACIÓN					
	BUEN CONGEL.		CONGEL. MEDIO		MAL CONGELADOR	
	Media	Desv. típica	Media	Desv. típica	Media	Desv. típica
% INTEGRIDAD ACROSOMAS	98,57 <sup>a</sup>	,73	97,30 <sup>a</sup>	1,64	96,40 <sup>b</sup>	1,78
% INTEGR. ACROS. TRAS 1,5h A 39°C	97,07 <sup>a</sup>	,84	95,35 <sup>a</sup>	2,26	94,70 <sup>a</sup>	1,60
% INTEGR. ACROS. TRAS 3h A 39°C	96,57 <sup>a</sup>	1,72	94,80 <sup>a</sup>	2,08	94,45 <sup>a</sup>	1,36
% INTEGR. ACROS. TRAS 4,5h A 39°C	95,14 <sup>a</sup>	1,46	93,96 <sup>a</sup>	1,86	93,25 <sup>a</sup>	1,77
% INTEGR. ACROS. TRAS 7h A 39°C	92,93 <sup>a</sup>	1,62	92,57 <sup>a</sup>	1,86	91,85 <sup>a</sup>	2,40

Figura 4.19: Promedios de integridad del acrosoma, en función del grupo de calidad, en la prueba de la termorresistencia. Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos de calidad.



	CATEGORÍA CONGELACIÓN					
	BUEN CONGEL.		CONGEL. MEDIO		MAL CONGELADOR	
	Media	Desv. típica	Media	Desv. típica	Media	Desv. típica
% MOVILIDAD INICIAL	91,55	4,05	91,85	3,03	89,99	4,97
% MOVILIDAD TRAS 1,5 H A 39°C	90,51	4,70	90,38	5,14	92,13	4,57
% MOVILIDAD TRAS 3 H A 39°C	88,84	5,97	87,44	5,78	89,24	4,55
% MOVILIDAD TRAS 4,5 H A 39°C	88,03	4,45	78,99	11,97	82,33	9,81
% MOVILIDAD TRAS 7 H A 39°C	57,22	18,02	44,35	15,40	41,79	8,88

Figura 4.20: Promedios de movilidad, en función del grupo de calidad, en la prueba de la termorresistencia. Distintos superíndices revelarían diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos de calidad.



	CATEGORÍA CONGELACIÓN					
	BUEN CONGEL.		CONGEL. MEDIO		MAL CONGEL.	
	Media	Desv. típica	Media	Desv. típica	Media	Desv. típica
% MOVILIDAD INICIAL (CAF)	93,49	3,30	92,44	5,15	89,53	4,37
% MOVILIDAD TRAS 1,5 H A 39°C (CAF)	92,13	6,24	91,98	3,71	92,96	3,27
% MOVILIDAD TRAS 3 H A 39°C (CAF)	91,03	6,14	90,48	5,29	90,81	5,27
% MOVILIDAD TRAS 4,5 H A 39°C (CAF)	86,63	7,15	90,11	6,11	89,54	5,95
% MOVILIDAD TRAS 7 H A 39°C (CAF)	85,93	9,17	84,08	12,19	83,69	8,48

**Figura 4.21:** Porcentajes medios de movilidad (tras incubación con cafeína), en función del grupo de calidad, en la prueba de la termorresistencia.

Distintos superíndices revelarían diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos de calidad.

En cambio, en aquellas muestras con cafeína, el descenso en el porcentaje de espermatozoides móviles a lo largo de la incubación se produce de un modo más progresivo y leve, de tal forma que la diferencia de valores entre todos los tiempos analizados es inferior a un 10 %, correspondiendo el valor medio máximo al grupo BC en el T0, con un  $93,5 \pm 3,3$  % y el valor mínimo al grupo MC tras 7 horas a 39 °C, con una media de un  $83,7 \pm 8,7$  %.

#### 4.2.3.3. Determinación de la congelabilidad de un eyaculado a partir de los resultados obtenidos tras la realización de un estrés por calor.

En las tablas 4.37, 4.38, 4.39 y 4.40 se muestran los índices de correlación calculados entre los resultados obtenidos, para los cuatro parámetros analizados tras la realización de la prueba de termorresistencia y el índice de congelabilidad, y entre esos resultados y la resistencia a la criopreservación de la movilidad espermática y la del acrosoma. En ellas se observa que no aparecen muchas correlaciones estadísticamente significativas entre los diferentes parámetros, si bien, cabe destacar el porcentaje de integridad de membrana, que es el único que muestra estas correlaciones con el índice de congelabilidad en todos los tiempos de recogida de datos.

4.2 Experimento 1: Estudio de las pruebas de laboratorio como indicadores de la congelabilidad seminal.

		RESISTENCIA AL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN			
		MEMB. PLASMÁTICA "CONGELABILIDAD"	ACROSOMA	MOVILIDAD	MOVILIDAD (CAFEÍNA)
% INTEGR. MEMB. PLASMÁTICA T1,5	Coef. Correl.	<u>.526</u>	<u>.573</u>	,224	,256
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,165	,110
% ACROSOMA PLASMÁTICA T1,5	Coef. Correl.	<u>.317</u>	<u>.358</u>	,126	,109
	Sig. (bilateral)	,046	,023	,440	,504
% MOVILIDAD T1,5	Coef. Correl.	-,135	-,028	-,134	-,271
	Sig. (bilateral)	,405	,865	,410	,091
% MOVILIDAD T1,5 (CAFEÍNA)	Coef. Correl.	-,034	-,153	,158	,089
	Sig. (bilateral)	,837	,346	,330	,584

Tabla 4.37: Coeficientes de correlación entre los valores obtenidos en los cuatro parámetros analizados en el T1,5 y los índices calculados postdescongelación.

Los coeficientes subrayados y en negrita presentan significación estadística ( $p < 0,05$ ).

		RESISTENCIA AL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN			
		MEMB. PLASMÁTICA "CONGELABILIDAD"	ACROSOMA	MOVILIDAD	MOVILIDAD (CAFEÍNA)
% INTEGR. MEMB. PLASMÁTICA T3	Coef. Correl.	<u>.547</u>	<u>.534</u>	<u>.355</u>	<u>.365</u>
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,025	,020
% ACROSOMA PLASMÁTICA T3	Coef. Correl.	,273	,306	,201	,144
	Sig. (bilateral)	,088	,055	,213	,376
% MOVILIDAD T3	Coef. Correl.	-,116	,033	,012	-,054
	Sig. (bilateral)	,477	,842	,941	,740
% MOVILIDAD T3 (CAFEÍNA)	Coef. Correl.	-,069	-,084	,306	,100
	Sig. (bilateral)	,671	,606	,055	,538

Tabla 4.38: Coeficientes de correlación entre los valores obtenidos en los cuatro parámetros analizados en el T3 y los índices calculados postdescongelación.

Los coeficientes subrayados y en negrita presentan significación estadística ( $p < 0,05$ ).

		RESISTENCIA AL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN			
		MEMB. PLASMÁTICA "CONGELABILIDAD"	ACROSOMA	MOVILIDAD	MOVILIDAD (CAFEÍNA)
% INTEGR. MEMB. PLASMÁTICA T4,5	Coef. Correl.	<u>.350</u>	,272	,242	,302
	Sig. (bilateral)	,027	,089	,133	,058
% ACROSOMA PLASMÁTICA T4,5	Coef. Correl.	,239	,216	,202	,163
	Sig. (bilateral)	,137	,181	,212	,314
% MOVILIDAD T4,5	Coef. Correl.	-,118	,137	,178	,127
	Sig. (bilateral)	,470	,398	,271	,435
% MOVILIDAD T4,5 (CAFEÍNA)	Coef. Correl.	-,214	-,157	,143	-,093
	Sig. (bilateral)	,185	,334	,378	,568

Tabla 4.39: Coeficientes de correlación entre los valores obtenidos en los cuatro parámetros analizados en el T4,5 y los índices calculados postdescongelación.

Los coeficientes subrayados y en negrita presentan significación estadística ( $p < 0,05$ ).

		RESISTENCIA AL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN			
		MEMB. PLASMÁTICA "CONGELABILIDAD"	ACROSOMA	MOVILIDAD	MOVILIDAD (CAFEÍNA)
% INTEGR. MEMB. PLASMÁTICA T7	Coef. Correl.	<u><b>,385</b></u>	,301	,259	<u><b>,368</b></u>
	Sig. (bilateral)	,014	,059	,107	,019
% ACROSOMA PLASMÁTICA T7	Coef. Correl.	,018	,015	,109	,093
	Sig. (bilateral)	,913	,925	,504	,567
% MOVILIDAD T7	Coef. Correl.	,169	,267	<u><b>,482</b></u>	<u><b>,314</b></u>
	Sig. (bilateral)	,296	,095	,002	,048
% MOVILIDAD T7 (CAFEÍNA)	Coef. Correl.	,102	,051	<u><b>,413</b></u>	,302
	Sig. (bilateral)	,531	,754	,008	,059

Tabla 4.40: Coeficientes de correlación entre los valores obtenidos en los cuatro parámetros analizados en el T7 y los índices calculados postdescongelación.

Los coeficientes subrayados y en negrita presentan significación estadística ( $p < 0,05$ ).

Posteriormente, realizamos el análisis multivariante de regresión para la congelabilidad de un eyaculado, utilizando los valores obtenidos en cada uno de los tiempos de toma de muestras. Los resultados se muestran en las tablas 4.41, 4.42, 4.43 y 4.44, en las que podemos destacar que sólo se incorpora al modelo una de las cuatro variables introducidas inicialmente, y coincide que en los cuatro modelos creados, uno para cada tiempo de incubación, la variable más representativa fue el porcentaje de integridad de la membrana plasmática.

El porcentaje de la varianza del índice "congelabilidad" que es explicado por el modelo creado es más elevado en los dos primeros tiempos de incubación (T1,5 y T3), con valores de un 25,8 y un 28,1 %, respectivamente. Los modelos calculados para el T4,5 y el T7 resultan ser menos relevantes en cuanto a su relación con la congelabilidad, como se refleja en sus porcentajes, de un 9,9 y un 12,6 %, respectivamente.

Las ecuaciones de regresión generadas a partir de los citados modelos son las siguientes:

$$T1,5: \text{Congelabilidad} = -129,549 + 2,224(\% \text{Integ.Memb}T1,5)$$

$$T3: \text{Congelabilidad} = -153,596 + 2,524(\% \text{Integ.Memb}T3)$$

$$T4,5: \text{Congelabilidad} = -67,155 + 1,539(\% \text{Integ.Memb}T4,5)$$

$$T7: \text{Congelabilidad} = -98,156 + 1,965(\% \text{Integ.Memb}T7)$$

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		t	Sig.
	B	Error típ.	Beta			
1	(Constante)	-129,549	50,437		-2,569	,014
	% INTEGR. MEMB. tras 1,5h a 39°C	<b>2,224</b>	,583	,526	3,817	,000
n=40	r=0,526	r <sup>2</sup> =0,277	r <sup>2</sup> correg.=0,258	Anova: F=14,569	p<0,001	

Tabla 4.41: Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad de un eyaculado empleando los valores analizados en el T1,5.

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	-153,596	53,705		-2,860	,007
	% INTEGR. MEMB. tras 3h a 39°C	2,524	,626	,547	4,032	,000
n=40		r=0,547	r <sup>2</sup> =0,300	r <sup>2</sup> correg.=0,281	Anova: F=16,260	p<0,001

Tabla 4.42: Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad de un eyaculado empleando los valores analizados en el T3.

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	-67,155	56,560		-1,187	,242
	% INTEGR. MEMB. tras 4,5h a 39°C	1,539	,669	,350	2,300	,027
n=40		r=0,350	r <sup>2</sup> =0,122	r <sup>2</sup> correg.=0,099	Anova: F=5,290	p<0,05

Tabla 4.43: Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad de un eyaculado empleando los valores analizados en el T4,5.

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	-98,156	62,669		-1,566	,126
	% INTEGR. MEMB. tras 7h a 39°C	1,965	,764	,385	2,570	,014
n=40		r=0,385	r <sup>2</sup> =0,148	r <sup>2</sup> correg.=0,126	Anova: F=6,607	p<0,05

Tabla 4.44: Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad de un eyaculado empleando los valores analizados en el T7.

#### 4.2.4. Evaluación de la resistencia de las células espermáticas a un choque a frigore.

##### 4.2.4.1. Análisis de los resultados obtenidos.

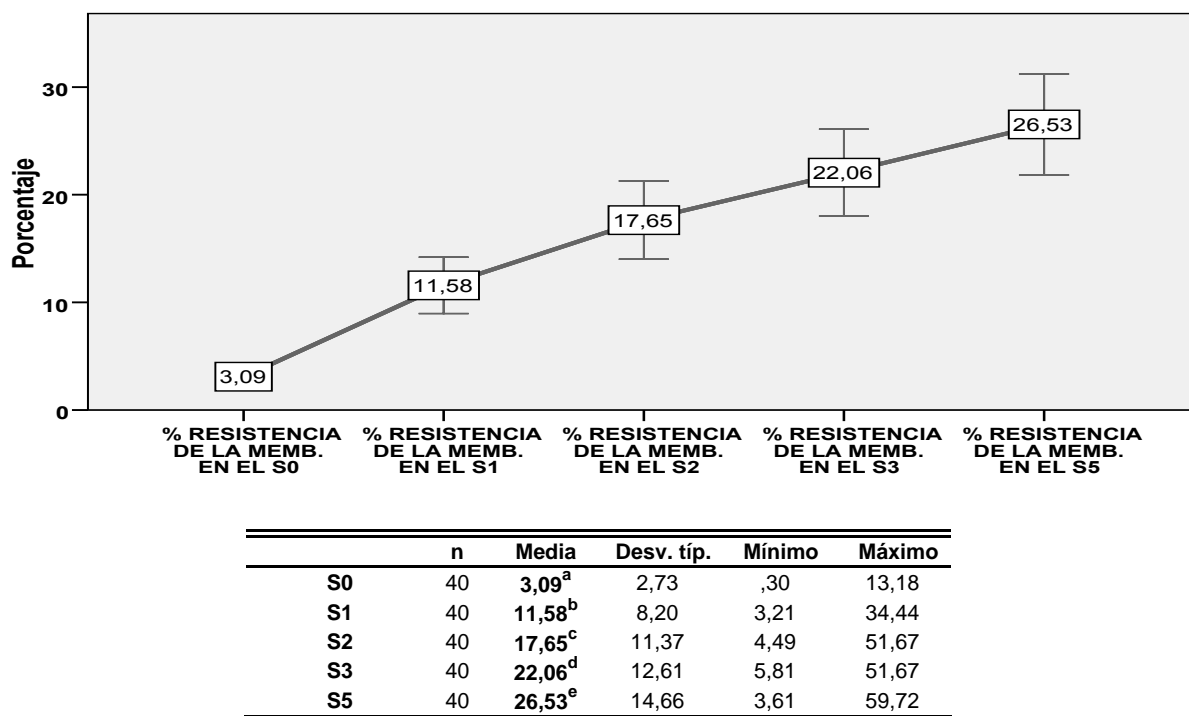
La finalidad de esta prueba consiste en determinar la resistencia de los eyaculados al choque a frigore en cada uno de los tiempos de incubación en los que se realizan los diferentes choques; para ello, únicamente se van a presentar los valores representativos de dicha resistencia, cuyo cálculo se realiza de forma similar a la empleada para la determinación de la resistencia a la criopreservación en las muestras descongeladas, en la que se partía de los valores obtenidos en el análisis del semen fresco.

##### Resistencia de la membrana plasmática a un choque a frigore.

El comportamiento de la membrana plasmática durante el choque a frigore se refleja en las siguientes figuras, donde se recogen los valores medios obtenidos en cada uno de los tiempos de incubación en los que se realiza la prueba. Así, se observa que a medida que transcurre el



tiempo de incubación a 20 °C, la membrana de los espermatozoides se va haciendo más resistente ( $p < 0,01$ ) al descenso brusco de temperatura, pasando de un  $3,1 \pm 2,7\%$  de espermatozoides con la membrana íntegra tras el primer choque a un  $26,5 \pm 14,7\%$  transcurridas cinco horas de incubación (figura 4.22).



**Figura 4.22:** Resistencia de la membrana a la prueba del choque a frigore (%). Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,01$ ).

Al agrupar los valores en función de la raza de los animales empleados en el experimento (figura 4.23), nos encontramos con el mismo patrón observado anteriormente, con una tendencia similar en ambas razas, sin que se aprecien diferencias de resistencia entre ellas, salvo en los dos primeros choques realizados ( $p < 0,05$ ).

Al analizar las medias obtenidas para cada animal en particular, nos encontramos con una mayor variabilidad en la respuesta, puesto que si bien la mayoría manifiesta un aumento en la resistencia de la membrana plasmática ( $p < 0,05$ ) entre los dos primeros choques realizados, ya a partir de la primera hora de incubación hay ciertos verracos, como el L437 o el G2552, en los que el aumento de los valores registrados no tiene una significación estadística y, en cambio, hay otros, como el G6328 o el R5487, que siguen presentando en el S5 incrementos significativos ( $p < 0,05$ ) con la valoración predecesora. En cada uno de los cinco choques realizados se ponen de manifiesto diferencias ( $p < 0,05$ ) entre los distintos animales (figura 4.24).

4.2 Experimento 1: Estudio de las pruebas de laboratorio como indicadores de la congelabilidad seminal.

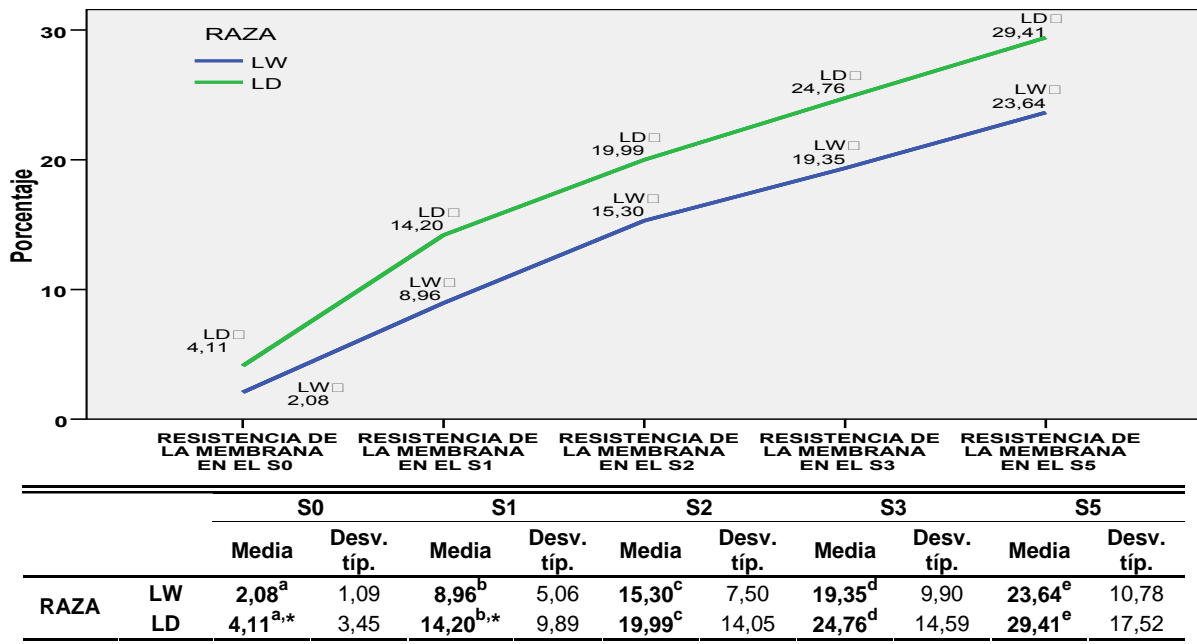


Figura 4.23: Resistencia de la membrana a la prueba del choque a frigore, en función de la raza (%). Distintos superíndices revelan diferencias significativas entre tiempos ( $p < 0,05$ ). \* revela diferencias significativas entre razas ( $p < 0,05$ ).

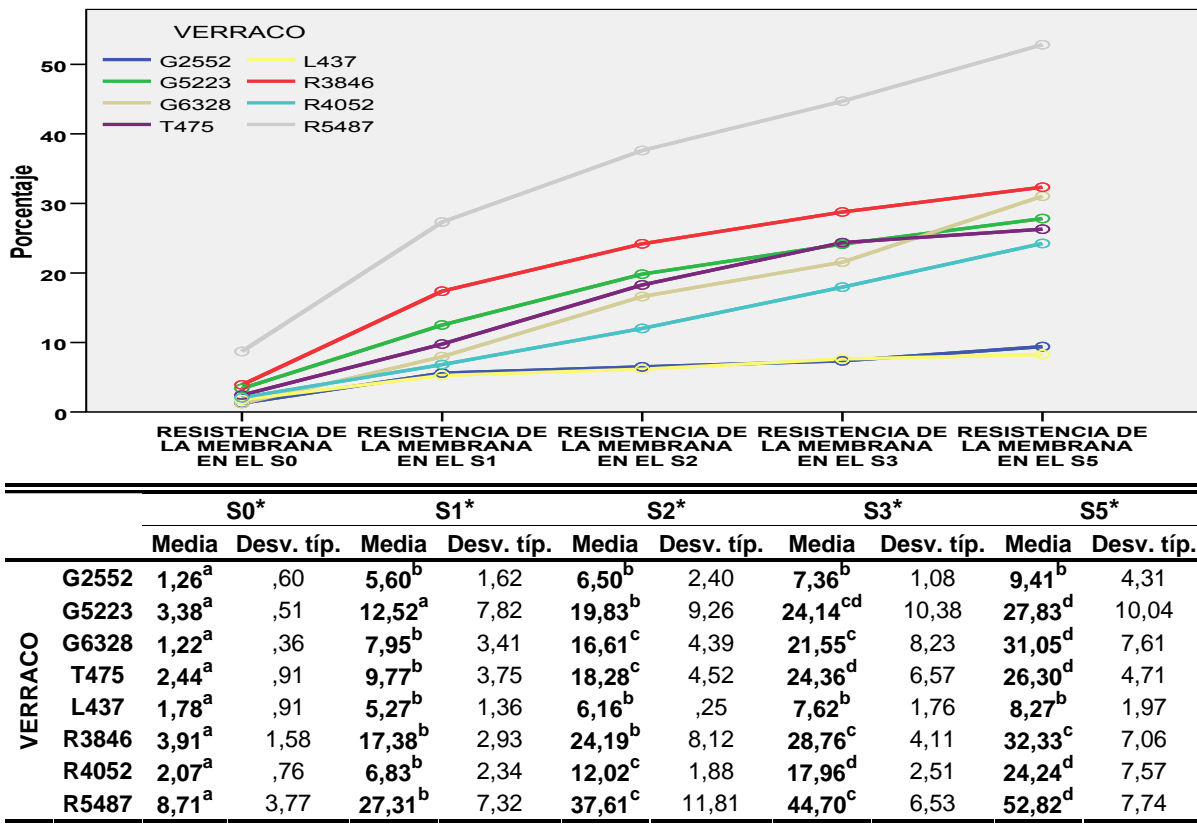
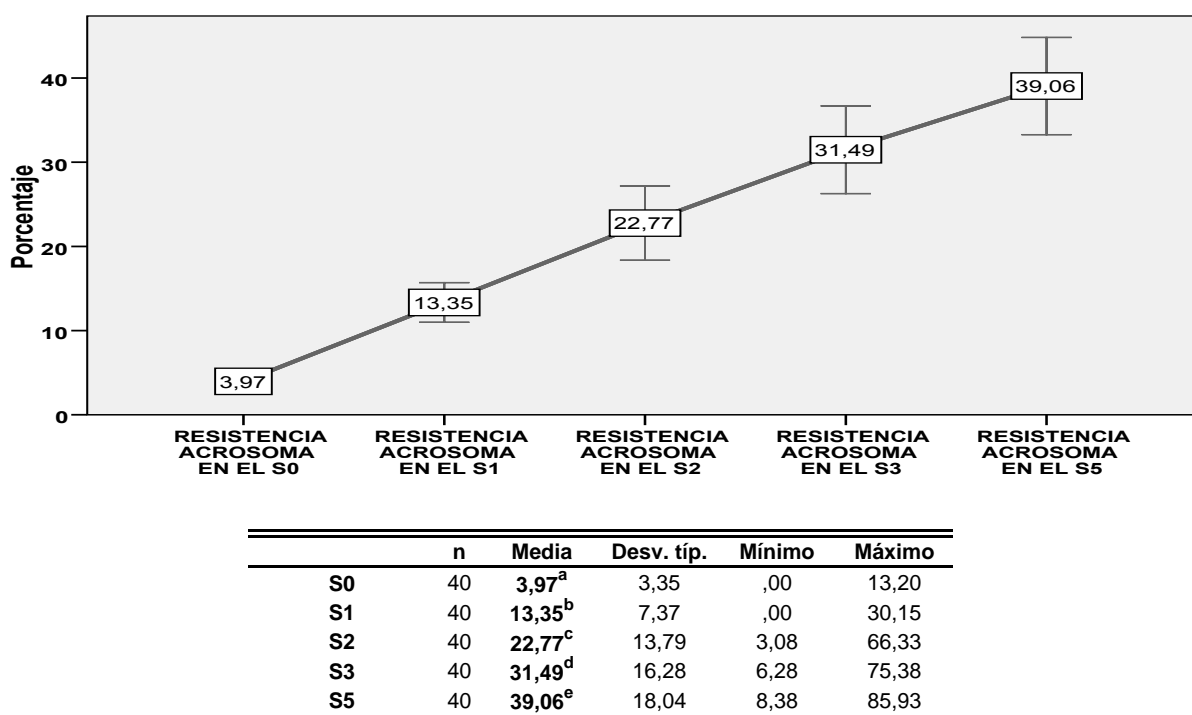


Figura 4.24: Resistencia de la membrana a la prueba del choque a frigore, en función del verraco (%). Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre choques. \* revela diferencias significativas entre verracos para ese choque ( $p < 0,05$ ).

**Resistencia del acrosoma a un choque a frigore.**

En las siguientes figuras se muestran las medias obtenidas para la integridad del acrosoma tras la realización de la prueba en los cinco tiempos establecidos. La respuesta de la vesícula acrosómica es similar a la encontrada con la membrana plasmática de los espermatozoides, ya que se incrementa ( $p < 0,01$ ) el porcentaje de integridad tras cada uno de los choques, a medida que va transcurriendo el tiempo de incubación de las muestras seminales a 20 °C, pasando de valores medios de un  $3,97 \pm 3,4\%$  a un  $39,1 \pm 18,0\%$  (figura 4.25).



**Figura 4.25:** Resistencia del acrosoma a la prueba del choque a frigore (%).  
Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,01$ ).

Ambas razas se comportan de forma similar entre ellas (figura 4.26), únicamente muestra valores superiores ( $p < 0,05$ ) la Landrace tras el primer choque a frigore realizado. A lo largo de la incubación, tanto la Large White como la Landrace muestran incrementos ( $p < 0,01$ ) en la resistencia al choque similares a los comentados para las medias generales.

Si nos fijamos en los valores medios obtenidos por cada animal (figura 4.27), se observa que en todos ellos la resistencia del acrosoma va incrementándose ( $p < 0,05$ ) a medida que transcurre el tiempo de incubación, si bien esta respuesta no se produce en todos los verracos con la misma intensidad en cada punto de toma de valores ( $p < 0,05$ ), siendo el R5487 el que mejor respuesta ofrece y el L437 el que presenta los valores más bajos.

4.2 Experimento 1: Estudio de las pruebas de laboratorio como indicadores de la congelabilidad seminal.

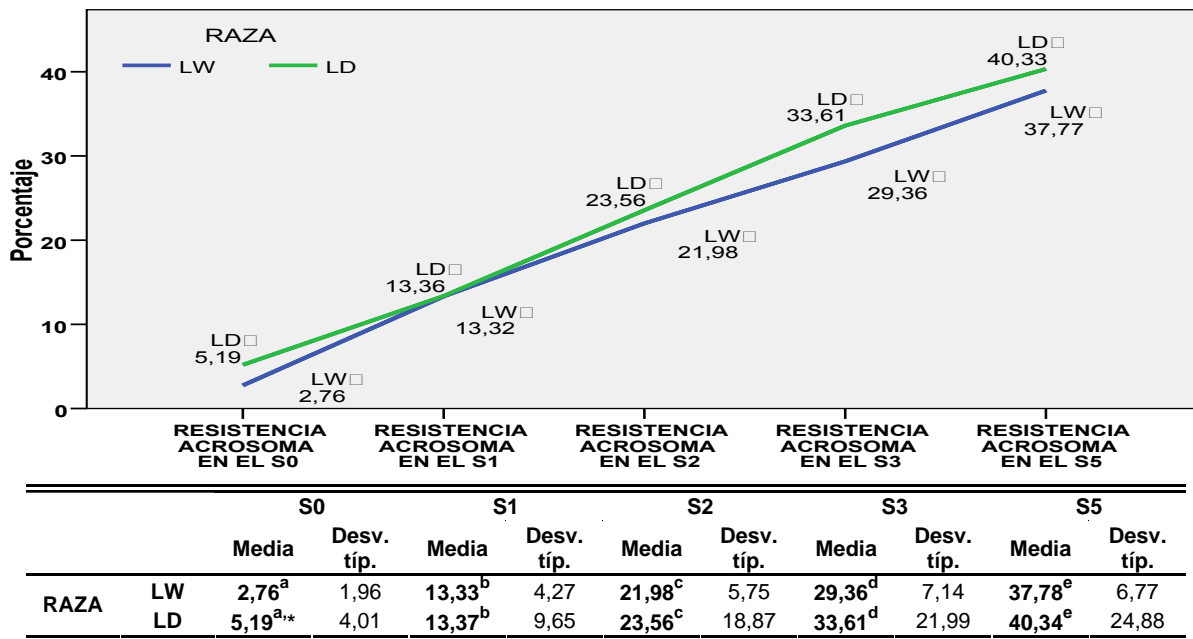


Figura 4.26: Resistencia del acrosoma a la prueba del choque a frigore, en función de la raza (%). Distintos superíndices revelan diferencias significativas entre choques ( $p < 0,05$ ). \* revela diferencias significativas entre razas ( $p < 0,05$ ).

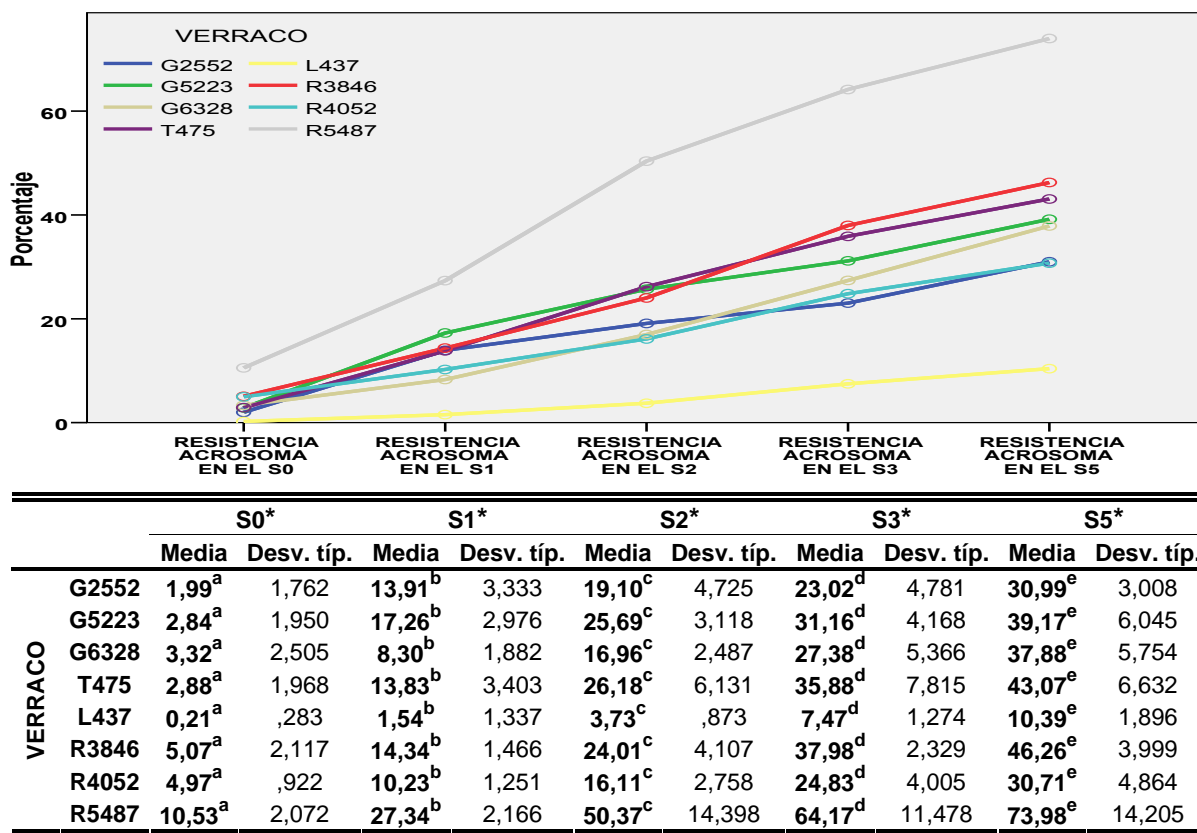
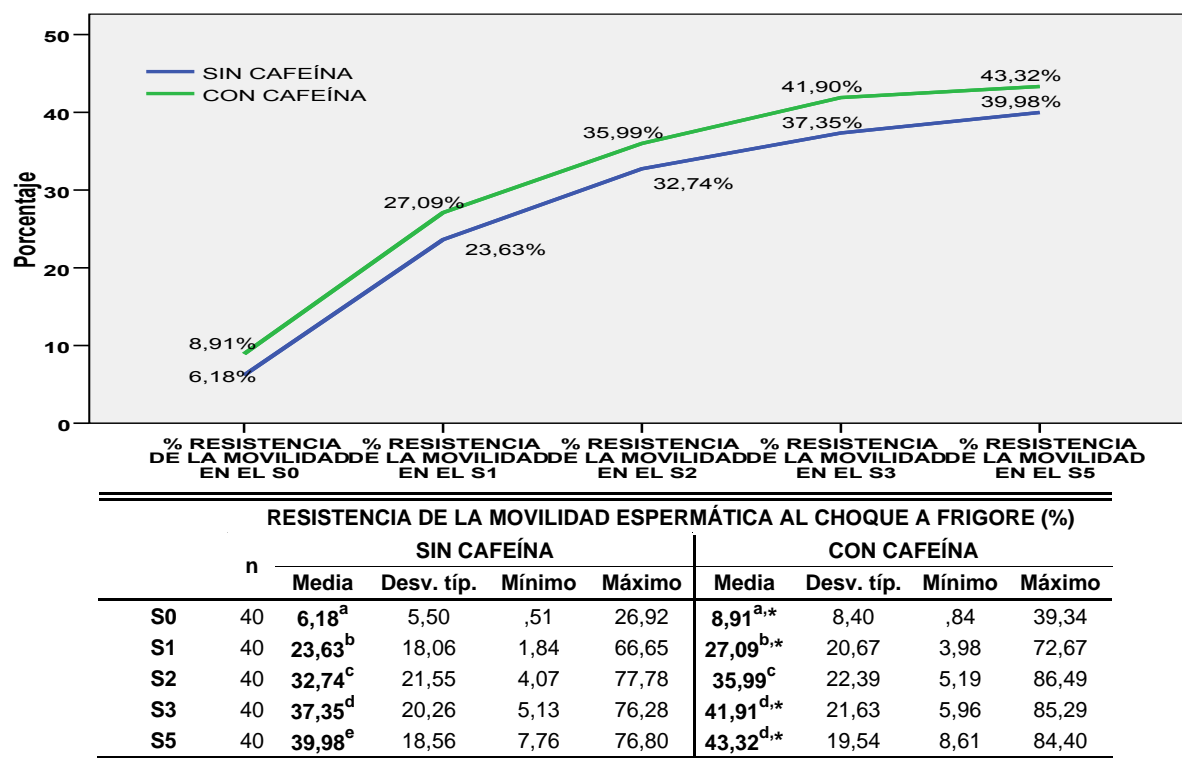


Figura 4.27: Resistencia del acrosoma a la prueba del choque a frigore, en función del verraco (%). Distintos superíndices revelan diferencias significativas entre choques ( $p < 0,05$ ). \* revela diferencias significativas entre verracos para ese choque ( $p < 0,05$ ).

### Resistencia de la movilidad espermática al choque *a frigore*.

#### Muestras con incubación posterior al choque *a frigore* en diluyente comercial normal.

Los porcentajes de espermatozoides móviles tras la realización de los diferentes choques quedan reflejados en las correspondientes figuras. En la figura 4.28 podemos comprobar cómo también se produce un incremento ( $p < 0,05$ ) en los valores a medida que transcurre el tiempo de incubación, partiendo de un porcentaje medio inicial de un  $6,2 \pm 5,5$  % y terminando, tras la quinta hora de incubación, con un  $40,0 \pm 18,6$  % de espermatozoides móviles tras la bajada brusca de temperatura. No obstante, este incremento parece atenuarse en los últimos tiempos de incubación, tanto para la integridad de la membrana plasmática como para la del acrosoma, hecho que podemos comprobar al tomar como referencia las medias calculadas por raza, donde no resulta significativo ( $p > 0,05$ ) para la raza Large White entre el S3 y el S5, ni para la Landrace en los últimos tres choques realizados (figura 4.29).



**Figura 4.28:** Resistencia de la movilidad a la prueba del choque *a frigore* (%).

Distintos superíndices revelan diferencias significativas entre choques ( $p < 0,01$ ). \* revela diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre muestras con y sin cafeína.

En cada tiempo de incubación ambas razas se comportan de una forma similar, sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los resultados obtenidos. En cambio, entre los distintos verracos empleados, una vez más, se muestran diferencias en la respuesta en cada uno de los tiempos ( $p < 0,05$ ), siendo nuevamente el R5487 el que mejor mantiene el porcentaje de movilidad tras el choque *a frigore* y el L437 y el G2552 los que peor se comportan (figura 4.30).

4.2 Experimento 1: Estudio de las pruebas de laboratorio como indicadores de la congelabilidad seminal.

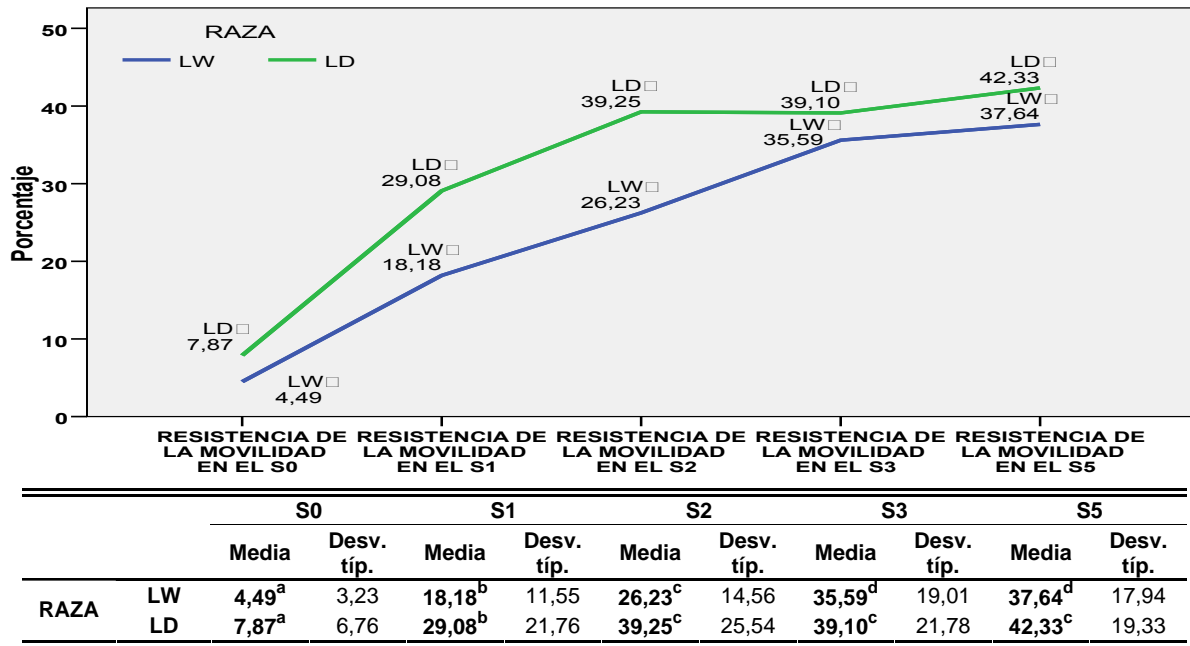


Figura 4.29: Resistencia de la movilidad a la prueba del choque a frigore, en función de la raza (%). Distintos superíndices revelan diferencias significativas entre choques ( $p < 0,05$ ). \* revelaría diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre razas dentro de cada choque.

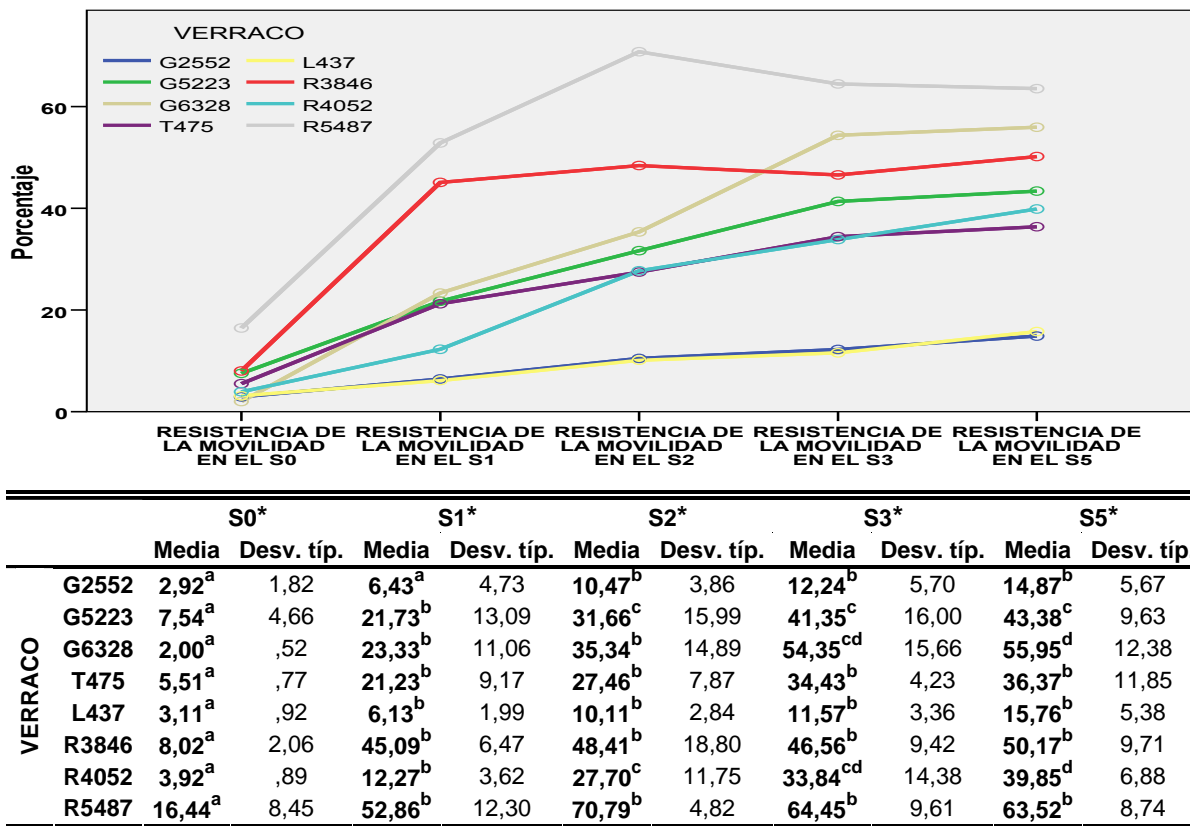
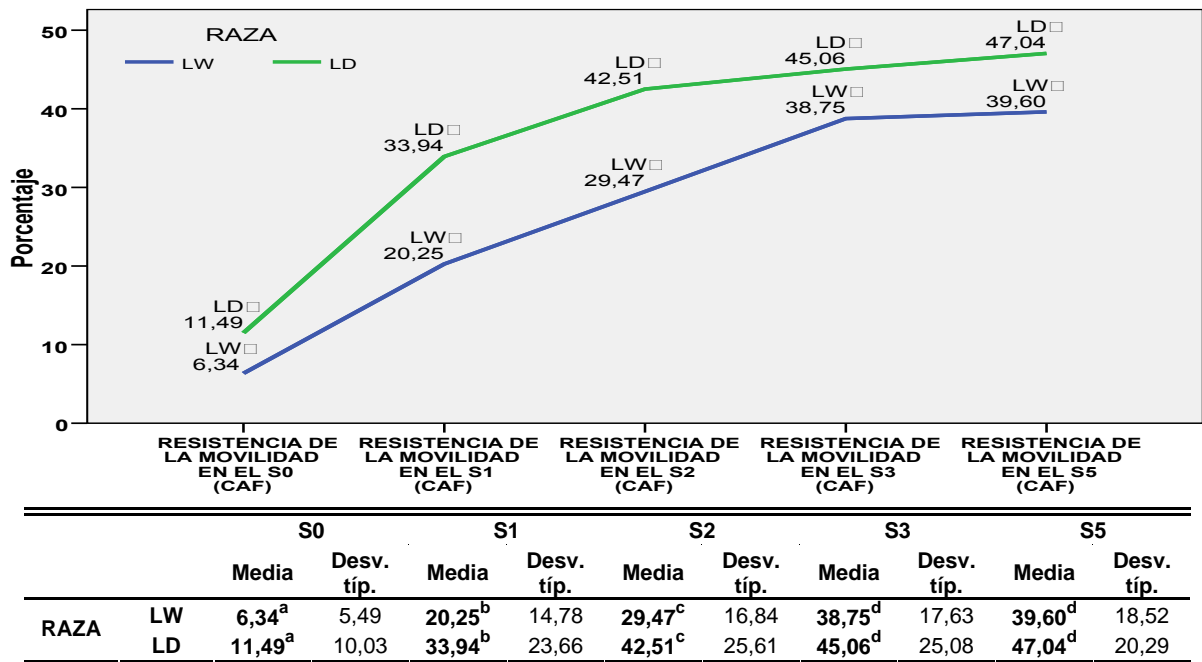


Figura 4.30: Resistencia de la movilidad a la prueba del choque a frigore, en función del verraco (%). Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre choques. \* revela diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre verracos para ese choque.

**Muestras con incubación posterior al choque a frigore en diluyente comercial suplementado con cafeína a una concentración de 1 mM.**

Las muestras incubadas en el diluyente con el estimulante de la movilidad presentan una respuesta muy parecida a la que se produce en aquellos no estimulados. Así, en el cómputo general (figura 4.28) se pasa de medias iniciales de un  $8,9 \pm 8,4\%$  a un  $43,3 \pm 19,5\%$  tras el último choque, mostrando una atenuación en el incremento de la resistencia al final de la incubación, donde no se observan diferencias significativas entre el 41,9 % del S3 y el 43,3 % del S5.

Este mismo patrón nos lo encontramos en ambas razas (figura 4.31), donde se produce un aumento de la resistencia en cada uno de los choques ( $p < 0,05$ ), con la excepción de los dos últimos. Una vez más, no se observan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las dos razas analizadas tras la realización de los diferentes choques.



**Figura 4.31:** Resistencia de la movilidad (tras incubación con cafeína) a la prueba del choque a frigore, en función de la raza (%).

Distintos superíndices revelan diferencias significativas entre choques ( $p < 0,05$ ). \* revelaría diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre razas para ese choque.

Si nos fijamos en la figura 4.32, podemos apreciar cómo la proporción relativa de espermatozoides móviles para cada uno de los verracos va incrementándose con el tiempo, pero sin que aparezcan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) a partir de la hora de incubación en la mayoría de ellos, siendo cuando éstas surgen, mucho más tenues que en las valoraciones realizadas sin cafeína.

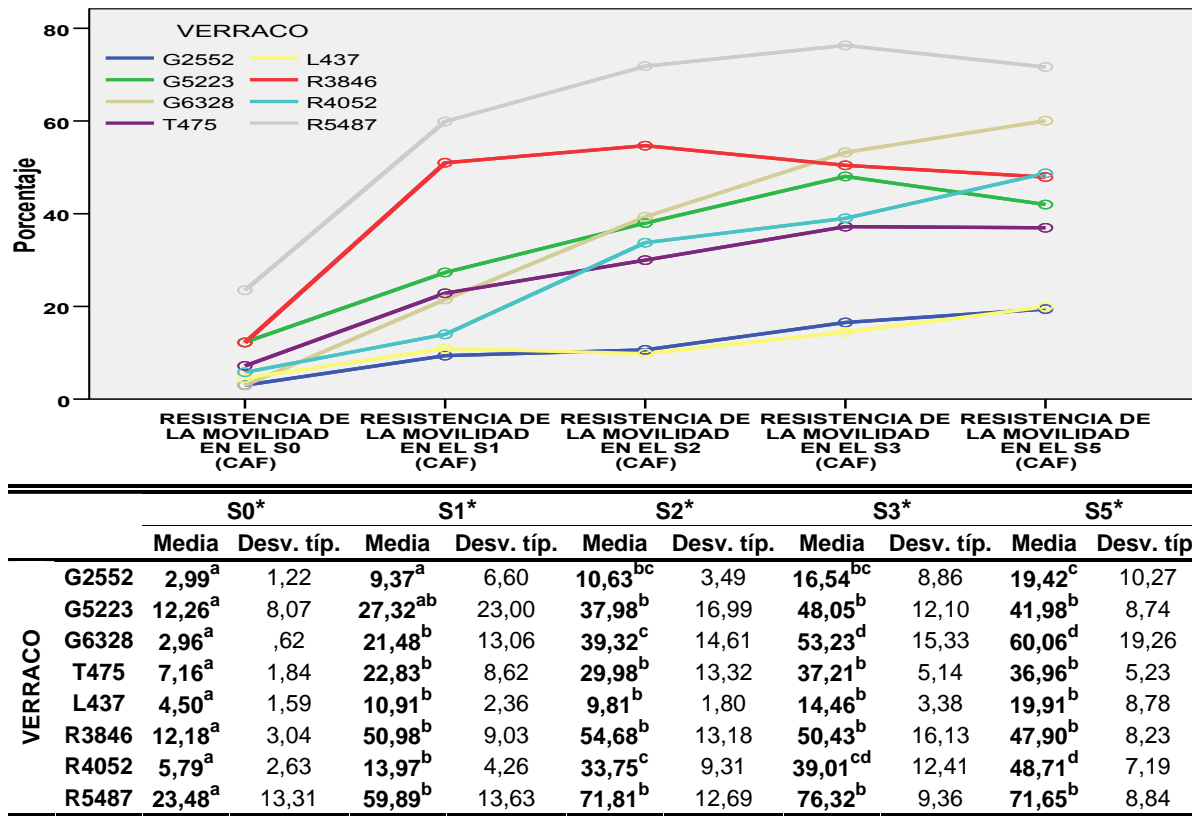


Figura 4.32: Resistencia de la movilidad (tras incubación con cafeína) a la prueba del choque a frigore, en función del verraco (%). Distintos superíndices revelan diferencias significativas entre choques ( $p < 0,05$ ). \* revela diferencias significativas entre verracos en el choque en que aparece.

#### 4.2.4.2. Influencia de la aptitud para la congelación de un eyaculado sobre la respuesta al choque a frigore.

Los porcentajes medios de resistencia de la membrana plasmática para las tres categorías establecidas en función de la aptitud para la congelación de los eyaculados se muestran en la figura 4.33, donde se aprecia un incremento similar en la evolución de todas ellas a lo largo de la incubación a 20 °C, si bien éste no ocurre con la misma intensidad.

En un principio, tras el S0, sólo el valor medio correspondiente al grupo BC difiere significativamente ( $p < 0,05$ ) de las otras dos categorías; lo mismo ocurre después del S1, con la salvedad de que las diferencias calculadas entre los valores observados en las tres categorías son más altas. A partir de este punto, ya se detectan valores significativamente distintos ( $p < 0,05$ ) entre los tres grupos, correspondiendo, en todo momento, los valores más altos al grupo BC y los más bajos al grupo MC.

De forma parecida a la observada en la valoración de la membrana plasmática, se comporta la vesícula acrosómica (figura 4.34), mostrando, durante toda la incubación, valores más altos aquellas muestras correspondientes al grupo BC, más bajos las correspondientes al grupo MC e intermedios las muestras del grupo CM. En el S0, el S3 y el S5 se registran diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre todos y cada uno de los tres grupos; en cambio, en el S1 y en el S2 estas diferencias sólo se producen en el grupo MC respecto a los otros dos.



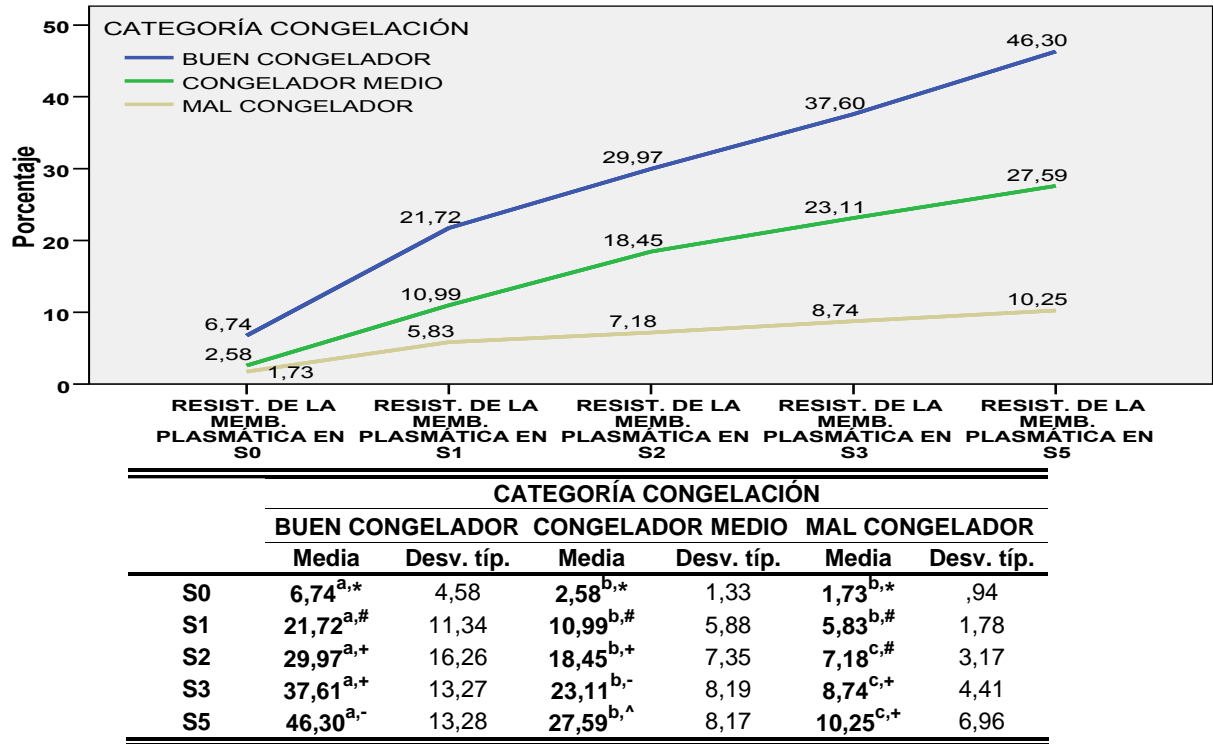


Figura 4.33: Resistencia de la membrana plasmática a la prueba del choque a frigore, en función del grupo de calidad (%). Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos de calidad. Distintos símbolos revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre pruebas.

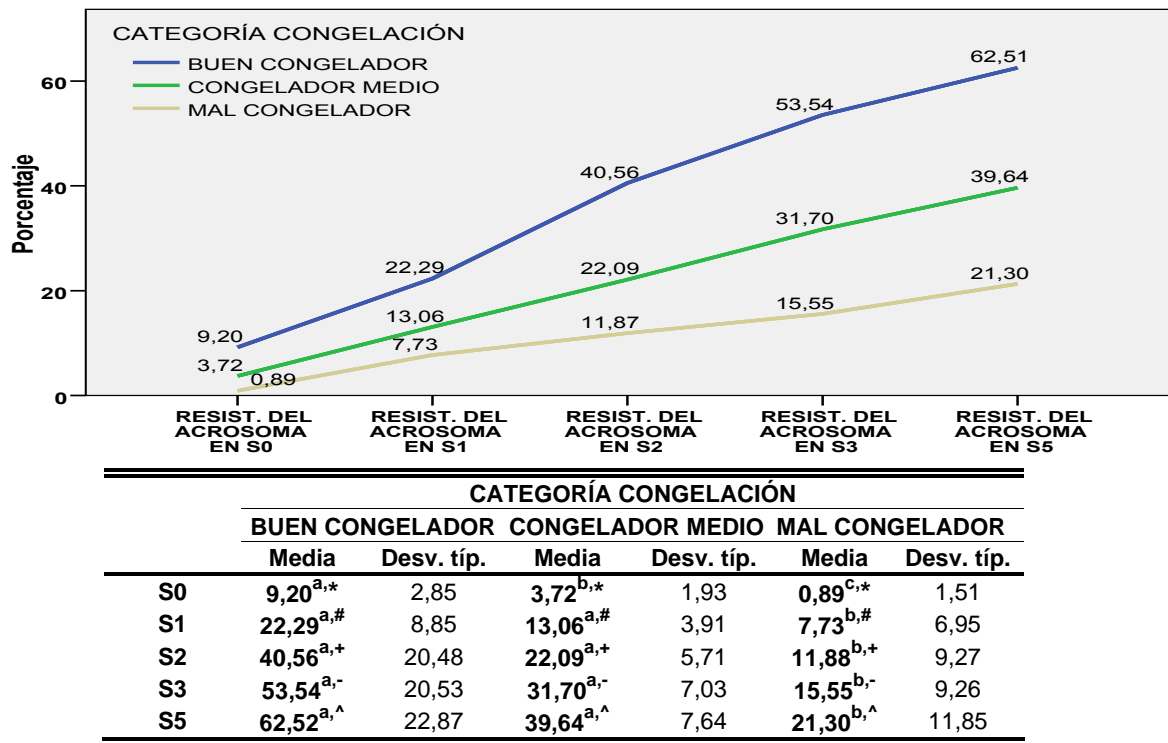


Figura 4.34: Resistencia del acrosoma a la prueba del choque a frigore, según del grupo de calidad (%). Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos de calidad. Distintos símbolos revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre pruebas.

La resistencia de la movilidad espermática observada en las diferentes muestras y tras los diversos choques realizados, al igual que en los dos parámetros anteriores, va incrementándose con la incubación a 20 °C ( $p < 0,05$ ) en los tres grupos, con la excepción del grupo BC, que experimenta una meseta en sus valores medios tras los últimos tres choques (figura 4.35).

En un primer momento (S0), sólo el grupo BC presenta unos porcentajes medios de movilidad significativamente más altos ( $p < 0,05$ ) respecto a los otros dos; a partir de aquí, tras los choques a *frigore* S1, S2 y S3 los tres grupos muestran valores significativamente diferentes entre ellos ( $p < 0,05$ ), siendo éstos, al igual que sucedía con los parámetros anteriores, más altos cuanto mejor sea la aptitud para la congelación del grupo correspondiente. Tras el S5, y debido a la meseta observada en los resultados del grupo BC, la significación estadística entre éste y el grupo CM desaparece, aunque sí se mantiene para ambos con respecto al tercer grupo.

Al incubar las muestras en un ambiente enriquecido con 0,1M de cafeína, se observa prácticamente el mismo patrón que sin la adición del estimulante, con la salvedad de que la meseta que se presentaba en el grupo BC tras el S2, el S3 y el S5, ahora se presenta de forma más tenue en este mismo grupo y, además, en el CM (figura 4.36).

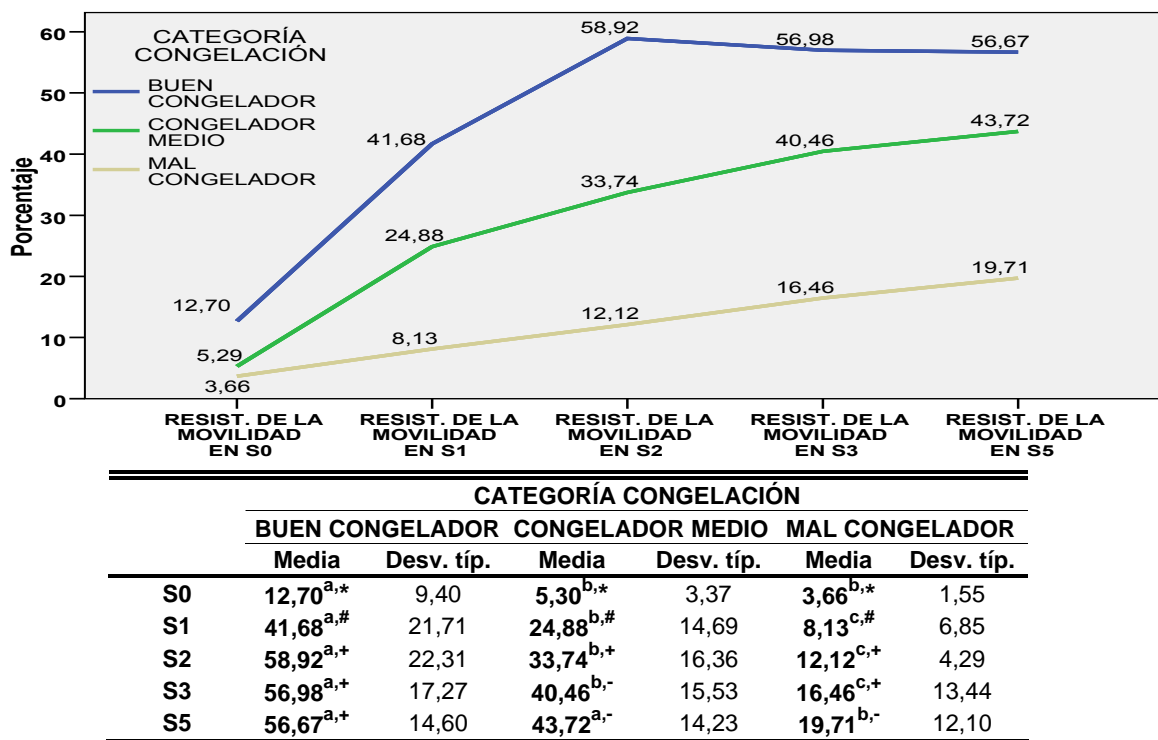
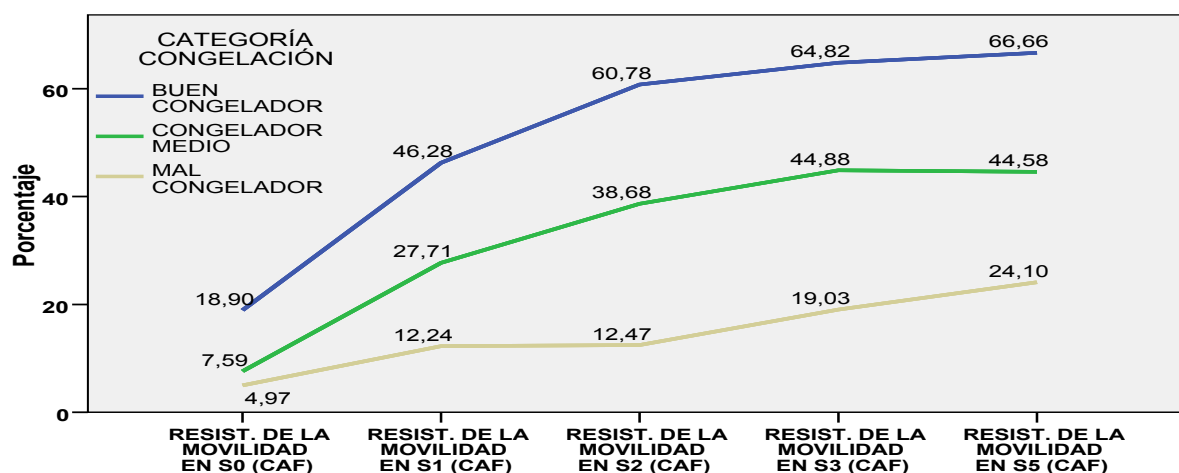


Figura 4.35: Resistencia de la movilidad a la prueba del choque a *frigore*, según el grupo de calidad (%). Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos de calidad. Distintos símbolos revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre pruebas.



	CATEGORÍA CONGELACIÓN					
	BUEN CONGELADOR		CONGELADOR MEDIO		MAL CONGELADOR	
	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
S0	18,90 <sup>a,*</sup>	13,48	7,59 <sup>b,*</sup>	5,27	4,97 <sup>b,*</sup>	4,15
S1	46,28 <sup>a,#</sup>	25,86	27,71 <sup>ab,#</sup>	18,48	12,24 <sup>b,#</sup>	6,16
S2	60,78 <sup>a,+</sup>	22,09	38,68 <sup>b,+</sup>	16,97	12,47 <sup>c,#</sup>	5,73
S3	64,82 <sup>a,+</sup>	22,97	44,88 <sup>b,+</sup>	15,30	19,03 <sup>c,+</sup>	9,54
S5	66,66 <sup>a,+</sup>	11,34	44,58 <sup>b,+</sup>	15,16	24,10 <sup>c,+</sup>	13,00

**Figura 4.36:** Resistencia de la movilidad (tras incubación con cafeína) a la prueba del choque a frigore, en función del grupo de calidad (%).

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos de calidad. Distintos símbolos revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre pruebas.

#### 4.2.4.3. Determinación de la congelabilidad de un eyaculado a partir de los resultados obtenidos tras un choque a frigore.

En las tablas 4.45, 4.46, 4.47, 4.48 y 4.49 aparecen reflejados los índices de correlación obtenidos entre los resultados de resistencia a la prueba del choque a frigore, calculados para los cuatro parámetros analizados tras los diferentes choques y el índice de congelabilidad y entre dichos resultados y la resistencia al proceso de congelación/descongelación, tanto del acrosoma como de la movilidad espermática. En ellas podemos observar que, a medida que transcurre el tiempo de incubación a 20 °C, van incrementándose tanto los valores de los coeficientes de correlación como el número de correlaciones estadísticamente significativas existentes.

El mayor coeficiente de correlación con respecto al índice de congelabilidad, que es el de referencia utilizado por algunos autores, se obtiene en la resistencia de la membrana plasmática tras el S5, con un 0,77. No obstante, las correlaciones más altas se producen casi siempre con el índice de resistencia del acrosoma a la congelación, llegando a alcanzar un 0,80 en el mismo parámetro y tras el mismo choque.

4.2 Experimento 1: Estudio de las pruebas de laboratorio como indicadores de la congelabilidad seminal.

RESISTENCIA AL CHOQUE A FRIGORE (S0)		RESISTENCIA AL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN			
		MEMB. PLASMÁTICA "CONGELABILIDAD"	ACROSOMA	MOVILIDAD	MOVILIDAD (CAFEÍNA)
MEMB. PLASMÁTICA	Coef. Correl.	<u>.356</u>	<u>.611</u>	,297	,184
	Sig. (bilateral)	,024	,000	,063	,255
ACROSOMA	Coef. Correl.	<u>.560</u>	<u>.689</u>	<u>.448</u>	<u>.432</u>
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,004	,005
MOVILIDAD	Coef. Correl.	<u>.336</u>	<u>.528</u>	,170	,077
	Sig. (bilateral)	,034	,000	,295	,635
MOVILIDAD (CAFEÍNA)	Coef. Correl.	<u>.388</u>	<u>.568</u>	,189	,113
	Sig. (bilateral)	,013	,000	,243	,487

Tabla 4.45: Coeficientes de correlación entre la resistencia de los cuatro parámetros analizados tras el S0 y los índices calculados postdescongelación.

Los coeficientes subrayados y en negrita presentan significación estadística ( $p < 0,05$ ).

RESISTENCIA AL CHOQUE A FRIGORE (S1)		RESISTENCIA AL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN			
		MEMB. PLASMÁTICA "CONGELABILIDAD"	ACROSOMA	MOVILIDAD	MOVILIDAD (CAFEÍNA)
MEMB. PLASMÁTICA	Coef. Correl.	<u>.419</u>	<u>.639</u>	,190	,192
	Sig. (bilateral)	,007	,000	,240	,235
ACROSOMA	Coef. Correl.	<u>.450</u>	<u>.611</u>	,206	,254
	Sig. (bilateral)	,004	,000	,202	,113
MOVILIDAD	Coef. Correl.	<u>.528</u>	<u>.530</u>	,278	<u>.361</u>
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,083	,022
MOVILIDAD (CAFEÍNA)	Coef. Correl.	<u>.455</u>	<u>.466</u>	,193	,285
	Sig. (bilateral)	,003	,002	,234	,075

Tabla 4.46: Coeficientes de correlación entre la resistencia de los cuatro parámetros analizados tras el S1 y los índices calculados postdescongelación.

Los coeficientes subrayados y en negrita presentan significación estadística ( $p < 0,05$ ).

RESISTENCIA AL CHOQUE A FRIGORE (S2)		RESISTENCIA AL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN			
		MEMB. PLASMÁTICA "CONGELABILIDAD"	ACROSOMA	MOVILIDAD	MOVILIDAD (CAFEÍNA)
MEMB. PLASMÁTICA	Coef. Correl.	<u>.577</u>	<u>.651</u>	<u>.319</u>	,298
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,045	,062
ACROSOMA	Coef. Correl.	<u>.508</u>	<u>.655</u>	<u>.254</u>	,229
	Sig. (bilateral)	,001	,000	,114	,155
MOVILIDAD	Coef. Correl.	<u>.605</u>	<u>.646</u>	<u>.366</u>	<u>.436</u>
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,020	,005
MOVILIDAD (CAFEÍNA)	Coef. Correl.	<u>.631</u>	<u>.620</u>	<u>.361</u>	<u>.487</u>
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,022	,001

Tabla 4.47: Coeficientes de correlación entre la resistencia de los cuatro parámetros analizados tras el S2 y los índices calculados postdescongelación.

Los coeficientes subrayados y en negrita presentan significación estadística ( $p < 0,05$ ).

RESISTENCIA AL CHOQUE A FRIGORE (S3)		RESISTENCIA AL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN			
		MEMB. PLASMÁTICA "CONGELABILIDAD"	ACROSOMA	MOVILIDAD	MOVILIDAD (CAFEÍNA)
MEMB. PLASMÁTICA	Coef. Correl.	<u>.695</u>	<u>.736</u>	<u>.396</u>	<u>.469</u>
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,011	,002
ACROSOMA	Coef. Correl.	<u>.608</u>	<u>.734</u>	<u>.326</u>	<u>.359</u>
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,040	,023
MOVILIDAD	Coef. Correl.	<u>.728</u>	<u>.649</u>	<u>.384</u>	<u>.469</u>
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,014	,002
MOVILIDAD (CAFEÍNA)	Coef. Correl.	<u>.722</u>	<u>.628</u>	<u>.398</u>	<u>.504</u>
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,011	,001

Tabla 4.48: Coeficientes de correlación entre la resistencia de los cuatro parámetros analizados tras el S3 y los índices calculados postdescongelación.

Los coeficientes subrayados y en negrita presentan significación estadística ( $p < 0,05$ ).

RESISTENCIA AL CHOQUE A FRIGORE (S5)		RESISTENCIA AL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN			
		MEMB. PLASMÁTICA "CONGELABILIDAD"	ACROSOMA	MOVILIDAD	MOVILIDAD (CAFEÍNA)
MEMB. PLASMÁTICA	Coef. Correl.	<u>.771</u>	<u>.803</u>	<u>.436</u>	<u>.465</u>
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,005	,002
ACROSOMA	Coef. Correl.	<u>.626</u>	<u>.718</u>	<u>.313</u>	<u>.353</u>
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,049	,025
MOVILIDAD	Coef. Correl.	<u>.719</u>	<u>.565</u>	<u>.483</u>	<u>.545</u>
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,002	,000
MOVILIDAD (CAFEÍNA)	Coef. Correl.	<u>.712</u>	<u>.624</u>	<u>.509</u>	<u>.515</u>
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,001	,001

Tabla 4.49: Coeficientes de correlación entre la resistencia de los cuatro parámetros analizados tras el S5 y los índices calculados postdescongelación.

Los coeficientes subrayados y en negrita presentan significación estadística ( $p < 0,05$ ).

Finalmente, realizamos para los valores obtenidos después de cada uno de los choques *a frigore*, el análisis multivariante de regresión para la congelabilidad de un eyaculado, mostrando los resultados en las tablas 4.50, 4.51, 4.52, 4.53 y 4.54, en las que podemos observar que, al igual que sucedía en la prueba de la termorresistencia, sólo se incorpora al modelo una de las cuatro variables introducidas inicialmente, que varía en función del tiempo empleado para el choque; así, en el S1 y el S3 resulta ser el porcentaje de movilidad sin cafeína, en el S2 el porcentaje de movilidad bajo la estimulación con cafeína, en el S0 la resistencia del acrosoma y en el S5 la resistencia de la membrana plasmática.

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	54,667	2,562	21,340	,000
	RESISTENCIA ACROSOMA AL CHOQUE A FRIGORE 0h	2,061	,495	,560	4,161
n=40	r=0,560	r <sup>2</sup> =0,313	r <sup>2</sup> correg.=0,295	Anova: F=17,317	p<0,001

Tabla 4.50: Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad de un eyaculado empleando los valores analizados tras el S0.

4.2 Experimento 1: Estudio de las pruebas de laboratorio como indicadores de la congelabilidad seminal.

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	54,326	2,789		19,475	,000
	RESISTENCIA DEL % MOVILIDAD AL CHOQUE A FRIGORE 1h	,361	,094	,528	3,831	,000
n=40	r=0,528	r <sup>2</sup> =0,279	r <sup>2</sup> correg.=0,260	Anova: F=14,678		p<0,001

Tabla 4.51: Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad de un eyaculado empleando los valores analizados tras el S1.

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	50,338	2,933		17,163	,000
	RESISTENCIA DEL % MOVILIDAD AL CHOQUE A FRIGORE 2h (CAF)	,348	,069	,631	5,009	,000
n=40	r=0,631	r <sup>2</sup> =0,398	r <sup>2</sup> correg.=0,382	Anova: F=25,095		p<0,001

Tabla 4.52: Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad de un eyaculado empleando los valores analizados tras el S2.

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	46,271	2,870		16,119	,000
	RESISTENCIA DEL % MOVILIDAD AL CHOQUE A FRIGORE 3h	,444	,068	,728	6,555	,000
n=40	r=0,728	r <sup>2</sup> =0,531	r <sup>2</sup> correg.=0,518	Anova: F=42,967		p<0,001

Tabla 4.53: Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad de un eyaculado empleando los valores analizados tras el S3.

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	45,626	2,632		17,337	,000
	RESISTENCIA DE LA MEMB. PLASM. AL CHOQUE A FRIGORE 5h	,650	,087	,771	7,458	,000
n=40	r=0,771	r <sup>2</sup> =0,594	r <sup>2</sup> correg.=0,583	Anova: F=55,624		p<0,001

Tabla 4.54: Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad de un eyaculado empleando los valores analizados tras el S5.

El porcentaje de la varianza del índice de congelabilidad que es explicado por los diferentes modelos, generalmente va aumentando a medida que discurre el tiempo de incubación de las muestras, siendo de un 29,5 % para el S0, de un 26,0 % para el S1, de un 38,2 % para el S2, de un 51,8 % para el S3 y, finalmente, de un 58,3 % para la resistencia al choque realizado tras las 5 horas.

Las ecuaciones de regresión generadas a partir de los citados modelos son las siguientes:

$$S0: \text{Congelabilidad} = 54,667 + 2,061(\text{Resistencia Acros.S0})$$

$$S1: \text{Congelabilidad} = 54,326 + 0,361(\text{Resistencia \%MovilidadS1})$$

$$S2: \text{Congelabilidad} = 50,338 + 0,348(\text{Resistencia \%Movilidad [CAF]S2})$$

$$S3: \text{Congelabilidad} = 46,271 + 0,444(\text{Resistencia \%MovilidadS3})$$

$$S5: \text{Congelabilidad} = 45,626 + 0,650(\text{Resistencia Memb.Plasm.S5})$$

### 4.3. Experimento 2: Evaluación de los patrones cinéticos descritos por los espermatozoides.

#### 4.3.1. Respuesta y evolución de los parámetros cinéticos individuales de los espermatozoides analizados.

##### 4.3.1.1. Respuesta y evolución de los parámetros cinéticos individuales.

##### **Evolución de los parámetros cinéticos individuales tras el proceso de criopreservación.**

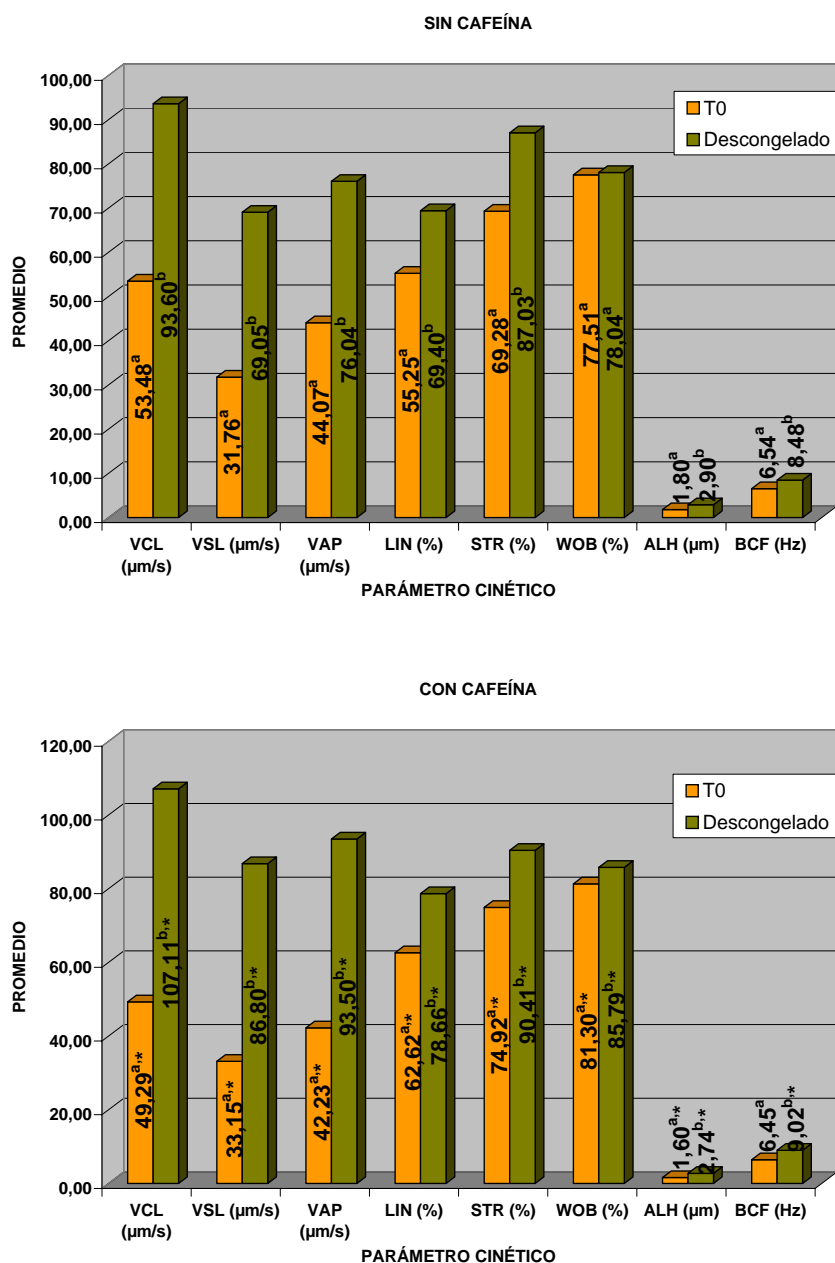
Como puede observarse en la figura 4.37, en las muestras descongeladas y en ausencia de cafeína, se produce un incremento claro ( $p < 0,01$ ), con respecto a las muestras analizadas tras la eyaculación, de casi todos los parámetros (VSL, VCL, VAP, LIN, STR, ALH y BCF), siendo el WOB el único que presenta valores similares ( $p > 0,05$ ) en ambas.

La adición de cafeína produce un aumento ( $p < 0,05$ ) en los valores resultantes del análisis cinemático en prácticamente todos parámetros estudiados, tanto para las muestras descongeladas, como para las analizadas en tiempo 0. Es en éstas últimas donde aparecen las excepciones: la BCF, con un valor similar en los dos casos, y la VCL y la VAP, cuyos valores disminuyen al incubarse con cafeína.

Al comparar los resultados de las dos razas estudiadas obtenidos sin la adición de cafeína (tabla 9.9 de los anexos), se observa que en el T0 los valores medios de la raza Landrace son más altos que los de la raza Large White, exceptuando el LIN, el STR y la BCF, y que además existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre ellas para los parámetros VCL, VAP, ALH y BCF. Después de realizar la descongelación de las muestras, se constata que estas diferencias significativas entre razas ( $p < 0,05$ ) aparecen en todos los parámetros analizados excepto en la ALH, siendo en todo momento los valores calculados para la raza Landrace superiores a los de la raza Large White.

Con la adición de cafeína a las muestras iniciales, se incorpora la VSL al grupo de parámetros que muestran diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre razas, si bien, y al contrario de lo que ocurre en las valoraciones sin cafeína, la mayoría de los promedios calculados para la raza Large White

resultan ser más altos que los de la Landrace, exceptuando el LIN y el WOB que no presentan significación estadística tras el análisis. Al incubar las muestras descongeladas con el citado estimulante, se observa que nuevamente aparecen diferencias entre razas en siete de los ocho parámetros analizados, siendo el STR el único que muestra valores estadísticamente similares en ambas. En este caso, la raza Large White presenta valores medios más bajos en la ALH, la BCF y los tres índices de velocidad (VCL, VSL y VAP), mientras que la raza Landrace los muestra en el LIN, el WOB y el STR.



**Figura 4.37:** Valores medios obtenidos para cada uno de los parámetros analizados en el T0 y tras el descongelado, tanto en ausencia como en presencia de cafeína.

Distintos superíndices entre T0 y el Descongelado, dentro de cada parámetro, revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). La presencia de \* indica variaciones significativas ( $p < 0,05$ ) entre las muestras con y sin cafeína.

Al analizar los datos correspondientes a cada verraco en particular (tablas 9.11, 9.12, 9.13 y



9.14 de los anexos), queda reflejada, tanto en las muestras iniciales como en las descongeladas, la existencia de una gran variabilidad entre animales, presentando diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre ellos en todos los parámetros, con la excepción del STR en el T0 donde no se observan diferencias en la respuesta de los distintos verracos en las muestras incubadas con cafeína.

#### Respuesta y evolución de los parámetros cinéticos individuales durante la prueba de la termorresistencia.

La incubación a 39 °C (tabla 4.55) produce un incremento inicial ( $p < 0,05$ ) a la hora y media de incubación en los valores de todos los parámetros excepto de la ALH. A partir de entonces, se observa un descenso paulatino ( $p < 0,05$ ) en los tres parámetros que reflejan la velocidad del espermatozoide (VCL, VSL y VAP), que pasa a ser más acusado tras las 7 horas ( $p < 0,01$ ). El resto de parámetros no presenta un patrón definido a lo largo de la incubación, no variando de manera sustancial respecto a los valores mostrados en el T1,5 y experimentando también una reducción de los niveles en el T7.

EVOLUCIÓN PARÁMETROS CINÉTICOS EN LA TERMORRESISTENCIA										
SIN CAFEÍNA										
	T0 (5185)		T1,5 (5061)		T3 (4966)		T4,5 (4112)		T7 (1856)	
	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	53,48 <sup>a</sup>	35,15	55,73 <sup>b</sup>	30,95	53,58 <sup>a</sup>	31,06	50,50 <sup>c</sup>	30,41	35,26 <sup>d</sup>	26,14
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	31,76 <sup>a</sup>	27,11	39,11 <sup>b</sup>	25,60	38,16 <sup>c</sup>	26,08	37,08 <sup>d</sup>	26,22	24,40 <sup>e</sup>	21,80
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	44,07 <sup>a</sup>	32,70	48,18 <sup>b</sup>	29,12	45,89 <sup>c</sup>	28,66	43,30 <sup>d</sup>	27,96	28,60 <sup>e</sup>	23,62
LIN (%)	55,26 <sup>a</sup>	24,51	68,04 <sup>b</sup>	21,92	68,82 <sup>b</sup>	21,32	70,41 <sup>c</sup>	20,99	63,93 <sup>d</sup>	23,60
STR (%)	69,28 <sup>a</sup>	22,67	79,91 <sup>b</sup>	18,87	81,40 <sup>c</sup>	18,25	83,13 <sup>d</sup>	17,24	80,69 <sup>b</sup>	17,99
WOB (%)	77,52 <sup>ad</sup>	16,24	83,60 <sup>b</sup>	13,48	83,05 <sup>cd</sup>	13,37	83,13 <sup>bc</sup>	13,53	76,76 <sup>d</sup>	17,36
ALH ( $\mu\text{m}$ )	1,80 <sup>a</sup>	0,96	1,76 <sup>a</sup>	0,85	1,76 <sup>a</sup>	0,92	1,67 <sup>b</sup>	0,89	1,30 <sup>c</sup>	0,77
BCF (Hz)	6,54 <sup>ad</sup>	2,92	7,41 <sup>b</sup>	2,82	7,34 <sup>b</sup>	2,86	7,35 <sup>b</sup>	2,83	6,74 <sup>d</sup>	2,95

**Tabla 4.55:** Valores medios obtenidos, sin la adición de cafeína, en cada uno de los parámetros analizados a lo largo de la prueba de la termorresistencia.

Distintos superíndices entre tiempos, dentro de cada parámetro, revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Al lado de cada tiempo figura entre paréntesis el número de espermatozoides analizados.

Al incubar las muestras con cafeína (tabla 4.56), observamos que las tres velocidades calculadas y la ALH van aumentando de forma paulatina a lo largo de la incubación hasta las cuatro horas y media para, a continuación, caer ligeramente ( $p < 0,05$ ) tras las siete horas. Por su parte, los resultados obtenidos para LIN, STR, WOB y BCF van aumentando, en líneas generales, a lo largo de los cuatro puntos de referencia tomados durante las siete horas de incubación.

En las figuras 4.38, 4.39, 4.40 y 4.41 podemos observar el efecto provocado por la cafeína en los tiempos de control establecidos; prácticamente en todos se produce un aumento ( $p < 0,05$ ) de los parámetros VCL, VSL, VAP, LIN, WOB y ALH, siendo la BCF el único que disminuye los valores en todos los tiempos, exceptuando el T7, donde muestra un incremento ( $p < 0,05$ ). El STR no muestra diferencias ( $p > 0,05$ ) en los valores calculados con y sin cafeína durante casi toda la prueba, únicamente después de las siete horas de incubación apunta un leve incremento ( $p < 0,05$ ) en las muestras estimuladas.

EVOLUCIÓN PARÁMETROS CINÉTICOS EN LA TERMORRESISTENCIA										
CON CAFEÍNA										
	T0 (5140)		T1,5 (5572)		T3 (5303)		T4,5 (5184)		T7 (4435)	
	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
VCL (µm/s)	49,29 <sup>a</sup>	32,92	57,93 <sup>b</sup>	31,22	58,98 <sup>ce</sup>	32,64	65,34 <sup>d</sup>	35,06	59,42 <sup>e</sup>	34,53
VSL (µm/s)	33,15 <sup>a</sup>	27,37	41,84 <sup>b</sup>	27,47	42,44 <sup>ce</sup>	27,78	47,30 <sup>d</sup>	29,66	44,02 <sup>e</sup>	29,48
VAP (µm/s)	42,23 <sup>a</sup>	31,09	50,86 <sup>b</sup>	29,95	51,74 <sup>c</sup>	30,35	57,06 <sup>d</sup>	32,04	52,14 <sup>bc</sup>	32,04
LIN (%)	62,62 <sup>a</sup>	24,67	69,31 <sup>b</sup>	22,40	70,24 <sup>c</sup>	21,55	71,47 <sup>d</sup>	20,75	72,96 <sup>e</sup>	21,28
STR (%)	74,92 <sup>a</sup>	21,55	80,11 <sup>b</sup>	19,14	80,76 <sup>c</sup>	18,97	82,15 <sup>d</sup>	18,28	83,70 <sup>e</sup>	18,14
WOB (%)	81,30 <sup>a</sup>	15,89	84,83 <sup>d</sup>	13,36	85,62 <sup>d</sup>	12,40	85,83 <sup>d</sup>	11,89	85,82 <sup>d</sup>	12,60
ALH (µm)	1,60 <sup>a</sup>	0,88	1,76 <sup>b</sup>	0,83	1,82 <sup>c</sup>	0,93	2,00 <sup>d</sup>	1,04	1,77 <sup>e</sup>	0,93
BCF (Hz)	6,45 <sup>a</sup>	2,80	7,11 <sup>b</sup>	2,73	7,09 <sup>b</sup>	2,64	7,12 <sup>b</sup>	2,70	7,35 <sup>c</sup>	2,72

Tabla 4.56: Valores medios obtenidos, con la adición de cafeína, en cada uno de los parámetros analizados a lo largo de la prueba de la termorresistencia.

Distintos superíndices entre tiempos, dentro de cada parámetro, revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Al lado de cada tiempo figura entre paréntesis el número de espermatozoides analizados.

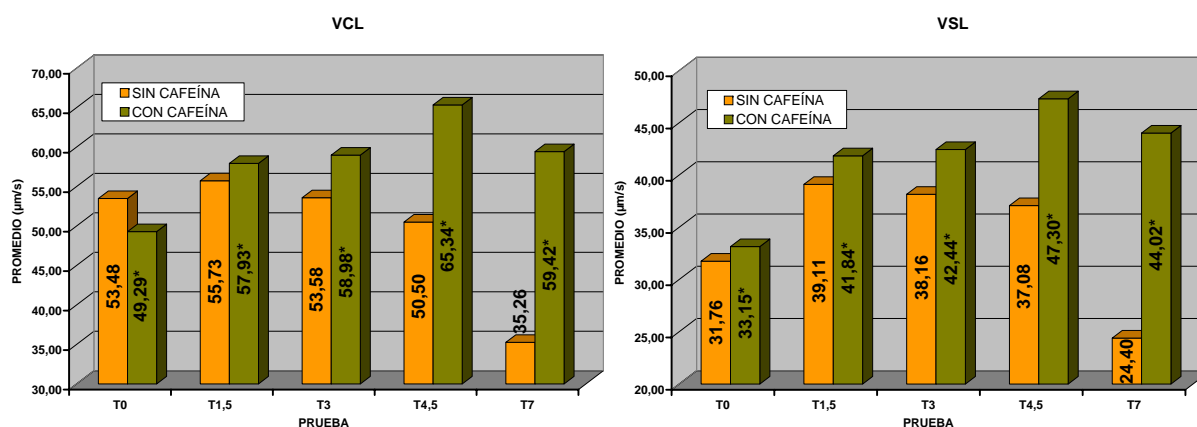


Figura 4.38: Valores medios de la VCL y de la VSL, en presencia y ausencia de cafeína, durante la prueba de la termorresistencia.

La presencia de \* indica variaciones significativas ( $p < 0,05$ ) entre muestras con y sin cafeína.

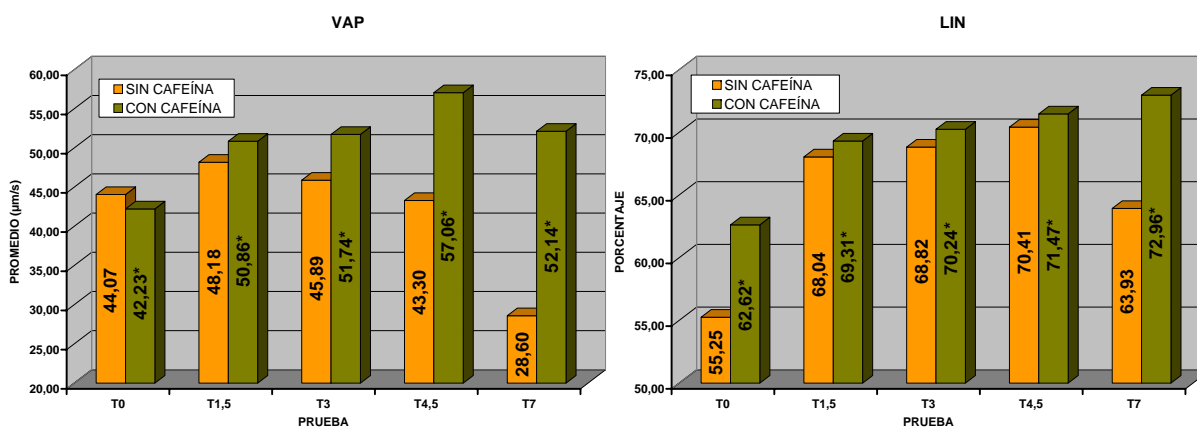
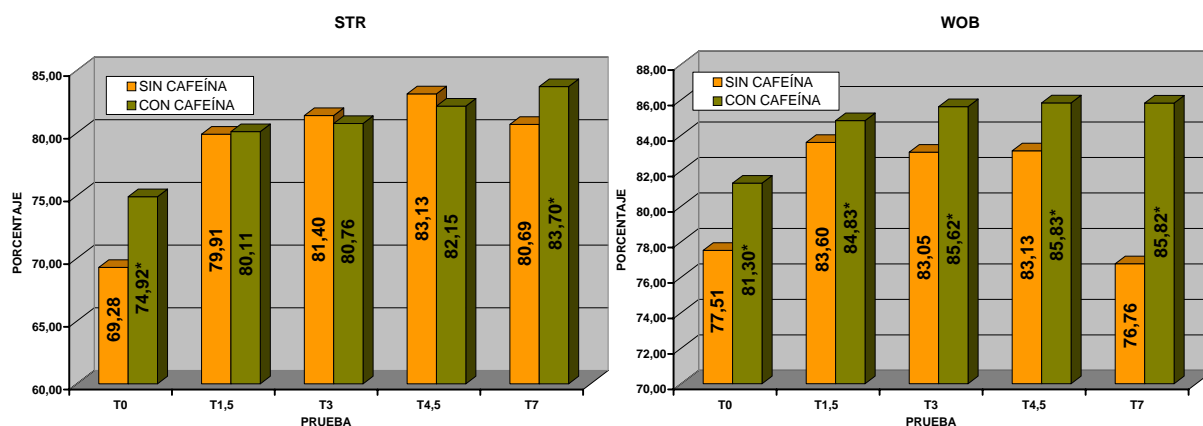


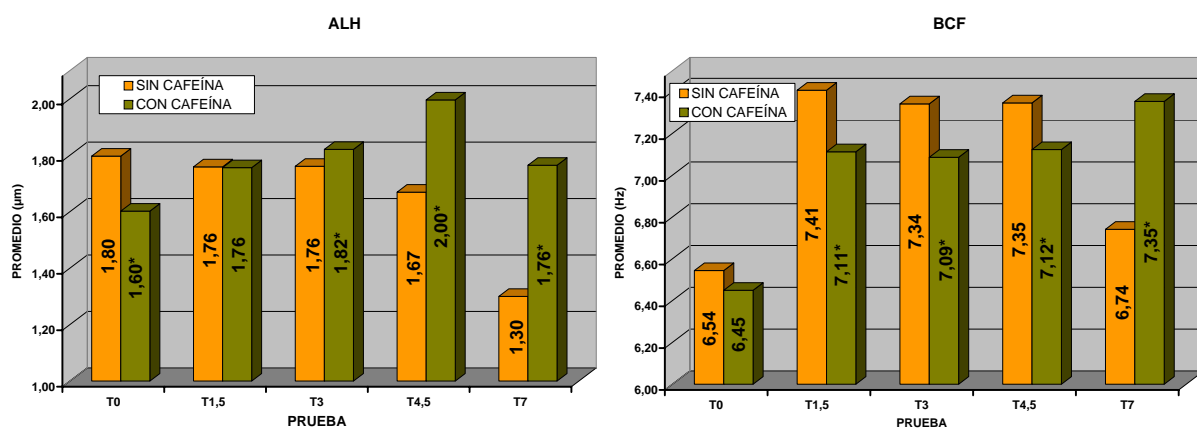
Figura 4.39: Valores medios de la VAP y del LIN, en presencia y ausencia de cafeína, durante la prueba de la termorresistencia.

La presencia de \* indica variaciones significativas ( $p < 0,05$ ) entre muestras con y sin cafeína.



**Figura 4.40:** Valores medios del STR y del WOB, en presencia y ausencia de cafeína, durante la prueba de la termorresistencia.

La presencia de \* indica variaciones significativas ( $p < 0,05$ ) entre las muestras con y sin cafeína.



**Figura 4.41:** Valores medios de la ALH y de la BCF, en presencia y ausencia de cafeína, durante la prueba de la termorresistencia.

La presencia de \* indica variaciones significativas ( $p < 0,05$ ) entre las muestras con y sin cafeína.

Al comparar los resultados obtenidos para las dos razas estudiadas (tabla 9.9 de los anexos), se comprueba que, en las muestras sin cafeína, los dos últimos tiempos de control presentan un mayor número de parámetros en los que la respuesta es diferente en función de la raza; así, en el T4,5 y en el T7 aparecen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las medias de los tres parámetros de velocidad, de la ALH y de la BCF, siendo los valores de la raza Landrace superiores a los de la Large White.

La administración de cafeína provoca un incremento en el número de parámetros en los que se detectan diferencias estadísticamente significativas entre razas, sobre todo en el T1,5 y en el T3. Por otra parte, y al contrario de lo ocurrido en las muestras sin cafeína, los valores obtenidos por la raza Large White son más altos ( $p < 0,05$ ) en los parámetros VCL, VSL, VAP, WOB y ALH en todos los análisis realizados a lo largo de la incubación. La BCF, por su parte, muestra diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) sólo durante la primera mitad de la incubación, siendo también en este caso inferiores los promedios calculados para la raza Landrace.

El análisis estadístico realizado con el fin de determinar posibles diferencias entre la respuesta de los parámetros cinemáticos mostrados por el conjunto de los espermatozoides de los ocho verracos empleados (tablas 9.11, 9.12, 9.13 y 9.14 de los anexos) revela que, en prácticamente todos los tiempos de incubación, tanto con cafeína como sin ella, aparecen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Los dos parámetros que muestran una mayor estabilidad en los promedios calculados para los ocho verracos fueron el STR y el WOB, siendo el primero, el único que, en la incubación sin cafeína, muestra una respuesta similar ( $p > 0,05$ ) en todos ellos a las 4,5 horas.

### Respuesta y evolución de los parámetros cinéticos individuales en la prueba del choque *a frigore*.

En la tabla 4.57 se recogen los resultados obtenidos, para los ocho parámetros cinéticos, en los análisis realizados sin la adición de cafeína, tras la ejecución de los distintos choques *a frigore* efectuados. La respuesta de los diferentes parámetros durante las cinco horas de incubación a 20 °C se refleja además, de una forma más clara en las figuras numeradas del 4.42 al 4.45.

EVOLUCIÓN PARÁMETROS CINÉTICOS EN LA PRUEBA DEL CHOQUE A FRIGORE												
SIN CAFEÍNA												
	T0 (5185)		S0 (541)		S1 (1113)		S2 (1560)		S3 (1803)		S5 (1952)	
	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	53,48 <sup>a</sup>	35,15	81,04 <sup>b</sup>	43,18	104,47 <sup>c</sup>	39,39	104,43 <sup>c</sup>	39,50	103,07 <sup>c</sup>	40,81	99,54 <sup>d</sup>	42,85
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	31,76 <sup>a</sup>	27,11	43,98 <sup>b</sup>	28,29	51,75 <sup>c</sup>	25,60	51,49 <sup>c</sup>	24,35	50,92 <sup>c</sup>	25,91	47,24 <sup>d</sup>	25,71
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	44,07 <sup>a</sup>	32,70	56,04 <sup>b</sup>	30,31	67,01 <sup>c</sup>	25,41	67,55 <sup>c</sup>	24,88	66,33 <sup>c</sup>	26,16	63,20 <sup>d</sup>	26,87
LIN (%)	55,26 <sup>a</sup>	24,50	54,73 <sup>a</sup>	20,02	50,68 <sup>b</sup>	18,96	51,38 <sup>b</sup>	20,01	51,31 <sup>b</sup>	19,71	49,91 <sup>c</sup>	20,72
STR (%)	69,28 <sup>a</sup>	22,67	77,01 <sup>b</sup>	18,97	76,14 <sup>b</sup>	19,55	75,88 <sup>b</sup>	20,18	75,65 <sup>bc</sup>	18,83	74,04 <sup>c</sup>	20,18
WOB (%)	77,52 <sup>a</sup>	16,24	69,58 <sup>b</sup>	14,32	65,51 <sup>c</sup>	13,48	66,64 <sup>c</sup>	14,31	66,62 <sup>c</sup>	14,96	66,08 <sup>c</sup>	15,70
ALH ( $\mu\text{m}$ )	1,80 <sup>a</sup>	0,96	3,16 <sup>b</sup>	1,86	4,31 <sup>c</sup>	1,87	4,29 <sup>c</sup>	1,94	4,21 <sup>d</sup>	2,01	4,11 <sup>d</sup>	2,04
BCF (Hz)	6,54 <sup>a</sup>	2,92	7,36 <sup>b</sup>	3,25	7,28 <sup>b</sup>	3,14	7,18 <sup>b</sup>	3,09	7,08 <sup>b</sup>	3,00	6,82 <sup>c</sup>	3,13

**Tabla 4.57:** Valores medios obtenidos, sin la adición de cafeína, en cada uno de los parámetros analizados a lo largo de la prueba del choque *a frigore*.

Distintos superíndices entre pruebas, dentro de cada parámetro, revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Al lado de cada prueba figura entre paréntesis el número de espermatozoides analizados.

La VCL, al igual que los otros dos parámetros de velocidad (VAP y VSL), sufre un aumento importante ( $p < 0,01$ ) tras la realización del descenso brusco de temperatura en todos los tiempos de incubación; estos valores van aumentando después de los dos primeros choques (S0 y S1) para, posteriormente, permanecer estables hasta la valoración realizada en el S5, donde disminuyen ( $p < 0,05$ ).

En cuanto al parámetro LIN, el efecto del choque produce una leve caída en sus valores, no resultando ésta ser significativa tras el S0, pero sí en el resto de choques, manteniéndose constantes los valores en el S1, el S2 y el S3, y disminuyendo algo más en el S5.

Los diferentes choques *a frigore* realizados a lo largo de la prueba provocan en el STR un

incremento de sus valores ( $p < 0,05$ ), que no es homogéneo en todos ellos, ya que se mantiene constante durante los tres primeros, para empezar a disminuir de forma leve en el S3, siendo ya estadísticamente significativa la diferencia ( $p < 0,05$ ) en el S5.

El WOB reduce sus promedios después de todos y cada uno de los choques realizados, siendo el primero el que experimenta un descenso menor. A partir de entonces, del S1 al S5, la respuesta es similar.

La ALH y la BCF se incrementan tras la realización de los choques, si bien difieren entre ellas en su evolución; así, la ALH va incrementando sus valores ( $p < 0,05$ ) en el S0 y el S1 y, a partir de entonces, comienzan a descender, si bien las diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) no se presentan hasta el S3. La BCF, por su parte, va disminuyendo de forma paulatina durante la incubación, siendo estadísticamente significativo sólo el descenso mostrado tras el choque realizado a las 5 horas.

La tabla 4.58 y las figuras 4.42 a 4.45 muestran los resultados y la evolución de los diferentes parámetros cinéticos con adición de cafeína tras la realización de los diferentes choques. El comportamiento de la VCL y la VSL es similar al observado en las muestras sin cafeína, presentando también un incremento importante ( $p < 0,05$ ) y progresivo en sus valores tras los dos primeros choques para, a continuación, mantenerse constantes en el S2 y el S3, y descender significativamente ( $p < 0,05$ ), con respecto a los resultados obtenidos tras los anteriores choques, en el S5. La VAP muestra prácticamente el mismo patrón, variando sólo en que el incremento inicial observado en los valores tras el S0 se mantiene hasta el S3.

EVOLUCIÓN PARÁMETROS CINÉTICOS EN LA PRUEBA DEL CHOQUE A FRIGORE												
CON CAFEÍNA												
	T0 (5140)		S0 (826)		S1 (1329)		S2 (1951)		S3 (2067)		S5 (2356)	
	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	49,29 <sup>a</sup>	32,92	101,00 <sup>b</sup>	44,66	109,18 <sup>c</sup>	40,15	109,53 <sup>c</sup>	43,07	108,38 <sup>c</sup>	42,47	95,76 <sup>d</sup>	45,68
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	33,15 <sup>a</sup>	27,37	58,94 <sup>bd</sup>	35,79	64,10 <sup>c</sup>	32,03	63,34 <sup>c</sup>	31,41	63,07 <sup>c</sup>	31,49	55,76 <sup>d</sup>	31,11
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	42,23 <sup>a</sup>	31,09	77,92 <sup>b</sup>	35,98	79,45 <sup>b</sup>	29,82	78,10 <sup>b</sup>	31,07	77,67 <sup>b</sup>	30,62	68,75 <sup>c</sup>	31,91
LIN (%)	62,62 <sup>a</sup>	24,67	59,54 <sup>b</sup>	24,05	59,41 <sup>b</sup>	22,05	58,86 <sup>b</sup>	20,68	59,07 <sup>b</sup>	21,04	59,47 <sup>b</sup>	21,08
STR (%)	74,92 <sup>a</sup>	21,55	75,47 <sup>b</sup>	24,23	79,00 <sup>c</sup>	21,24	79,88 <sup>c</sup>	19,49	79,79 <sup>c</sup>	20,16	79,37 <sup>c</sup>	19,61
WOB (%)	81,30 <sup>a</sup>	15,89	77,74 <sup>b</sup>	13,71	73,87 <sup>ce</sup>	13,87	72,46 <sup>d</sup>	13,84	72,85 <sup>d</sup>	14,01	73,62 <sup>e</sup>	14,32
ALH ( $\mu\text{m}$ )	1,60 <sup>a</sup>	0,88	3,34 <sup>b</sup>	1,79	3,89 <sup>c</sup>	1,82	4,00 <sup>c</sup>	1,93	3,93 <sup>c</sup>	1,90	3,55 <sup>d</sup>	1,98
BCF (Hz)	6,45 <sup>a</sup>	2,80	7,00 <sup>b</sup>	3,68	7,48 <sup>c</sup>	3,61	7,59 <sup>c</sup>	3,52	7,62 <sup>c</sup>	3,42	7,53 <sup>c</sup>	3,32

**Tabla 4.58:** Valores medios obtenidos, con la adición de cafeína, en cada uno de los parámetros analizados a lo largo de la prueba del choque a frigore.

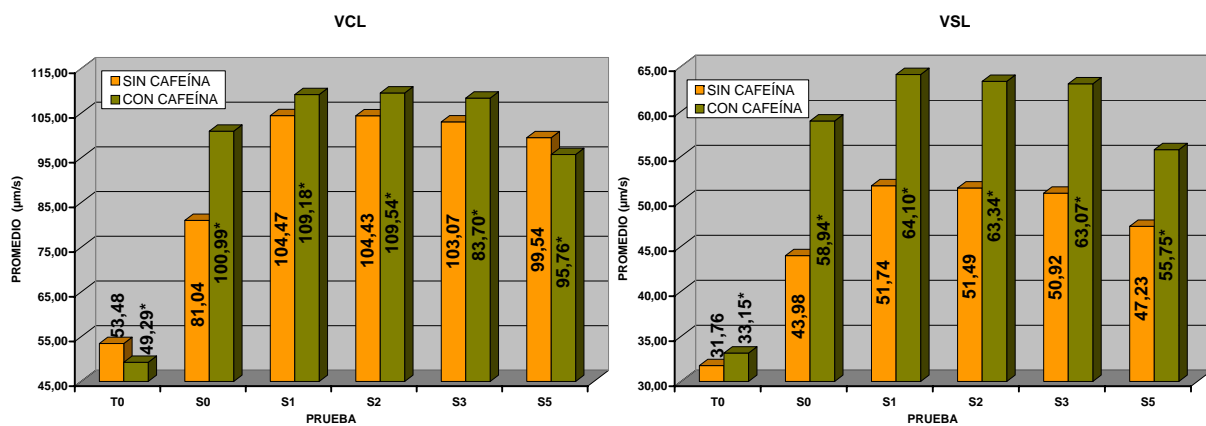
Distintos superíndices entre pruebas, dentro de cada parámetro, revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Al lado de cada prueba figura entre paréntesis el número de espermatozoides analizados.

La ALH, la BCF y el STR se comportan de forma parecida, si bien, mientras el primer parámetro muestra el mismo patrón que la VSL y la VCL, los otros dos difieren en que el descenso de los valores reflejado tras las 5 horas no se produce.

Los parámetros WOB y LIN, al igual que sucedía en las muestras sin cafeína, son los únicos

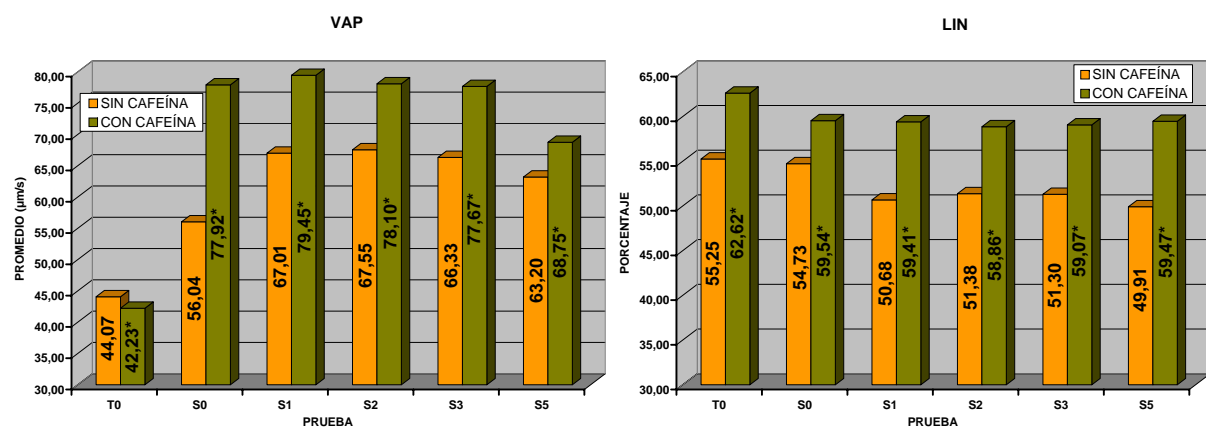
que reducen sus valores ( $p < 0,05$ ) tras los choques *a frigore*; en el WOB los valores descienden progresivamente en los tres primeros choques, se mantienen constantes en el S3 y experimentan un incremento en el S5. Por su parte, el LIN es el único parámetro que muestra la misma respuesta al choque independientemente del momento de incubación.

La adición de cafeína a las muestras tras cualquiera de los choques produce un incremento generalizado en todos los parámetros (figuras 4.42, 4.43, 4.44 y 4.45), con dos únicas excepciones: la ALH, en la que en todos los choques se produce, salvo en el inicial, un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) con respecto a las muestras sin cafeína, y la BCF en la que el descenso se produce en el S0. En el resto de parámetros y tiempos este incremento resulta ser significativo ( $p < 0,05$ ) en la práctica mayoría, exceptuando únicamente los valores obtenidos para el STR tras el choque de las 0 horas.



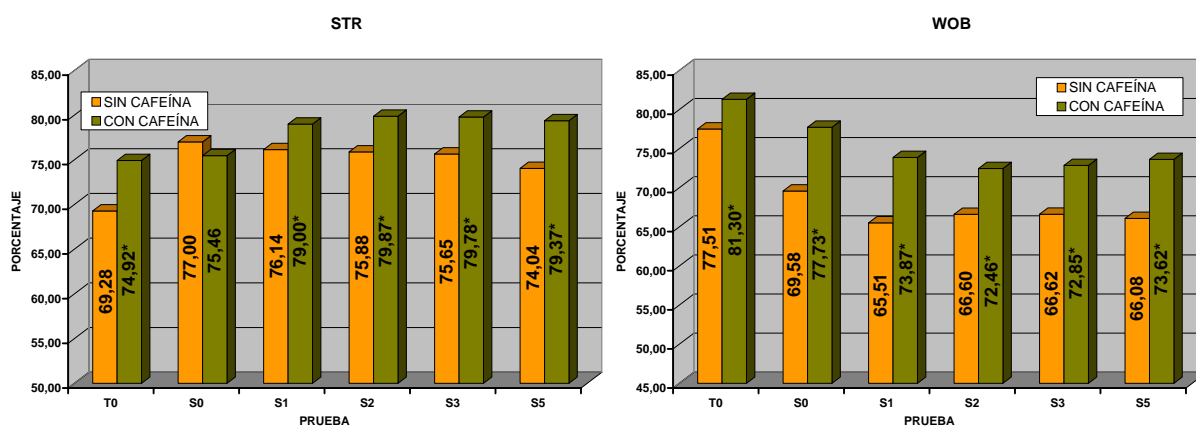
**Figura 4.42:** Valores medios de la VCL y de la VSL, en presencia y ausencia de cafeína, durante la prueba del choque a frigore.

La presencia de \* indica variaciones significativas ( $p < 0,05$ ) entre las muestras con y sin cafeína.



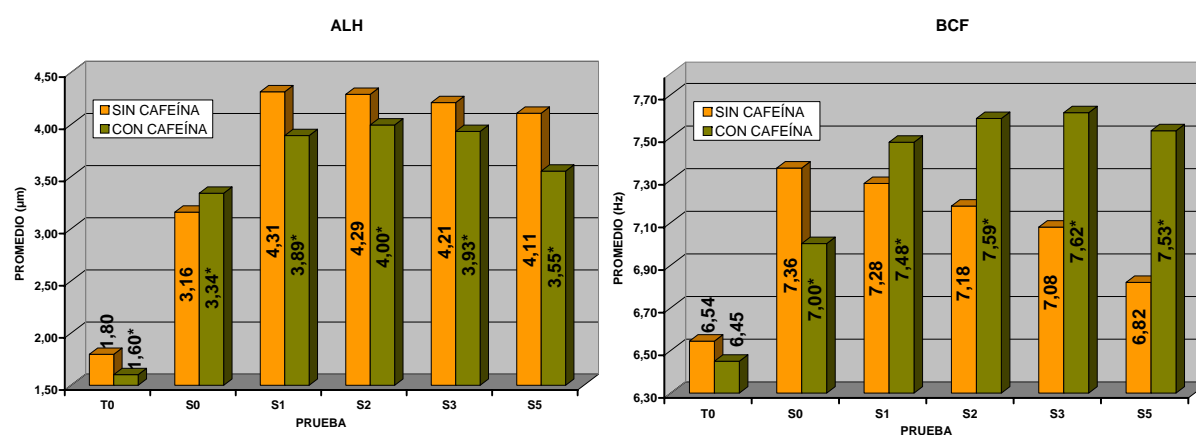
**Figura 4.43:** Valores medios de la VAP y del LIN, en presencia y ausencia de cafeína, durante la prueba del choque a frigore.

La presencia de \* indica variaciones significativas ( $p < 0,05$ ) entre las muestras con y sin cafeína.



**Figura 4.44:** Valores medios del STR y del WOB, en presencia y ausencia de cafeína, durante la prueba del choque a frigore.

La presencia de \* indica variaciones significativas ( $p < 0,05$ ) entre las muestras con y sin cafeína.



**Figura 4.45:** Valores medios de la ALH y de la BCF, en presencia y ausencia de cafeína, durante la prueba del choque a frigore.

La presencia de \* indica variaciones significativas ( $p < 0,05$ ) entre las muestras con y sin cafeína.

Al analizar los resultados por raza (tabla 9.10 de los anexos), observamos que las diferencias ( $p < 0,05$ ) entre ellos son evidentes para muchos de los parámetros y tiempos en las muestras sin cafeína, y que en aquellas con estimulación química, el número de parámetros en los que se aprecian diferencias se reduce considerablemente. Cabría destacar que la VAP es el único parámetro que, en las muestras sin cafeína, permanece constante ( $p > 0,05$ ) entre las dos razas en todos los tiempos de incubación.

Al igual que sucedía en la prueba de termorresistencia, al comparar la respuesta de los ocho verracos para los diferentes parámetros se observan, en prácticamente todos los tiempos de incubación, tanto con cafeína como sin ella, diferencias significativas. En las muestras incubadas sin cafeína la respuesta en el S0 para las tres velocidades calculadas es similar en todos los animales, al igual que en el S1 y el S2 para la BCF. En aquellas otras incubadas con el estimulante de la movilidad, los valores sólo se mantienen constantes en el S0 para la VCL (tablas 9.15, 9.16, 9.17 y 9.18 de los anexos).

#### 4.3.1.2. Respuesta de los parámetros cinéticos individuales en función de la aptitud para la congelación de los diferentes eyaculados.

##### **Respuesta de los parámetros cinéticos individuales en fresco y tras la criopreservación de las muestras, en función de la capacidad de congelación de los diferentes eyaculados.**

Al analizar los resultados en función del grupo de calidad establecido (tabla 9.19 de los anexos) en las muestras recogidas en tiempo 0, aun existiendo diferencias ( $p < 0,05$ ) entre ellos en algunos parámetros, no se observa ningún patrón claro, ya que en muchos casos los valores de los eyaculados clasificados como malos congeladores (MC) son intermedios respecto a los recogidos en los buenos (BC) y medios congeladores (CM); sólo para los parámetros LIN, WOB y BCF, los valores del grupo MC son significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ).

Tras el descongelado, se observa que las muestras pertenecientes al grupo BC presentan medias más altas ( $p < 0,01$ ) para la VCL, la VSL y la VAP, seguido de los congeladores medios y malos, al contrario que sucede con la BCF, en la que los valores más altos correspondieron al grupo MC y los más bajos al BC ( $p < 0,05$ ).

Al añadir cafeína a las muestras (tabla 9.20 de los anexos), aparecen diferencias ( $p < 0,05$ ) entre los grupos de calidad en el T0 para las tres velocidades (VSL, VCL y VAP), mientras que en la ALH y en el WOB éstas desaparecen. En el resto de parámetros la comparación de los tres grupos de calidad muestra la misma respuesta que en la incubación sin cafeína, puesto que el LIN y el STR no mostraron diferencias entre grupos, mientras que en la BCF el grupo MC permaneció con valores significativamente más bajos ( $p < 0,05$ ) que los de los otros dos. En las muestras descongeladas se refleja una pérdida del patrón establecido anteriormente para los parámetros de velocidad y se mantiene el observado en la BCF, ya que el grupo MC sigue siendo el que presenta valores más altos ( $p < 0,05$ ).

##### **Respuesta de los parámetros cinéticos individuales con la incubación a 39 °C, en función de la capacidad de congelación de los diferentes eyaculados.**

A la hora y media de incubación (tabla 9.19 de los anexos), aquellos eyaculados pertenecientes al grupo MC muestran valores más bajos ( $p < 0,05$ ) en todos los parámetros menos en la ALH y el WOB. Posteriormente, a las tres horas se invierte la respuesta, siendo este grupo el que valores más altos ( $p < 0,05$ ) obtiene en cuatro de los ocho parámetros analizados (VCL, VSL, VAP y WOB). A partir de aquí, se igualan bastante los resultados entre los tres grupos, no mostrando un patrón claro de respuesta, puesto que en muchos casos, y como ocurría en los valores analizados en las muestras iniciales y descongeladas, aun existiendo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre ellos, los valores del grupo MC se sitúan entre los congeladores buenos y medios. No obstante, en cuatro parámetros en el T4,5 (VCL, VSL, VAP y BCF) y en seis de ellos en el T7 (los cuatro anteriores además del WOB y de la ALH), aquellos eyaculados con una buena capacidad de congelación presentan medias superiores al grupo MC, siendo en todos ellos significativas las diferencias ( $p < 0,05$ ), excepto en las tres velocidades del T4,5.



En las muestras con adición de cafeína (tabla 9.20 de los anexos), se recogen resultados inversos a los obtenidos sin ella, destacando que durante prácticamente toda la incubación, en la VCL, en la VAP y en el WOB los valores más altos corresponden a aquellos eyaculados que peor congelan, siendo estadísticamente significativa la diferencia ( $p < 0,05$ ) con los del grupo BC, en todos los tiempos menos en el T7 para estos tres parámetros y en el T4,5 para el WOB. La BCF, por su parte, muestra niveles inferiores ( $p < 0,05$ ) en el grupo MC que en los otros dos durante las siete horas de duración de la prueba, si bien en el T7 las diferencias no son estadísticamente significativas con el grupo BC.

**Respuesta de los parámetros cinéticos individuales en la prueba del choque *a frigore*, en función de la capacidad de congelación de los diferentes eyaculados.** Los valores observados en esta prueba para los diferentes grupos de calidad de los eyaculados se presentan en la tabla 9.21 de los anexos.

La realización de un choque *a frigore* sin que las muestras hayan sufrido un tiempo de estabilización a 20 °C, no nos muestra diferencias reseñables entre los citados tres grupos. Una vez transcurrida una hora a la citada temperatura, los espermatozoides del grupo MC presentan, tras la realización del correspondiente choque (S1), valores medios inferiores ( $p < 0,05$ ) en la VSL, la VCL y la ALH a los del grupo BC, sumándose a éstos, tras el S2, el STR y la VAP. En el S3 las diferencias estadísticamente significativas, entre el grupo MC y el BC, se reducen a tres parámetros ALH, LIN y WOB, siendo en estos dos últimos el grupo MC el que presenta un valor medio más elevado.

En el S5 se invierte la tendencia que han presentado las tres velocidades hasta este momento, en la que los eyaculados del grupo BC presentan valores más elevados que los del grupo MC, si bien, las diferencias observadas sólo son estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en la VAP. En el resto de parámetros estas diferencias entre el grupo BC y MC no se reflejan, siendo el grupo CM el que presenta en algunos casos (VCL y ALH) los valores medios más elevados ( $p < 0,05$ ).

Al añadir cafeína a las muestras (tabla 9.22 de los anexos), se observa que en el S0, el grupo MC presenta velocidades medias más bajas que el BC, si bien las diferencias sólo presentan significación estadística en la VCL y en la VSL. La BCF, por el contrario, muestra valores más elevados cuanto peor congela un eyaculado, siendo este momento el único en el que se refleja significación estadística en este parámetro entre los grupos BC y MC a lo largo de toda la prueba.

Si tomamos como referencia las tres velocidades calculadas, observamos la misma tendencia que en el S0 en las tres primeras horas de incubación, donde el grupo BC presentaba medias más altas que el grupo MC, si bien, la significación estadística sólo aparece en la VSL en el S1, en las tres en el S2 y en la VSL y en la VAP en el S3. Esta tendencia se invierte en el S5, donde el grupo MC muestra valores más elevados en las tres velocidades, siendo significativamente diferentes sólo en la VAP.

El LIN, el STR y el WOB presentaron resultados estadísticamente similares entre el grupo BC y MC en prácticamente toda la prueba, reduciéndose las diferencias entre ellos ( $p < 0,05$ ) al

LIN y al STR en el S1 y al STR en el S3, siendo en estos casos siempre superiores los valores del grupo BC.

La ALH no muestra diferencias ( $p > 0,05$ ) entre los citados grupos en toda la prueba, salvo en el S2, donde los valores medios del BC fueron claramente superiores a los del MC.

#### 4.3.1.3. Determinación de la congelabilidad de un eyaculado a partir de los valores observados en los parámetros cinéticos individuales.

##### Mediante los parámetros cinéticos del semen fresco.

En la tabla 4.59 aparecen reflejados los índices de correlación estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) obtenidos entre los diferentes parámetros cinéticos analizados en el T0, tanto en presencia como en ausencia de cafeína, y el índice de congelabilidad, así como entre ellos y la resistencia a la criopreservación de la movilidad espermática y del acrosoma. Sólo dos parámetros muestran alguna correlación significativa con estos índices; en las muestras incubadas sin cafeína, el WOB presenta un índice de correlación con la congelabilidad de 0,35 y en las estimuladas químicamente es el STR el que presenta correlación negativa con la resistencia del acrosoma a la congelación ( $r = -0,33$ ).

CAFÉINA PRUEBA		CONGELABILIDAD		RESIST. ACROSOMA A LA CONGEL.
NO	T0	WOB (%)	,348	
SI	T0	STR (%)		-,325

**Tabla 4.59:** Coeficientes de correlación estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) entre los valores de los diferentes parámetros cinéticos en en T0 y los índices calculados postdescongelación.

Tras el análisis de regresión múltiple, los dos modelos originados elevan la correlación a un 0,56 en las muestras sin cafeína y a un 0,52 en aquellas otras a las que sí se les administró el estimulante de la motilidad. La explicación de la variabilidad del índice de congelabilidad a partir de los parámetros cinéticos estudiados en estos dos modelos es de un 27,3 % y de un 24,9 %, respectivamente (tabla 4.60).

PRUEBA	CAFÉINA	Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		t	Sig.
			B	Error típ.	Beta			
T0	NO	2	(Constante)	-99,526	42,368		-2,349	,024
			BCF (Hz)	8,983	3,242	,381	2,770	,009
			WOB (%)	1,334	,507	,362	2,631	,012
	SI	1	(Constante)	-2,990	17,730		-,169	,867
			BCF (Hz)	10,254	2,748	,518	3,731	,001
NO CAF.	n=40	r=0.557	r <sup>2</sup> =0.310	r <sup>2</sup> correg.=0,273		Anova: F=8,324	p<0,01	
CAF.	n=40	r=0.518	r <sup>2</sup> =0.268	r <sup>2</sup> correg.=0,249		Anova: F=13,919	p<0,01	

**Tabla 4.60:** Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con los valores de los parámetros cinéticos en el T0.

Las ecuaciones de regresión obtenidas son las siguientes:

$$T0 \text{ (sin CAF): } \textit{Congelabilidad} = -99,526 + 8,983(\textit{BCF}) + 1,334(\textit{WOB})$$

$$T0 \text{ (con CAF): } \textit{Congelabilidad} = -2,990 - 10,254(\textit{BCF})$$

### Mediante los parámetros cinéticos observados en la prueba de la termorresistencia.

La prueba de termorresistencia no nos proporciona una información más precisa para la predicción de la congelabilidad que la aportada por las valoraciones del semen fresco, apareciendo significación estadística únicamente en dos de los cuatro tiempos analizados, el T3 y el T7 (tabla 4.61). En el T3 la velocidad mostrada por los espermatozoides en los tres parámetros de medida (VCL, VSL y VAP), y la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) reflejan correlaciones positivas de en torno a un 0,35 con la congelabilidad, destacando la VSL que resulta ser, además, la única que muestra un índice de correlación significativo con la resistencia del acrosoma. Por su parte, en el T7 la BCF, con una correlación con la congelabilidad de 0,38, es el único parámetro relacionado significativamente ( $p < 0,05$ ) con alguno de los índices postdescongelación calculados.

CAFÉINA PRUEBA		CONGELABILIDAD	RESIST. ACROSOMA A LA CONGEL.
NO	T3	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	,337
		VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	,345
		VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	,329
		ALH ( $\mu\text{m}$ )	,354
	T7	BCF (Hz)	,379

**Tabla 4.61:** Coeficientes de correlación estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) entre los valores de los diferentes parámetros cinéticos en la prueba de la termorresistencia y los índices calculados postdescongelación.

Tras establecer las correlaciones existentes, se efectúa el análisis multivariante de regresión para la congelabilidad de los eyaculados, empleando los valores de los diferentes parámetros en cada uno de los tiempos analizados, tanto en presencia como en ausencia de cafeína. Los resultados se muestran en las tablas 4.62, 4.63 y 4.64.

PRUEBA	CAFÉINA	Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		t	Sig.
			B	Error típ.	Beta			
T1,5	NO	1	(Constante)	-2,650	22,396		-1,118	,906
			BCF (Hz)	8,859	3,019	,430	2,934	,006
	SI	2	(Constante)	93,614	48,731		1,921	,062
			BCF (Hz)	15,973	3,426	,684	4,663	,000
			WOB (%)	-1,697	,646	-,386	-2,627	,012
NO CAF.	n=40	r=0.430	r <sup>2</sup> =0.185	r <sup>2</sup> correg.=0,163		Anova: F=8,610		p<0,01
CAF.	n=40	r=0.611	r <sup>2</sup> =0.373	r <sup>2</sup> correg.=0,339		Anova: F=11,013		p<0,01

**Tabla 4.62:** Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con los valores de los parámetros cinéticos en el T1,5.

PRUEBA	CAFEÍNA	Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		t	Sig.
			B	Error típ.	Beta			
T3	NO	2	(Constante)	129,767	52,623		2,466	,018
			BCF (Hz)	12,254	3,959	,473	3,095	,004
			WOB (%)	-1,890	,674	-,428	-2,804	,008
	SI	1	(Constante)	-4,641	24,596		-,189	,851
BCF (Hz)			9,531	3,464	,408	2,752	,009	
NO CAF.	n=40	r=0.506	r <sup>2</sup> =0.256	r <sup>2</sup> correg.=0,216	Anova:	F=6,374	p<0,01	
CAF.	n=40	r=0.408	r <sup>2</sup> =0.166	r <sup>2</sup> correg.=0,144	Anova:	F=6,572	p<0,01	

Tabla 4.63: Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con los valores de los parámetros cinéticos en el T3.

PRUEBA	CAFEÍNA	Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		t	Sig.
			B	Error típ.	Beta			
T7	SI	2	(Constante)	58,659	33,169		1,768	,085
			BCF (Hz)	9,490	3,528	,398	2,690	,011
			LIN (%)	-,893	,367	-,360	-2,429	,020
n=40	r=0.476	r <sup>2</sup> =0.226	r <sup>2</sup> correg.=0,185	Anova:	F=5,412	p<0,01		

Tabla 4.64: Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con los valores de los parámetros cinéticos en el T7.

No se pueden realizar modelos estadísticamente aceptables para la prueba del T4,5, ni con cafeína ni sin ella, al igual que sucede en el T7 sin cafeína. En todos los modelos creados se utiliza la BCF, bien como la única variable introducida en el modelo, como en el T1,5 sin cafeína o el T3 con ella, o bien en combinación con otra, como el WOB en el T1,5 con cafeína o en el T3 sin ella, o con el LIN en el T7 con cafeína. De todos los modelos, el que explica una mayor proporción de la variabilidad de la congelabilidad es el creado para las muestras incubadas con cafeína en el T1,5. Las ecuaciones de regresión generadas a partir de los citados modelos son las siguientes:

$$T1,5 \text{ (sin CAF.): } \textit{Congelabilidad} = -2,650 + 8,859(\textit{BCF})$$

$$T1,5 \text{ (con CAF.): } \textit{Congelabilidad} = 93,614 + 15,973(\textit{BCF}) - 1,697(\textit{WOB})$$

$$T3 \text{ (sin CAF.): } \textit{Congelabilidad} = 129,767 + 12,254(\textit{BCF}) - 1,890(\textit{WOB})$$

$$T3 \text{ (con CAF.): } \textit{Congelabilidad} = -4,641 + 9,531(\textit{BCF})$$

$$T7 \text{ (con CAF.): } \textit{Congelabilidad} = 58,695 + 9,490(\textit{BCF}) - 0,893(\textit{LIN})$$

Mediante los parámetros cinéticos observados en la prueba del choque *a frigore*.

La prueba del choque *a frigore*, al igual que sucedía con las subpoblaciones o con los otros parámetros analizados en el experimento 1, resulta ser mucho más indicativa que la termorresistencia o que la valoración del semen fresco, al mostrar en todos los tiempos en el que se analizaron

las muestras, excepto en el S0 sin cafeína, correlaciones significativas con alguno de los cuatro índices postdescongelación, siendo la VSL en el S2 en las muestras no estimuladas químicamente, el único parámetro con correlaciones significativas con todos ellos y, a su vez, el único que las muestra con la resistencia del acrosoma a la congelación (tabla 4.65).

CAFÉINA	PRUEBA	CONGE LAB.	RESIST. ACROSOMA A LA CONGEL.	RESIST. MOVILIDAD A LA CONGEL.	RESIST. MOVILIDAD (CAFÉINA) A LA CONGEL.	
NO	S1	WOB (%)	-,501		-,418	
		ALH (µm)	,327	,373	,357	
	S2	VCL (µm/s)	,359			
		VSL (µm/s)	,449	,326	,338	,332
		VAP (µm/s)			,314	
		WOB (%)	-,314			
		ALH (µm)	,412			
	SI	S3	VCL (µm/s)		,398	
			LIN (%)	-,437		
		S5	STR (%)	-,336		
WOB (%)			-,414			-,379
ALH (µm)			,343		,455	,359
VCL (µm/s)					,316	
S0		LIN (%)	-,463			-,398
		WOB (%)	-,479			-,422
SI		S1	ALH (µm)		,353	
			BCF (Hz)	-,400		
	S2	VSL (µm/s)	,519		,525	,589
		LIN (%)	,362		,399	,566
		STR (%)	,556		,503	,713
		VSL (µm/s)				,332
	S3	ALH (µm)	,380			,414
		BCF (Hz)			,422	,395
		VSL (µm/s)			,365	,326
	S5	STR (%)			,348	
VCL (µm/s)				,316		
VSL (µm/s)				,330		
WOB (%)		-,320			-,317	
ALH (µm)				,339		

**Tabla 4.65:** Coeficientes de correlación estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) entre los valores de los diferentes parámetros cinéticos en la prueba del choque a frigore y los índices calculados postdescongelación.

En las muestras sin cafeína, el WOB es el parámetro más correlacionado con la congelabilidad, tanto porque muestra significación estadística en todos los tiempos analizados, excepto en el S0, como porque presenta el valor más alto de todos, con un 0,50 en el S1, siendo todas las correlaciones negativas, como también lo son las de las otras dos ratios de velocidad analizadas (el LIN y el STR).

Las mejores correlaciones encontradas con la resistencia de la movilidad al proceso de congelación/descongelación, con y sin cafeína, se observan en la ALH, que tanto en el S1 como en el S3 y el S5, presenta significación estadística en ambos casos, así como el valor más elevado de todos en el S3.

En las muestras incubadas con cafeína los índices de correlación por regla general se elevan, llegando hasta un 0,71 de correlación entre el STR con la resistencia de la movilidad a la criopreservación analizada con cafeína. Con respecto al índice de congelabilidad, las valoraciones realizadas tras el choque efectuado a la hora de incubación a 20 °C resultan las más correlacionadas, presentando valores de 0,52 y de 0,56 con la VSL y el STR, respectivamente. En el S1 estos mismos parámetros son los que presentan las correlaciones más altas con los índices de resistencia de la movilidad a la congelación sin cafeína. Por su parte, la resistencia del acrosoma a la criopreservación no se ve correlacionada significativamente con ninguno de los ocho parámetros analizados en las muestras con cafeína.

Una vez observadas las correlaciones existentes, procedemos a realizar el análisis multivariante de regresión para la congelabilidad de un eyaculado, utilizando para ello los valores mostrados por cada parámetro, tanto en presencia como en ausencia de cafeína, después de cada uno de los choques *a frigore*. Los resultados aparecen reflejados en las tablas 4.66, 4.67, 4.68 y 4.69.

No es posible realizar modelos estadísticamente aceptables para la prueba del S0, ni con cafeína ni sin ella, y tampoco para el S3 con cafeína. En las muestras sin cafeína, estos modelos reflejan correlaciones de 0,50 y de 0,57 en el S1 y en el S2, respectivamente, si bien, el porcentaje de la varianza del índice de congelabilidad que es explicado por los parámetros en estas dos pruebas es notablemente inferior, con valores respectivos de un 23,1 y un 29,2%. Los modelos generados a partir de los valores observados en las pruebas realizadas con posterioridad a las 2 horas de incubación a 20 °C de las muestras (S3 y S5), al contrario de lo que sucedía con los parámetros estudiados en el experimento 1, reflejan índices de regresión más bajos (del 17,0 y del 20,9%, respectivamente).

PRUEBA	CAFEÍNA	Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		t	Sig.
			B	Error típ.	Beta			
S1	NO	1	(Constante)	147,360	23,768		6,200	,000
			WOB (%)	-1,274	,357	-,501	-3,565	,001
	SI	2	(Constante)	-5,236	11,781		-,444	,659
			STR (%)	2,177	,407	1,740	5,343	,000
			LIN (%)	-1,720	,443	-1,265	-3,886	,000
NO CAF.	n=40	r=0.501	r <sup>2</sup> =0.251	r <sup>2</sup> correg.=0,231	Anova:	F=12,707	p<0,01	
CAF.	n=40	r=0.714	r <sup>2</sup> =0.510	r <sup>2</sup> correg.=0,483	Anova:	F=19,224	p<0,01	

Tabla 4.66: Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con los valores de los parámetros cinéticos en el S1.

PRUEBA	CAFEÍNA	Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		Sig.	
			B	Error típ.	Beta	t		
S2	NO	2	(Constante)	81,109	22,550		3,597	,001
			WOB (%)	-,824	,311	-,358	-2,645	,012
			VSL (µm/s)	,741	,208	,481	3,555	,001
	SI	3	(Constante)	-48,177	34,023		-1,416	,165
			STR (%)	1,078	,375	,393	2,872	,007
			ALH (µm)	17,056	4,273	1,042	3,991	,000
			VCL (µm/s)	-,370	,156	-,619	-2,373	,023
NO CAF.	n=40	r=0.573	r <sup>2</sup> =0.328	r <sup>2</sup> correg.=0,292	Anova:	F=9,039	p<0,01	
CAF.	n=40	r=0.630	r <sup>2</sup> =0.397	r <sup>2</sup> correg.=0,347	Anova:	F=7,913	p<0,01	

Tabla 4.67: Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con los valores de los parámetros cinéticos en el S2.

PRUEBA	CAFEÍNA	Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		Sig.	
			B	Error típ.	Beta	t		
S3	NO	1	(Constante)	99,468	12,359		8,048	,000
			LIN (%)	-,693	,231	-,437	-2,994	,005
	n=40	r=0.437	r <sup>2</sup> =0.191	r <sup>2</sup> correg.=0,170	Anova:	F=8,961	p<0,01	

Tabla 4.68: Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con los valores de los parámetros cinéticos en el S3.

PRUEBA	CAFEÍNA	Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		Sig.	
			B	Error típ.	Beta	t		
S5	NO	1	(Constante)	122,465	17,795		6,882	,000
			WOB (%)	-,889	,264	-,479	-3,366	,002
	SI	1	(Constante)	118,539	26,764		4,429	,000
			WOB (%)	-,754	,362	-,320	-2,086	,044
NO CAF.	n=40	r=0.479	r <sup>2</sup> =0.230	r <sup>2</sup> correg.=0,209	Anova:	F=11,328	p<0,01	
CAF.	n=40	r=0.320	r <sup>2</sup> =0.103	r <sup>2</sup> correg.=0,079	Anova:	F=4,350	p<0,05	

Tabla 4.69: Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con los valores de los parámetros cinéticos en el S5.

Los modelos obtenidos del análisis multivariante de regresión para las muestras a las que se le añade cafeína, explican un mayor porcentaje de la varianza en el S1 y el S2, siendo de un 48,3 % para el primero y de un 34,7 % para el segundo. Sin embargo, el modelo establecido en el S5 explica sólo un 7,9 %, que es notablemente inferior al 20,9 % que se obtenía tras ese choque en las muestras sin cafeína.

Las ecuaciones de regresión generadas para las muestras sin cafeína son las siguientes:

$$S1: \text{Congelabilidad} = 147,360 - 1,274(WOB)$$

$$S2: \text{Congelabilidad} = 81,109 - 0,824(WOB) + 0,741(VSL)$$

$$S3: \text{Congelabilidad} = 99,468 - 0,693(LIN)$$

$$S5: \text{Congelabilidad} = 122,465 - 0,889(WOB)$$

Las ecuaciones de regresión generadas a partir de las muestras con cafeína son las siguientes:

$$S1: \text{Congelabilidad} = -5,236 + 2,177(STR) - 1,720(LIN)$$

$$S2: \text{Congelabilidad} = -48,177 + 1,078(WOB) + 17,056(ALH) - 0,370(VCL)$$

$$S5: \text{Congelabilidad} = 118,539 - 0,754(WOB)$$

### 4.3.2. Estudio de subpoblaciones a partir de los parámetros cinéticos de los espermatozoides

#### 4.3.2.1. Determinación de las subpoblaciones cinéticas presentes en un eyaculado.

Siguiendo el proceso descrito en el epígrafe 3.7.2.2, obtenemos, mediante el método de las K-means, el mejor agrupamiento de las células espermáticas al clasificarlas en 40 *bins*. Una vez determinado esto, procedemos a realizar, por medio de los algoritmos propuestos por Ciampi *et al.* (2007), el árbol jerárquico o dendograma (figura 4.46), a partir del cual se representa la altura a la que se encuentran los nodos del mismo (figura 4.47), para posteriormente concluir, basándonos en estos dos gráficos, que el número óptimo de subpoblaciones en que debemos agrupar a los espermatozoides es de 3.

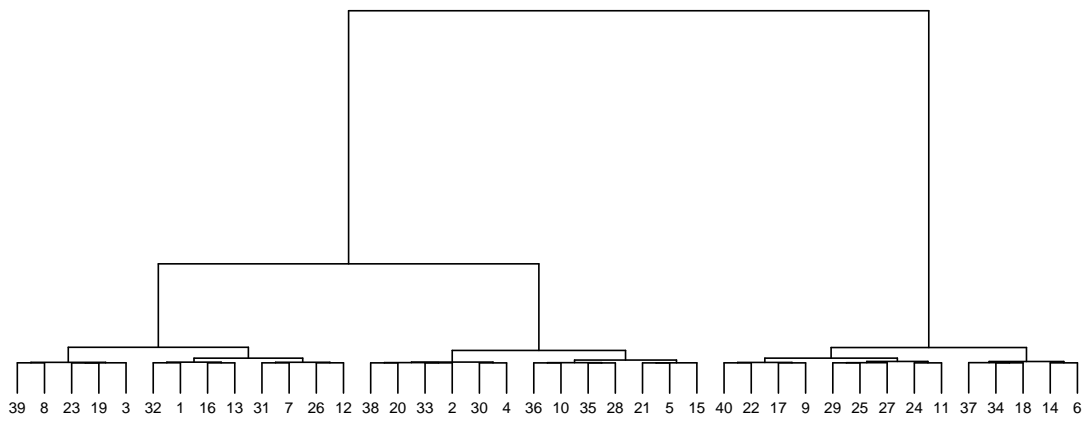
Para comprobar la validez de esta teoría, se procede a calcular el índice de Fowlkes-Mallows, que resulta ser notablemente alto (0,87), y a realizar una representación de las densidades de los datos de partida correspondiente a la proyección del análisis discriminante lineal (LDA), donde se constata la existencia de dos focos principales, que agrupan a la mayor parte de los casos y un tercero más tenue y disperso, que corresponde a la subpoblación con un menor número de integrantes (figura 4.48); en concreto, la subpoblación 1 (SP1) agrupa al 44,23 %, la subpoblación 3 (SP3) al 41,23 % y, finalmente, la subpoblación 2 (SP2) al 14,54 % restante. Por tanto, las células espermáticas de las muestras iniciales se agrupan dentro de las diferentes subpoblaciones de una forma desigual, reuniendo dos de ellas más del 85 % de los espermatozoides.

El valor medio de los ocho parámetros cinéticos en cada una de estas subpoblaciones se encuentra recogido en la tabla 4.70:

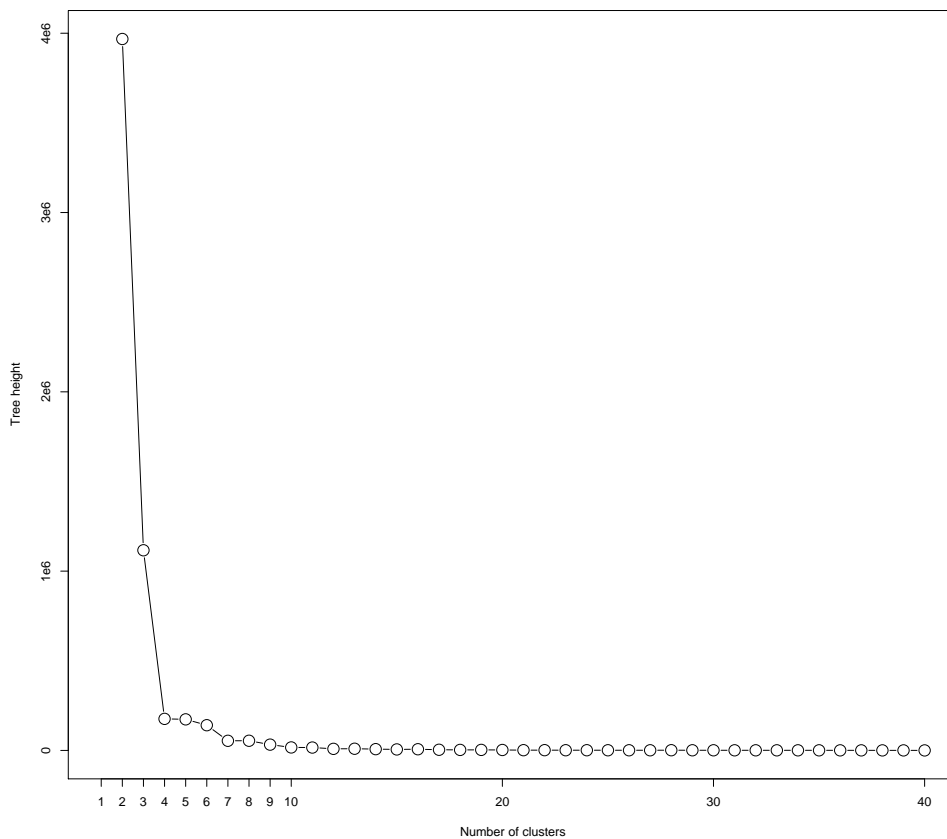
	PARÁMETROS CINÉTICOS							
	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH ( $\mu\text{m}$ )	BCF (Hz)
<b>SUBPOBLACIÓN (SP1)</b>	<b>60,850</b>	<b>49,140</b>	<b>54,489</b>	<b>79,697</b>	<b>89,748</b>	<b>88,602</b>	<b>1,761</b>	<b>7,142</b>
<b>SUBPOBLACIÓN (SP2)</b>	<b>93,854</b>	<b>43,298</b>	<b>78,473</b>	<b>47,061</b>	<b>56,273</b>	<b>83,845</b>	<b>2,914</b>	<b>6,558</b>
<b>SUBPOBLACIÓN (SP3)</b>	<b>27,487</b>	<b>9,646</b>	<b>17,923</b>	<b>35,603</b>	<b>55,711</b>	<b>63,892</b>	<b>1,307</b>	<b>5,962</b>

Tabla 4.70: Promedio de los parámetros cinéticos en cada subpoblación.

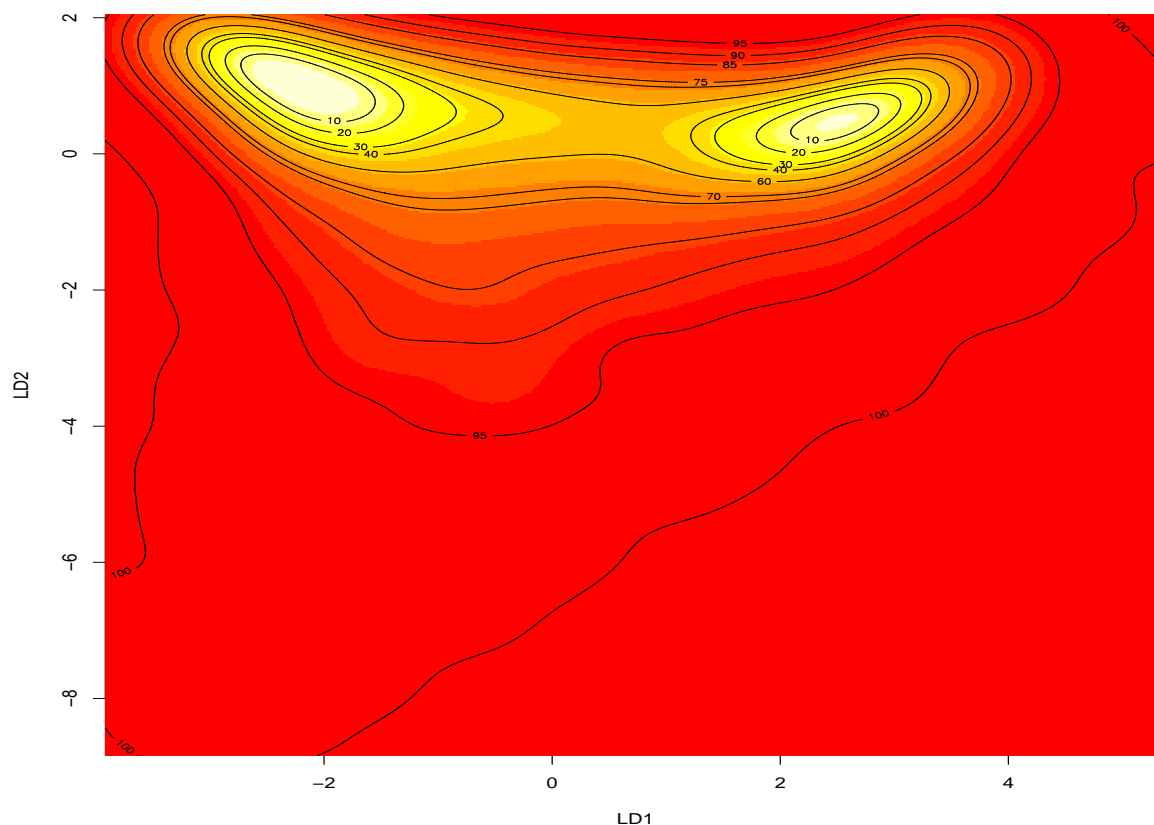




**Figura 4.46:** Dendrograma resultante de la aplicación de los algoritmos de Ciampi et al. (2007) donde se establece el número de subpoblaciones cinéticas. Los números del eje horizontal representan los 40 bins obtenidos inicialmente.



**Figura 4.47:** Altura de los nodos de unión en el árbol jerárquico aglomerativo.



**Figura 4.48:** *Distribución de densidades de los datos cinéticos tras su proyección.*

#### 4.3.2.2. Respuesta y evolución de las subpoblaciones cinéticas en las diferentes pruebas.

##### **Respuesta de las subpoblaciones cinéticas al proceso de criopreservación.**

El análisis realizado sobre el porcentaje de espermatozoides calculado para cada subpoblación, una vez realizada la descongelación (tabla 4.71) evidencia un espectacular incremento ( $p < 0,01$ ), con respecto a los valores del T0, en el tamaño de la SP1, en detrimento de la SP3, que reduce su promedio de forma notable ( $p < 0,01$ ). Por su parte, la SP2 permanece constante tras el proceso de criopreservación, mostrando un porcentaje medio estadísticamente no significativo ( $p > 0,05$ ) respecto al observado en el semen fresco.

La adición de cafeína provoca, en las muestras de semen fresco, variaciones evidentes en el tamaño de las diferentes subpoblaciones ( $p < 0,05$ ); así, la SP2 y la SP3 experimentan una reducción a favor de la SP1, llegando ésta a albergar al 57,25 % de los espermatozoides tras la estimulación química. Por su parte, en las muestras descongeladas la adición de cafeína produce cambios similares a los observados tras la criopreservación de las muestras, ya que se incrementa el porcentaje de la SP1 ( $p < 0,05$ ), se reduce el de la SP3 ( $p < 0,05$ ) y se mantiene el de la SP2, si bien, y a diferencia de lo que sucede en el proceso de congelación/descongelación, la tendencia es a que en esta última subpoblación, se reduzcan los valores en lugar de aumentar.

		RESPUESTA AL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN					
		SUBPOBLACIONES					
		SP1		SP2		SP3	
		Media	Desviación típica	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica
PRUEBA	T0	44,23 <sup>a</sup>	7,68	14,54 <sup>a</sup>	6,52	41,23 <sup>a</sup>	8,42
	Descongelado	64,34 <sup>b</sup>	9,63	18,15 <sup>a</sup>	8,17	17,52 <sup>b</sup>	7,24
	T0 (CAF)	57,25 <sup>a,*</sup>	7,14	8,84 <sup>a,*</sup>	4,44	33,92 <sup>a,*</sup>	8,65
	Descongelado (CAF)	78,28 <sup>b,*</sup>	8,44	15,02 <sup>a</sup>	9,12	6,71 <sup>b,*</sup>	2,87

**Tabla 4.71:** Variación de la distribución de las subpoblaciones cinéticas tras el proceso de criopreservación.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre T0 y Descongelado, tanto en las muestras con cafeína como en aquellas sin ella. La presencia de \* revela diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre muestras con y sin cafeína.

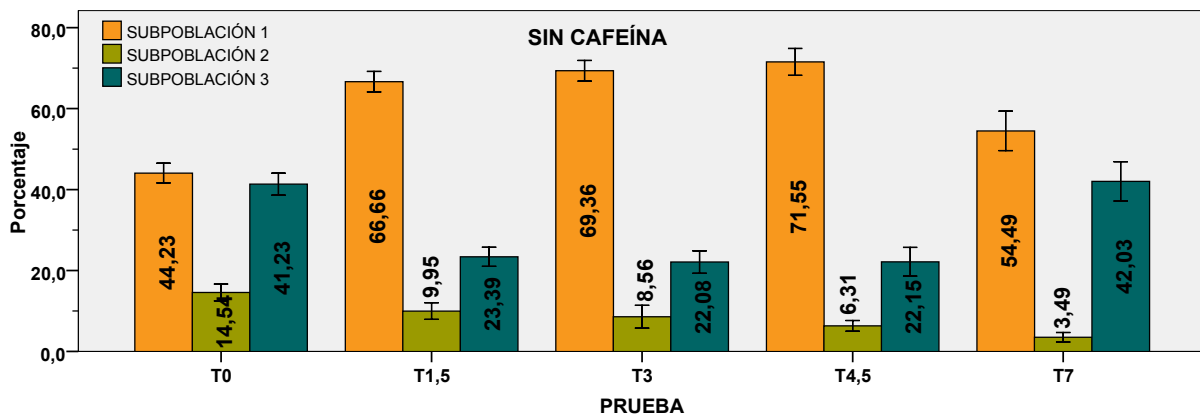
En la tabla 9.23 de los anexos, que recoge la comparación del tamaño de las subpoblaciones espermáticas entre las dos razas analizadas, tanto en presencia como en ausencia de cafeína, se observa que en ninguna de las muestras analizadas en el T0 aparecen diferencias entre ambas razas, que sí surgen, en cambio, tras la descongelación ( $p < 0,05$ ), en la SP1 y la SP3 en las incubaciones sin cafeína y en la SP2 en las incubadas con cafeína.

Cuando se realiza la comparación de los resultados obtenidos para los ocho verracos utilizados en este experimento, se reflejan diferencias ( $p < 0,05$ ) entre algunos de los promedios de las diferentes subpoblaciones; en particular, para las muestras con cafeína (tabla 9.24 de los anexos), se detectan diferencias entre animales en la SP2 y en la SP3 en el T0 y en la SP1 y en la SP2 tras la descongelación, y en las muestras sin cafeína (tabla 9.25 de los anexos) estas diferencias únicamente surgen en las muestras descongeladas para las tres subpoblaciones.

### Respuesta y evolución de las subpoblaciones cinéticas durante la prueba de la termoresistencia.

El porcentaje de espermatozoides asignado a cada subpoblación, tanto para las muestras incubadas en ausencia como en presencia de cafeína, en los diferentes momentos de toma de muestras, aparece especificado en las figuras 4.49 y 4.50.

Como puede apreciarse en la primera, en las tres subpoblaciones se produce una variación cuando se realiza la incubación a 39 °C, observándose, ya a la hora y media, un aumento ( $p < 0,05$ ) de la SP1 y un descenso de las otras dos subpoblaciones (SP2 y SP3). A partir de entonces, en la SP3 no se aprecian diferencias hasta las 7 horas, cuando se produce un incremento importante en su tamaño, alcanzando valores similares a los que presenta en el eyaculado recién extraído. En la SP1, por el contrario, se va produciendo un ligero incremento, de forma gradual, a lo largo de la incubación, para experimentar una reducción significativa ( $p < 0,05$ ) en sus valores en el T7. La SP2, por su parte, presenta un descenso progresivo a lo largo de toda la incubación.



		SIN CAFEÍNA					
		SUBPOBLACIONES					
		SP1		SP2		SP3	
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
PRUEBA	T0	44,23 <sup>a</sup>	7,68	14,54 <sup>a</sup>	6,52	41,23 <sup>a</sup>	8,42
	T1,5	66,67 <sup>b</sup>	7,93	9,96 <sup>b</sup>	6,47	23,39 <sup>b</sup>	7,36
	T3	69,36 <sup>bc</sup>	8,04	8,56 <sup>b</sup>	8,83	22,08 <sup>b</sup>	8,66
	T4,5	71,55 <sup>bc</sup>	10,36	6,31 <sup>bc</sup>	4,11	22,15 <sup>b</sup>	11,12
	T7	54,49 <sup>d</sup>	15,22	3,49 <sup>c</sup>	3,70	42,03 <sup>a</sup>	15,14

**Figura 4.49:** Distribución de las tres subpoblaciones, en ausencia de cafeína, durante la prueba de la termorresistencia.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre pruebas.

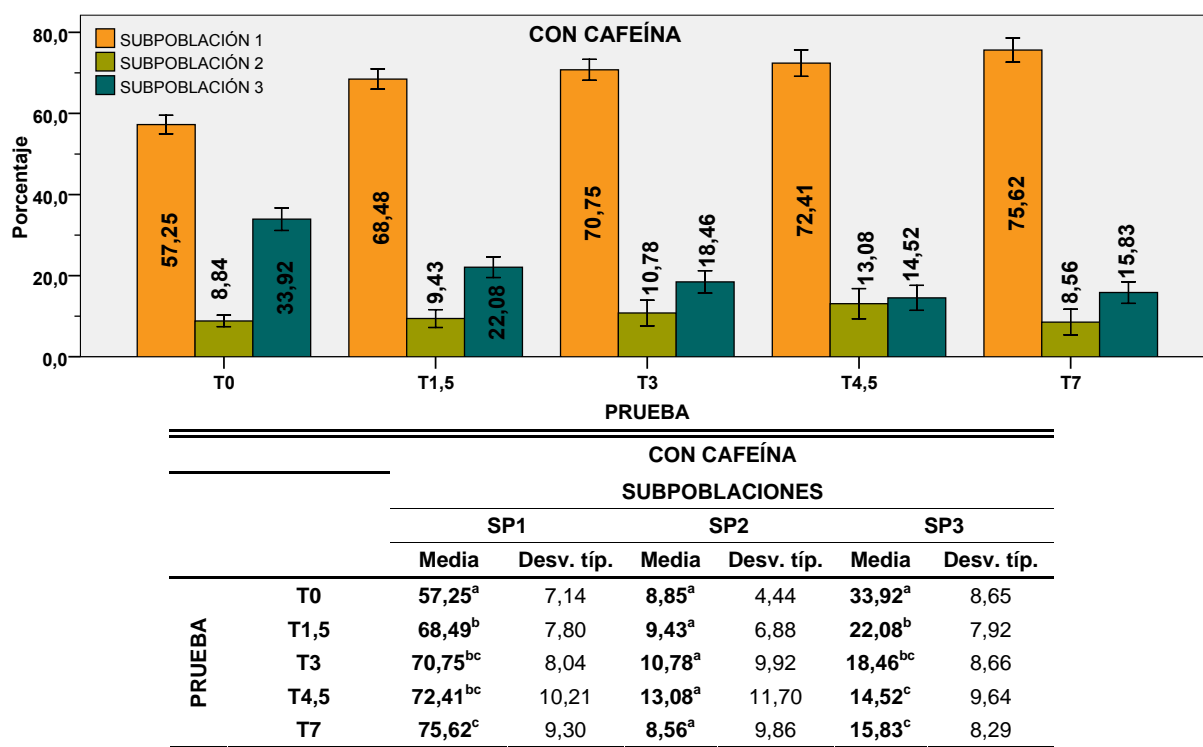
Al incubar las muestras seminales en un medio enriquecido con cafeína (figura 4.50), no se aprecia una variación tan brusca como la observada al principio de la incubación en aquellas muestras sin estimulación química, de forma que dos de las tres subpoblaciones van mostrando, desde la etapa inicial y durante toda la incubación, cambios suaves y progresivos; en concreto, en la SP1 se observa un incremento continuo durante toda la incubación, mientras que en la SP3 se produce un descenso progresivo ( $p < 0,05$ ), llegando a estabilizarse en las dos últimas tomas de muestras (T4,5 y T7). Por último, en la SP2 los valores permanecen constantes, sin observarse diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ninguno de los distintos tiempos analizados.

En cuanto a las variaciones en el tamaño de las diferentes subpoblaciones en función de la adición o no de cafeína al medio, no se muestran diferencias en ninguna de ellas en el T1,5 ni en el T3, sólo se detectan en la SP2 y en la SP3 tras las 4,5 horas de incubación a 39 °C y se observan en todas ellas ( $p < 0,01$ ) tras las 7 horas (tabla 9.26 de los anexos).

En la tabla 9.23 de los anexos, donde se recoge la comparación del tamaño de las subpoblaciones espermáticas entre las dos razas analizadas a lo largo de toda la prueba de la termorresistencia, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre ambas razas en ausencia de cafeína, en ninguna de las tomas de muestras realizadas. Sin embargo, tras la incubación con cafeína, sí se observa una mayor variabilidad en función de la raza, sobre todo en la SP3, donde la raza Large White muestra valores inferiores ( $p < 0,05$ ) en todos los tiempos dentro de la incubación, y

en la SP2, donde esta misma raza presenta promedios superiores ( $p < 0,05$ ) en el T1,5 y en el T4,5.

La administración de cafeína produce diferencias ( $p < 0,05$ ) entre los diferentes verracos en todas las subpoblaciones y en todos los tiempos de la incubación analizados (tabla 9.24 de los anexos). Sin su presencia, en cambio, el tamaño de las subpoblaciones resulta más homogéneo entre los diferentes animales, reduciéndose las diferencias entre ellos ( $p < 0,05$ ) a la SP1 y SP3 en el T1,5, a la SP2 y SP3 en el T3, a la SP3 en el T4,5 y a la SP1 y SP2 tras la siete horas de incubación (tabla 9.25 de los anexos).



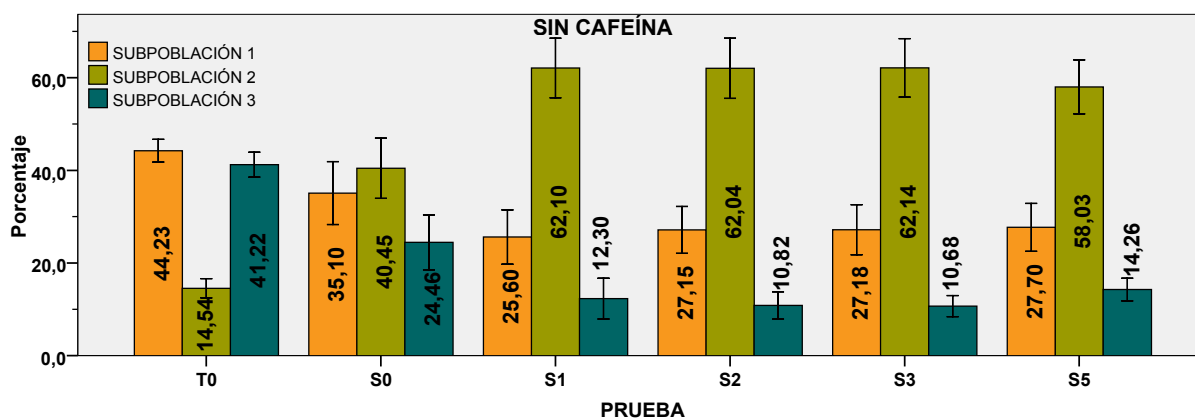
**Figura 4.50:** Distribución de las tres subpoblaciones, en presencia de cafeína, durante la prueba de la termoresistencia.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre pruebas.

### Respuesta y evolución de las subpoblaciones cinéticas en la prueba del choque *a frigore*.

El porcentaje de espermatozoides asignado a cada subpoblación cinética tras la realización de cada uno de los choques *a frigore*, así como el de referencia en el eyaculado recién extraído, tanto sin cafeína en el medio de incubación como con ella, se reflejan en las figuras 4.51 y 4.52.

En aquellas muestras incubadas sin el estimulante (figura 4.51), los porcentajes de las diferentes subpoblaciones experimentan cambios ostensibles ( $p < 0,05$ ) con respecto a los valores iniciales en el eyaculado, tras la realización de casi todos los choques. A partir de la hora de incubación a 20 °C, el tamaño de las diferentes subpoblaciones permanece estable ( $p > 0,05$ ) entre los diferentes tiempos en los que se realiza la toma de muestras posterior a cada choque.



		SIN CAFEÍNA					
		SUBPOBLACIONES					
		SP1		SP2		SP3	
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
PRUEBA	T0	44,23 <sup>a</sup>	7,68	14,54 <sup>a</sup>	6,52	41,23 <sup>a</sup>	8,42
	S0	35,10 <sup>ab</sup>	21,26	40,45 <sup>b</sup>	20,29	24,46 <sup>b</sup>	18,59
	S1	25,60 <sup>b</sup>	18,34	62,11 <sup>c</sup>	20,08	12,30 <sup>c</sup>	13,79
	S2	27,15 <sup>b</sup>	15,77	62,05 <sup>c</sup>	20,32	10,82 <sup>c</sup>	9,23
	S3	27,18 <sup>b</sup>	16,92	62,14 <sup>c</sup>	19,75	10,68 <sup>c</sup>	7,16
	S5	27,71 <sup>b</sup>	16,18	58,03 <sup>c</sup>	18,24	14,27 <sup>c</sup>	7,65

Figura 4.51: Distribución de las tres subpoblaciones, en ausencia de cafeína, durante la prueba del choque a frigore.

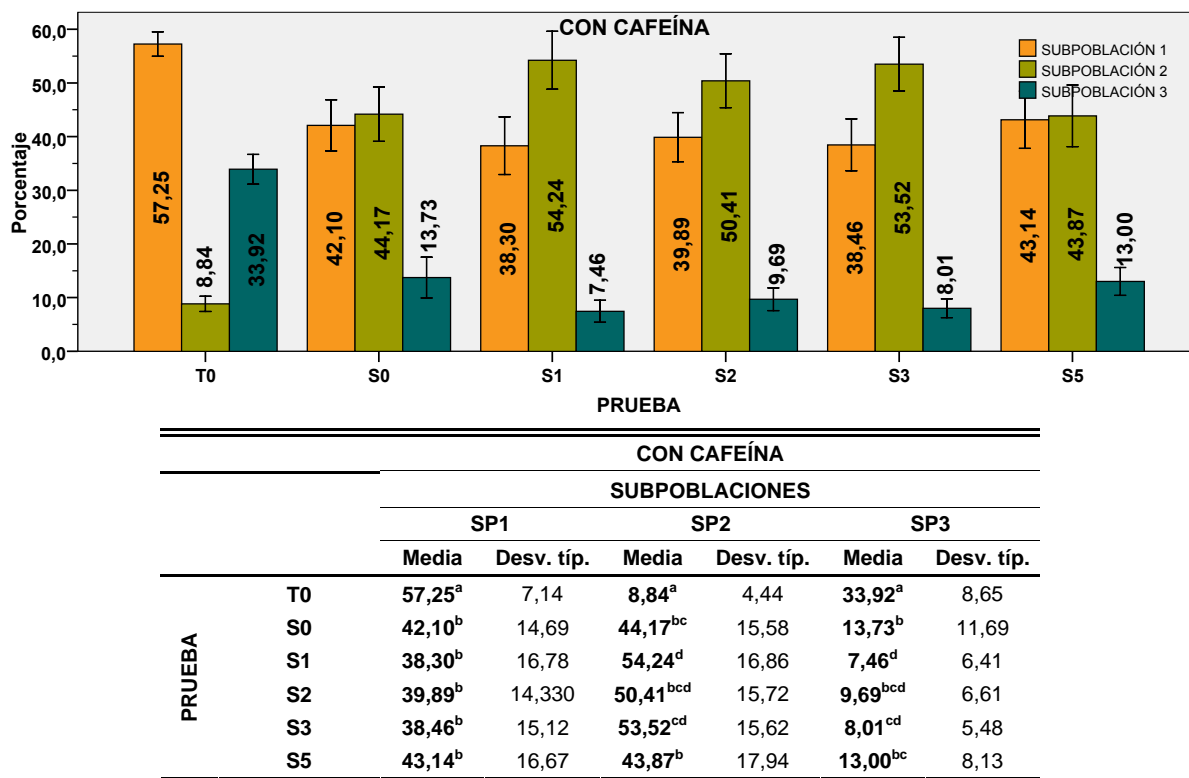
Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre pruebas.

Los cambios apreciados en la distribución de las diferentes subpoblaciones espermáticas tras la realización de un descenso brusco de la temperatura, se pueden resumir en un aumento importante del tamaño de la SP2 y una reducción clara de los valores medios de la SP1 y más aún de la SP3, siendo todas estas variaciones más patentes a partir de la hora de estabilización a 20 °C.

Al incubar las muestras con cafeína (figura 4.52) se observan unos resultados similares a los obtenidos sin ella, con una reducción de la SP1 y de la SP3 y con un incremento de la SP2.

En la tabla 9.27 de los anexos aparecen reflejadas las diferencias en el tamaño subpoblacional en función de la administración o no de cafeína, observándose, para las muestras estimuladas, un aumento de la SP1 ( $p < 0,05$ ) en todos los choques realizados excepto en el inicial, una reducción en la SP2 ( $p < 0,05$ ) tras el choque realizado a las 2, 3 y 5 horas de incubación y una reducción clara de la SP3 ( $p < 0,05$ ) en el S0 y en el S1.

En la tabla 9.28 de los anexos se refleja el tamaño de las subpoblaciones espermáticas en las dos razas analizadas, tanto en presencia como en ausencia de cafeína, en los diferentes puntos de toma de muestras. No se observan diferencias ( $p > 0,05$ ) entre ambas razas tras ninguno de los choques a frigore en aquellas muestras incubadas sin la citada sustancia, apareciendo éstas ( $p < 0,05$ ), con la estimulación química de la cafeína, únicamente en la SP1 y en la SP2 tras el S2.



**Figura 4.52:** Distribución de las tres subpoblaciones, en presencia de cafeína, durante la prueba del choque a frigore.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre pruebas.

Al realizar la comparación de los resultados obtenidos sin cafeína para los diferentes animales (tabla 9.29 de los anexos), se constata que las diferencias ( $p < 0,05$ ) entre verracos aparecen, para la SP2, a la hora de incubación y a partir de entonces en todas las tomas de muestras; para la SP1 ( $p < 0,05$ ) tras el S2, el S3 y el S5 y, finalmente, en la SP3 las diferencias ( $p < 0,05$ ) surgen en el S2 y en el S3. Con la administración de cafeína (tabla 9.30 de los anexos) la SP1 manifiesta diferencias entre verracos ( $p < 0,05$ ) en todos los choques realizados; en la SP2 éstas se detectan en todos ellos a excepción del S0, mientras que en la SP3 los valores obtenidos para cada animal son similares ( $p > 0,05$ ) a partir del S1.

#### 4.3.2.3. Respuesta de las subpoblaciones espermáticas en función de la aptitud para la congelación de los diferentes eyaculados.

##### Distribución de las subpoblaciones cinéticas en el T0 en función de la aptitud para la congelación de los eyaculados.

Como aparece reflejado en las tablas 4.72 y 4.73, la distribución de las diferentes subpoblaciones no se ve afectada al tener en cuenta la aptitud para la congelación. Así, aunque en las muestras sin cafeína se aprecia una ligera tendencia a que los malos congeladores presenten valores más bajos para la SP1 y más altos para la SP3, no se encuentran evidencias estadísticas al respecto. Al realizar el análisis de las muestras con cafeína, las diferencias entre los valores medios de los tres grupos se reducen aún más, no siendo, en ningún caso, estadísticamente significativas.

### Respuesta de las subpoblaciones espermáticas en la termorresistencia en función de la aptitud para la congelación de los eyaculados.

Los resultados del porcentaje de espermatozoides pertenecientes a cada uno de los grupos de calidad establecidos, en cada uno de los tiempos de la termorresistencia en los que se analizaron las muestras, aparecen recogidos en la tabla 4.72.

Cuando las muestras se incuban con estimulación química, no se observan diferencias ( $p > 0,05$ ) en el tamaño de las distintas subpoblaciones entre los diferentes grupos de calidad, en ninguno de los puntos de referencia establecidos. En las muestras sin cafeína únicamente aparecen ( $p < 0,05$ ) en la SP3 tras mantenerlas durante una hora y media a 39 °C.

		SIN CAFEÍNA						CON CAFEÍNA						
		GRUPO BC		GRUPO CM		GRUPO MC		GRUPO BC		GRUPO CM		GRUPO MC		
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	
PRUEBA	T0	SP1	46,34	10,60	44,81	6,68	40,80	7,27	59,11	9,41	56,47	7,33	57,72	5,06
		SP2	14,09	4,08	14,44	7,24	15,19	6,52	7,79	3,75	8,68	4,54	9,94	4,83
		SP3	39,59	12,19	40,72	8,74	44,03	4,26	33,11	10,85	34,86	9,27	32,34	5,47
	T1,5	SP1	65,61	7,53	68,77	8,12	62,56	6,55	67,79	8,44	69,72	8,17	66,13	6,52
		SP2	9,94	5,05	10,25	7,00	9,28	6,40	8,23	5,83	8,92	8,07	11,45	4,13
		SP3	24,46 <sup>a</sup>	7,86	20,98 <sup>a</sup>	6,99	28,17 <sup>b</sup>	5,72	23,99	6,57	21,36	9,09	22,41	6,05
	T3	SP1	68,56	6,76	69,43	8,78	69,76	7,76	70,11	5,96	70,53	9,76	71,69	4,73
		SP2	8,19	3,47	9,15	11,32	7,45	3,73	7,00	5,72	13,49	11,87	7,20	3,99
		SP3	23,26	6,65	21,42	9,54	22,79	8,38	22,89	6,69	15,97	10,02	21,08	3,28
T4,5	SP1	72,51	6,49	70,27	11,81	73,84	9,25	72,27	8,23	71,37	12,15	74,89	5,98	
	SP2	7,07	4,91	6,37	4,61	5,64	2,03	8,81	4,29	15,20	14,33	11,18	7,06	
	SP3	20,41	8,43	23,38	12,59	20,51	9,59	18,94	9,85	13,42	10,91	13,95	5,29	
T7	SP1	60,04	10,67	51,86	17,57	56,66	11,26	75,57	4,62	74,03	11,02	79,33	6,47	
	SP2	2,54	3,04	3,68	4,03	3,69	3,55	4,13	1,58	11,45	12,17	5,00	2,67	
	SP3	37,43	11,87	44,46	16,89	39,66	12,82	20,31	4,20	14,53	9,68	15,67	6,09	

**Tabla 4.72:** Distribución de cada subpoblación para cada grupo de calidad, establecido en función de su aptitud para la congelación en el T0 y durante la prueba de la termorresistencia. Distintos superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos de calidad.

### Respuesta de las subpoblaciones espermáticas tras un choque a frigore en función de la aptitud para la congelación de los eyaculados.

Los porcentajes de espermatozoides pertenecientes a cada uno de los grupos de calidad establecidos, obtenidos tras cada uno de los choques que se realizan a las muestras seminales aparecen recogidos en la tabla 4.73, tanto en el supuesto de incubación con cafeína como sin ella. Cuando las muestras se incuban sin estimulación química, se observan diferencias ( $p < 0,05$ ) en el tamaño de la SP1 entre los diferentes grupos de calidad, en las valoraciones realizadas tras el S1, el S3 y el S5, y en el tamaño de la SP2 en las realizadas después del S1 y el S5, permaneciendo la SP3 con valores similares en los tres grupos de calidad en todos los choques.

Cuando las muestras se incuban con cafeína no se observan diferencias ( $p > 0,05$ ) en el tamaño de las distintas subpoblaciones entre los grupos de calidad en ninguno de los análisis efectuados tras la realización de los diferentes choques.



	SIN CAFEÍNA						CON CAFEÍNA						
	GRUPO BC		GRUPO CM		GRUPO MC		GRUPO BC		GRUPO CM		GRUPO MC		
	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	
T0	SP1	46,34	10,60	45,08	6,68	40,80	7,27	59,11	9,41	56,47	7,33	57,72	5,06
	SP2	14,09	4,08	14,40	7,29	15,19	6,52	7,79	3,75	8,68	4,54	9,94	4,83
	SP3	39,59	12,19	40,50	8,53	44,03	4,26	33,11	10,85	34,86	9,27	32,34	5,47
S0	SP1	29,33	17,82	31,36	22,17	47,73	17,51	44,44	9,99	40,15	16,56	44,77	13,53
	SP2	40,50	13,79	44,88	19,68	30,23	23,33	45,46	9,43	46,19	15,91	38,84	18,22
	SP3	30,17	11,96	23,76	21,44	22,07	15,68	10,09	7,38	13,68	11,95	16,40	13,77
S1	SP1	20,96 <sup>a</sup>	10,85	20,45 <sup>a</sup>	12,34	40,69 <sup>b</sup>	25,88	36,47	15,23	40,47	14,44	34,60	22,93
	SP2	68,01 <sup>a</sup>	14,73	68,18 <sup>a</sup>	17,66	43,99 <sup>b</sup>	18,82	54,74	16,18	51,22	13,57	60,82	23,12
	SP3	11,03	6,84	11,37	14,98	15,34	15,18	8,79	3,59	8,31	6,80	4,56	6,59
S2	SP1	29,26	8,89	23,31	16,48	34,50	16,12	35,07	8,59	40,10	16,18	42,78	13,18
	SP2	60,97	12,30	66,89	20,71	51,65	21,42	55,00	10,10	50,13	18,38	47,85	12,39
	SP3	9,80	5,87	9,80	9,02	13,87	11,55	9,93	4,02	9,76	6,46	9,36	8,73
S3	SP1	28,86 <sup>ab</sup>	12,95	20,80 <sup>a</sup>	15,65	40,66 <sup>b</sup>	14,93	43,30	11,23	35,04	15,18	42,94	16,51
	SP2	60,51	17,03	67,67	18,87	50,53	19,91	47,93	13,69	56,39	15,72	50,81	16,58
	SP3	10,61	6,98	11,52	7,18	8,80	7,61	8,76	4,23	8,56	6,00	6,24	5,05
S5	SP1	31,57 <sup>ab</sup>	9,46	20,45 <sup>a</sup>	14,61	41,68 <sup>b</sup>	13,78	41,54	9,95	40,87	19,71	49,48	11,32
	SP2	51,50 <sup>ab</sup>	13,16	65,50 <sup>a</sup>	18,78	45,42 <sup>b</sup>	10,52	44,14	16,12	47,69	18,82	34,89	15,11
	SP3	16,96	4,69	14,04	8,50	12,90	7,38	14,31	10,73	11,46	5,99	15,64	10,33

**Tabla 4.73:** Distribución de cada subpoblación para cada grupo de calidad, establecido en función de su aptitud para la congelación en el T0 y durante la prueba del choque a frigore. Distintos superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos de calidad.

#### 4.3.2.4. Determinación de la congelabilidad de un eyaculado a partir del tamaño de las subpoblaciones cinéticas.

Mediante los parámetros cinéticos del semen fresco.

La realización de los oportunos análisis para el cálculo de correlación entre el tamaño de las distintas subpoblaciones en el T0 y los índices establecidos postdescongelación (congelabilidad, resistencia a la criopreservación del acrosoma y de la movilidad, con y sin adición de cafeína), no arroja ninguna correlación estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en las muestras incubadas con cafeína. Sin embargo, en aquellas otras sin el estimulante de la movilidad se establecen índices de correlación con la congelabilidad de 0,419, para el tamaño de la SP1, y de -0,441 para la SP3 (tabla 4.74).

CAFEÍNA PRUEBA				CONGELABILIDAD
NO	T0	SP1	Coef. Correlación	,419
		SP3	Coef. Correlación	-,441

**Tabla 4.74:** Coeficientes de correlación estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) entre el tamaño de las diferentes subpoblaciones en el T0 y los índices calculados postdescongelación.

Al realizar el análisis multivariante de regresión a partir del tamaño de las diferentes subpoblaciones en el T0, se comprueba que sólo puede establecerse un modelo estadísticamente representativo, aunque sólo explica un 7,8 % de la variabilidad posdescongelado de las muestras,

modelo que se efectúa a partir de la variable SP3 en las aquellas incubadas sin cafeína (tabla 4.75); la fórmula resultante del mismo es la siguiente:

$$T0 \text{ (sin CAF.): } Congelabilidad = 82,093 - 0,467(SP3)$$

PRUEBA	CAFEÍNA	Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		t	Sig.
			B	Error típ.	Beta			
T0	NO	1	(Constante)	82,093	9,487		8,653	,000
			SP3	-,467	,226	-,318	-2,068	,045
n=40	r=0.318	r <sup>2</sup> =0.101	r <sup>2</sup> correg.=0,078	Anova:		F=4,278	p<0,05	

**Tabla 4.75:** Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con el tamaño de las diferentes subpoblaciones espermáticas en el T0.

**Mediante los parámetros cinéticos observados en la prueba de la termorresistencia.**

La evolución de las subpoblaciones en la prueba de la termorresistencia muestra escasas relaciones significativas con los índices posdescongelación; simplemente cabe mencionar la correlación positiva observada en el T7, bajo la influencia de la cafeína, entre la SP2 y la congelabilidad de las muestras, estimándose, en este caso, un valor de 0,355 (tabla 4.76).

CAFEÍNA PRUEBA				CONGELABILIDAD
SI	T7	SP2	Coef. Correlación	,355

**Tabla 4.76:** Coeficientes de correlación estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) entre el tamaño de las diferentes subpoblaciones en la prueba de la termorresistencia y los índices calculados postdescongelación.

Tras efectuar el análisis de regresión, sólo podemos establecer dos modelos a partir de los datos recogidos en el estudio de las subpoblaciones espermáticas efectuado en los cuatro tiempos de incubación; éstos corresponden a las muestras del T3 y del T7, ambas con incubación previa en el medio enriquecido con cafeína y empleando el tamaño de la SP2 como única variable del modelo (tablas 4.77 y 4.78). El porcentaje de varianza de la congelabilidad explicado, a partir de las siguientes fórmulas, resulta de un 7,5 % en el primero (T3) y de un 10,3 % en el segundo (T7).

$$T3 \text{ (con CAF.): } Congelabilidad = 58,634 + 0,392(SP2)$$

$$T7 \text{ (con CAF.): } Congelabilidad = 59,053 + 0,445(SP2)$$

PRUEBA	CAFEÍNA	Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		t	Sig.
			B	Error típ.	Beta			
T3	SI	1	(Constante)	58,634	2,793		20,993	,000
			SP2	,392	,192	,315	2,043	,048
n=40	r=0.315	r <sup>2</sup> =0.099	r <sup>2</sup> correg.=0,075	Anova:	F=4,172	p<0,05		

**Tabla 4.77:** Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con el tamaño de las diferentes subpoblaciones espermáticas en el T3.

PRUEBA	CAFEÍNA	Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		t	Sig.
			B	Error típ.	Beta			
T7	SI	1	(Constante)	59,053	2,462		23,989	,000
			SP2	,445	,190	,355	2,341	,025
n=40	r=0.335	r <sup>2</sup> =0.126	r <sup>2</sup> correg.=0,103	Anova:	F=5,482	p<0,05		

**Tabla 4.78:** Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con el tamaño de las diferentes subpoblaciones espermáticas en el T7.

#### Mediante los parámetros cinéticos observados en la prueba del choque *a frigore*.

Las valoraciones realizadas a las muestras en la prueba del choque *a frigore* resultan ser las más eficaces a la hora de establecer relaciones significativas con los índices postdescongelación establecidos (tabla 4.79). La mayoría de estas correlaciones aparecen con la congelabilidad, pero también se observan valores interesantes con la resistencia del acrosoma y de la movilidad, valorando ésta tras la incubación con cafeína.

En las muestras sin cafeína podemos destacar el tamaño de la SP1, que presenta correlaciones negativas con la congelabilidad de las muestras en todas las valoraciones realizadas a partir de la hora de incubación, alcanzando su valor máximo en el S5 con un índice de -0,516. Por su parte, la SP2 presenta correlaciones positivas con la congelabilidad, ofreciendo también valores interesantes, e incluso superiores en ocasiones a los observados para la SP1, como podemos constatar en los índices calculados en el S1 y el S2.

La SP3 es la única subpoblación de las tres correlacionada significativamente en el S0 con algún índice posdescongelación, si bien, ni en este caso ni en el S5, lo es con la congelabilidad sino con la resistencia del acrosoma, en el primer caso, y con la resistencia de la movilidad, con cafeína, en el segundo.

Las muestras incubadas con cafeína muestran correlaciones significativas en todos los choques excepto en el S0, resultando éstas a partir del tamaño de la SP3, en el S1, el S2 y el S3 y a partir del de la SP1 y de la SP2 en el S5; al igual que sucedía en las valoraciones realizadas sin cafeína, las correlaciones observadas con algún índice posdescongelación diferente a la congelabilidad aparecen con el tamaño de la SP3.

CAFÉINA	PRUEBA	CONGELABILIDAD		RESIST. ACROSOMA A LA CONGEL.	RESIST. MOVILIDAD (CAFÉINA) A LA CONGEL.
		S0	SP3	,384	
NO	S1	SP1	-,382		
		SP2	,424		
	S2	SP1	-,331		
		SP2	,348		
	S3	SP1	-,385		
		SP1	-,516		
	S5	SP2	,390		
		SP3			,364
	SI	S1	SP3	,401	
S2		SP3			-,347
S3		SP3		-,331	
S5		SP1	-,405		
		SP2	,415		

**Tabla 4.79:** Coeficientes de correlación estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) entre el tamaño de las diferentes subpoblaciones en la prueba del choque a frigore y los índices calculados postdescongelación.

Tras establecer las correlaciones existentes, se efectúa el análisis multivariante de regresión para la congelabilidad de los eyaculados, empleando el tamaño de las tres subpoblaciones después de cada choque, tanto en presencia como en ausencia de cafeína. Los resultados se muestran en las tablas 4.80, 4.81, 4.82 y 4.83.

No se pueden realizar modelos estadísticamente aceptables para la prueba del S0, ni con cafeína ni sin ella, como tampoco se puede para el S2 ni para el S3 con cafeína. En todos los modelos creados se incluye una sola variable, siendo la SP1 la utilizada en el del S3 y el del S5 sin cafeína, explicando a partir de ellos un 12,6 y un 24,7% de la varianza de la congelabilidad, respectivamente; se emplea la SP2 en los modelos del S1 y del S2 sin cafeína y del S5 con ella, proporcionando una explicación de la congelabilidad de las muestras del 15,8, del 9,8 y del 15,1%, respectivamente; y por último, se recurre a la SP3 para establecer el modelo más apropiado a partir de los valores de las muestras incubadas con cafeína en el S1, con el que la explicación de la varianza es de un 13,9%. Las ecuaciones de regresión generadas a partir de los citados modelos son las siguientes:

$$S1 \text{ (sin CAF.)}: \text{Congelabilidad} = 46,657 + 0,261(SP2)$$

$$S1 \text{ (con CAF.)}: \text{Congelabilidad} = 57,088 + 0,774(SP3)$$

$$S2 \text{ (sin CAF.)}: \text{Congelabilidad} = 49,716 + 0,212(SP2)$$

$$S3 \text{ (sin CAF.)}: \text{Congelabilidad} = 70,488 - 0,281(SP1)$$

$$S5 \text{ (sin CAF.)}: \text{Congelabilidad} = 73,762 + -0,394(SP1)$$

$$S5 \text{ (con CAF.)}: \text{Congelabilidad} = 50,315 + 0,286(SP2)$$

#### 4. RESULTADOS

PRUEBA	CAFEÍNA	Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		Sig.	
			B	Error típ.	Beta	t		
S1	NO	1	(Constante)	46,657	5,890		7,922	,000
			SP2	,261	,090	,424	2,888	,006
	SI	1	(Constante)	57,088	2,801		20,381	,000
			SP3	,774	,286	,401	2,701	,010
NO CAF.	n=40	r=0.424	r <sup>2</sup> =0.180	r <sup>2</sup> correg.=0,158	Anova:	F=8,338	p<0,01	
CAF.	n=40	r=0.401	r <sup>2</sup> =0.161	r <sup>2</sup> correg.=0,139	Anova:	F=7,295	p<0,05	

Tabla 4.80: Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con el tamaño de las diferentes subpoblaciones espermáticas en el S1.

PRUEBA	CAFEÍNA	Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		Sig.	
			B	Error típ.	Beta	t		
S2	NO	1	(Constante)	49,716	6,027		8,249	,000
			SP2	,212	,092	,348	2,292	,028
n=40	r=0.348	r <sup>2</sup> =0.121	r <sup>2</sup> correg.=0,098	Anova:	F=5,252	p<0,05		

Tabla 4.81: Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con el tamaño de las diferentes subpoblaciones espermáticas en el S2.

PRUEBA	CAFEÍNA	Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		Sig.	
			B	Error típ.	Beta	t		
S3	NO	1	(Constante)	70,488	3,486		20,221	,000
			SP1	-,281	,109	-,385	-2,570	,014
n=40	r=0.385	r <sup>2</sup> =0.148	r <sup>2</sup> correg.=0,126	Anova:	F=6,604	p<0,05		

Tabla 4.82: Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con el tamaño de las diferentes subpoblaciones espermáticas en el S3.

PRUEBA	CAFEÍNA	Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		Sig.	
			B	Error típ.	Beta	t		
S5	NO	1	(Constante)	73,762	3,393		21,741	,000
			SP1	-,394	,106	-,516	-3,710	,001
	SI	1	(Constante)	50,315	4,807		10,466	,000
			SP2	,286	,102	,415	2,814	,008
NO CAF.	n=40	r=0.516	r <sup>2</sup> =0.266	r <sup>2</sup> correg.=0,247	Anova:	F=13,516	p<0,01	
CAF.	n=40	r=0.415	r <sup>2</sup> =0.172	r <sup>2</sup> correg.=0,151	Anova:	F=7,916	p<0,01	

Tabla 4.83: Modelo multivariante de regresión para la congelabilidad calculado con el tamaño de las diferentes subpoblaciones espermáticas en el S5.

## 4.4. Experimento 3: Estudio de la resistencia al choque a frigore

### 4.4.1. Influencia de la presencia de la gota citoplasmática en la resistencia celular al choque a frigore

En la tabla 4.84, que muestra los porcentajes de cada una de las seis categorías morfológicas resultantes de la evaluación de las muestras sometidas a los choques a frigore, además del porcentaje medio que éstas presentaban en el eyaculado, se comprueba que ninguna categoría permanece, tras la realización de cada choque, con valores similares a los mostrados en la valoración del semen fresco (eyaculado).

	CATEGORIA MORFOLÓGICA												
	NORMALES		GP		GD		COLA+GOTA		COLA		CABEZA		
	n	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
EYACUL.	14	76,86 <sup>a</sup>	11,18	6,57 <sup>a</sup>	5,91	12,57 <sup>a</sup>	7,86	2,79 <sup>a</sup>	1,89	,93 <sup>a</sup>	,92	,29 <sup>a</sup>	,47
S0	14	28,57 <sup>b</sup>	17,58	17,00 <sup>b</sup>	12,88	32,43 <sup>b</sup>	11,13	22,00 <sup>b</sup>	11,23	,00 <sup>b</sup>	,00	,00 <sup>b</sup>	,00
S1	14	44,86 <sup>bc</sup>	26,48	22,00 <sup>b</sup>	22,28	26,43 <sup>ab</sup>	7,11	6,71 <sup>a</sup>	3,89	,00 <sup>b</sup>	,00	,00 <sup>b</sup>	,00
S2	14	52,00 <sup>bc</sup>	27,50	20,86 <sup>b</sup>	19,45	22,43 <sup>abc</sup>	9,25	4,43 <sup>a</sup>	3,61	,29 <sup>b</sup>	,73	,00 <sup>b</sup>	,00
S3	14	57,29 <sup>ab</sup>	26,06	18,57 <sup>b</sup>	19,93	20,43 <sup>bc</sup>	11,67	3,57 <sup>a</sup>	3,16	,14 <sup>b</sup>	,53	,00 <sup>b</sup>	,00

**Tabla 4.84:** Porcentaje de espermatozoides vivos de cada una de las categorías morfológicas analizadas tras la realización del choque a frigore.

Distintos superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las valoraciones realizadas dentro de cada categoría morfológica.

Las mayores diferencias se producen después del choque inicial (S0), con el que todas las categorías cambian de forma notable, especialmente el grupo “COLA+GOTA”, que engloba a aquellos espermatozoides que presentan una torsión a nivel de la cola y, además, la presencia de una gota citoplasmática distal (GCD), que experimenta un sorprendente aumento en su porcentaje medio, pasando de un 2,79 % a un 22,0 %. Como este incremento puede ser debido a que muchos de los espermatozoides integrados en el grupo GD (formado por los espermatozoides cuya única diferencia morfológica con los normales es la presencia de una gota distal), hayan experimentado, como consecuencia del descenso brusco de temperatura, una torsión de la cola alrededor de la gota citoplasmática, a partir de este momento aquellos espermatozoides que originariamente pertenecían al grupo “COLA+GOTA” serán incluidos para el análisis de los resultados en el grupo GD, considerando como la característica que los define únicamente la presencia de la GCD. Una vez realizada esta corrección, los datos se recogen en la tabla 4.85, en la que se comprueba la drástica reducción del porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales experimentada tras el S0, que pasa de un  $76,9 \pm 11,2$  % a un  $28,6 \pm 17,6$  %, porcentaje que va después ascendiendo a medida que transcurre el tiempo de incubación, hasta llegar a valores estadísticamente similares a los del eyaculado.

En cambio, el porcentaje de espermatozoides que presentan una gota citoplasmática, ya sea distal o proximal, se incrementa de forma significativa ( $p < 0,05$ ) respecto a los valores del semen fresco, en todas las valoraciones efectuadas tras los choques, alcanzando máximas de un

54,4±9,3 % en el grupo GD tras el S0 y de un 22,0±22,3 % en el grupo GP tras el S1.

Por su parte, las otras dos categorías, que encuadran a los espermatozoides con alteraciones a nivel de la cabeza o de la cola, parten ya de un porcentaje muy bajo, que se reduce ( $p < 0,05$ ) aún más tras los choques, llegando incluso a ser cero en muchos casos.

	CATEGORÍA MORFOLÓGICA										
	NORMALES			GP		GD		COLA		CABEZA	
	n	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
EYACUL.	14	76,86 <sup>a</sup>	11,18	6,57 <sup>a</sup>	5,91	15,36 <sup>a</sup>	7,37	,93 <sup>a</sup>	,92	,29 <sup>a</sup>	,47
S0	14	28,57 <sup>b</sup>	17,58	17,00 <sup>b</sup>	12,88	54,43 <sup>b</sup>	9,35	,00 <sup>b</sup>	,00	,00 <sup>b</sup>	,00
S1	14	44,86 <sup>bc</sup>	26,48	22,00 <sup>b</sup>	22,28	33,14 <sup>b</sup>	8,37	,00 <sup>b</sup>	,00	,00 <sup>b</sup>	,00
S2	14	52,00 <sup>bc</sup>	27,50	20,86 <sup>b</sup>	19,45	26,86 <sup>b</sup>	11,76	,29 <sup>b</sup>	,73	,00 <sup>b</sup>	,00
S3	14	57,29 <sup>ab</sup>	26,06	18,57 <sup>b</sup>	19,93	24,00 <sup>b</sup>	11,79	,14 <sup>b</sup>	,53	,00 <sup>b</sup>	,00

**Tabla 4.85:** Porcentaje corregido de espermatozoides vivos de cada una de las categorías morfológicas analizadas tras la realización del choque a frigore.

Distintos superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las valoraciones realizadas dentro de cada categoría morfológica.

Con el fin de intentar determinar si la presencia de una gota citoplasmática es un indicativo de una menor susceptibilidad al choque a frigore, procedemos a calcular la variación porcentual, con respecto a los valores del eyaculado, que experimentan los espermatozoides morfológicamente normales (grupo “normal”), los que tienen gota citoplasmática (grupo “gota”, que comprende a los grupos GD y GP), y el resto de las categorías analizadas, que quedan englobadas en un tercer grupo (“otros”). En la tabla 4.86, donde aparecen recogidas las variaciones experimentadas tras los choques en el grupo “normal” y el grupo “gota”, se evidencian diferencias claramente significativas ( $p < 0,05$ ), como ya se podía intuir con los valores recogidos en las tablas 4.84 y 4.85.

	CATEGORÍA MORFOLÓGICA								
	NORMAL			GOTA			OTROS		
	n	Media	Desv. típ.	n	Media	Desv. típ.	n	Media	Desv. típ.
% VARIACIÓN (EYAC-S0)	14	-64,95 <sup>a</sup>	17,86	28	302,95 <sup>b</sup>	256,58	28	*	*
% VARIACIÓN (EYAC-S1)	14	-44,06 <sup>a</sup>	29,89	28	171,93 <sup>b</sup>	161,83	28	*	*
% VARIACIÓN (EYAC-S2)	14	-34,61 <sup>a</sup>	29,64	28	142,66 <sup>b</sup>	163,92	28	*	*
% VARIACIÓN (EYAC-S3)	14	-27,65 <sup>a</sup>	26,87	28	93,12 <sup>b</sup>	124,29	28	*	*

**Tabla 4.86:** Variación, con respecto a los valores del eyaculado, del porcentaje de espermatozoides normales, con presencia de gota citoplasmática y con otras alteraciones morfológicas.

Distintos superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre categorías morfológicas para cada intervalo de tiempo.

\* denota la imposibilidad de realizar el cálculo como consecuencia de valores iguales a 0 en la categoría correspondiente del eyaculado.

La mayor variación aparece tras el S0, donde los valores iniciales para este segundo grupo se incrementan más de un 300 %, mientras que en el “normal” el valor desciende casi un 65 %. Estas diferencias van reduciéndose progresivamente a medida que transcurre el tiempo de incu-

bación a 20 °C, quedando, tras el S3, en un incremento de células con gota citoplasmática de un 93,1±124,3 % y una reducción de normales de un 27,7±26,9 %.

Otro de los objetivos ha sido determinar si este incremento de la resistencia de los espermatozoides con gota citoplasmática, varía en función de la diferente localización de la misma en la estructura espermática. La tabla 4.87 recoge la variación experimentada en las cinco categorías morfológicas establecidas en un principio. Los espermatozoides con GCD incrementan su resistencia, en el S0, en un 313,9±154,5 % para, posteriormente, tras el S1, el S2 y el S3, presentar valores medios de un 150,3±94,0 %, un 85,1±64,0 % y un 65,2± 80,2 %, respectivamente.

Por su parte, el grupo GP presenta, en casi todos los choques, incrementos estadísticamente similares ( $p>0,05$ ) a los observados en el grupo GD, con una única excepción, que tras el S2 se mantiene el incremento medio en un 200,2±211,1 %, mientras que en el grupo GD baja hasta poco más de un 85 %, para igualarse de nuevo desde el punto de vista estadístico una vez realizado el S3, al producirse una bajada pronunciada de la resistencia de los espermatozoides con GCP.

	CATEGORIA MORFOLÓGICA										
	NORMALES			GP		GD		COLA		CABEZA	
	n	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
% VARIACIÓN (EYAC-S0)	14	-64,95 <sup>a</sup>	17,86	291,97 <sup>b</sup>	335,56	313,93 <sup>b</sup>	154,49	*	*	*	*
% VARIACIÓN (EYAC-S1)	14	-44,06 <sup>a</sup>	29,89	193,61 <sup>b</sup>	211,09	150,25 <sup>b</sup>	93,92	*	*	*	*
% VARIACIÓN (EYAC-S2)	14	-34,61 <sup>a</sup>	29,64	200,20 <sup>b</sup>	211,13	85,12 <sup>c</sup>	63,99	*	*	*	*
% VARIACIÓN (EYAC-S3)	14	-27,65 <sup>a</sup>	26,87	121,09 <sup>b</sup>	154,80	65,15 <sup>b</sup>	80,21	*	*	*	*

**Tabla 4.87:** Variación, con respecto a los valores del eyaculado, del porcentaje de las diferentes categorías morfológicas analizadas.

Distintos superíndices indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre categorías morfológicas para cada intervalo de tiempo.

\* denota la imposibilidad de realizar el cálculo como consecuencia de valores iguales a 0 en la categoría correspondiente del eyaculado.

#### 4.4.2. Efecto del diluyente comercial y de la presencia de plasma seminal en la resistencia al choque a frigore

En las tablas 4.88 y 4.91 se reflejan los porcentajes medios de integridad de la membrana plasmática y acrosómica recogidos tras los diferentes choques, tanto para cada uno de los diluyentes empleados en la dilución y redilución de las muestras (BTS y MR-A), como para cada uno de los tres grupos creados en función del momento en el que se elimina de éstas el plasma seminal: al inicio de la prueba (grupo CI), al realizar el choque (grupo CMto) y en ningún momento (grupo SC).



## 4.4.2.1. Integridad de la membrana plasmática.

Con ambos diluyentes y en los tres grupos, a medida que transcurre el tiempo de incubación previo, se produce un aumento evidente ( $p < 0,01$ ) de la resistencia de la membrana plasmática a los diferentes choques *a frigore* (tabla 4.88).

		% INTEGRIDAD MEMBRANA PLASMÁTICA									
		CENTRIFUGACIÓN									
		GRUPO CI			GRUPO CMto			GRUPO SC			
		n	Media	Desv. típ.	n	Media	Desv. típ.	n	Media	Desv. típ.	
DILUYENTE	BTS	S0	16	5,41 <sup>a</sup>	3,03	16	5,41 <sup>a</sup>	3,03	16	5,44 <sup>a</sup>	3,09
		S1	16	18,39 <sup>b</sup>	8,61	16	24,44 <sup>b</sup>	7,26	16	24,39 <sup>b</sup>	8,09
		S2	16	26,89 <sup>c</sup>	6,99	16	36,33 <sup>b</sup>	13,84	16	36,31 <sup>c</sup>	15,17
		S3	16	32,16 <sup>c</sup>	12,40	16	40,86 <sup>c</sup>	17,49	16	38,45 <sup>c</sup>	14,93
	MR-A	S0	16	8,09 <sup>a</sup>	6,09	16	8,11 <sup>a</sup>	6,10	16	10,80 <sup>a</sup>	8,16
		S1	16	23,84 <sup>b</sup>	9,05	16	32,23 <sup>b</sup>	8,29	16	29,03 <sup>b</sup>	7,56
		S2	16	32,47 <sup>b</sup>	12,31	16	47,97 <sup>c</sup>	14,76	16	43,81 <sup>c</sup>	15,68
		S3	16	42,61 <sup>c</sup>	12,67	16	54,23 <sup>c</sup>	16,15	16	48,14 <sup>c</sup>	13,83

**Tabla 4.88:** Resultados medios de integridad de la membrana plasmática obtenidos para cada grupo de muestras.

Distintos superíndices revelan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tiempos de incubación previos a los choques.

Para poder estudiar la influencia sobre la resistencia de esta estructura, tanto del diluyente utilizado como del momento de eliminación del plasma, o bien, la interacción de estos dos factores, se realiza un ANOVA factorial, cuyos resultados se reflejan en la tabla 4.89. En ella podemos comprobar que la significación mostrada por la variable “diluyente”, que engloba a los dos diluyentes utilizados, resulta inferior a la establecida en 0,05, en todos los tiempos de incubación, lo cual permite concluir que la resistencia de la membrana plasmática al choque es diferente en las muestras incubadas con BTS y en aquellas diluidas en MR-A.

Por su parte, el momento en el que se realiza la eliminación del plasma seminal (variable “centrifugación”), también tiene una incidencia importante sobre la resistencia de la membrana al choque *a frigore*, como indican los correspondientes valores de significación calculados al analizar las medias observadas en los diferentes grupos ( $p < 0,05$ ).

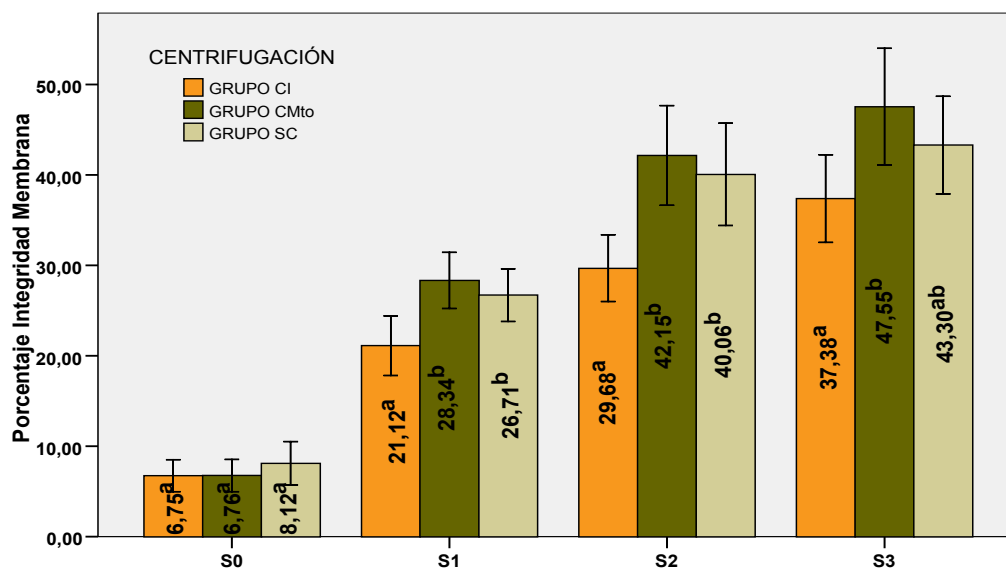
En la citada tabla también podemos observar, tomando como referencia el valor de significación, que en ninguna de las pruebas se produce interacción entre las dos variables analizadas (“diluyente” y “centrifugación”); este hecho nos permite anticipar que el efecto producido por el diluyente sobre la resistencia de la membrana plasmática, no tiene por qué ser diferente para cada uno de los grupos de centrifugación.

PRUEBA	Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
S0	Modelo corregido	385,32	5	77,06	2,74	,02
	Intersección	4989,61	1	4989,61	177,20	,00
	DILUYENTE	307,81	1	307,81	10,93	,00
	CENTRIFUGACIÓN	39,83	2	19,92	,71	,49
	DILUYENTE * CENTRIFUGACIÓN	37,68	2	18,84	,67	,51
	Error	2534,24	90	28,16		
	Total	7909,16	96			
	Total corregida	2919,55	95			
S1	Modelo corregido	1814,27	5	362,85	5,44	,00
	Intersección	61877,14	1	61877,14	928,02	,00
	DILUYENTE	853,55	1	853,55	12,80	,00
	CENTRIFUGACIÓN	917,74	2	458,87	6,88	,00
	DILUYENTE * CENTRIFUGACIÓN	42,97	2	21,49	,32	,73
	Error	6000,87	90	66,68		
	Total	69692,28	96			
	Total corregida	7815,14	95			
S2	Modelo corregido	4637,59	5	927,52	5,12	,00
	Intersección	133541,65	1	133541,65	737,83	,00
	DILUYENTE	1629,40	1	1629,40	9,00	,00
	CENTRIFUGACIÓN	2854,61	2	1427,31	7,89	,00
	DILUYENTE * CENTRIFUGACIÓN	153,57	2	76,79	,42	,66
	Error	16289,36	90	180,99		
	Total	154468,59	96			
	Total corregida	20926,94	95			
S3	Modelo corregido	4723,94	5	944,79	4,38	,00
	Intersección	175377,61	1	175377,61	812,72	,00
	DILUYENTE	2996,02	1	2996,02	13,88	,00
	CENTRIFUGACIÓN	1667,22	2	833,61	3,86	,02
	DILUYENTE * CENTRIFUGACIÓN	60,70	2	30,35	,14	,87
	Error	19421,20	90	215,79		
	Total	199522,74	96			
	Total corregida	24145,13	95			

**Tabla 4.89:** Resultados obtenidos tras la realización del análisis factorial de la varianza para la integridad de la membrana plasmática.

Al analizar de forma individual cada una de estas variables, se comprueba que en la variable “centrifugación” (figura 4.53), tras la realización del choque *a frigore* inicial (S0), no se aprecian diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre las tres categorías establecidas, que sí aparecen a partir de la hora de permanencia de las muestras a 20 °C, concretamente, aquellas a las que se les ha eliminado el plasma desde un primer momento (grupo CI) presentan resultados medios inferiores ( $p < 0,05$ ) a los otros dos grupos después del S1 y del S2 y al grupo CMto tras el S3. En todos los choques realizados, excepto en el inicial, se observa el mismo patrón: los resultados medios más bajos corresponden al grupo CI y los más altos al grupo CMto, presentando valores intermedios el grupo que engloba a las muestras sin centrifugar (grupo SC) pero

sin aparecer, en ningún caso, diferencias estadísticamente significativas con el grupo CMto.



**Figura 4.53:** Porcentajes de integridad de la membrana plasmática obtenidos en los tres grupos de centrifugación tras los diferentes choques.

Diferentes superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos.

Al examinar la respuesta de estos tres grupos dentro de cada uno de los diluyentes empleados, y sin tener en cuenta el tiempo previo que permanecieron las muestras a 20 °C (tabla 4.90), se puede apreciar más o menos el mismo patrón en ambos, pues el grupo CI sigue presentando unos valores medios más bajos, si bien, las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre este grupo y los otros dos sólo surgen con el BTS, mientras que con el MR-A únicamente aparecen en la comparación con el grupo CMto.

Si además tenemos en cuenta el tiempo previo de incubación, nos encontramos con un patrón similar, ya que exceptuando el inicial, en todos los tiempos considerados las medias más bajas corresponden al grupo CI y las más altas al grupo CMto. No obstante, en aquellas muestras diluidas con BTS sólo se aprecian diferencias significativas entre los tres grupos en el S3, permaneciendo, con medias estadísticamente similares entre el grupo CMto y el SC, en los choques realizados a la hora y a las dos horas. Por otro lado, en aquellas muestras diluidas con MR-A, estas diferencias entre los tres grupos aparecen en prácticamente todos los tiempos (S1, S2 y S3).

Con respecto a la influencia de los diferentes diluyentes comerciales, al analizar los datos obtenidos, se observa que todas las muestras diluidas con MR-A presentan porcentajes medios de integridad de la membrana plasmática superiores ( $p < 0,05$ ) a los de aquellas en las que se emplea BTS, tanto en general para cada choque realizado, como en función del momento de eliminación del plasma seminal.

		% INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA								
		CENTRIFUGACIÓN								
		GRUPO CI		GRUPO CMto		GRUPO SC		Total		
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	
DILUYENTE	BTS	S0	5,41 <sup>a</sup>	3,03	5,41 <sup>a</sup>	3,03	5,44 <sup>a</sup>	3,09	5,42	2,99
		S1	18,39 <sup>a</sup>	8,61	24,44 <sup>b</sup>	7,26	24,39 <sup>b</sup>	8,09	22,41	8,34
		S2	26,89 <sup>a</sup>	6,99	36,33 <sup>b</sup>	13,84	36,31 <sup>b</sup>	15,17	33,18	13,05
		S3	32,16 <sup>a</sup>	12,40	40,86 <sup>b</sup>	17,49	38,45 <sup>c</sup>	14,93	37,16	15,22
		Total	20,71 <sup>a</sup>	13,11	26,76 <sup>b</sup>	18,00	26,15 <sup>b</sup>	17,32	24,54	16,43
	MR-A	S0	8,09 <sup>a,*</sup>	6,09	8,11 <sup>a,*</sup>	6,10	10,80 <sup>b,*</sup>	8,16	9,00 <sup>*</sup>	6,83
		S1	23,84 <sup>a,*</sup>	9,05	32,23 <sup>b,*</sup>	8,29	29,03 <sup>c,*</sup>	7,56	28,37 <sup>*</sup>	8,86
		S2	32,47 <sup>a,*</sup>	12,31	47,97 <sup>b,*</sup>	14,76	43,81 <sup>c,*</sup>	15,68	41,42 <sup>*</sup>	15,50
		S3	42,61 <sup>a,*</sup>	12,67	54,23 <sup>b,*</sup>	16,15	48,14 <sup>c,*</sup>	13,83	48,33 <sup>*</sup>	14,78
		Total	26,75 <sup>a,*</sup>	16,29	35,64 <sup>b,*</sup>	21,47	32,95 <sup>ab,*</sup>	18,73	31,77 <sup>*</sup>	19,21

**Tabla 4.90:** Porcentajes medios de integridad de la membrana plasmática en función tanto del diluyente empleado como del momento de eliminación del plasma seminal.

Diferentes superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos de centrifugación.

\* indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los diluyentes empleados.

#### 4.4.2.2. Integridad de la membrana acrosómica.

De forma similar a lo observado en el análisis de la integridad de la membrana plasmática, el acrosoma va adquiriendo una mayor resistencia al choque a frigore a medida que va transcurriendo el tiempo de incubación a 20 °C, con independencia del diluyente empleado y del momento de eliminación del plasma seminal (tabla 4.91).

		% INTEGRIDAD MEMBRANA ACROSÓMICA									
		CENTRIFUGACIÓN									
		GRUPO CI			GRUPO CMto			GRUPO SC			
		n	Media	Desv. típ.	n	Media	Desv. típ.	n	Media	Desv. típ.	
DILUYENTE	BTS	S0	16	7,70 <sup>a</sup>	3,56	16	7,72 <sup>a</sup>	3,57	16	7,77 <sup>a</sup>	4,78
		S1	16	14,08 <sup>b</sup>	5,39	16	17,31 <sup>b</sup>	5,27	16	16,83 <sup>b</sup>	5,67
		S2	16	19,91 <sup>c</sup>	6,23	16	23,52 <sup>c</sup>	6,07	16	21,45 <sup>b</sup>	6,41
		S3	16	25,58 <sup>d</sup>	5,52	16	29,31 <sup>d</sup>	4,34	16	28,78 <sup>c</sup>	4,81
		Total	16	19,16 <sup>b</sup>	5,32	16	22,23 <sup>c</sup>	5,07	16	21,21 <sup>b</sup>	5,25
	MR-A	S0	16	8,55 <sup>a</sup>	4,62	16	8,56 <sup>a</sup>	4,61	16	8,94 <sup>a</sup>	5,67
		S1	16	16,25 <sup>b</sup>	6,18	16	20,56 <sup>b</sup>	6,20	16	18,83 <sup>b</sup>	5,69
		S2	16	22,36 <sup>c</sup>	6,94	16	26,83 <sup>c</sup>	7,16	16	25,11 <sup>c</sup>	7,45
		S3	16	28,44 <sup>d</sup>	7,23	16	34,39 <sup>d</sup>	5,95	16	32,16 <sup>d</sup>	6,26
		Total	16	18,40 <sup>b</sup>	6,24	16	22,46 <sup>c</sup>	6,27	16	20,76 <sup>b</sup>	6,27

**Tabla 4.91:** Resultados medios de integridad de la membrana acrosómica obtenidos para cada grupo de muestras.

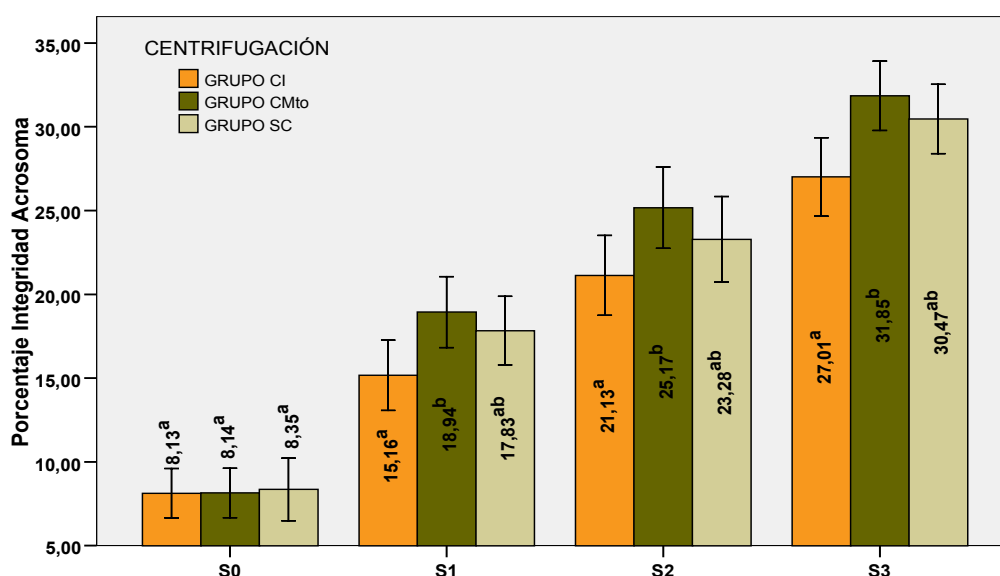
Distintos superíndices revelan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tiempos de incubación previos a los choques.

Al realizar el ANOVA factorial con el fin de determinar la influencia de las variables “diluyente” y “centrifugación” sobre la integridad del acrosoma tras un choque por frío, se desprenden

resultados muy parecidos a los recogidos para la integridad de la membrana plasmática.

Como se observa en la tabla 4.92, tampoco se aprecia aquí interacción entre las dos variables analizadas en ninguna de las pruebas efectuadas, pero sí podemos constatar que en la mayoría de éstas existe una variación ( $p < 0,05$ ) en la respuesta del acrosoma al descenso brusco de temperatura, tanto en función del diluyente como del momento de eliminación del plasma seminal. Esto no se evidencia únicamente en el S0, donde el valor de las significaciones nos permite concluir que los cambios acaecidos en la integridad acrosómica son similares en los dos diluyentes empleados, así como en los tres grupos de centrifugación establecidos.

Al analizar individualmente los datos recogidos para la variable “centrifugación” (figura 4.54), se observa que las diferencias entre los tres grupos ( $p < 0,05$ ) se producen en los choques realizados a la hora, a las 2 y a las 3 horas de incubación, presentando todos ellos la misma tendencia: el grupo CMto muestra la mayor resistencia del acrosoma al choque *a frigore*, el grupo CI la menor y el grupo SC los valores intermedios y sin significación estadística ( $p > 0,05$ ) con los otros dos.



**Figura 4.54:** Porcentajes de integridad de la membrana acrosómica obtenidos en los tres grupos de centrifugación tras los diferentes choques.

Diferentes superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos.

Al analizar la respuesta de los tres grupos en función del diluyente empleado (tabla 4.93), se aprecia que los valores medios recogidos a partir de la hora de incubación en los grupos CMto y SC son superiores ( $p < 0,05$ ), en prácticamente todas las valoraciones, a los del grupo CI, tanto en las muestras diluídas en MR-A como en aquellas otras en las que utilizó el BTS, exceptuando el S2 y para este último diluyente, en el que, aun siendo un valor medio más alto el del grupo SC, no se aprecia significación estadística con el CI.

Por otra parte, también a partir de la hora de incubación, en la dilución con MR-A se observa

que las muestras a las que se les eliminó el plasma seminal en el momento del choque (CMto) mostraron valores más altos ( $p < 0,05$ ) que aquellas en las que permaneció durante toda la prueba (SC), mientras que con el BTS estas diferencias sólo se pudieron establecer en el S2.

PRUEBA	Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
S0	Modelo corregido	23,41	5	4,68	,23	,95
	Intersección	6464,23	1	6464,23	314,87	,00
	DILUYENTE	21,81	1	21,81	1,06	,31
	CENTRIFUGACIÓN	1,02	2	,51	,02	,98
	DILUYENTE * CENTRIFUGACIÓN	,57	2	,29	,01	,99
	Error	1847,71	90	20,53		
	Total	8335,34	96			
	Total corregida	1871,12	95			
S1	Modelo corregido	394,85	5	78,97	2,39	,04
	Intersección	28768,18	1	28768,18	872,05	,00
	DILUYENTE	146,64	1	146,64	4,45	,04
	CENTRIFUGACIÓN	240,82	2	120,41	3,65	,03
	DILUYENTE * CENTRIFUGACIÓN	7,39	2	3,70	,11	,89
	Error	2969,04	90	32,99		
	Total	32132,07	96			
	Total corregida	3363,89	95			
S2	Modelo corregido	504,26	5	100,85	2,23	,06
	Intersección	51652,69	1	51652,69	1140,75	,00
	DILUYENTE	236,55	1	236,55	5,22	,02
	CENTRIFUGACIÓN	261,57	2	130,78	2,89	,06
	DILUYENTE * CENTRIFUGACIÓN	6,14	2	3,07	,07	,93
	Error	4075,18	90	45,28		
	Total	56232,13	96			
	Total corregida	4579,44	95			
S3	Modelo corregido	761,26	5	152,25	4,58	,00
	Intersección	85114,91	1	85114,91	2560,75	,00
	DILUYENTE	341,27	1	341,27	10,27	,00
	CENTRIFUGACIÓN	398,43	2	199,21	5,99	,00
	DILUYENTE * CENTRIFUGACIÓN	21,57	2	10,79	,32	,72
	Error	2991,44	90	33,24		
	Total	88867,61	96			
	Total corregida	3752,70	95			

**Tabla 4.92:** Resultados obtenidos tras la realización del análisis factorial de la varianza para la integridad de la membrana acrosómica.

Al igual que sucedía con la membrana plasmática, la dilución del semen con el diluyente MR-A provoca, en todos los grupos de centrifugación y en todos los tiempos de incubación establecidos, que los espermatozoides adquieran una mayor resistencia del acrosoma al choque a frigore que en el caso del BTS (tabla 4.93).

		% INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA ACROSÓMICA								
		CENTRIFUGACIÓN								
		GRUPO CI		GRUPO CMto		GRUPO SC		Total		
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	
DILUYENTE	BTS	S0	7,70 <sup>a</sup>	3,56	7,72 <sup>a</sup>	3,57	7,77 <sup>a</sup>	4,78	7,73	3,93
		S1	14,08 <sup>a</sup>	5,39	17,31 <sup>b</sup>	5,27	16,83 <sup>b</sup>	5,67	16,08	5,52
		S2	19,91 <sup>a</sup>	6,23	23,52 <sup>b</sup>	6,07	21,45 <sup>a</sup>	6,41	21,63	6,28
		S3	25,58 <sup>a</sup>	5,52	29,31 <sup>b</sup>	4,34	28,78 <sup>b</sup>	4,81	27,89	5,09
		Total	16,82 <sup>a</sup>	8,45	19,47 <sup>a</sup>	9,38	18,71 <sup>a</sup>	9,35	18,33	9,09
	MR-A	S0	8,55 <sup>a,*</sup>	4,62	8,56 <sup>a,*</sup>	4,61	8,94 <sup>a,*</sup>	5,67	8,68 <sup>*</sup>	4,89
		S1	16,25 <sup>a,*</sup>	6,18	20,56 <sup>b,*</sup>	6,20	18,83 <sup>c,*</sup>	5,69	18,55 <sup>*</sup>	6,16
		S2	22,36 <sup>a,*</sup>	6,94	26,83 <sup>b,*</sup>	7,16	25,11 <sup>c,*</sup>	7,45	24,77 <sup>*</sup>	7,28
		S3	28,44 <sup>a,*</sup>	7,23	34,39 <sup>b,*</sup>	5,95	32,16 <sup>c,*</sup>	6,26	31,66 <sup>*</sup>	6,83
		Total	18,90 <sup>a,*</sup>	9,66	22,59 <sup>a,*</sup>	11,22	21,26 <sup>a,*</sup>	10,58	20,91 <sup>*</sup>	10,56

**Tabla 4.93:** Porcentajes medios de integridad de la membrana acrosómica en función tanto del diluyente empleado como del momento de eliminación del plasma seminal.

Diferentes superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos de centrifugación.

\* indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los diluyentes empleados.

#### 4.4.3. Influencia del tiempo de incubación previo sobre la congelabilidad espermática

La tabla 4.94 muestra los valores medios de integridad de la membrana plasmática y del acrosoma, así como el promedio de movilidad total que mostraron los eyaculados utilizados, tanto en el momento de la recepción de los mismos en el laboratorio, como una vez transcurridos los diferentes tiempos de incubación a 15 °C, justo antes de proceder a realizar los choques *a frigore* o las centrifugaciones pertinentes del proceso de congelación.

TIEMPO INCUBACIÓN	PARÁMETRO VALORADO						
	% MOVILIDAD			% INTEGR. MEMB. PLASMÁTICA		% INTEGR. MEMB. ACROSÓMICA	
	n	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
0 HORAS	8	94,20 <sup>a</sup>	5,38	89,19 <sup>a</sup>	1,93	97,88 <sup>a</sup>	1,46
3 HORAS	8	92,70 <sup>a</sup>	4,79	88,63 <sup>a</sup>	1,43	97,75 <sup>a</sup>	1,16
6 HORAS	8	92,74 <sup>a</sup>	5,01	87,50 <sup>a</sup>	1,51	96,75 <sup>a</sup>	1,04
12 HORAS	8	91,34 <sup>a</sup>	5,15	87,06 <sup>ab</sup>	1,64	95,75 <sup>a</sup>	1,39
24 HORAS	8	80,46 <sup>b</sup>	6,62	84,50 <sup>b</sup>	2,76	93,38 <sup>b</sup>	2,45

**Tabla 4.94:** Porcentajes medios de movilidad total y de integridad de la membrana plasmática y de la acrosómica en los diferentes tiempos de incubación.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para cada parámetro entre los tiempos de valoración.

Todos los eyaculados empleados presentan una alta calidad ya que, tras su recolección, se

observan valores medios superiores al 89 % para los tres parámetros estudiados, si bien éstos van reduciéndose progresivamente a medida que transcurre el tiempo de incubación, siendo estadísticamente significativa la diferencia respecto a los iniciales ( $p < 0,05$ ) transcurridas 24 horas. El parámetro que disminuye de una forma más notable es el porcentaje de movilidad total, que pasó de una media de un  $91,3 \pm 5,2$  % a las 12 horas de incubación a un  $80,5 \pm 6,6$  % a las 24 horas.

#### 4.4.3.1. Estudio del efecto producido por el choque a frigore a lo largo del periodo de incubación.

Del mismo modo que en el primer experimento, donde se estudió la influencia del tiempo de incubación durante las primeras cinco horas desde la extracción del eyaculado, aquí también nos encontramos, a medida que aumenta el tiempo de permanencia de las muestras a  $15^{\circ}\text{C}$ , con porcentajes medios cada vez más altos en prácticamente todos los parámetros analizados (tabla 4.95).

		n	Media	Desv. típ.	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
PORCENTAJE MOVILIDAD	3 HORAS	8	50,54 <sup>a</sup>	21,05	7,44	32,94	68,15	22,81	80,00
	6 HORAS	8	75,08 <sup>bc</sup>	11,71	4,14	65,29	84,87	61,08	96,48
	12 HORAS	8	88,11 <sup>c</sup>	4,24	1,50	84,56	91,65	81,42	93,24
	24 HORAS	8	62,70 <sup>ab</sup>	22,03	7,79	44,29	81,12	33,14	90,20
INTEGRIDAD MEMB. PLASMÁTICA (%)	3 HORAS	8	30,31 <sup>a</sup>	14,52	5,13	18,18	42,45	17,50	55,50
	6 HORAS	8	59,41 <sup>b</sup>	10,01	3,54	51,04	67,77	43,00	74,00
	12 HORAS	8	61,97 <sup>b</sup>	6,87	2,43	56,23	67,71	52,75	74,75
	24 HORAS	8	71,25 <sup>b</sup>	4,95	1,75	67,11	75,39	63,75	77,25
INTEGRIDAD ACROSOMA (%)	3 HORAS	8	38,25 <sup>a</sup>	12,87	4,55	27,49	49,01	25,00	58,00
	6 HORAS	8	58,75 <sup>b</sup>	9,56	3,38	50,76	66,74	50,00	77,00
	12 HORAS	8	71,50 <sup>bc</sup>	8,94	3,16	64,02	78,98	62,00	84,00
	24 HORAS	8	79,88 <sup>c</sup>	11,38	4,02	70,36	89,39	60,00	93,00

**Tabla 4.95:** Valores medios obtenidos para los tres parámetros estudiados tras la realización del choque en los diferentes tiempos de incubación.

Distintos superíndices para el mismo parámetro indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tiempos de incubación.

En efecto, puede apreciarse que la integridad de la membrana plasmática presenta a las 3 horas de incubación una media de un  $30,3 \pm 14,5$  %, y 21 horas después el valor medio recogido ascendió a un  $71,5 \pm 5,0$  %. De igual forma sucede con la integridad acrosómica, que pasa de un  $38,3 \pm 12,9$  %, tras el choque realizado a las 3 horas, a un  $79,9 \pm 11,4$  % a las 24.

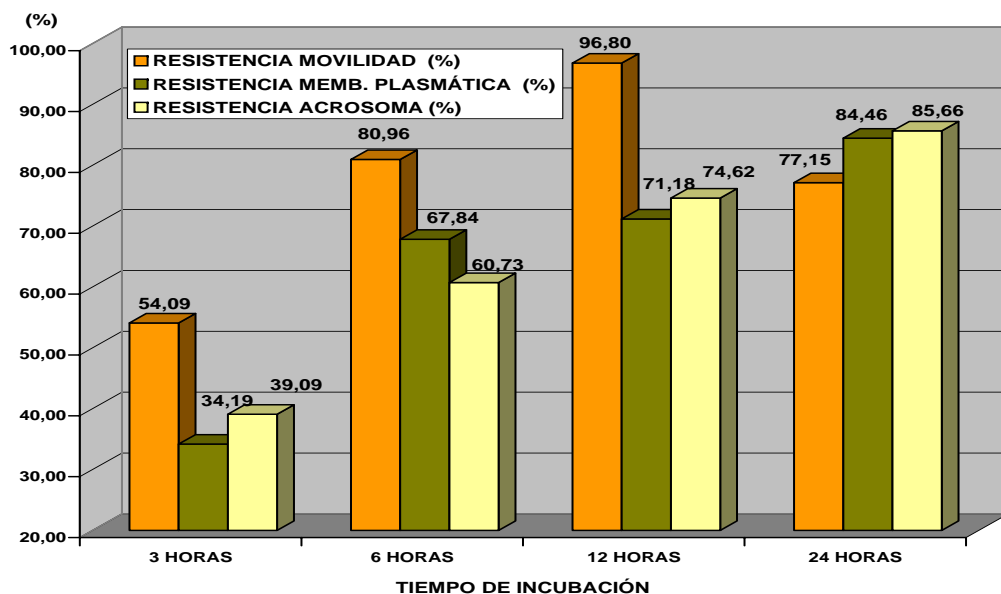
El porcentaje de movilidad también presenta un incremento claro a lo largo del tiempo de incubación, si bien en este caso sólo es hasta las 12 horas, ya que los valores medios calculados tras el choque de las 24 horas resultan estadísticamente inferiores ( $p < 0,05$ ) a los obtenidos en ésta.



No obstante, como los datos expuestos corresponden a las medias obtenidas tras la realización del choque *a frigore*, debido al citado descenso de calidad de las muestras a medida que permanecen a 15 °C, es preciso realizar una corrección, tomando como referencia los valores que presentaban los eyaculados en el momento previo a la realización de los choques o de las centrifugaciones pertinentes del protocolo de congelación, con el fin de determinar en qué medida se han modificado los diferentes parámetros tras los choques, obteniendo los valores de la resistencia al choque en cada tiempo, en forma de porcentaje de espermatozoides que “han soportado” la prueba. Para ello aplicaremos una fórmula similar a la empleada en experimentos anteriores:

$$\text{Resistencia Choque (\%)} = \frac{\% \text{ Parámetro después Choque} \times 100}{\% \text{ Parámetro antes Choque}}$$

Los resultados obtenidos tras la aplicación de esta fórmula se muestran en el gráfico 4.55 y, de una forma más detallada, en la tabla 4.96. En ellos se aprecia, en líneas generales, el mismo comportamiento, incrementos en la resistencia de los espermatozoides a medida que avanza la incubación de las muestras, e incluso con similares diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tiempos de incubación pero, lógicamente, con valores más altos que los reflejados en la tabla 4.95.



**Figura 4.55:** Resistencia al choque a frigore que presentan los tres parámetros estudiados en los diferentes tiempos de incubación.

Distintos superíndices para el mismo parámetro indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tiempos de incubación.

		n	Media	Desv. tip.	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
RESISTENCIA MOVILIDAD (%)	3 HORAS	8	54,09 <sup>a</sup>	21,82	7,71	35,85	72,33	27,84	85,15
	6 HORAS	8	80,96 <sup>b</sup>	11,64	4,12	71,23	90,70	65,91	99,70
	12 HORAS	8	96,80 <sup>b</sup>	8,28	2,93	89,88	103,72	85,35	114,26
	24 HORAS	8	77,15 <sup>ab</sup>	23,19	8,20	57,77	96,54	39,87	104,27
RESISTENCIA MEMB. PLASMÁTICA (%)	3 HORAS	8	34,19 <sup>a</sup>	16,29	5,76	20,56	47,81	19,89	61,67
	6 HORAS	8	67,84 <sup>b</sup>	10,99	3,89	58,65	77,03	50,00	82,68
	12 HORAS	8	71,18 <sup>bc</sup>	7,76	2,74	64,69	77,67	61,94	84,94
	24 HORAS	8	84,46 <sup>c</sup>	7,36	2,60	78,31	90,62	73,74	94,38
RESISTENCIA ACROSOMA (%)	3 HORAS	8	39,09 <sup>a</sup>	12,99	4,59	28,22	49,95	25,25	59,18
	6 HORAS	8	60,73 <sup>b</sup>	9,91	3,50	52,45	69,01	51,02	79,38
	12 HORAS	8	74,62 <sup>bc</sup>	8,72	3,08	67,33	81,91	64,58	86,60
	24 HORAS	8	85,66 <sup>c</sup>	12,79	4,52	74,96	96,35	63,16	101,09

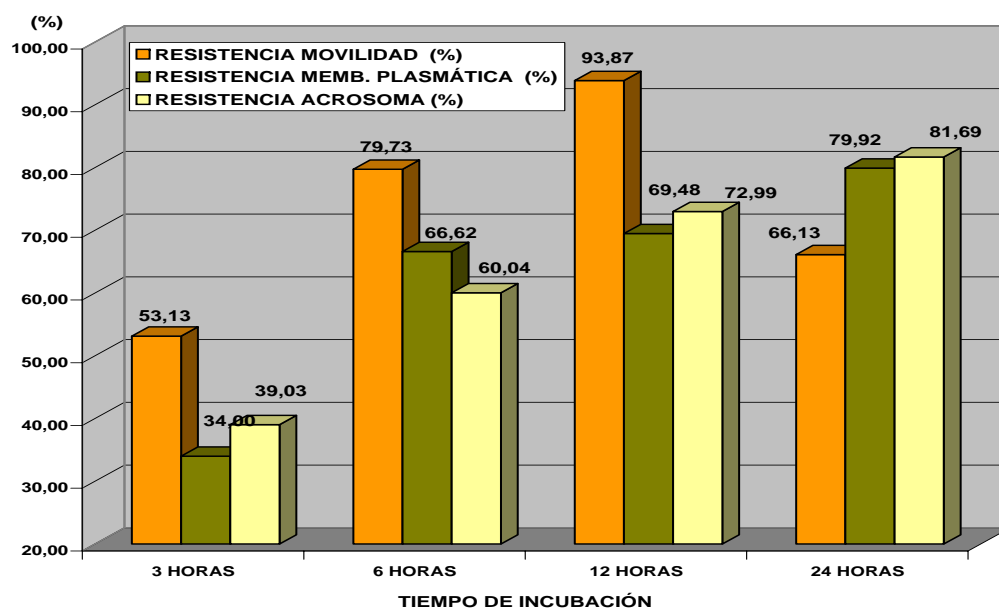
**Tabla 4.96:** Resistencia al choque a frigore que presentan los tres parámetros estudiados en los diferentes tiempos de incubación.

Distintos superíndices para el mismo parámetro indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tiempos de incubación.

Como puede apreciarse, la resistencia de los diferentes parámetros al someter las muestras a un descenso brusco de temperatura a 0 °C, mantenida durante 5 minutos, es elevada, pues alcanza máximos de un 96,8±8,1 % de movilidad espermática a las 12 horas y de un 84,5±7,4 % de vitalidad y un 85,7±12,8 % de integridad acrosómica a las 24 horas. Sin embargo, estos resultados podrían haberse visto notablemente mermados debido a la permanencia de los espermatozoides a 15 °C, por lo que, para poder acercarnos a una determinación más fiable de qué tiempo de los establecidos resulta más apropiado para que un mayor porcentaje de espermatozoides resistan a todo el proceso, realizamos nuevamente la correspondiente corrección, tomando como referencia, en este caso, aquellos valores calculados tras la extracción del eyaculado, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Resistencia Choque (\%)} = \frac{\% \text{ Parámetro después Choque } \times 100}{\% \text{ Parámetro 0 horas}}$$

Los valores calculados (figura 4.56 y tabla 4.97) no revelan diferencias esenciales con los anteriores, resultando ser la incubación durante 24 horas la que ofrece un porcentaje más alto de integridad de membrana plasmática y de acrosoma tras el choque a frigore, con medias de un 79,9±5,8 % y un 81,7±12,1 %, respectivamente, y la realizada durante 12 horas aquella que muestra el mayor porcentaje de movilidad espermática, con una media de un 93,9±8,1 %.



**Figura 4.56:** Resistencia de las diferentes estructuras analizadas a la prueba del choque a frigore en los diferentes tiempos de incubación (se emplean como referencia los valores iniciales). Distintos superíndices para el mismo parámetro indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tiempos de incubación.

		n	Media	Desv. típ.	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%			
						Límite inferior	Límite superior	Mínimo	Máximo
RESISTENCIA MOVILIDAD (%)	3 HORAS	8	53,13 <sup>a</sup>	21,07	7,45	35,52	70,75	27,77	83,56
	6 HORAS	8	79,73 <sup>bc</sup>	11,42	4,04	70,18	89,27	64,27	97,24
	12 HORAS	8	93,87 <sup>c</sup>	8,13	2,87	87,07	100,66	83,66	111,87
	24 HORAS	8	66,13 <sup>ab</sup>	21,22	7,50	48,39	83,88	35,60	90,91
RESISTENCIA MEMB. PLASMÁTICA (%)	3 HORAS	8	34,00 <sup>a</sup>	16,34	5,78	20,34	47,65	20,11	61,33
	6 HORAS	8	66,62 <sup>b</sup>	11,27	3,98	57,20	76,04	49,43	81,77
	12 HORAS	8	69,48 <sup>b</sup>	7,49	2,65	63,22	75,74	60,60	82,60
	24 HORAS	8	79,92 <sup>b</sup>	5,83	2,06	75,05	84,79	71,74	86,93
RESISTENCIA ACROSOMA (%)	3 HORAS	8	39,03 <sup>a</sup>	12,93	4,57	28,22	49,84	25,00	59,18
	6 HORAS	8	60,04 <sup>b</sup>	9,80	3,46	51,85	68,23	50,00	78,57
	12 HORAS	8	72,99 <sup>bc</sup>	8,43	2,98	65,94	80,04	63,27	84,85
	24 HORAS	8	81,69 <sup>c</sup>	12,06	4,26	71,60	91,77	60,00	95,88

**Tabla 4.97:** Resistencia de las diferentes estructuras analizadas a la prueba del choque a frigore en los diferentes tiempos de incubación (se emplean como referencia los valores iniciales). Distintos superíndices para el mismo parámetro indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tiempos de incubación.

#### 4.4.3.2. Influencia del tiempo de incubación sobre la resistencia celular a la congelación.

En la tabla 4.98 se detallan los resultados obtenidos en las valoraciones realizadas a las muestras de semen congelado tras los cuatro tiempos de incubación.

		n	Media	Desv. tip.	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
<b>PORCENTAJE MOVILIDAD</b>	3 HORAS	8	54,04 <sup>ac</sup>	12,39	4,38	43,69	64,40	40,83	74,60
	6 HORAS	8	58,00 <sup>a</sup>	11,19	3,96	48,65	67,36	46,21	74,70
	12 HORAS	8	57,92 <sup>a</sup>	9,98	3,53	49,57	66,26	44,38	70,47
	24 HORAS	8	48,55 <sup>c</sup>	18,83	6,66	32,81	64,29	22,22	77,84
<b>INTEGRIDAD MEMB. PLASMÁTICA (%)</b>	3 HORAS	8	48,84 <sup>a</sup>	5,31	1,88	44,40	53,29	39,75	55,00
	6 HORAS	8	53,09 <sup>ab</sup>	3,85	1,36	49,88	56,31	48,50	59,50
	12 HORAS	8	56,22 <sup>bc</sup>	4,00	1,42	52,87	59,57	51,25	64,75
	24 HORAS	8	60,13 <sup>c</sup>	4,02	1,42	56,77	63,48	52,25	66,00
<b>INTEGRIDAD ACROSOMA (%)</b>	3 HORAS	8	19,63 <sup>a</sup>	3,58	1,27	16,63	22,62	15,00	23,00
	6 HORAS	8	20,75 <sup>a</sup>	4,86	1,72	16,68	24,82	14,00	28,00
	12 HORAS	8	25,75 <sup>ab</sup>	4,83	1,71	21,71	29,79	19,00	30,00
	24 HORAS	8	30,75 <sup>b</sup>	6,50	2,30	25,32	36,18	23,00	40,00

**Tabla 4.98:** Valores medios obtenidos para los tres parámetros estudiados tras la realización del choque en los diferentes tiempos de incubación.

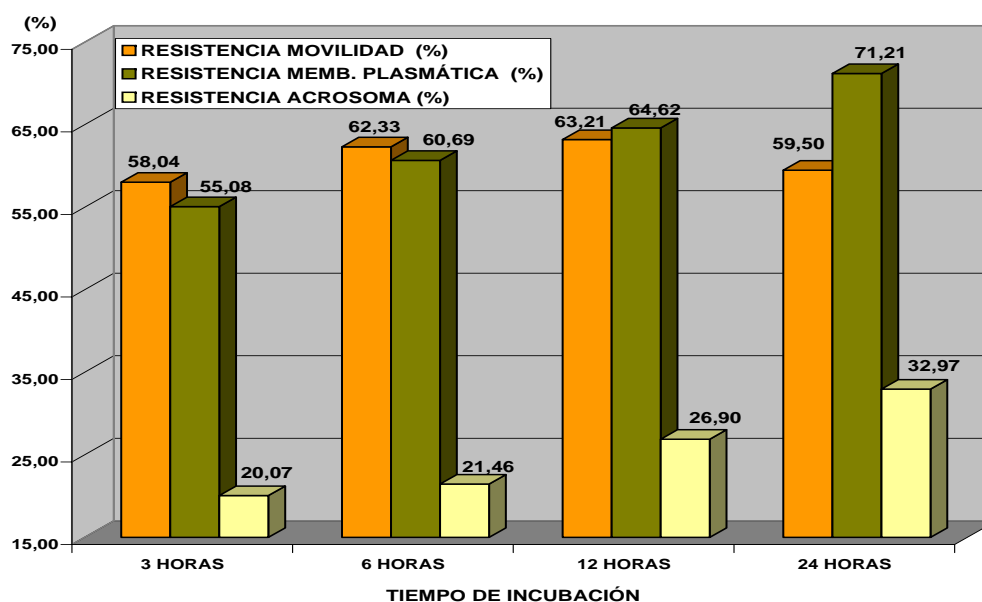
Distintos superíndices para el mismo parámetro indica diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los tiempos de incubación.

Los valores relativos a la integridad de la membrana plasmática y a la de la vesícula acrosómica aumentan ( $p < 0,05$ ) a medida que transcurre el tiempo de incubación; la vitalidad se ve incrementada de un  $48,8 \pm 5,3\%$  al emplear el tiempo de incubación habitual en los protocolos (3 horas), a un  $60,1 \pm 4,0\%$  al utilizar el de 24 horas, mientras que el acrosoma pasa de una integridad media de un  $19,6 \pm 3,6\%$  a un  $30,8 \pm 6,5\%$  en esos mismos tiempos.

En cambio, el porcentaje de movilidad espermática ya no experimenta un aumento constante en los valores a medida que transcurre la incubación, sino que incluso, de la misma forma que sucedía en el choque *a frigore*, después de la incubación efectuada durante 24 horas, se aprecian valores medios significativamente más bajos ( $p < 0,05$ ) que los obtenidos a las 6 y a las 12 horas.

Para establecer de una forma más precisa el efecto provocado por el proceso de congelación propiamente dicho, realizamos una corrección en los mismos términos que la efectuada con los datos correspondientes al choque *a frigore*, para así obtener la resistencia de los diferentes parámetros evaluados al proceso de congelación (figura 4.57 y tabla 4.99).

Podemos comprobar cómo, al igual que lo expuesto con el choque *a frigore*, el incremento de la resistencia espermática ( $p < 0,05$ ), tanto para la integridad de membrana como para la del acrosoma, se produce a medida que aumenta el tiempo de incubación previo, y el porcentaje movilidad no muestra diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre ninguno de los tiempos analizados.



**Figura 4.57:** Resistencia a la congelación observada por los tres parámetros estudiados en los diferentes tiempos de incubación.

Distintos superíndices para el mismo parámetro indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tiempos de incubación.

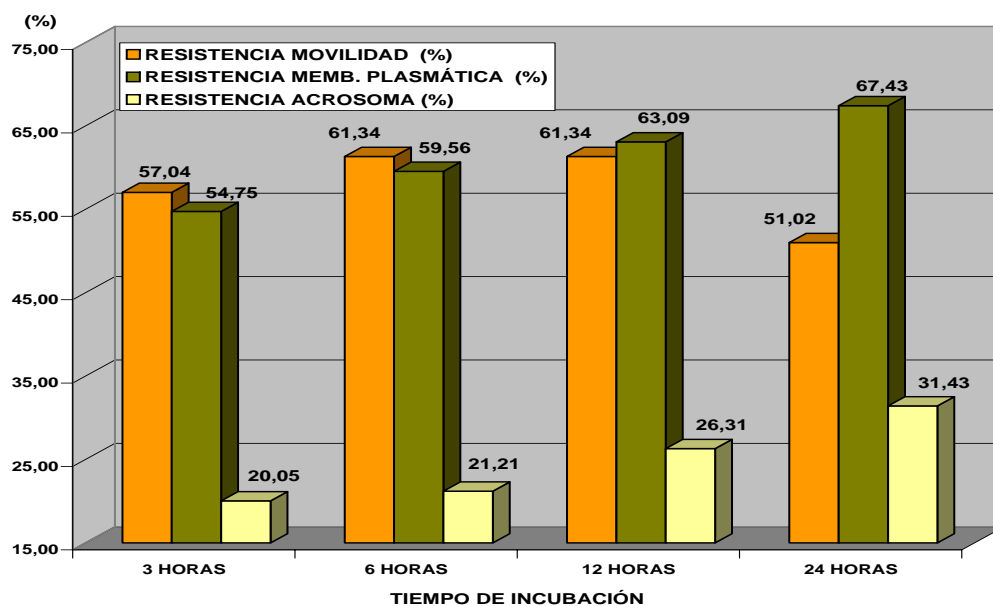
		n	Media	Desv. típ.	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%			
						Límite inferior	Límite superior	Mínimo	Máximo
RESISTENCIA MOVILIDAD (%)	3 HORAS	8	58,04 <sup>a</sup>	11,53	4,07	48,41	67,68	44,97	78,23
	6 HORAS	8	62,33 <sup>a</sup>	9,98	3,53	53,99	70,68	48,99	77,19
	12 HORAS	8	63,21 <sup>a</sup>	8,70	3,08	55,94	70,48	49,19	73,28
	24 HORAS	8	59,50 <sup>a</sup>	20,31	7,18	42,52	76,48	29,45	90,22
RESISTENCIA MEMB. PLASMÁTICA (%)	3 HORAS	8	55,08 <sup>a</sup>	5,64	1,99	50,37	59,79	45,95	62,86
	6 HORAS	8	60,69 <sup>ab</sup>	4,43	1,56	56,99	64,39	55,43	68,00
	12 HORAS	8	64,62 <sup>bc</sup>	5,14	1,82	60,33	68,91	57,91	74,86
	24 HORAS	8	71,21 <sup>c</sup>	5,23	1,85	66,84	75,58	62,95	79,52
RESISTENCIA ACROSOMA (%)	3 HORAS	8	20,07 <sup>a</sup>	3,65	1,29	17,03	23,12	15,15	23,47
	6 HORAS	8	21,46 <sup>a</sup>	5,07	1,79	17,22	25,70	14,29	28,87
	12 HORAS	8	26,90 <sup>ab</sup>	5,09	1,80	22,65	31,16	19,79	31,58
	24 HORAS	8	32,97 <sup>b</sup>	7,16	2,53	26,99	38,95	25,00	43,01

**Tabla 4.99:** Resistencia al proceso de congelación observada por los tres parámetros estudiados en los diferentes tiempos de incubación.

Distintos superíndices para el mismo parámetro indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tiempos de incubación.

Tras realizar la corrección de los valores con respecto a los porcentajes de los parámetros analizados en el semen fresco, para así establecer el tiempo de incubación más apropiado que permita obtener los valores más altos en el proceso de congelación/descongelación (figura 4.58 y tabla 4.100), observamos que la resistencia de la membrana plasmática y de la acrosómica a la prueba, es similar, alcanzando, a las 24 horas de incubación, máximos de un  $67,4 \pm 4,7\%$  y un  $31,4 \pm 6,7\%$ , respectivamente, por lo que podemos concluir que el descenso de calidad que se

produce al permanecer las muestras a 15 °C durante todo el tiempo de la prueba, no es tan acusado como el incremento de resistencia de estas dos estructuras al citado proceso.



**Figura 4.58:** Resistencia al proceso de congelación para los tres parámetros estudiados en los diferentes tiempos de incubación.

Distintos superíndices para el mismo parámetro indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tiempos de incubación.

		n	Media	Desv. típ.	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
RESISTENCIA MOVILIDAD (%)	3 HORAS	8	57,04 <sup>ac</sup>	10,72	3,79	48,08	66,00	44,76	75,19
	6 HORAS	8	61,34 <sup>a</sup>	9,61	3,40	53,31	69,38	48,64	75,29
	12 HORAS	8	61,34 <sup>a</sup>	8,75	3,09	54,03	68,66	46,72	71,02
	24 HORAS	8	51,02 <sup>c</sup>	17,98	6,36	35,99	66,04	23,39	79,09
RESISTENCIA MEMB. PLASMÁTICA (%)	3 HORAS	8	54,75 <sup>a</sup>	5,75	2,03	49,94	59,56	45,17	63,22
	6 HORAS	8	59,56 <sup>ab</sup>	4,65	1,64	55,68	63,45	54,95	67,61
	12 HORAS	8	63,09 <sup>bc</sup>	5,13	1,81	58,80	67,38	58,24	73,58
	24 HORAS	8	67,43 <sup>c</sup>	4,65	1,64	63,55	71,32	59,38	75,00
RESISTENCIA ACROSOMA (%)	3 HORAS	8	20,05 <sup>a</sup>	3,66	1,30	16,99	23,12	15,00	23,47
	6 HORAS	8	21,21 <sup>a</sup>	4,99	1,76	17,04	25,38	14,00	28,57
	12 HORAS	8	26,31 <sup>ab</sup>	4,90	1,73	22,21	30,41	19,59	30,61
	24 HORAS	8	31,43 <sup>b</sup>	6,68	2,36	25,84	37,01	23,71	40,82

**Tabla 4.100:** Resistencia al proceso de congelación para los tres parámetros estudiados en los diferentes tiempos de incubación.

Distintos superíndices para el mismo parámetro indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tiempos de incubación.

En cambio, el porcentaje de movilidad de los espermatozoides presenta a las 24 horas una caída similar a la observada en los valores analizados sin corrección alguna, pasando del  $61,3 \pm 8,8$  % que mostraba a las 12 horas a un  $52,0 \pm 18,0$  %. Este descenso, teniendo en cuenta los resultados

calculados para el proceso de congelación propiamente dicho (tabla 4.99), no estaría motivado por una reducción en la resistencia de los espermatozoides al mismo, sino que es debido a la reducción de movilidad producida por la permanencia de las muestras a 15 °C.





## Capítulo 5

# DISCUSIÓN



## 5.1. Calidad de las muestras descongeladas.

### 5.1.1. Movilidad e integridad de la membrana plasmática tras la descongelación.

La calidad de las muestras una vez descongeladas se refleja en porcentajes medios de integridad de la membrana plasmática y de motilidad total de los espermatozoides (54,9 % y 47,8 %, respectivamente) similares a los recogidos por los autores que diseñaron la técnica empleada (Bwanga *et al.*, 1990; 1991a; 1991b), manteniéndose ambos dentro del rango establecido por posteriores estudios (Eriksson y Rodríguez-Martínez, 1999; Eriksson *et al.*, 2001; Peláez, 2003) en los que también se utilizó dicha técnica (entre un 43 % y un 61 %, para la vitalidad, y entre un 21,3 % y un 53 % para la motilidad).

A la hora de comparar nuestros resultados con los obtenidos en otros trabajos, es preciso tener en cuenta el método empleado en cada caso para realizar las diferentes valoraciones (Peláez, 2003); así, respecto a la integridad de la membrana plasmática se emplea la combinación de DCF e IP sólo en uno de los trabajos mencionados, obteniendo en él promedios inferiores a los nuestros. De la misma forma, la cuantificación del porcentaje de motilidad se ve afectada por el método de valoración, pudiéndose apreciar que en los trabajos consultados los resultados inferiores aparecen en los que la motilidad se valoró mediante una estimación visual de la misma (como pueden ser Peláez, 2003 o Kumar *et al.*, 2003), mientras que en aquellos otros en los que se utilizó un sistema computarizado de análisis seminal, permanecieron en un rango más alto y acotado que el mencionado (44-53 %), dentro del cual se encuadran también nuestros resultados. Esta falta de uniformidad entre la utilización de un sistema CASA y la estimación visual ha sido recogida por autores como Blanco-Palau (1998) y Vyt *et al.* (2004b), que manifiestan lo poco apropiado que resultan estas comparaciones debido a las pobres correlaciones existentes entre ambos métodos. Por su parte, Holt (1997) e Hirai *et al.* (2001) consideran mucho más adecuada la utilización del sistema CASA para este fin, tanto por la considerable reducción de la subjetividad, como por presentar un mayor poder discriminante que la estimación visual. A la luz de los resultados obtenidos, podemos considerar que la elección de estos métodos de valoración ha sido acertada, y su ejecución correcta.

La incubación de las muestras descongeladas en un diluyente con cafeína produjo el habitual incremento general en la movilidad total (Domínguez *et al.*, 1985; Fattouh y Abdou, 1991), que no fue similar en todas ellas, sino que posiblemente se vio condicionado por el porcentaje inicial que presentaban las muestras, siendo superior el incremento observado en aquellas que tenían una pobre movilidad, e inferior o nulo en aquellas otras con una movilidad más o menos elevada (Garbers *et al.*, 1971a; Domínguez *et al.*, 1985; Fattouh y Abdou, 1991). Los resultados obtenidos confirman este dato, ya que el citado incremento en el porcentaje de movilidad estuvo inversamente relacionado con la movilidad de la muestra ( $r=-0,585$ ), de forma similar a lo observado por Peláez (2003).

Las diferencias existentes entre los porcentajes medios de espermatozoides vivos y móviles en las muestras descongeladas, que en nuestro trabajo, con algo más de un 7% de espermatozoides vivos sin movimiento, no son muy acusadas, han sido observadas por varios autores (Medrano y Holt, 1998; Eriksson y Rodríguez-Martínez, 2000b; Peláez, 2003). La presencia de estos espermatozoides puede ser debida a un estado metabólico bajo de los mismos (Medrano y Holt, 1998), o bien a que presenten, como consecuencia del enfriamiento (Peterson *et al.*, 1979; Watson y Plummer, 1985; White, 1993; Bailey y Buhr, 1995), concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  excesivamente altas, lo cual resulta muy perjudicial para la motilidad. Se ha determinado que ambas circunstancias pueden ser revertidas con la incubación en un medio con cafeína (Peláez, 2003), por lo que parece acertada la utilización de esta sustancia para manifestar la capacidad mótil de los espermatozoides descongelados.

En efecto, la incubación con cafeína revierte esta situación, hasta el punto de que el porcentaje de células con movilidad llega incluso a superar en un 13% al de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra, no pudiendo confirmar la aseveración realizada por Makler *et al.* (1980), en la que exponía que la cafeína sólo presentaba un efecto en aquellas células que la mantenían.

La posibilidad de que células catalogadas como “muertas” puedan manifestar movilidad podría ser explicado por dos hipótesis:

- La existencia de células espermáticas que presentan la membrana plasmática dañada pero que, a su vez, evidencian movilidad en un breve espacio de tiempo resulta factible (fundamentalmente si son estimuladas de forma artificial), pero van a estar condenadas a la supresión de la movilidad a medio/largo plazo, como consecuencia de la pérdida del transporte activo y de la permeabilidad selectiva del plasmalema (Watson, 1995), hecho que ya había comprobado Valcárcel *et al.* (1994) al incubar las muestras a 37 °C durante un determinado tiempo.
- Si bien ciertos autores opinan que para realizar la valoración de la integridad del plasmalema el IP resulta más apropiado, por su mayor sensibilidad, que otras sustancias empleadas para detectar los daños celulares, como el verde rápido (Valcárcel *et al.*, 1994) o la bisbenzimidida (Baltés, 1993), hay otros que proponen su posible toxicidad, al penetrar en células que en un principio muestran integridad en su membrana plasmática (Pintado *et al.*, 2000), con lo que el porcentaje de espermatozoides vivos se vería artificialmente reducido.

### 5.1.2. Integridad acrosómica tras la descongelación.

Los resultados que hemos obtenido en la evaluación de la integridad acrosómica no corroboran la teoría expuesta por varios autores, que consideran que el acrosoma presenta mayor estabilidad que la membrana plasmática ante fenómenos adversos, entre los cuales se encuentran, la criopreservación (Ortman y Rodríguez-Martínez, 1994) y el choque *a frigore* (Harrison y Vickers, 1990). Los valores recogidos en nuestro trabajo se aproximan más a los de Thilmant (1997) o Roca *et al.* (1999), cuyos promedios son inferiores a los que presenta la membrana plasmática. Este hecho

puede ser una consecuencia, en parte, de la utilización de técnicas analíticas diferentes, ya que la elección de una u otra, al igual que se expuso con la motilidad y la vitalidad, puede alterar significativamente los resultados obtenidos, debido a la diferente capacidad de discriminación del estado del acrosoma que tiene cada una (Paulenz *et al.*, 1995; Ortman y Rodríguez-Martínez, 1994). Thilmant (1997) y Roca *et al.* (1999) utilizaron la misma técnica que nosotros, la evaluación bajo microscopía de contraste de fases, basada en la técnica descrita por Pursel y Johnson (1974), mientras que los que abogan por la mayor estabilidad de la membrana acrosómica han recurrido a técnicas fluorescentes para su valoración; no obstante, existen trabajos, como el de Almlid *et al.* (1989), en los que, utilizando el contraste de fases, se observan porcentajes medios de integridad del acrosoma superiores a los de la membrana plasmática.

### 5.1.3. Resistencia al proceso de criopreservación.

A pesar de que los protocolos empleados para la criopreservación de semen porcino han sufrido notables modificaciones en los últimos años, con el fin de reducir el efecto deletéreo que el proceso produce sobre los espermatozoides, para así conseguir una mejor calidad del semen descongelado, la pérdida de viabilidad espermática sigue siendo considerable, puesto que únicamente sobreviven a la criopreservación en torno a un 50 % (Curry y Watson, 1994; Holt, 1997; Watson, 1995 y 2000; Bailey *et al.*, 2008).

La corrección realizada sobre todos los parámetros valorados nos permite conocer la verdadera resistencia de las diferentes estructuras analizadas a la congelación/descongelación, y se aprecia cómo, en efecto, en todas ellas disminuye notablemente el porcentaje de “normalidad” que mostraban en fresco. En concreto, los resultados obtenidos nos muestran que el 62,86 % de los espermatozoides mantuvieron la integridad de la membrana plasmática, el 23,8 % la de la membrana acrosómica y que la movilidad permaneció en el 52,2 % de las células, pasando este último porcentaje a un 74,6 % al incubar las muestras con cafeína.

A pesar de la importancia conferida a la raza en otros trabajos (Johnson *et al.*, 1981 y 1982.; Almlid y Hofmo, 1996; Thurston *et al.*, 2001) en relación a la congelabilidad del semen, no pudimos observar ninguna influencia de aquella, ni sobre la calidad posdescongelado, ni sobre la resistencia al proceso de criopreservación, en ninguno de los parámetros estudiados.

En cambio, donde sí se han apreciado notables diferencias en todos ellos, ha sido en los promedios obtenidos por cada verraco, corroborando la alta variabilidad individual descrita por numerosos autores (Medrano y Holt, 1998; Holt *et al.*, 2005; Roca *et al.*, 2006a). Esta marcada diferencia en la resistencia del semen de los diferentes animales al proceso posibilita la distinción entre verracos con una buena y una mala capacidad para la congelación (Watson, 1995), como queda de manifiesto al analizar los promedios calculados para los diferentes parámetros, donde los machos L437 y G2552 presentan los valores más bajos en todos ellos, y el R4052 y el R5487 los más altos, también en todos ellos.

#### 5.1.4. Grupos de calidad establecidos.

El verraco es el factor que ejerce una mayor influencia en la criopreservación de un eyaculado, más incluso que las condiciones de criopreservación (Medrano y Holt, 1998; Roca *et al.*, 2006a). No obstante, aunque las buenas características espermáticas observadas tras la descongelación en el material seminal de un determinado animal, en bastantes ocasiones son similares en sucesivos eyaculados (Roca *et al.*, 2006a), no existe evidencia alguna de que esto vaya a mantenerse a lo largo del tiempo; de hecho, varios autores han descrito esta variabilidad intraverraco (Pelález, 2003; Roca *et al.*, 2006b), y es que, la capacidad de criopreservación puede verse modificada por diversas circunstancias, como cambios transitorios en la salud del animal, o inapropiadas actuaciones, tanto en la extracción del semen (Holt, 2000a) como en la posterior manipulación antes de que tenga lugar la congelación (Roca *et al.*, 2006b), además de por factores como la edad, la época del año o las condiciones ambientales (Wilkins y Kennedy, 1985; Woelders *et al.*, 1996).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo permiten entrever esta variabilidad, ya que distintos eyaculados de un mismo verraco están clasificados en grupos de calidad diferentes, Buenos Congeladores (BC), Congeladores Medios (CM) y Malos Congeladores (MC); en concreto, esto ocurre en tres de los ocho animales empleados (el R4052, el G2552 y el G5223), presentando promedios dispares entre los eyaculados en alguno de los parámetros analizados. No obstante, las variaciones existentes parece que no han de suponer modificaciones sustanciales en la capacidad de criopreservación, puesto que los valores medios calculados en prácticamente todos los parámetros de los tres grupos de calidad resultan más que aceptables, si consideramos los resultados publicados con anterioridad.

En clasificaciones similares Holt *et al.* (2005) obtuvieron promedios de vitalidad para los grupos MC, CM y BC de 17,2 %, 28,7 % y 37,2 %, respectivamente, mientras que Roca *et al.* (2006a) recogieron valores algo superiores, con medias de 17,01 %, 32,81 % y 54,86 %, en los mismos parámetros y para los mismos grupos. En nuestro trabajo, al tomar como referencia para establecer las tres categorías de aptitud para la congelación, la resistencia de los distintos parámetros a la criopreservación, en lugar de simplemente el valor medio obtenido en la evaluación de las muestras descongeladas, es lógico que los promedios de cada grupo resulten algo más elevados, situándose en un 45,49 %, un 66,5 % y un 75,70 %, respectivamente (tabla 4.17). A pesar de haber utilizado criterios diferentes, la comparación con los otros trabajos nos sirve para valorar muy satisfactoriamente el resultado de todo el proceso, sobre todo teniendo en cuenta que la estimación esperada de supervivientes al mismo ronda el 50 % (Watson, 1995; 2000; Curry, 2000).

En los mencionados trabajos los promedios de movilidad quedan establecidos, para los citados grupos, en un 17,7 %, un 22,7 % y un 54,1 %, en el estudio de Holt *et al.* (2005), y en un 18,29 %, un 39,80 % y un 59,37 % en el de Roca *et al.* (2006a), mientras que en el nuestro, habiendo incubado las muestras con cafeína, observamos una resistencia en el 60,28 %, el 78,26 % y el 83,08 % de los espermatozoides en los citados grupos (tabla 4.17). La comparación, aun no existiendo un mismo criterio para el establecimiento de los grupos, pone de manifiesto que los animales utilizados en este trabajo presentan una mayor capacidad para la criopreservación que

los empleados por los otros autores, ya que, sobre todo en el grupo de malos congeladores, se puede observar que las medias de resistencia son notablemente altas.

## 5.2. Experimento 1: Estudio de las pruebas de laboratorio como indicadores de la congelabilidad seminal

### 5.2.1. Valoración convencional del semen.

Si observamos los resultados medios de los parámetros empleados en las pruebas rutinarias de contrastación seminal, se comprueba que los eyaculados presentan valores dentro del rango establecido como normal para esta especie (Martín-Rillo, 1982; Kondracki *et al.*, 2006; González-Urdiales *et al.*, 2006). Al centrarnos en el volumen y en la concentración de los eyaculados, se aprecian grandes oscilaciones en los resultados respecto a sus valores medios, corroborando lo expuesto por Martín-Rillo (1982), que considera que ambos parámetros están muy expuestos a diversos factores de variación, como la edad, el estado sanitario, la aclimatación, la época del año, el fotoperiodo, el ritmo de extracción, la raza o las variaciones genéticas de carácter individual; no obstante, únicamente los dos últimos resultarían condicionantes en nuestro estudio, puesto que el resto permanecieron más o menos constantes para todos los animales. De todos modos, no pudieron apreciarse diferencias estadísticamente significativas entre razas, si bien los eyaculados de raza Landrace mostraron una tendencia a presentar valores superiores en ambos parámetros. Esta ausencia de significación podría deberse al hecho de que las dos razas empleadas (Large White y Landrace) son incluidas por Martín-Rillo (1982) dentro del grupo de las más productivas, claramente por encima de la Blanco Belga, la Pietrain o la Hampshire, resultando mucho más complicado encontrar significación entre ellas y más aun, si tenemos en cuenta que los verracos utilizados provienen de un Centro de IA comercial que somete a sus animales a una selección continua basada en los parámetros seminales convencionales analizados en este experimento.

Tampoco se aprecian diferencias entre las dos razas empleadas en el análisis de la movilidad espermática, en el que se observa una clara variación entre la valoración subjetiva y la realizada por el sistema computarizado. Las pobres correlaciones encontradas por Blanco-Palau (1998) y Vyt *et al.* (2004b) entre estos métodos de valoración (ya comentadas en el apartado relativo a las muestras descongeladas) responden a que ambos emplean una metodología completamente distinta en la determinación de la movilidad espermática, hasta el punto de que las conclusiones elaboradas a partir de ellas, pueden resultar contradictorias (Tejerina, 2008). La mayor capacidad de discriminación del sistema CASA, reflejada en nuestro estudio en la determinación de diferencias significativas entre las medias obtenidas por verraco (algo para lo que la estimación visual se reveló incapaz), corrobora la conclusión a la que llegaron Holt (1997) e Hirai *et al.* (2001), que consideraban la valoración computarizada mucho más apropiada para el análisis cinético.

Por su parte, la incubación con cafeína registró un ligero aumento en el porcentaje medio de movilidad, pero sin significación estadística, posiblemente como consecuencia del débil o nulo

efecto, ya mencionado, que ejerció en las muestras en que la movilidad inicialmente ya era elevada (Garbers *et al.*, 1971a; Domínguez *et al.*, 1985; Fattouh y Abdou, 1991), como resulta en este caso (91,3 %).

La alta calidad de los eyaculados empleados queda patente, no sólo en el porcentaje de espermatozoides que manifiestan movilidad, sino también con los altos promedios de integridad del acrosoma, de vitalidad o de células con morfología normal; este último parámetro fue uno de los pocos en los que se pudieron apreciar diferencias significativas entre razas, mostrando los eyaculados de la raza Large White, un mayor porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales que los de la raza Landrace. Esta observación, debido a la tendencia mostrada en nuestro estudio por los eyaculados Landrace a presentar una mayor resistencia al proceso de criopreservación, parece estar en oposición con lo relatado por autores como Roca *et al.* (2006a), en semen porcino, o Dorado *et al.* (2008), en semen de macho cabrío, que plantearon que la normalidad morfológica de las células estaba directamente relacionada con la congelabilidad de los eyaculados.

La aparente falta de relación que nosotros observamos entre la resistencia al proceso y la morfología celular vuelve a quedar de manifiesto al analizar los resultados medios de los diferentes verracos, donde se puede comprobar cómo el R5487 (aquel que mostró una mayor capacidad de criopreservación) presenta el segundo menor porcentaje de células morfológicamente normales, estando incluso por debajo del promedio calculado para el L437 (en teoría, el más sensible a la congelación/descongelación), si bien, hay que indicar que no se encontraron diferencias significativas entre ellos.

Si seguimos fijándonos en los valores medios calculados para cada verraco y en las posibles diferencias entre ellos, comprobamos que la integridad, tanto de la membrana plasmática, como de la acrosómica, sí muestra un patrón algo más relacionado con la capacidad de congelación de los diferentes animales, siendo las diferencias encontradas entre los animales más sensibles y los más resistentes a la criopreservación, estadísticamente significativas; y es que, en cierto modo, la distribución de los resultados medios de cada verraco, puede proporcionarnos una visión aproximada de la influencia de un determinado parámetro sobre la congelabilidad de un eyaculado, o cuando menos, detectar una posible ausencia de relación entre ellos, dado que el individuo ejerce una gran influencia sobre la variabilidad de los eyaculados criopreservados, no sólo en porcino (Larsson y Einarsson, 1976; Thurston *et al.*, 2001 y 2002; Medrano *et al.*, 2002a; Saravia *et al.*, 2005; Roca *et al.*, 2006a) sino también en otras especies, como la equina (Janett *et al.*, 2003) y la ovina (D'Alessandro y Martemucci, 2003). No obstante, establecer conclusiones a partir de estas impresiones resulta poco fiable, tanto por la falta de consistencia estadística, como por la variabilidad que presentan los eyaculados criopreservados de un mismo verraco (Watson, 1995; Holt, 2000a), que ha sido achacada a diversos factores, como pueden ser cambios transitorios en la salud del animal o una incorrecta manipulación del material seminal (Roca *et al.*, 2006b).

Resulta más apropiado el análisis del comportamiento de los tres grupos de calidad establecidos en función de la capacidad de criopreservación, ya que confiere un mayor peso a los resultados



individuales de los eyaculados; en él se confirma que los valores medios de concentración, de integridad de ambas membranas y del porcentaje de movilidad de las muestras incubadas con cafeína, presentan una cierta sincronía con la aptitud para la congelación de los eyaculados, puesto que se recogieron los valores más altos para estos parámetros en el grupo BC, los intermedios en el CM y los más bajos en el grupo MC, siendo el porcentaje de movilidad con cafeína el menos indicativo de los cuatro, al no detectarse diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos. Los resultados obtenidos nos sugieren, por una parte, que los eyaculados con una baja concentración van a ser notablemente más sensibles al proceso de congelación/descongelación que aquellos otros que presentan medias superiores a 289 mill. spz/ml (considerando que esta concentración corresponde a la de la fracción rica del eyaculado diluida con 100 ml de diluyente seminal) y, por otra parte, que la integridad de ambas membranas, sobre todo la de la plasmática, puede ser utilizada para discriminar eyaculados que presentan, únicamente, alta capacidad de criopreservación, ya que, aunque el grupo BC manifiesta diferencias evidentes con el MC, éstas no se aprecian entre los grupos CM y MC.

Una aproximación más a la relación existente entre la congelabilidad de las muestras y las valoraciones convencionales de semen realizadas en los Centros de IA comerciales, nos la aporta el establecimiento de coeficientes de correlación entre éstas y los cuatro índices calculados para la resistencia al proceso. Entre estos coeficientes destacan, por sus correlaciones significativas con los cuatro índices posdescongelación, las valoraciones de la concentración y del porcentaje de espermatozoides con integridad en su plasmalema. El alto coeficiente establecido entre la congelabilidad de los eyaculados y su concentración no resulta sorprendente puesto que ya en 1993, Colenbrander *et al.* propusieron este parámetro como criterio de calidad seminal, debido a la relación mostrada con la capacidad fecundante de los eyaculados; así mismo, fue posteriormente incluido por Roca *et al.* (2006a) en los modelos de regresión lineal creados para la predicción de la capacidad de criopreservación del semen porcino, a partir de parámetros seminales analizados convencionalmente. No obstante, sería interesante realizar un estudio más en profundidad de la influencia de la concentración, ya que existen otros trabajos en los que no se aprecian diferencias ni en la fertilidad ni en la prolificidad en función de este parámetro (Gadea, 1996), e incluso algún estudio en torno a la relación existente entre las valoraciones seminales y la calidad posdescongelación, determina que aquellos eyaculados con una baja concentración resultan mucho más apropiados para la criopreservación (Gosálvez *et al.*, 2002).

Este tipo de discrepancias acerca de la importancia de la concentración de un eyaculado podrían estar motivadas, bien por la falta de uniformidad en el rango de concentración de los diferentes trabajos, o bien por lo complejo que resulta recoger la fracción rica, ya que en la práctica, la separación de las dos últimas fases del eyaculado (la rica o espermática y la posespermática) no resulta tan sencilla, puesto que con frecuencia aparecen intercaladas, haciendo francamente complicado evitar la recolección de parte de la posespermática junto con la fracción rica, y ello conlleva, entre otros efectos, una reducción sustancial de la concentración, con el consiguiente aumento del volumen. En definitiva, la presencia de parte de esta fracción posespermática podría resultar determinante a la hora de estimar la aptitud de un eyaculado para la

criopreservación, puesto que se ha establecido que las células no pertenecientes a la fracción rica o espermática van a presentar una menor capacidad de adaptación frente a situaciones estresantes como el enfriamiento o la criopreservación (Polge, 1956; Selles *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003a).

Otro factor a tener en cuenta es el volumen recogido del eyaculado, que si bien resulta un factor que no mostró correlaciones significativas en nuestro trabajo, sí parece tener influencia en la criopreservación del semen porcino según otros autores, como Gosálvez *et al.* (2002). A pesar de que, tanto en el estudio de éstos como en el nuestro, se ha tratado de recolectar la fracción rica de los eyaculados, la mayoría de los valores medios obtenidos superan el límite máximo establecido por numerosos autores (Martínez *et al.*, 1986; 1992; Saiz *et al.*, 1994; Gerfen *et al.*, 1994; González-Urdiales *et al.*, 2006) para el volumen de la fracción rica (100 ml), lo cual induce a pensar que en aquellos que superan esta cifra se ha producido una incorporación de fracción posespermática. Nuestra experiencia profesional indica que los verracos cuyos eyaculados presentan una gran concentración muestran separaciones de las fases muy definidas, haciendo mucho más fácil la tarea de recoger únicamente su fracción rica, mientras que aquellos otros eyaculados con una baja concentración seminal suelen provenir de verracos en los que es mucho más complicado establecer los límites entre la fracción espermática y la posespermática, por lo que la incidencia de la recolección de parte de esta última es mucho mayor. Este hecho puede ser el causante de que las correlaciones obtenidas en nuestro estudio, a pesar de no mostrar significación estadística, resulten negativas para todos los índices, o de que Gosálvez *et al.* (2002) determinen en aquellos eyaculados con un volumen inferior a 100 ml, un porcentaje de movilidad tras la descongelación estadísticamente superior a los que presentaron volúmenes entre 100 y 150 ml, o incluso superiores a 150 ml.

El análisis de integridad de las membranas plasmática y acrosómica se muestra en nuestro estudio como una de las valoraciones más relacionadas con la resistencia espermática a la criopreservación; no obstante, a pesar de que el estado de ambas membranas, fundamentalmente de la plasmática, juega un papel importante tanto en la fisiología como en la adaptación de la célula a las variaciones ambientales acaecidas durante el proceso (sobre todo en relación a la reducción térmica y a los cambios osmóticos), no hemos podido constatar la existencia de ningún trabajo en el que aparezcan correlaciones interesantes entre el porcentaje de espermatozoides vivos del eyaculado y la resistencia de los mismos a la congelación/descongelación. En cambio, un parámetro que sí aparece con determinada frecuencia en los trabajos publicados, es la normalidad morfológica de los espermatozoides; así, Roca *et al.* (2006a) en semen porcino, y Dorado *et al.* (2008) en semen de macho cabrío, encuentran tanto correlaciones interesantes como modelos de regresión lineal que lo incorporan en un afán de determinar la variabilidad de las muestras descongeladas. En nuestro caso, el único coeficiente de correlación estadísticamente significativo para este parámetro, se encontró con la resistencia de la movilidad espermática, tras la incubación de las muestras descongeladas con cafeína. La morfología celular ha sido propuesta como criterio de selección de eyaculados fértiles en la mayoría de las especies (Evans y Maxwell, 1987; Colenbrander y Kemp, 1990; Leboeuf *et al.*, 2000), ya que numerosas alteraciones morfológicas están asociadas con problemas de fertilidad. De hecho, muchas de estas anomalías están originadas por

defectos en la génesis o en la maduración de las células (González-Urdiales *et al.*, 2006), lo que posiblemente dificulte su correcto funcionamiento, desde el punto de vista fisiológico, haciendo que la capacidad de adaptación que manifiestan frente a situaciones adversas sea más limitada que en aquellas otras que, teóricamente, presentan un pleno desarrollo.

### **5.2.2. Evaluación de la resistencia de las células espermáticas a un estrés hiposmótico (HOST Y ORT).**

Holt (2000b) expuso que la evaluación de la tolerancia al estrés osmótico cuando interviene el crioprotector, resulta un gran indicador de la supervivencia espermática a la criopreservación, ya que nos va a permitir identificar la respuesta celular tanto de la estructura de la membrana, como de su permeabilidad y elasticidad, estando todos estos datos muy relacionados con la capacidad de adaptación de la membrana a cambios del medio externo, como los que suceden en el proceso de congelación/descongelación. Curry y Watson (1994) determinaron que aquellas células supervivientes a este proceso representan a una subpoblación altamente resistente a cambios osmóticos, por lo que sugirieron que las diferencias en la sensibilidad de la membrana plasmática al transporte de agua, podría ser uno de los factores importantes en la determinación de células con una alta resistencia a la criopreservación.

Durante la adición del crioprotector y en la posterior congelación, tiene lugar una exposición de las células a condiciones hiperosmóticas, que en la descongelación pasan, de forma repentina, a ser de hipoosmolaridad. Estos cambios bruscos que tienen lugar en el proceso han llevado a diversos autores a evaluar la resistencia de las membranas a ambas situaciones, determinando la mayor resistencia celular a las condiciones hiperosmóticas que a las hipoosmóticas, dado que al rehidratar de nuevo las células se aprecia un mayor porcentaje de daños celulares. Este hecho ha sido observado tanto en espermatozoides humanos (Gao *et al.*, 1993b), como en los de conejo, toro, aves de corral o incluso arenques (Lovelock y Polge, 1954, en Curry y Watson, 1994), lo que sugiere que en la criopreservación, la lisis osmótica ocurre principalmente en la descongelación, y así se ha comprobado al analizar las muestras bajo criomicroscopía (Holt *et al.*, 1992). De hecho, y a pesar de que Watson y Duncan (1988) en semen de carnero obtuvieran buenas correlaciones entre los daños ocurridos tras la incubación en condiciones de hiperosmolaridad y los observados tras la criopreservación, la utilización de soluciones hiperosmóticas no ha proporcionado en general muchas correlaciones interesantes con la calidad de las muestras descongeladas en otras especies, como la equina o la porcina (Caiza de la Cueva *et al.*, 1997; 1997). Es posible que la variación de las condiciones en las que se desarrollaron estos trabajos tenga mucho que ver, ya que en el estudio de Watson y Duncan, la realización de una incubación a 0 °C pudiera llevar implícitos otros factores determinantes para la supervivencia posdescongelación, como la sensibilidad celular al descenso de temperatura. A la luz de los resultados obtenidos y coincidiendo con otros autores (Schilling *et al.*, 1984; Watson, 1995; Petzoldt *et al.*, 1996), hemos considerado más interesante optar por la incubación en medios hipoosmóticos para la búsqueda de una estimación de la capacidad de criopreservación de los eyaculados.

En nuestro estudio, la respuesta de los espermatozoides a la incubación a 37 °C en un medio hiposmótico, tanto durante 30 minutos como durante 60, mostró porcentajes medios de espermatozoides HOST positivos (con torsión de cola) dentro del rango descrito por otros autores para el semen de verraco (Gadea, 1996; Vázquez *et al.*, 1997). Las diferencias calculadas entre los promedios observados en cada uno de estos tiempos resultan ser estadísticamente significativas, en oposición a lo expuesto en otros trabajos, donde para la misma osmolaridad del medio, Pérez-Llano *et al.* (1998a) no apreciaron significación estadística entre 30 y 120 minutos, ni Vázquez *et al.* (1997) entre 5 y 120 minutos. No obstante, nuestros resultados se encuentran dentro del 8 % de variación entre tiempos relatado en este último trabajo, presentando además, una correlación muy alta ( $r = 0,995$ ) entre ambas pruebas. Todo ello nos lleva a pensar que la presencia de significación puede haberse debido a la elección del método estadístico empleado, ya que en ambos trabajos, al utilizar más de dos tiempos de incubación (cuatro y cinco), se optó por la realización de un análisis de la varianza (ANOVA), mientras que en nuestro estudio, al haber únicamente dos tiempos, optamos por un análisis de muestras dependientes mediante la prueba t- Student. El diseño del análisis de muestras dependientes busca dar una mayor validez a las inferencias obtenidas, controlando o eliminando la influencia de susceptibilidades individuales, de raza, de edad, etc., cuyo efecto no es deseable, puesto que podría interferir en los resultados de la prueba; es por esto por lo que la aparición de significación estadística en este tipo de pruebas es más probable que en otras, como el ANOVA o la t- Student para muestras independientes, en cuyo diseño sí se contempla la posible influencia de este tipo de variables, dada la aleatoriedad necesaria a la hora de incorporar sujetos a la prueba.

Las diferencias detectadas, tanto a nivel de raza (a favor de la raza Landrace), como entre los diferentes verracos, sugiere que el HOST resulta una prueba con una buena capacidad de discriminación entre eyaculados, apreciándose, además, una cierta concordancia con la resistencia al proceso de criopreservación; así, se observa que tanto la raza Landrace, como los dos verracos con mejores promedios en el test de endósmosis (R5487 y R4052), resultaron ser también los que habían mostrado medias de resistencia más altas tras el descongelado.

Por su parte, Schilling *et al.* (1984) realizaron, basándose en los resultados de la prueba de resistencia osmótica (ORT), una clasificación de la calidad seminal a partir de los porcentajes medios de movilidad y de integridad del acrosoma, tanto de los eyaculados como de los verracos, tras un periodo de conservación en refrigeración y congelación. Teniendo en cuenta estas clasificaciones, podemos considerar que todos los eyaculados empleados en nuestro trabajo son de calidad “muy buena”, ya que prácticamente todos los promedios se encontraron por encima del 71 % establecido por estos autores como límite inferior para este grupo de calidad (tabla 9.3). Del mismo modo, todos nuestros verracos ocupan el rango más elevado de calidad, al superar claramente el 65 % de promedio que se establece en el citado estudio para la categoría de “buenos reproductores” (tabla 4.33). Al igual que con el HOST, en el ORT se observan diferencias significativas entre los resultados medios de las incubaciones realizadas (a los 60 y a los 120 minutos), mostrando también una alta correlación entre ellos ( $r = 0,981$ ), por lo que se deduce que ambos tiempos de incubación pueden ser utilizados para valorar el estado funcional de la membrana por

medio de esta técnica.

Tanto para el HOST como para el ORT, la posibilidad de realizar reducciones en el tiempo de incubación facilitaría su aplicación en los laboratorios comerciales convencionales. Como hemos indicado, en nuestro trabajo las diferencias apreciadas entre incubaciones en ambas pruebas, aunque mínimas, son significativas y altamente correlacionadas, lo cual implica que, para una osmolaridad de 100 mOsm/kg, existe una subpoblación espermática que requiere para reaccionar un tiempo de incubación superior a los 30 minutos para el HOST y a los 60 para el ORT. Para lograr la máxima respuesta de la población espermática en un tiempo menor habría que reducir la osmolaridad del medio hipoosmótico, y así lo realizaron Pérez-Llano *et al.* (1998c); (2001), consiguiendo, mediante variantes cortas de tan sólo 5 minutos de duración para ambas pruebas, valores similares a los obtenidos en las pruebas originales desarrolladas por Jeyendran *et al.* (1984) y Schilling *et al.* (1984). En cualquier caso, la alta correlación entre los tiempos empleados en esta tesis doctoral, posibilitaría la utilización de la incubación más corta si la rutina de trabajo del laboratorio lo requiriera.

Pérez-Llano *et al.* (1998a) sugirieron que existe algún tipo de relación entre la resistencia de la membrana acrosómica y la respuesta funcional de la membrana plasmática frente a una solución hiposmótica. Aunque en nuestro estudio se comprobó que la raza Landrace obtuvo promedios estadísticamente superiores a los de la raza Large White en las dos pruebas, no todos los eyaculados respondieron del mismo modo en ellas; este es el caso del G5223, que en el ORT presenta el 2º valor más elevado a los 60 minutos de incubación, mientras que en el HOST queda relegado al 3º en el mismo tiempo, y del R4052, que pasa de ser el que mejor respuesta presenta al medio hipoosmótico en cuanto a porcentaje de espermatozoides con presencia de torsión de la cola, a ser el 4º en cuanto a integridad acrosómica (tablas 4.30 y 4.33). Estas diferencias dejan la relación de ambas pruebas en un discreto coeficiente de 0,44 para el mismo tiempo de incubación, coeficiente que se aproxima al 0,57 calculado por Pérez-Llano *et al.* (1998a). En cambio, Campi *et al.* (2007) obtuvieron una relación entre las dos pruebas mucho más estrecha, hasta el punto de no apreciar diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de ambas.

La prueba de resistencia osmótica, al igual que el test de endósmosis, nos deja una cierta relación con la resistencia de los eyaculados al proceso de criopreservación, que no sólo se evidencia en el caso del verraco que obtiene los valores más altos (el R5487), sino que los dos verracos con una menor capacidad para la congelación (G2552 y L437) presentaron igualmente los promedios más bajos en esta prueba.

Al analizar más en profundidad la relación existente entre las pruebas hipoosmóticas y la congelabilidad de los eyaculados, nos encontramos con que el HOST, en ambas incubaciones, muestra diferencias estadísticamente significativas entre los eyaculados con una buena aptitud para la congelación y aquellos otros con aptitudes catalogadas como medias o malas, no pudiendo observarse significación estadística entre los valores medios de estos dos últimos grupos. Este hecho nos sugiere que el test de endósmosis resulta una prueba apta para la identificación de

eyaculados con una gran capacidad de criopreservación, pero que no resulta lo suficientemente precisa para discernir entre los que muestran una menor resistencia al proceso. El ORT, por su parte, parece que presenta una mayor capacidad de discriminación a este respecto, puesto que detecta diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de calidad establecidos.

Esta diferencia en la capacidad de discriminación de ambas pruebas se aprecia con más detalle al analizar las correlaciones con los distintos índices de resistencia a la criopreservación, donde el ORT presenta correlaciones significativas con los cuatro índices, mientras que en el HOST, aunque se observan interesantes correlaciones significativas con la congelabilidad y con la resistencia del acrosoma, éstas no se ven reflejadas con los dos índices de movilidad.

La relación mostrada entre el HOST y la resistencia a la criopreservación corrobora en parte lo señalado por otros autores, como Watson (1995) o Petzoldt *et al.* (1996), que consideran que el test de endósmosis es un buen indicador para evaluar la capacidad de criopreservación de los espermatozoides, si bien a partir de él, nosotros no hemos conseguido reproducir las correlaciones significativas encontradas por otros autores entre esta prueba y la movilidad posdescongelado, tanto en semen equino (Magistrini *et al.*, 1997) como en humano (Gehring, 1986 en Pérez-Llano *et al.*, 2001). Y es que, aunque la movilidad y el estado de la membrana plasmática se encuentren claramente relacionados, suponiendo las alteraciones en la segunda, la supresión de la primera a medio/largo plazo (Watson, 1995), lo cierto es que la presencia de espermatozoides móviles no viables, así como de células viables no móviles en las muestras descongeladas es un hecho (Smikle y Turek, 1997; Medrano y Holt, 1998; Eriksson y Rodríguez-Martínez, 2000b; Peláez, 2003), por lo que la idoneidad de la capacidad móvil para predecir la resistencia al proceso de criopreservación no va a ser tanta como la del estado de las membranas celulares.

Los coeficientes de correlación mostrados en los dos tiempos del test de Resistencia Osmótica nos indican la mayor importancia de esta prueba a la hora de establecer la aptitud para la criopreservación de un eyaculado, ya que, en prácticamente todos los casos son más elevados que los del HOST y además, como hemos mencionado, muestran una relación significativa con la resistencia de la movilidad. Esta prueba ha sido considerada como una de las más determinantes para conocer la congelabilidad de un eyaculado y en este sentido, Schilling *et al.* (1984) reflejaron correlaciones de entre un 0,6 y un 0,65 con la movilidad y de entre un 0,6 y un 0,73 con el porcentaje de acrosomas normales, tanto para el semen descongelado como para el refrigerado. La obtención de índices más bajos en nuestro estudio ( $r = 0,523$  para la resistencia del acrosoma y  $r = 0,456$  para la de la movilidad) puede deberse a la diferencia de calidad en los eyaculados utilizados en cada trabajo; así, mientras Schilling *et al.* (1984) recurrieron a un abanico de eyaculados que se repartían por cinco categorías (“muy malos”, “malos”, “regulares”, “buenos” y “muy buenos”) en función del resultado del ORT, nosotros, con base en esta misma clasificación, únicamente empleamos eyaculados de calidad “muy buena”, debido a la selección continua a la que se ven sometidos los verracos en CENTROTEC S.A., lo que limita drásticamente la variabilidad de las muestras, pudiendo verse reducidas con ello las correlaciones encontradas; así ha sucedido, en concreto, entre otros parámetros seminales y la fertilidad *in vitro* (Gadea, 2005).

De todos modos, la obtención de estas buenas correlaciones no nos proporciona más que una información parcial acerca de la estimación de la capacidad de criopreservación de un eyaculado. La utilización del análisis de regresión por pasos, nos permitió determinar que la realización del test de Resistencia Osmótica tras 60 minutos de incubación, resulta el más interesante, tanto por ser el que explica un mayor porcentaje de la variabilidad del semen descongelado (un 22%), como por suponer un ahorro de tiempo con respecto al que implica una incubación de 60 minutos más. Este resultado parece un poco débil para la repercusión que históricamente se le ha dado a este tipo de pruebas (Holt, 2000b; Watson, 1995; Petzoldt *et al.*, 1996), pero hay que tener en cuenta que los daños celulares acaecidos en el proceso de congelación/descongelación responden a mucho más que a un mero estrés osmótico, puesto que hay una gran incidencia de otros factores sobre la calidad seminal final, como la formación de cristales de hielo, la resistencia de las membranas al descenso de temperatura, el efecto solución, la peroxidación lipídica, etc., que limitan la utilización de este tipo de pruebas como parámetros predictores de la congelabilidad de un eyaculado. No obstante, la utilización de medios anisosmóticos ha de considerarse una vía interesante para formar parte de los protocolos de selección de animales cuyo semen sea destinado a la criopreservación, ya que la variabilidad individual en la respuesta al estrés osmótico es considerada, por algunos autores (Petrunkina *et al.*, 2004), como un reflejo de las diferencias en la funcionalidad de membrana que resultan cruciales para la predicción de la congelabilidad.

### **5.2.3. Evaluación de la resistencia de las células espermáticas a un estrés por calor (termorresistencia).**

El estrés que sufren los espermatozoides cuando son sometidos a altas temperaturas durante un periodo de tiempo prolongado, ocasiona daños en las membranas celulares (acrosómica y plasmática) y en su capacidad móvil, reduciendo enormemente la vida útil de las células espermáticas (Decuadro, 2001) y, por consiguiente, provocando una caída en la capacidad fecundante del semen (Sala-Echave *et al.*, 2008).

Este tipo de alteraciones, han sido relatadas en varias especies animales (Kozumplik y Sosnová, 1985; Kozumplik y Roubal, 1990; Tardif *et al.*, 1999; Torres-Bianchini *et al.*, 2003; Sala-Echave *et al.*, 2008) y en concreto, en semen de verraco se han observado descensos estadísticamente significativos en la calidad de las muestras, a partir de los 45 minutos de incubación a 42,5 °C (Tardif *et al.*, 1999), o incluso tras 15 minutos a 37 °C (Sala-Echave *et al.*, 2008). En nuestro estudio, todos los parámetros analizados reflejaron porcentajes medios inferiores ya en el primer tiempo de valoración (a las 1,5 horas), si bien la práctica totalidad de ellos no llegaron a mostrar significación estadística con respecto a los valores iniciales hasta una vez transcurridas tres horas de incubación, con una única excepción, referida a la integridad de la vesícula acrosómica, cuyos diferenciales resultaron significativos entre todos los tiempos analizados en la incubación, si bien presentó caídas más leves que el resto de parámetros en cada una de las valoraciones. Por tanto, la incubación de las muestras a 39 °C no parece producir daños severos a las membranas, como demuestra la leve disminución de sus porcentajes de integridad a lo largo del tiempo en que se

mantiene. El parámetro de la movilidad espermática resultó con diferencia el más afectado por la incubación a 39 °C, como refleja la notable reducción en su porcentaje una vez transcurridas las 7 horas, coincidiendo con lo observado en semen de bovino por Torres-Bianchini *et al.* (2003).

La disminución de calidad de nuestras muestras resultó similar en las dos razas analizadas en casi todos los tiempos, apareciendo únicamente diferencias esporádicas en el porcentaje de movilidad sin cafeína en el T4,5 y con ella en el T7. Del mismo modo, al analizar los resultados por animal, nos encontramos con que en muy pocos puntos existieron diferencias en la respuesta de los distintos verracos, coincidiendo éstas, tanto en el parámetro analizado como en los tiempos donde aparecieron, con las diferencias entre razas (figuras de la 4.14 a la 4.17).

Estos resultados sugieren que la proporción de células espermáticas con motilidad resulta el parámetro más discriminante de todos los evaluados en la termorresistencia, confirmando lo expuesto por Kozumplík y Sosnová (1985), Tardif *et al.* (1999) y Torres-Bianchini *et al.* (2003) para los que resulta ser, además, el que presenta una mayor correlación con la capacidad fecundante *in vivo*. Aunque el hecho de que los eyaculados de verracos Landrace presenten una mayor calidad al final de la incubación (atendiendo únicamente al porcentaje de movilidad), como así indicaban las pruebas hiposmóticas, podría ser indicativo de que la termorresistencia resulta una prueba interesante para la discriminación de eyaculados, coincidiendo con Kozumplík y Roubal (1990), al analizarlo con más detenimiento, podemos percatarnos de que una gran parte de esta diferencia entre razas corresponde al comportamiento claramente discordante de un único macho del total de ocho que se emplearon en el estudio; así, el G6328 pasa de un 86,99 % de movilidad en aquellas muestras sin cafeína en el T3 a un 61,66 % en el T4,5 y, de igual forma, el G5223 pasa, en las muestras estimuladas químicamente, de un 87,92 % en el T4,5 a un 66,66 % en el T7, sin que el resto de animales Large White mostrasen una evolución muy diferente a la de los de la raza Landrace. A la vista de estos resultados, estamos más de acuerdo con Tardif *et al.* (1999) y Torres-Bianchini *et al.* (2003), que consideran la termorresistencia una prueba poco determinante para comprobar diferencias de calidad entre eyaculados.

La escasa capacidad discriminatoria manifestada por esta prueba en nuestro estudio, frente a la mostrada en otros (Fiser *et al.*, 1991; Peláez, 2003), podría deberse a que en éstos se utilizaron muestras descongeladas; así, Fiser *et al.* (1991), la emplearon para determinar la funcionalidad del semen criopreservado y establecieron que la incubación a una temperatura elevada sirve para sacar a la luz daños latentes de las membranas de los espermatozoides originados durante el proceso de congelación/descongelación, que, a la postre, van a desencadenar la muerte celular. En cambio, como en las muestras de semen fresco estos daños no existen, la capacidad de selección de eyaculados mediante esta técnica va ser mucho más limitada que en el caso de las muestras criopreservadas, ya que presentan una variación en la integridad de ambas membranas notablemente inferior a éstas, como queda patente al comparar nuestros resultados con los obtenidos en aquellos trabajos.

No obstante, al analizar los resultados de nuestro trabajo y agruparlos en las categorías establecidas en función de la aptitud de los eyaculados para la congelación, se comprueba que



únicamente el porcentaje de integridad de la membrana plasmática revela diferencias significativas entre los distintos grupos, de manera que aquellos eyaculados que presentan una mayor resistencia de esta estructura a la criopreservación (BC), mantienen una mayor resistencia a la incubación a 39 °C que los que componen el grupo MC. Por lo tanto, teniendo en cuenta el comportamiento de la membrana plasmática, la termorresistencia pudiera ser una prueba orientativa respecto a la capacidad de congelación de ciertos eyaculados, si bien sólo permitiría discriminar aquellos cuya supervivencia al proceso distase mucho entre ellos.

Los coeficientes de correlación entre los diferentes promedios de los parámetros analizados, en cada uno de los tiempos empleados, con los índices calculados posdescongelación, revelan prácticamente el mismo dato, esto es, que el porcentaje de integridad de la membrana plasmática es el único parámetro con una correlación estadísticamente significativa con la congelabilidad en todos los tiempos, siendo además, el que presenta un mayor coeficiente, con un 0,526 en el T1,5. A medida que avanza el tiempo de permanencia a 39 °C, estos coeficientes muestran una reducción considerable, lo que supone que la incubación disminuye la capacidad para estimar la congelabilidad de los eyaculados, por lo que no resultaría una prueba recomendable para este fin. Este hecho ya podía intuirse en las gráficas 4.18 y 4.19, donde los valores medios de los diferentes grupos de calidad van acercándose a medida que transcurre la incubación, llegando incluso, en la integridad de la vesícula acrosómica, a desaparecer las diferencias existentes entre los tres grupos en el semen fresco.

La realización del análisis multivariante de regresión, nos ha permitido corroborar lo ya expuesto; por una parte, la integridad de la membrana plasmática resulta ser el parámetro más relevante en la predicción de la congelabilidad, y por otra, a partir de las tres horas de incubación, los modelos creados disminuyen notablemente el porcentaje de varianza del índice de “congelabilidad” que permiten explicar, si bien, en ningún momento éstos superaron el 28,1%. Estos pobres valores predictivos no sorprenden, debido a que los mecanismos deletéreos en la prueba de la termorresistencia no parecen tener nada que ver con los principales que actúan en el proceso de criopreservación, como, por ejemplo, el descenso de temperatura, el estrés osmótico o la formación de cristales de hielo (Watson, 1995).

#### **5.2.4. Evaluación de la resistencia de las células espermáticas a un choque *a frigore*.**

La alta sensibilidad de los espermatozoides de verraco frente a los descensos bruscos de temperatura queda patente por la pérdida de viabilidad que experimentan (Watson, 1981a; Watson y Plummer, 1985), que responde, por una parte, a los cambios morfológicos ocurridos en numerosas estructuras de la célula (membrana plasmática, acrosómica o mitocondria) y, por otra, también a la degeneración del ADN o a cambios bioquímicos originados por la supresión de la capacidad selectiva de la membrana, lo que conduce, entre otros efectos, a una disminución de la actividad respiratoria y de la glicólisis (De Leeuw *et al.*, 1990b), quedando esto de manifiesto

principalmente por una reducción de la movilidad celular.

Nuestro estudio estuvo en la línea de otros trabajos (Pursel *et al.*, 1972a, 1972b y 1973; Fiser y Fairfull, 1986; Tamuli y Watson, 1994a; Nath *et al.*, 1994), reflejando una caída, tanto en el porcentaje de integridad de las membranas estudiadas (acrosómica y plasmática), como en la motilidad espermática, incluso tras la estimulación de las muestras con cafeína. La resistencia de las membranas después de 5 minutos a 0 °C presentó unos porcentajes muy bajos, ya que sólo el 3,09 % de los espermatozoides se mantuvieron con la membrana plasmática íntegra y la acrosómica, por su parte, permaneció en el 3,97 %. La temperatura empleada en la prueba y la velocidad del enfriamiento de las muestras tienen mucho que ver en la severidad del daño, hecho que ha sido relatado también por numerosos autores (Watson, 1981a). Es por esta dependencia de la temperatura por lo que se ha sugerido la implicación en este daño del fenómeno de transición lateral de fases (De Leeuw *et al.*, 1990b; Drobnis *et al.*, 1993), que va a producir finalmente la ruptura de la estructura de membrana (Watson y Plummer, 1985). La transición y separación lateral de fases va a implicar un aumento en la permeabilidad de la membrana, así como una pérdida de la capacidad selectiva de la misma por alteraciones, entre otras, de la funcionalidad de las proteínas estructurales (Parks, 1997), que conlleva, a su vez, una modificación de la composición del medio intracelular, que va a originar una alteración del metabolismo espermático (Drobnis *et al.*, 1993). Estas variaciones del medio interno hacen referencia, esencialmente, al cambio en las concentraciones de determinados iones como el Na<sup>+</sup>, el Zn<sup>+</sup> y el Ca<sup>2+</sup>, que aumentan, o el K<sup>+</sup>, que se reduce, al igual que el Mg<sup>+</sup> cuando las muestras están diluídas, pero también a la pérdida de ATP, ácidos nucleicos y enzimas necesarias para el correcto funcionamiento de la célula. El incremento del Ca<sup>2+</sup> (Quinn y White, 1966; Robertson *et al.*, 1988; White, 1993; Bailey y Buhr, 1995) resulta de gran importancia, ya que interviene en la regulación de muchas funciones del espermatozoide, como la motilidad, la modulación de la actividad de la adenilato ciclasa (AC) [Goh y White, 1988; Willoughby y Cooper, 2007], o incluso la inducción de la reacción acrosómica y de la hiperactividad espermática (White, 1993; Ho *et al.*, 2002; Ho y Suárez, 2003; Suárez y Ho, 2003; Suárez, 2008).

El choque *a frigore* también provoca alteraciones apreciables en la morfología del acrosoma, como un hinchamiento de toda la estructura o una vesiculización de su membrana (Quinn *et al.*, 1969; Jones y Martin, 1973; Pursel, 1979); esta disminución del porcentaje total de acrosomas morfológicamente normales puede ser consecuencia directa de las alteraciones morfológicas que suceden en las membranas celulares, pero también puede atribuirse a la aparición de cambios similares a los observados en el proceso de capacitación espermática (Watson, 1995). Así, el incremento de calcio intracelular que ocurre durante el enfriamiento podría justificar estos cambios, ya que estimula procesos dependientes de él, como la citada capacitación espermática y la posterior reacción acrosómica (RA) [Yanagimachi, 1994], permitiendo la fusión entre las membranas plasmática y acrosomal externa (Stornelli *et al.*, 2005), hecho que ha quedado patente al conseguir inducir la RA incrementando los niveles intracelulares mediante la utilización de ionóforos de Ca<sup>2+</sup> (Januskauskas *et al.*, 2000b).

No obstante, existen otras dos teorías que pueden justificarlo más allá de la influencia de los

iones  $\text{Ca}^{2+}$ :

- Por una parte, mediante el efecto del enfriamiento sobre la arquitectura lipídica de las membranas, ya que probablemente tiene lugar la inhibición de los mecanismos que permiten mantener la asimetría de las mismas (Verhoven *et al.*, 1992; Müller *et al.*, 1994; Gadella y Harrison, 2000; Gadella y Harrison, 2002), haciendo que tengan una mayor capacidad para fusionarse.
- Por otra parte, como consecuencia de la sensibilidad mostrada por los elementos del citoesqueleto a los descensos de temperatura, puede originarse la aparición de fenómenos de despolimerización de los filamentos de actina, para acabar desembocando en la desestabilización de la membrana, que proporcionará una mayor capacidad de fusión de las membranas (Watson, 2000), lo cual ha sido descrito por Spungin *et al.*, 1995, como un requisito previo esencial para la aproximación de ambas en el camino hacia la exocitosis acrosomal.

Por tanto, la aparición de acrosomas con una morfología alterada puede que no corresponda a un daño directo del choque por frío sobre las membranas de los espermatozoides, sino que resulte de la inducción de una RA verdadera; en cualquier caso, ambos hechos van a reducir de forma considerable la capacidad fecundante de las muestras.

Aunque posiblemente confluyan las tres teorías expuestas en la inducción de la reacción acrosómica, se puede destacar la implicación de los iones calcio en el proceso, por el paralelismo existente entre el incremento intracelular del mismo y la severidad de los daños celulares acaecidos en el choque por frío (ambos resultan mayores cuanto más baja es la temperatura final alcanzada por las células y cuanto más alta es la velocidad de enfriamiento [White, 1993]). A la vista de esta implicación, se han establecido métodos de protección de los espermatozoides frente a los descensos bruscos de temperatura, mediante la adición de sustancias como la fosfatidilcolina, que consiguen reducir las alteraciones celulares producidas en el choque *a frigore* a través de la disminución de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Simpson *et al.*, 1987).

Otra consecuencia destacable y que resulta ser una de las alteraciones más características de la aplicación de un descenso brusco de temperatura a una muestra seminal, es la pérdida irreversible de la capacidad mótil de muchas de sus células (Lasley y Bogart, 1944). En nuestro estudio, únicamente el 6,81 % mantuvieron la movilidad mostrada en el semen fresco; los altos coeficientes de correlación que encontramos entre la resistencia de la membrana plasmática y el porcentaje de espermatozoides que mantuvieron la movilidad, tanto sin cafeína ( $r = 0,888$ ), como con ella ( $r = 0,912$ ), nos indican la influencia que tienen las alteraciones ocurridas en esta membrana sobre dicha movilidad espermática. Esta correlación positiva ha sido sugerida por diversos autores (Emerit *et al.*, 1991; Bell *et al.*, 1993) y su repercusión puede ser consecuencia de varios procesos interrelacionados entre sí. Por una parte, el mencionado incremento de la permeabilidad del plasmalema durante el enfriamiento, altera la regulación que ejerce la célula

sobre su medio intracelular, por la modificación funcional de las proteínas estructurales (principalmente las transportadoras, como los canales de calcio [Robertson y Watson, 1986; Bailey y Buhr, 1994]) y por el libre intercambio de iones a través de las soluciones de continuidad creadas entre las diferentes fases lipídicas (Watson y Plummer, 1985; Watson y Morris, 1987). Ambas provocan, entre otras alteraciones, el consabido incremento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , que está claramente asociado con el cese de la movilidad celular observado tras el choque por frío, como relatan numerosos estudios (Tash y Means, 1982; Gibbons y Gibbons, 1980a; Hong *et al.*, 1984 y 1985a). La influencia de este ión sobre la movilidad es tal, que variaciones micromolares en su concentración pueden provocar cambios notables en el movimiento del flagelo; por este motivo, en condiciones normales, la célula espermática dispone de bombas muy precisas en la membrana plasmática para garantizar unas bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel del flagelo (Tash y Means, 1982).

Por otra parte, otro proceso íntimamente asociado con el enfriamiento brusco es la peroxidación lipídica (Bilodeau *et al.*, 2000; Chatterjee y Gagnon, 2001; Chatterjee *et al.*, 2001), cuyo efecto depresor sobre la movilidad ha sido ampliamente relatado (White, 1993; Gadea *et al.*, 2005a; Aitken *et al.*, 1998; Membrillo Ortega *et al.*, 2003). Asimismo, se ha determinado que el desequilibrio creado por el intercambio descontrolado de iones entre el medio y la célula, va a alterar de forma severa otros aspectos del metabolismo celular (revisar Mann y Lutwak-Mann, 1981), como por ejemplo, el metabolismo energético; así, en los espermatozoides sometidos a un choque *a frigore* se produce una menor incorporación de fructosa y de oxígeno, observándose además un caída notable en los niveles de ATP (White, 1993), que responde a un descenso de su producción mitocondrial, bien por lesiones a nivel de las membranas de la mitocondria (no hay que olvidar la naturaleza membrano-dependiente del proceso), o bien por la ausencia del equilibrio iónico necesario para el correcto funcionamiento de este orgánulo (Mishra *et al.*, 1989). Sea como fuere, la disminución de la energía procedente del ATP va a originar inicialmente un descenso en la progresividad de los espermatozoides, seguida de una reducción total de la movilidad celular (Serres *et al.*, 1991).

Las reducciones observadas en los parámetros analizados no presentan la misma intensidad en todos los verracos empleados en nuestro estudio, incluso se observan valores medios estadísticamente distintos entre las dos razas empleadas. Esta alta variabilidad puede ser explicada por la existencia de diferencias intrínsecas a las membranas, que posiblemente modifiquen la funcionalidad de las mismas (Gadella *et al.*, 1999). Estas diferencias se han atribuido a variaciones en la composición lipídica (De Leeuw *et al.*, 1990a; Parks y Linch, 1992), fundamentalmente a la ratio colesterol/fosfolípidos y al índice de insaturación de los ácidos grasos, ya que tanto el colesterol, como las particularidades estéricas que imponen los dobles o triples enlaces de cada molécula de ácido graso, influyen sobre la facilidad con la que se producen los fenómenos de separación lateral de fases (Alberts *et al.*, 1989). La implicación de este tipo fenómenos presenta una base genética, que puede intuirse al observar que la raza Landrace muestra en la vitalidad, la integridad acrosómica y la movilidad, con y sin cafeína, medias superiores a la raza Large White, y mucho más a nivel de verraco, donde se comprueba cómo los mismos animales acaparan en todos

los parámetros, tanto los valores medios más altos unos, como los más bajos otros; en efecto, el R5487 presenta promedios muy superiores al resto de animales en todos ellos, y entre el G6328 y el L437 se reparten los valores más bajos. La existencia de verracos con una mayor o menor resistencia al enfriamiento brusco, tomando como referencia los análisis realizados, podría estar justificada por esas variaciones estructurales de la membrana plasmática, ya que la respuesta de esta estructura al choque *a frigore*, como hemos explicado, condiciona el grado de modificación del medio intracelular y éste, a su vez, repercutirá tanto en el estado de la vesícula acrosómica, como en la capacidad móvil de los espermatozoides.

La incubación de las distintas muestras seminales a 20 °C incrementó, tanto el mantenimiento de la capacidad móvil de los espermatozoides, como la resistencia de las diferentes membranas al choque por frío, llegando a promedios máximos de un 39,05 % para el acrosoma, de un 26,53 % para la membrana plasmática y de un 43,32 % y un 39,98 % para el porcentaje de movilidad, con y sin cafeína, respectivamente. Este fenómeno ha sido relatado por numerosos autores (Pursel *et al.*, 1972b; Pursel *et al.*, 1973; Nath *et al.*, 1994), y aunque se ha considerado inherente a la célula y se ha determinado que está sometido a una notable influencia ambiental (Pursel *et al.*, 1972b; Pursel *et al.*, 1973), el mecanismo por el cual sucede no ha quedado perfectamente clarificado (Robertson *et al.*, 1988). Esta menor sensibilidad que manifiestan las membranas celulares al choque por frío cuando se incrementa el tiempo de incubación previo (White, 1993), también tiene su repercusión sobre la entrada de calcio al interior de la célula, que resulta notablemente inferior, por lo que parte del mantenimiento de la movilidad y de la integridad acrosómica, podría ser consecuencia de esta menor concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Si atendemos a los promedios obtenidos en nuestras muestras, podemos comprobar que la diferencia media existente entre la resistencia de la membrana plasmática de una y otra raza parece mantenerse a lo largo de la incubación, si bien no se refleja significación estadística entre ellas a partir de las dos horas. El hecho de que se mantenga esta diferencia media nos incita a pensar que esa pérdida de susceptibilidad es inherente a las células, pero al analizar las variaciones observadas para cada verraco en particular a lo largo de las 5 horas de incubación, nos encontramos con que, aunque la amplia mayoría de animales empleados se mantiene en la misma posición que en el S0, existen otros que modifican este patrón, como el G6328, que pasa de ser el que inicialmente muestra el valor medio más bajo, a presentar, tras el S5, el tercer promedio más alto. Esto pone de manifiesto la existencia de variaciones intraverraco, ya no sólo en la susceptibilidad al choque, sino también en la capacidad de adquisición de resistencia mediante la incubación. La interacción del medio en esta pérdida de susceptibilidad resulta un factor clave, ya que su pH, su factor de dilución y su composición están relacionados con ella (Pursel *et al.*, 1972b; Pursel *et al.*, 1973; Watson y Plummer, 1985). En nuestro estudio, tanto el pH como el factor de dilución y la composición del medio artificial, fueron similares para todas las muestras, por lo que el propio plasma seminal podría ser el elemento determinante; de hecho, numerosos autores han recogido su influencia sobre la resistencia espermática al choque *a frigore* (Pursel *et al.*, 1973; Church y Graves, 1976; Berger y Clegg, 1985; Maxwell *et al.*, 1999).

La variación en la pérdida de susceptibilidad no se reveló tan claramente al analizar los resultados de resistencia del acrosoma, observándose porcentajes medios mucho más parecidos entre las dos razas estudiadas. Por otro lado, la respuesta del acrosoma a la incubación también resultó mucho más homogénea entre los animales empleados, no pudiendo destacar diferencias importantes entre ellos. Los valores recogidos en todos los tiempos resultaron ligeramente superiores a los de la membrana plasmática, confirmando la teoría expuesta por Harrison y Vickers (1990), que consideran que esta estructura presenta una mayor estabilidad frente al choque por frío. Este hecho podría ser el causante de la menor variabilidad observada entre las diferentes muestras, haciendo que la valoración acrosómica resulte menos indicada para discriminar eyaculados con base en la sensibilidad mostrada a los descensos bruscos de temperatura.

El incremento de la movilidad a medida que transcurre la incubación a 20 °C es similar en los dos tipos de muestras empleadas, con y sin cafeína, siendo los valores obtenidos con el estimulante significativamente superiores en la mayoría de los tiempos. Resulta reseñable el hecho de que este incremento no sea mayor, sobre todo si tenemos en cuenta que una de las vías por las que la cafeína ejerce su efecto sobre la movilidad es mediante la traslocación del calcio, lo que conllevaría una reducción de su concentración intracelular (Hong *et al.*, 1985b); otro proceso que se ha determinado que está implicado es la inhibición de la fosfodiesterasa dependiente de calmodulina (Garbers *et al.*, 1973; Hong *et al.*, 1985b; Dimitriadis *et al.*, 2008), que incrementa la concentración de AMPc (necesario para la fosforilación proteica). No obstante, ninguna de estas vías parece resultar tan eficaz en espermatozoides que han sufrido un choque por frío, lo cual puede estar justificado por dos motivos, bien por el desorden iónico generado tras el choque *a frigore*, que generaría un incorrecto funcionamiento de estas rutas metabólicas, o bien por la acumulación excesiva de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior de la célula, con niveles tan elevados que su eliminación hacia el medio extracelular no resulte suficiente para permitir el movimiento del flagelo.

La movilidad de los espermatozoides también evidencia que la respuesta de los eyaculados a la incubación varía notablemente, tanto en función de la raza, como del verraco en cuestión. Así, al observar la figura 4.29, se comprueba que la raza Landrace muestra una tendencia a adquirir con mayor celeridad un alto nivel de movilidad tras el choque por frío, a pesar de no reflejarse diferencias significativas entre razas. El hecho de que los eyaculados procedentes de verracos Large White deban permanecer un mayor tiempo a 20 °C para adquirir el máximo nivel de movilidad, queda de nuevo de manifiesto, aunque de forma ligeramente atenuada, en las muestras incubadas con cafeína.

Una vez más, donde resulta más patente la influencia del tiempo de permanencia a 20 °C, es en las medias calculadas para los diferentes animales. Su análisis revela que en general el comportamiento resulta bastante homogéneo; así, el verraco R5487, vuelve a marcar los valores más altos en todos los tiempos, y el G2552 y el L437 mantienen permanentemente niveles muy bajos también en todos ellos. No obstante, existen dos tipos de respuesta que destacan sobre la uniformidad mostrada por la mayoría de los eyaculados; una, la que presentan tanto el R5487 como el R3846, que pronto adquieren los valores máximos de movilidad, en una hora el primero y en dos el segundo, que después van a mantener en los siguientes tiempos analizados. La otra

respuesta que nos interesa resaltar es la que manifiesta el G6328, que incrementa notablemente el porcentaje de espermatozoides que mantienen la capacidad móvil cada hora, pasando de ser el eyaculado con un menor porcentaje de células en movimiento a ser el segundo con mayor porcentaje después del S5, por detrás únicamente del R5487 (figura 4.30). Este tipo de respuesta la había mostrado ya el G6328 al analizar la resistencia de la membrana plasmática, dato que constituye un indicador más de la relación existente entre ambos parámetros.

Teniendo en cuenta estas variaciones individuales, la velocidad con que la motilidad manifiesta una mayor tolerancia al enfriamiento podría indicar la capacidad de resistencia al proceso de criopreservación, ya que el análisis de la respuesta de los distintos grupos de calidad en función de su aptitud para la congelación, nos revela que el grupo BC adquiere de una forma más rápida el máximo nivel de movilidad (en el S2), mientras que en los otros dos grupos, formados por los eyaculados con una menor capacidad para la criopreservación, este incremento es más lento y progresivo a lo largo de las cinco horas de incubación. Por otra parte, tanto en el porcentaje de células móviles (con y sin cafeína) como en los de integridad de las membranas plasmática y acrosómica, se puede comprobar cómo la respuesta al choque *a frigore* difiere en función de la capacidad de congelación de los eyaculados, siendo, en todos los casos, aquellos que presentan una mayor resistencia a la congelación los que van soportar mejor el descenso de temperatura. La existencia de diferencias significativas entre los valores medios de los tres grupos, fundamentalmente entre el BC y el MC, sugiere que la resistencia al choque puede ser utilizada como técnica para discriminar eyaculados con una baja congelabilidad. Esta capacidad de discriminación aumenta considerablemente a medida que transcurre el tiempo en que las muestras permanecen a 20 °C, como queda demostrado al observar el incremento de las diferencias, punto a punto, entre los valores medios de los tres grupos.

Estas evidentes diferencias entre los tres grupos nos indican que, ante una posible estimación de la congelabilidad de un eyaculado, la realización del choque por frío es la prueba más determinante de todas las analizadas en este experimento; en efecto, la resistencia espermática al mismo y a la criopreservación han sido relacionadas en muchos estudios, siendo posiblemente el incremento de la resistencia celular a los descensos de temperatura, la vía más empleada para incrementar la calidad de las muestras descongeladas; en este sentido, numerosos trabajos, partiendo de la premisa de que la composición lipídica de la membrana plasmática marca la resistencia espermática al enfriamiento, han tratado de obtener una mejor respuesta al choque *a frigore*, bien mediante la elección de espermatozoides cuyas características de membrana les hacen más resistentes al frío, como los epididimarios (Lasley y Bogart, 1944; Watson y Plummer, 1985), o bien mediante la utilización de preparaciones lipídicas purificadas, como la incorporación a los diluyentes de yema de huevo o de sustancias como el SDS. La yema de huevo contiene fosfolípidos (Quinn *et al.*, 1980; Graham y Foote, 1987; Chesmedjieva *et al.*, 1996) y lipoproteínas de baja densidad (Watson, 1976; Foulkes, 1977; Watson, 1981b) que proporcionan un efecto protector frente al choque *a frigore*, y el SDS es un detergente aniónico que solubiliza las proteínas y que, asociado a la yema de huevo, confiere un efecto protector sobre el acrosoma y sobre la movilidad (Pursel *et al.*, 1978). La aplicación de estos mismos métodos sobre muestras que van a

ser criopreservadas ha incrementado también notablemente la supervivencia celular posdescongelación (Graham *et al.*, 1971; Pursel y Johnson, 1975b; Pursel *et al.*, 1978; Fiser y Fairfull, 1986).

Hay otros trabajos, más actuales, que manifiestan la relación entre la capacidad de criopreservación y la resistencia al choque por frío, de forma que, basándose en la disminución que se observa tras la descongelación, tanto en la proporción de ácidos grasos poliinsaturados, como en el contenido de colesterol (hecho, este último, correlacionado con la caída de la movilidad y de la integridad acrosómica [Chesmedjieva *et al.*, 1996; Maldjian *et al.*, 2005]), tratan de modificar en cierta medida la composición de las membranas, mediante la inclusión de sustancias como el ácido docosahexaenoico (DHA) en la dieta (Maldjian *et al.*, 2005) o las ciclodextrinas en los diluyentes (Zeng y Terada, 2001; Mocé y Graham, 2006), para conseguir incrementar la calidad de las muestras una vez descongeladas. La utilización de este tipo de sustancias en soluciones espermáticas sometidas a un choque *a frigore*, les confiere también una mayor resistencia al proceso (Zeng y Terada, 2000). El hecho de que estas iniciativas para incrementar la resistencia al descenso brusco de temperatura mejoren también la resistencia a la criopreservación, o viceversa, sugiere que la susceptibilidad al choque por frío va a determinar una gran parte de la sensibilidad de las células a la criopreservación, en consonancia con las evidencias obtenidas por Holt y North (1991), que planteaban que los fenómenos de transición de fases eran los principales causantes de los daños observados durante el calentamiento celular tras la descongelación, etapa en la que, según estos autores, se producen los mayores daños en la membrana plasmática.

Nuestros resultados confirman, desde un primer momento, la existencia de correlaciones interesantes entre la resistencia al enfriamiento y a la criopreservación, que en el S0 no resultan más elevadas que aquellas observadas en algunas de las valoraciones convencionales o en las pruebas hipoosmóticas, por lo que se podría considerar que el choque por frío no es una prueba con más relevancia que las otras; sin embargo, al analizar los coeficientes a medida que transcurre el tiempo de incubación, se observa que éstos se van haciendo más elevados, surgiendo incluso significación estadística con índices con los que no la había en las primeras horas, llegando, en el S5, a alcanzar coeficientes de 0,771 y 0,802, que superan claramente los obtenidos con otras pruebas y confirman lo que se intuía al ver el comportamiento de los diferentes grupos de calidad, que era una prueba con una alta capacidad de discriminación de eyaculados, sobre todo si se realiza una incubación previa de las muestras.

El porcentaje de variabilidad posdescongelación que es explicado por la resistencia al choque *a frigore* mediante los modelos de regresión creados, se vió incrementado igualmente al aumentar el tiempo de incubación de las muestras, pasando de un 29,5 % en el S0, a un 58,3 % en el S5, incorporando sólo una variable a cada uno de ellos. Teniendo en cuenta que Roca *et al.* (2006a) consideran que sobre el 70 % de la variabilidad de la criosupervivencia del semen de verraco podría ser explicada únicamente por factores intrínsecos al mismo, y si la determinación de casi un 60 % de esta variabilidad se realiza mediante una sola valoración, la resistencia de la membrana plasmática al S5, puede afirmarse que dicha valoración es un método bastante eficaz para la preselección de verracos con una alta congelabilidad.



Este incremento ocasionado por la incubación a 20 °C puede ser consecuencia de la acción de factores externos a las propias células y, dentro de éstos, posiblemente y como se había indicado, del plasma seminal. La utilización de marcadores genéticos para estudiar la capacidad de criopreservación del semen de verraco está empezando a dar resultados interesantes; así, Thurston *et al.* (2002), tras encontrar evidencias de la existencia de marcadores genéticos para la congelabilidad del semen, concluyeron que había la posibilidad de que éstos estuvieran más relacionados con la composición del plasma seminal o con las funciones de las glándulas sexuales accesorias, que con la variabilidad en la fisiología o en la bioquímica espermática. Por su parte, Hernández *et al.* (2007a) determinaron que la adición de plasma seminal de eyaculados procedentes de buenos congeladores a eyaculados de malos congeladores incrementaba, tanto la calidad de las muestras descongeladas, como el porcentaje de ovocitos penetrados y polispermicos.

Esta supuesta importancia del plasma seminal también ha sido relatada en el choque por frío (Pursel *et al.*, 1973; Church y Graves, 1976; Berger y Clegg, 1985; Maxwell *et al.*, 1999), por lo que resultaría interesante estudiar más en profundidad su relevancia en ambos procesos a fin de determinar la existencia de una posible relación entre ellos, en un intento de mejorar la predicción de la congelabilidad de los eyaculados.

### **5.3. Experimento 2: Evaluación de los patrones cinéticos descritos por los espermatozoides.**

#### **5.3.1. Respuesta y evolución de los parámetros cinéticos individuales de los espermatozoides analizados.**

El análisis de la movilidad espermática siempre ha tenido un gran peso específico dentro de la batería de pruebas que se realizan a una muestra seminal con el fin de determinar su calidad. Comúnmente, su ejecución viene siendo efectuada a través de microscopía óptica mediante una estimación visual, tanto del porcentaje de células móviles como de la calidad de su movimiento, considerando como patrón de referencia para esta última, al progresivo y rectilíneo (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2008). Este método, caracterizado por su escaso coste, y a pesar de que presenta grandes variaciones entre valoraciones, ya que depende enormemente, entre otras cosas, de la experiencia del técnico que las efectúe, ha contribuido al desarrollo y éxito de la inseminación artificial, al permitir eliminar eyaculados con pobres motilidades y que, por consiguiente, traerían consigo problemas de subfertilidad o infertilidad. No obstante, esta técnica no va a resultar tan útil cuando los eyaculados presentan movilidades altas o simplemente aceptables, puesto que por encima de un determinado valor, porcentajes más elevados no van a implicar necesariamente una mayor calidad seminal (Gadea *et al.*, 1998).

Hoy en día, cada vez resulta más habitual la utilización de un sistema computarizado para efectuar el análisis seminal, ya que no sólo reduce la subjetividad de la estimación visual, sino que aporta una mayor información para la detección de diferencias inapreciables por el ojo humano (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2008), como las provocadas por variaciones del medio externo, por diversos estadios fisiológicos de las células, genéticas (entre razas o verracos), etc., algo que

podimos comprobar en nuestro trabajo al estudiar el porcentaje total de espermatozoides móviles, cuando el análisis computarizado detectó diferencias entre verracos no apreciadas en la estimación visual.

La generalización en el uso de estos sistemas CASA, que ha contribuido al abaratamiento de costes haciéndolos aún más atractivos para los usuarios, ha permitido definir las características del movimiento espermático, si bien, por el momento sigue sin despejarse la importancia biológica de muchos de los parámetros calculados, por lo que la interpretación de los resultados resulta laboriosa y las conclusiones a las que se llega no son relevantes en muchas ocasiones.

### **Evolución de los parámetros cinéticos individuales tras el proceso de criopreservación.**

Analizando en nuestro trabajo los resultados medios para los ocho parámetros cinéticos calculados, se observa en el semen descongelado con respecto al semen fresco un incremento notable en todos ellos, exceptuando al WOB, que permanece con valores estadísticamente similares (figura 4.37).

Si bien muchos autores han observado en el semen descongelado de verraco un aumento generalizado de los promedios calculados, son notables las diferencias entre lo publicado por unos y otros. Así, mientras la mayoría muestran un incremento de la velocidad celular, expresado en subidas de la VCL, la VSL y la VAP (Peña *et al.*, 2003b; Saravia *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2008b; Tejerina, 2008), existen otros parámetros en los que se recoge una mayor variabilidad en la respuesta a la criopreservación, lo cual permitiría realizar afirmaciones contradictorias; en concreto, atendiendo a los promedios recogidos para la ALH, hay autores que califican al movimiento celular tras la descongelación como de “menos vigoroso” (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2008) con base en el descenso significativo observado (Eriksson *et al.*, 2001), mientras que otros, como Flores *et al.* (2008b), observan que las células analizadas prácticamente duplican el valor del citado parámetro, permitiendo llegar a una conclusión opuesta a la anterior, sobre todo teniendo en cuenta que la BCF también se ve incrementada tras la descongelación. Esta falta de uniformidad en la respuesta de la ALH podría ser consecuencia de las fuentes de variación existentes entre los distintos sistemas CASA, reflejadas en la revisión bibliográfica (epígrafe 2.3.4).

El incremento de la velocidad del movimiento celular detectado tras la descongelación nos puede dar una falsa sensación de mejora de la capacidad móvil de los espermatozoides (Katkov y Lulat, 2000), fundamentalmente si tomamos al pie de la letra aseveraciones como la realizada por Graham *et al.* (1984), que consideraba a la velocidad espermática como un indicador indirecto del buen funcionamiento de la mitocondria. Sin embargo, el incremento reflejado no se ha de tomar como una mejora de la capacidad móvil, sino como un cambio en el patrón cinético exhibido por los espermatozoides (Tejerina, 2008), que aparece en parte como respuesta a la modificación de la concentración intracelular de ciertos iones, como se expondrá más adelante. Además, no hay que olvidar que los promedios calculados en el análisis cinético se realizan sobre aquellos espermatozoides que mantienen la movilidad, por lo que subgrupos que presentasen valores de velocidad bajos en semen fresco han podido perder completamente la capacidad móvil tras el proceso de criopreservación, no contabilizando para el promedio calculado posdescongelación.

Otra de las ideas generalizadas acerca de las características cinéticas de las células espermáticas criopreservadas, es que éstas manifiestan un patrón más circular (Eriksson *et al.*, 2001; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2008), y aunque en esta misma dirección apunta el incremento extremadamente alto que muestra la VCL en nuestro trabajo, no indica lo mismo el aumento de los promedios de descriptores cinéticos como el LIN o el STR (esta misma respuesta se observa en el trabajo realizado por Flores *et al.* (2008b), si bien en este caso fueron menos elevados y no mostraron diferencias estadísticamente significativas con el semen fresco). El hecho de que el LIN permanezca inalterado, o mucho más si aumenta, implica que el incremento sufrido por la VSL resulta tanto o más importante que el de la VCL, dejando sin sentido la citada afirmación (no hay que olvidar que el índice de linealidad calcula lo próxima que es la trayectoria circular del espermatozoide a una línea recta mediante la relación porcentual entre la VSL y la VCL). No obstante, la circunstancia de que este patrón de movimiento circular al que se refieren algunos autores, se produzca justo en el momento después de la descongelación, volviéndose más lineal al permanecer en incubación a 38 °C por un periodo cercano a los 30 minutos, como recoge Rodríguez-Martínez *et al.* (2008) [a partir de los trabajos de Eriksson *et al.* (2001), Saravia *et al.* (2005) y Hernández *et al.* (2007b)], va a hacer que lo consideremos, más que como una característica que define a las células criopreservadas, como un posible movimiento de transición que presentan los espermatozoides en la recuperación de la movilidad que se vio suprimida por el descenso térmico.

Este patrón cinético que se observa en los espermatozoides tras la criopreservación, también aparece después del enfriamiento de las muestras a 5, e incluso a 15 °C (Eriksson *et al.*, 2001), y dado que en ambas situaciones se produce un incremento citosólico del  $\text{Ca}^{2+}$ , hay que valorar una más que probable influencia de este ión en la manifestación de dicho patrón. Como hemos comentado, el  $\text{Ca}^{2+}$  va a provocar la activación de la adenilato ciclasa (AC) [Morton *et al.*, 1974; Okamura *et al.*, 1985; Gross *et al.*, 1987], incrementando la concentración de AMPc, que va a modular la actividad de la enzima Proteín Kinasa dependiente de AMPc (PKA), promoviendo la expresión de la movilidad, lo cual podría justificar el incremento generalizado de los parámetros de velocidad espermática tras la descongelación. Por otro lado, el  $\text{Ca}^{2+}$  también muestra una acción directa sobre el axonema (Tash y Means, 1982), lo que provoca un tipo de movimiento más asimétrico (Cook *et al.*, 1994), que se traduce a su vez en la manifestación de un patrón mucho más circular, como se ha recogido en semen de rata, de erizo de mar y de corvina del Atlántico (Lindemann *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 2000; Ho y Suárez, 2003), conformando una posible explicación al notable incremento registrado en la VCL.

La curva de absorción del calcio que presentan las células espermáticas descongeladas, también puede ser un indicador de la influencia de este ión en la transitoriedad del movimiento circular que muestran los espermatozoides tras la descongelación; en concreto, se ha detectado que en espermatozoides de carnero, los niveles pasan, en un intervalo corto de tiempo, de un pico de en torno a 79 nmol por cada 100 millones de células, justo tras la descongelación, a valores inferiores, similares a los espermatozoides control (Simpson y White, 1986).

El cambio en el patrón cinético de algunos espermatozoides descongelados también ha sido relacionado con la hiperactivación asociada a la criocapacitación, fenómeno que responde a la

aparición, tras el proceso de congelación/descongelación, de modificaciones celulares similares a las ocurridas en la capacitación espermática, que van a desembocar en la reacción acrosómica. Estos cambios han sido descritos en numerosas especies (Fuller y Whittingham, 1996; Cormier *et al.*, 1997; Maxwell y Johnson, 1997a; Neild *et al.*, 1999) y a ellos se atribuye la reducción del tiempo hábil de fecundación que suelen manifestar los espermatozoides criopreservados.

Cuando tiene lugar la capacitación espermática, en las proximidades del lugar de fecundación se produce un cambio en el patrón de movimiento denominado hiperactivación (descrito por primera vez por Yanagimachi, 1969), que va a permitir al espermatozoide desprenderse de la pared del oviducto, desplazarse por su lumen y atravesar las células del *cumulus oophorus* (Stauss *et al.*, 1995; Suárez y Ho, 2003) y que se caracteriza básicamente por un desplazamiento no lineal de la cabeza, con un incremento de la asimetría y de la amplitud de batido de cola, lo que va a provocar, a su vez, que el espermatozoide muestre una baja progresión hacia delante y una marcada trayectoria circular (Yanagimachi, 1994).

Esta capacitación espermática y la criocapacitación van a presentar una gran similitud en cuanto a la reorganización que se produce en la membrana plasmática, como consecuencia, principalmente, del movimiento de las proteínas estructurales de membrana (Holt y North, 1984) y de la reducción en el contenido de esteroides (Canvin y Buhr, 1989; Visconti *et al.*, 1999b), que se traduce en un notable incremento en su fluidez. Esta mayor fluidez de la membrana plasmática detectada, tanto en las células criopreservadas (Hinkovska-Galcheva *et al.*, 1989) como en las capacitadas *in vitro* (Harrison *et al.*, 1996; Flesch *et al.*, 1999), ha sido relacionada con el incremento de ciertos iones en el interior de la célula, fundamentalmente el calcio, no sólo en la capacitación (Harrison *et al.*, 1993) sino también durante el enfriamiento celular, en descensos térmicos rápidos (Bailey y Buhr, 1995), y en otros más lentos (Green y Watson, 2001). Incluso, algunos autores proponen que este incremento intracelular de calcio que se produce en el enfriamiento va a activar las mismas vías celulares que en la capacitación (Cormier *et al.*, 1997; Fuller y Whittingham, 1997; Maxwell y Johnson, 1997a).

No obstante, a pesar de las similitudes existentes entre la capacitación y la criocapacitación, éstas no pueden equipararse totalmente; así, la influencia del incremento citosólico del calcio en la fosforilación proteica, fundamentalmente en la fosforilación de la tirosina, no es igual en ambos procesos, puesto que el enfriamiento por sí solo no es capaz de provocar la fosforilación del rango de proteínas que presentan un aparente peso molecular de 32 kDa (Bravo *et al.*, 2005), algo que sí se ha determinado que ocurre en las células capacitadas *in vitro* (Tardif *et al.*, 2001; Tardif *et al.*, 2003). Como la fosforilación de la tirosina interviene como mediadora en muchos procesos celulares (Pawson, 2004), es más prudente no equiparar sus efectos, hasta que se conozca más en profundidad su regulación molecular, así como la del desencadenamiento de la hipermotilidad.

También hay que ser precavido a la hora de estimar la incidencia de la criocapacitación a partir de los patrones de movilidad que presentan las células descongeladas, puesto que se ha podido constatar que, a pesar de la confluencia en el tiempo de la capacitación *in vitro* y de la hiperactivación espermática, las vías que regulan ambas no son exactamente las mismas (Suárez y Ho, 2003), a la vista de los resultados obtenidos en diversos estudios, como por ejemplo, el

hecho de que el requerimiento de bicarbonato para que ocurra una y otra sea diferente (Boatman y Robbins, 1991), o de que la incubación de espermatozoides de hámster en determinados medios (compuestos por sustratos energéticos, epinefrina, BSA, hipotaurina y penicilamina) permita el desarrollo de la hipermotilidad una hora antes de que ocurra la capacitación (DeMott *et al.*, 1995). Sin embargo, la presencia de muchas características comunes en ambos procesos, como que la implicación del incremento citosólico del calcio resulta crucial en su desarrollo, hace que se busque una relación directa entre ellos. La importancia del aumento intracelular de calcio en la génesis y en el mantenimiento de la hiperactivación ha sido ampliamente relatada (Ho *et al.*, 2002; Suárez y Ho, 2003; Ho y Suárez, 2003; Suárez, 2008), así como su influencia sobre la movilidad espermática, provocando una mayor asimetría y amplitud del batido flagelar (Cook *et al.*, 1994; Ho *et al.*, 2002; Sakata *et al.*, 2003; Quill *et al.*, 2003). En estudios realizados con espermatozoides de hámster se ha podido cambiar el patrón de movimiento de activado a hiperactivado, y viceversa, aumentando y disminuyendo, respectivamente, las concentraciones extracelulares de calcio (Yanagimachi, 1994), por lo que sería lógico concluir que los niveles de calcio intracelular son los que van a determinar este tipo de movimiento, con independencia de si se han desencadenado o no los mecanismos que producirán la reacción acrosómica. En consonancia con este razonamiento, parece lícito pensar que la recuperación de la linealidad referida anteriormente, manifestada por las células criopreservadas al ser incubadas a 38 °C durante 30 minutos (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2008), responde a la disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por la reactivación de las bombas  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasas, que habían sido inactivadas con el descenso térmico (Green y Watson, 2001), algo que evidenciaría la capacidad de adaptación de las células al proceso de criopreservación.

Por otra parte, Katkov y Lulat (2000) determinaron que las células descongeladas que muestran un movimiento típicamente circular y veloz resultan ser aquellas que presentan una mayor resistencia a la criopreservación, mientras que las más sensibles son las que muestran trayectorias más rectas y lineales, a la vez que considerablemente más lentas. Este hecho parece estar en oposición con lo expuesto por Holt *et al.* (1985) y Liu *et al.* (1991), que recogían, en semen humano, una elevada correlación entre el LIN y la fertilidad en pruebas de FIV; posiblemente, ello se deba al hecho de que los promedios de velocidad más altos en el semen recién descongelado tienen mayor relevancia en la calidad seminal que los patrones lineales de movimiento, como se puede entrever en nuestro trabajo, donde el grupo de buenos congeladores presenta medias notablemente más elevadas en los tres descriptores de velocidad analizados, que los grupos de medios y malos congeladores, mientras que en los otros cinco parámetros estudiados no se reflejaron diferencias significativas entre grupos.

Dado que las células con movimientos más veloces y curvilíneos tras la descongelación recuperan la linealidad una vez transcurrido un cierto periodo de tiempo a 38 °C, resultaría interesante valorar la alternativa de realizar el análisis cinético una vez transcurrido ese tiempo, con el fin de registrar las características cinéticas sin que éstas se vean influenciadas por esas variaciones transitorias del medio intracelular.

No obstante, hay que tener muy en cuenta que, a pesar de la gran utilidad de los sistemas CASA en el estudio del movimiento espermático, la mayoría de ellos se basan en el movimiento

de la cabeza, por lo que resulta francamente complicada la evaluación del estado de hiperactivación, ya que al ser éste un movimiento caracterizado fundamentalmente por un patrón flagelar, el análisis se va a basar en una estimación indirecta, resultando poco preciso para este fin (Suárez y Ho, 2003). Este hecho, pudiera ser una de las causas de la disparidad de valores obtenidos por los autores con la utilización de sistemas computarizados para la cuantificación de este movimiento; así, algunos autores, como Mortimer y Mortimer (1990) en semen humano, consiguieron detectar promedios que se acercaban notablemente a la definición del movimiento realizada por Yanagimachi (1994), al describir un aumento de la VCL y de la ALH, así como una reducción de la VSL, el LIN, el STR, el WOB y la BCF, o como Schmidt y Kamp (2004), que también recogieron un incremento de la VCL y de la ALH, junto con un descenso del LIN en semen porcino. En cambio, existen otros trabajos en los que, mediante la utilización de distintos medios capacitantes, no se han podido reproducir estos resultados, como el de García-Herreros *et al.* (2005), que observaron incrementos en el LIN y en el STR, o como el de Sansegundo (2008), que obtuvo un aumento generalizado de la mayoría de los parámetros, resultados estos últimos que se asemejan a los recogidos en nuestro trabajo, tras el proceso de criopreservación.

La dificultad para describir este tipo de movimiento mediante los parámetros cinéticos calculados por los sistemas CASA, puede verse explicada también por el hecho de que el análisis realizado se efectúa sobre los valores medios de la población total de espermatozoides móviles, de forma que se podría estar enmascarando la manifestación de características cinéticas similares a las de las células hiperactivadas en una determinada subpoblación espermática, por lo que sería más interesante analizar el comportamiento de las diferentes subpoblaciones, en un intento de conocer mejor la incidencia de la criopacitación.

La adición de cafeína a las muestras originó un incremento general en los parámetros que indican un movimiento lineal (VSL, LIN y STR), así como un descenso de la ALH. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Abaigar *et al.* (1999) que calificaban al movimiento de los espermatozoides de verraco estimulados con cafeína, como más rápido y progresivo, como consecuencia del descenso observado en la ALH y el incremento de dos de las velocidades calculadas (VSL y VCL).

A pesar de que está ampliamente contrastado que el tratamiento de una solución espermática con metilxantinas va a provocar un incremento del AMPc en el interior de las células (Garbers *et al.*, 1971b; Hoskins *et al.*, 1975; Wang *et al.*, 1993), lo que conlleva un aumento tanto del porcentaje de células móviles como de su velocidad, incluida la VCL (Glogowski *et al.*, 2002), nuestro trabajo no evidenció la subida de este descriptor cinético, sino que incluso mostró un ligero pero significativo descenso en sus promedios.

La presencia de diferencias en los promedios de la velocidad curvilínea al verse incrementado el AMPc ha sido relatada en otros trabajos; así, Mahony *et al.* (1996), (2000) y Li y Liu (2002), empleando semen de primate, indujeron el aumento del porcentaje de movilidad y la progresividad de las células mediante la subida de los niveles de AMPc, bien por medio de la inhibición de la fosfodiesterasa (a través de la cafeína) o bien, mediante la administración de análogos del AMPc (como el dibutirilAMPc), recogiendo una elevación notable en el promedio de la VCL en unos (Mahony *et al.*, 1996, 2000), mientras que en el otro (Li y Liu, 2002) no se apreciaron

diferencias estadísticamente significativas con los valores calculados en el grupo sin tratar.

En nuestro estudio, la existencia de variaciones, no sólo en este parámetro sino también en el resto de velocidades y en la BCF, entre los eyaculados provenientes de los distintos verracos analizados (tablas de la 9.11 a la 9.14 en los anexos), deja a la luz una clara influencia individual en la respuesta espermática al tratamiento con este tipo de sustancias. Sin embargo, parámetros cinéticos como la ALH o, fundamentalmente, el LIN, el STR o el WOB (a pesar de que estos últimos sean extraídos de los promedios de las velocidades) casi no muestran variaciones entre animales, aumentando en todos ellos, lo que sugiere que el efecto de la cafeína se caracteriza más por la adquisición de un patrón más lineal y progresivo que por el incremento de la velocidad del movimiento.

La respuesta espermática a la cafeína en las muestras descongeladas sí evidenció el incremento de la VCL, así como del resto de parámetros, salvo la ALH, que redujo sus promedios al igual que en el semen fresco. Las modificaciones de los parámetros por la estimulación de las muestras descongeladas, que se produjeron prácticamente por igual en todos los animales, fueron más acusadas que las observadas en el T0. Esta aparente mayor influencia de la cafeína sobre los espermatozoides descongelados puede responder al bajo estado metabólico que presentan muchos de ellos tras la criopreservación (Medrano y Holt, 1998), o incluso podría deberse a acciones específicas de las metilxantinas sobre la neutralización de las ROS (cuya aparición es más frecuente después de la descongelación que en semen fresco), con la consecuente reducción de la peroxidación lipídica (Bell *et al.*, 1993; McKinney *et al.*, 1996; Okada *et al.*, 1997), aunque posiblemente, el mayor efecto de la cafeína en estas muestras se ejerza mediante la traslocación de calcio (Hong *et al.*, 1985b; Loughlin y Agarwal, 1992; Nagai *et al.*, 1994), pues al reducirse la concentración de este ión en el interior de la célula, se facilita, por una parte, la expresión de la movilidad en aquellos espermatozoides cuya capacidad de movimiento se había visto limitada por el gran acúmulo originado tras la criopreservación y, por otra, se modifica notablemente el patrón de aquellos otros cuyos niveles de calcio habían favorecido un tipo de movimiento más curvilíneo, al transformarlo en uno más lineal.

### **Respuesta y evolución de los parámetros cinéticos individuales durante la prueba de la termorresistencia.**

A partir de los experimentos realizados, observamos que la incubación de muestras seminales de verraco a 39 °C durante varias horas provoca la manifestación de un patrón de movimiento más rectilíneo, caracterizado fundamentalmente por el incremento de la VSL, el LIN, el STR y la BCF, así como por un descenso de la ALH, en términos similares a los observados anteriormente por Holt *et al.* (1997) [tabla 4.55].

El comportamiento de los tres parámetros de velocidad y de la BCF, que experimentan un incremento al inicio de la prueba, para posteriormente, en el T7, disminuir de forma considerable, hace suponer la influencia del aumento de la actividad metabólica provocado por el incremento térmico (Zou y Yang, 2000), que va a estimular las funciones celulares, entre las cuales se halla

la movilidad, quedando de manifiesto por un aumento en la frecuencia de batido del flagelo y, en general, por una mayor velocidad de los espermatozoides. Esta mayor actividad metabólica va a originar un consumo energético más acelerado, disminuyendo las reservas de energía con mayor celeridad (Zou y Yang, 2000), lo cual podría ser la causa de que, en las etapas finales de la incubación se origine una reducción, tanto del porcentaje total de espermatozoides móviles como de la velocidad del movimiento y de la frecuencia de batido flagelar, circunstancia que, para Fraser *et al.* (2001), resulta representativa de células con una baja capacidad fecundante y con una marcada incapacidad para sobrevivir un periodo de tiempo prolongado.

Otra causa que podría justificar esta caída de valores en los parámetros cinéticos después de siete horas de incubación, y que también se encuentra relacionada con el incremento metabólico, es la formación de un mayor número de ROS, como consecuencia del aumento de la actividad respiratoria originada por la mayor demanda energética de las células espermáticas. Estas ROS van a provocar fenómenos de lipoperoxidación de la membrana (Comaschi *et al.*, 1989; Aitken, 1994; Aurich *et al.*, 1997; Cerolini *et al.*, 2000; Batellier *et al.*, 2001) alterando la funcionalidad celular y su movilidad, así como una notable reducción de la concentración del ATP espermático, que conlleva una reducción de la fosforilación proteica en el axonema (De Lamirande *et al.*, 1997) pudiendo, con ello, colaborar en la reducción de la BCF y de la velocidad celular en general.

Al incubar las muestras con cafeína se produjo un incremento en prácticamente todos los parámetros cinéticos, a lo largo de las siete horas de incubación a 39 °C (figuras de la 4.38 a la 4.41), si bien éste resultó mucho más evidente en los dos últimos puntos de toma de datos (T4,5 y T7), en los que el descenso que sufren sus promedios en las muestras no estimuladas es muy marcado (tabla 4.56).

El efecto de la cafeína sobre el movimiento de los espermatozoides mantenidos a 39 °C también provoca un incremento de la velocidad y de la progresividad, si bien éste, durante las primeras cuatro horas y media de incubación, resulta mucho menos importante que el detectado en el T0, y esto se aprecia con más notoriedad en los tres parámetros que definen la linealidad del movimiento, llegando incluso a no aparecer diferencias significativas con las muestras sin tratar en el caso del STR. El alto grado de actividad metabólica que presentan los espermatozoides en esta prueba está, con bastante probabilidad, detrás de ello, ya que ese incremento que se produce, como consecuencia de las altas temperaturas, en la mayoría de los parámetros cinéticos analizados, reduce el margen de mejora que presentan las células móviles en el T0.

Aunque en algún trabajo realizado con semen de porcino (Abaigar *et al.*, 1999) se ha relatado que la cafeína ejerce un efecto reductor en los promedios de la ALH, en nuestro estudio se observa que al realizar la incubación van aumentando progresivamente, lo cual podría explicarse a partir de la interpretación que de forma habitual se ha conferido a este parámetro; por una parte, puede ser indicativo de un movimiento más progresivo (Abaigar *et al.*, 1999; Eriksson *et al.*, 2001; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2008), ya que una menor ALH indicaría una menor amplitud del “cabeceo”, lo que va a posibilitar una mejor progresión de las células, y, por otra parte, se ha relacionado a la ALH con la vigorosidad del movimiento (Tejerina, 2008), puesto que valores altos pueden resultar reveladores de la fuerza que el espermatozoide ejerce para el movimiento



del flagelo. Así, en los primeros momentos de la incubación a 39 °C, las muestras sin cafeína experimentan un descenso en el promedio de este parámetro, algo que se puede achacar, con toda probabilidad, al incremento del metabolismo celular provocado por la temperatura (mayor progresividad); a su vez, las células espermáticas van perdiendo capacidad móvil con el paso de las horas, como queda de manifiesto en la reducción del porcentaje de espermatozoides móviles. El incremento de los promedios de la ALH observado con la cafeína, puede que responda al movimiento de aquellas células a las que, habiendo perdido o estando próximas a perder su movilidad, el aumento intracelular del AMPc les ha posibilitado realizar un último “esfuerzo” para desplazarse (mayor vigorosidad), si bien éstas van a presentar una clara dificultad para ejecutar este desplazamiento, manifestándolo con una mayor ALH. A medida que transcurren las horas, se va a incrementar el porcentaje de estas células débiles, y por lo tanto, los promedios de este parámetro van a ser mayores en el T4,5 y en el T7. En este sentido, se observa también que los animales en los que la cafeína empieza antes a elevar las medias de ALH, corresponden a aquellos en los que disminuye el porcentaje de espermatozoides móviles de forma más temprana.

La BCF no experimentó ninguna variación tras la estimulación de las muestras con cafeína en el T0, algo que también ha sido observado en otros trabajos, como los de Abaigar *et al.* (1999) o Yeste *et al.* (2008); en cambio, con la incubación a 39 °C los promedios de las muestras seminales estimuladas descendieron significativamente en el T1,5, el T3 y el T4,5, y únicamente se evidenció un incremento claro en el T7, punto en el que las muestras no estimuladas habían experimentado una notable caída en su capacidad móvil. Este comportamiento, referido al porcentaje total de células móviles, ya fue relatado por Garbers *et al.* (1971a), Domínguez *et al.* (1985), Rees *et al.* (1990) o Fattouh y Abdou (1991), que expusieron que los porcentajes en muestras espermáticas con una alta movilidad inicial, o bien no se veían modificados, o bien se veían disminuidos por la adición de cafeína, mientras que aquellas otras con una baja actividad móvil mostraban un incremento mucho más acusado; este dato nos sugiere que la BCF puede resultar un indicador interesante de la actividad metabólica de las células.

### **Respuesta y evolución de los parámetros cinéticos individuales en la prueba del choque *a frigore*.**

Como ya se ha expuesto, una de las principales afectaciones que manifiestan los espermatozoides que han sufrido un choque *a frigore* es la pérdida irreversible de la capacidad móvil (Lasley y Bogart, 1944; Quinn y White, 1966), que responde principalmente a cambios estructurales de la membrana plasmática (Watson, 1981a; Watson y Plummer, 1985), así como a las modificaciones bioquímicas del medio intracelular originadas por éstos (De Leeuw *et al.*, 1990b; Woelders, 1990; Watson, 1995). No obstante, la supresión definitiva de la movilidad no va a ocurrir de forma generalizada en todas las células, sino que un determinado porcentaje va a mantener la capacidad de desplazarse, muy probablemente porque las alteraciones originadas en ellas a nivel de la membrana no resultan tan marcadas como en aquellas otras que muestran una clara incapacidad para el movimiento. Esta implicación de la integridad de la membrana en el movimiento celular puede verse corroborada en nuestro estudio, al observar las altas correlaciones existentes (nunca

inferiores a 0,806) entre los promedios de resistencia de la membrana plasmática y los de espermatozoides que mantuvieron la movilidad tras los diferentes choques, bien fuera con estimulación previa de las muestras con cafeína, como sin ella (tablas de 9.4 a 9.8 de los anexos).

En nuestro trabajo se comprobó que el choque por frío modifica considerablemente las características del movimiento espermático, apreciándose un patrón caracterizado por un notable incremento de la velocidad del desplazamiento y de la amplitud lateral del movimiento de la cabeza, con respecto al mostrado en fresco (tabla 4.57). No hemos encontrado literatura previa que analice, mediante sistemas CASA, el movimiento espermático tras un descenso brusco de temperatura, y aunque este patrón se asemeja bastante al que hemos descrito en las muestras descongeladas, pueden apreciarse ciertas diferencias entre ambos; en particular, en el descongelado se ven incrementados de forma generalizada todos los descriptores analizados, excepto la BCF que aparece inalterado, mientras que tras el choque *a frigore*, este último también presenta una cierta elevación en sus promedios, a la vez que, por su parte, otros parámetros como el LIN o el WOB, no sólo no se ven incrementados, como ocurría en el descongelado, sino que muestran una reducción clara en sus valores medios.

Las similitudes en el patrón de movimiento de las células espermáticas criopreservadas y el mostrado tras sufrir el choque *a frigore*, denota una más que posible relación entre estos dos procesos, algo que resulta razonable si tenemos en cuenta que el choque por frío resulta uno de los principales responsables directos del daño celular ocasionado en la criopreservación (Maxwell y Johnson, 1997b). El efecto deletéreo ocasionado por el enfriamiento brusco en ambos, posiblemente implique la aparición de variaciones parecidas en el medio intracelular; en concreto, tanto tras el choque como tras la criopreservación se ha relatado, como una de las variaciones más evidentes, el notable incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Quinn y White, 1966; Robertson y Watson, 1986; White, 1993; Bailey y Buhr, 1994), encontrando en espermatozoides de carnero una gran similitud entre las curvas que recogen la evolución de la absorción de calcio para ambos procesos (Simpson y White, 1986), por lo que, dada la relación de este ión con la cinética espermática, no resulta descabellado que se manifiesten patrones de movimiento semejantes.

La resistencia de la membrana plasmática al enfriamiento va a determinar el grado del acúmulo de calcio en el interior de la célula, de forma que nos encontramos con que en especies más resistentes al descenso de temperatura, como la bovina, los valores de calcio intracelular son mucho menores que en la especie porcina (Bailey y Buhr, 1994), o que la interiorización de este ión resulta más elevada cuanto menor es la temperatura final alcanzada por la muestra (Simpson y White, 1986; Watson y Plummer, 1985), si bien esta dependencia térmica está mucho menos marcada en la especie porcina que en otras especies como la ovina (Watson y Plummer, 1985), posiblemente por la diferencia de sensibilidad al enfriamiento existente entre ellas. No obstante, hay que ser prudentes con esta aseveración, puesto que en el trabajo de Simpson y White (1986) se observó la paradoja de que las muestras congeladas a  $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$  mostraban niveles de absorción de calcio mucho más bajos que si se detenía el proceso en  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hecho justificado por los autores aduciendo una posible afectación mitocondrial que iba a impedir la incorporación normal de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la mitocondria en la descongelación, disminuyendo con ello sensiblemente los

niveles detectados.

El hecho de que el grado de concentración intracelular de calcio esté influenciado por el daño originado en las diferentes estructuras celulares, sugiere que podría emplearse como un indicador indirecto de la resistencia de los espermatozoides al proceso y, dada la relación existente entre la concentración intracelular de calcio y ciertos patrones de movimiento espermático, es posible que el análisis de las características cinéticas mediante sistemas CASA pudieran aportar datos objetivos de la resistencia de los diferentes eyaculados, tanto al choque por frío, como a la criopreservación.

Por otra parte, numerosos autores han relatado el aumento de la resistencia de las membranas al descenso brusco de temperatura mediante el incremento del tiempo de incubación previo (Pursel *et al.*, 1972a; Pursel *et al.*, 1973; Watson, 1979; Pursel y Park, 1985; Robertson *et al.*, 1988), observándose además, cómo a medida que transcurre éste, se reduce la interiorización de calcio por parte de los espermatozoides (Robertson *et al.*, 1988). Esta disminución de la susceptibilidad celular queda claramente de manifiesto, tanto en los trabajos citados como en el nuestro, en los promedios de viabilidad y de integridad acrosómica o en el porcentaje total de espermatozoides móviles, si bien la limitación de calcio intracelular no se evidenció en nuestro estudio con modificaciones en los patrones de movimiento de los espermatozoides, ya que la inmensa mayoría de las medias de los ocho parámetros analizados se mantuvieron constantes tras los diferentes choques (tabla 4.57). Las diferencias más evidentes se observaron en el S0, valoración a la que no le conferimos mucha importancia dado el bajo número de espermatozoides analizados en ella, y en el S5, donde se recogieron valores ligeramente inferiores en las tres velocidades, en la BCF y en la ALH, siendo este último parámetro el único en el que se entrevería un posible efecto de la reducción en los niveles de calcio; en cambio, entre la hora y las tres horas de incubación los promedios no varían de forma significativa en prácticamente ningún descriptor, a pesar de haberse recogido en ese intervalo de tiempo un claro incremento tanto en el porcentaje de espermatozoides que mantuvieron la movilidad tras el choque, como en la resistencia de la membrana plasmática al mismo. Este hecho podría responder a que la influencia de los niveles de calcio intracelular sobre la movilidad espermática sea la misma en un rango relativamente amplio, lo que sugeriría, como se planteaba respecto al semen descongelado, que la célula no ha tenido tiempo para reorganizarse y eliminar la suficiente cantidad de calcio como para que se pueda manifestar una variación en la cinética de los espermatozoides, al haber realizado las valoraciones a los pocos minutos de efectuar el choque. El hecho de que la reversibilidad de los fenómenos de transición lateral de fases, una vez que se realiza el calentamiento de las muestras enfriadas, resulte sólo parcial (Holt y North, 1984; De Leeuw *et al.*, 1990a), sugiere que el grado de recuperación de cada eyaculado va a depender de características individuales del mismo, por lo que se presupone que la capacidad de adaptación, el restablecimiento de las funciones celulares, la eliminación de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y la consiguiente recuperación de un patrón de movimiento más "normal", también va a depender de estas características; es por esto por lo que parece recomendable que la valoración cinética de las muestras se efectúe después de haberlas mantenido un tiempo considerable en incubación, ya que posiblemente se mostraría con mayor precisión el efecto del aumento de la resistencia celular al choque por frío, si bien queda por determinar cuál es el tiempo ideal de permanencia de las

muestras en incubación, ya que la reducción de los niveles de calcio pudiera resultar más lenta de lo aconsejable para el análisis cinético, si atendemos a los resultados obtenidos por Simpson y White (1986) en semen de carnero, puesto que fueron necesarios 200 minutos en incubación para recoger niveles de absorción de calcio tras el choque realizado (5 minutos a 0 °C) similares a los obtenidos en el pico máximo del semen descongelado.

#### **Determinación de la congelabilidad de un eyaculado a partir de los valores observados en los parámetros cinéticos individuales.**

Nuestros resultados indican, a tenor de las diferencias encontradas entre los tres grupos en los que se dividieron los eyaculados según su aptitud para la criopreservación, que la calidad de las muestras recién descongeladas se refleja principalmente en la velocidad mostrada por las células, ya que el grupo que integra a los mejores congeladores (BC) registró los promedios más elevados, seguido del grupo de congeladores medios (CM) y de los malos congeladores (MC) [tabla 9.19 de los anexos]. Como ya se ha señalado, esto concuerda en parte con los resultados recogidos por Katkov y Lulat (2000), que manifiestan que las células caracterizadas por una mayor criorresistencia muestran patrones más veloces y circulares tras la descongelación, si bien este último punto no se ha podido corroborar en nuestro trabajo por la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en los patrones que miden la linealidad del movimiento, que también se produce en el resto de parámetros analizados, aunque se observa una cierta tendencia a que la capacidad de congelación esté inversamente relacionada con la frecuencia de batido flagelar de las células descongeladas, lo que implicaría que las células con una buena capacidad de criopreservación presenten movimientos más veloces pero con una menor frecuencia de batido.

La utilización de los descriptores cinéticos en el semen fresco como medio para predecir la capacidad de congelación de un eyaculado, teniendo en cuenta los resultados recogidos en nuestro trabajo, no parece resultar muy eficaz, pues sólo se alcanzó a explicar un 27,3 % de la variabilidad observada en las muestras descongeladas, si bien, hay que destacar que este porcentaje se obtuvo a través de un modelo de regresión múltiple integrado únicamente por dos de los ocho parámetros, el WOB y la BCF (tabla 4.60). A pesar de este escaso valor predictivo, resulta interesante observar la relación existente entre la resistencia a la criopreservación y ciertos parámetros cinéticos, como el WOB, cuyo coeficiente de correlación con la congelabilidad nos indica que aquellas células que presentan un alto grado de oscilación de la trayectoria real de la cabeza respecto de la trayectoria media, van a ser las que resisten mejor todo el proceso. Esta correlación positiva del WOB ya se dejó entrever al analizar el comportamiento de los tres grupos de calidad establecidos, ya que el grupo MC mostraba promedios significativamente menores que los de los otros dos grupos con una mejor aptitud para la criopreservación, lo cual fue registrado también respecto al LIN o a la BCF. Este último parámetro, a pesar de no reflejar significación estadística en sus relaciones con los índices que analizan la resistencia al proceso, no sólo resultó ser, como hemos indicado, el otro parámetro incluido en el modelo de regresión de las muestras no estimuladas, sino que fue el único integrante del mejor modelo establecido para aquellas otras que sí fueron tratadas, llegando a explicar por sí mismo casi un 25 % de la varianza total de la resistencia de

la membrana plasmática al proceso de congelación/descongelación.

La ausencia, de forma previa al análisis cinético, de algún tipo de estrés sobre las células recién eyaculadas puede que sea uno de los factores que determinen las débiles relaciones recogidas, ya que la criopreservación resulta un proceso esencialmente estresante para los espermatozoides; en esta misma línea, ya varios autores habían recogido la ausencia de relaciones estadísticamente significativas entre diferentes descriptores de calidad seminal en semen fresco y los calculados tras la descongelación (Rath y Niemann, 1997; Roca *et al.*, 2000a). No obstante, nuestro trabajo permite entrever la importancia del análisis individualizado del movimiento espermático para este fin, ya que permite, como se comprobó en el primer experimento, establecer relaciones a partir de la movilidad celular que no se consiguen con el porcentaje total de espermatozoides móviles y también discriminar entre los tres grupos de calidad en función de su aptitud para la criopreservación.

Al someter a las muestras seminales a distintas situaciones de estrés se pudo comprobar cómo las relaciones con la resistencia a la criopreservación se modificaban; así, la clasificación de los eyaculados en función de su aptitud para la congelación nos permitió observar que en la incubación de las muestras a 39 °C, los eyaculados que presentaban una mayor resistencia eran, por una parte, y al igual que en el T0, los que manifestaban velocidades estadísticamente superiores, pero por otra, y como elemento diferenciador respecto a los resultados recogidos en el semen fresco, también eran los que mostraban una mayor frecuencia de batido flagelar (tabla 9.19 de los anexos). Incluso a nivel de la ALH, que a lo largo de las primeras 4,5 horas de incubación había mostrado una similitud entre los tres grupos, en el T7 resultó significativamente más elevada en el grupo BC, lo que podría indicar una mayor vigorosidad en el movimiento de estas células, en un punto caracterizado por una escasa capacidad móvil. Esta mejor respuesta de las células espermáticas provenientes de eyaculados con una buena capacidad de criopreservación, podría responder a que su membrana plasmática presenta un mejor estado, dada la relación de éste con la capacidad móvil (Woelders, 1990; Watson, 1995), así como con la congelabilidad, como se observó en el primer experimento, donde el grupo BC era el que presentaba un mayor promedio de integridad, tanto en fresco, como tras los choques por frío o durante la incubación a 39 °C.

A pesar de esto, el análisis de los parámetros cinéticos de células espermáticas sometidas a un estrés térmico no aporta, a la hora de intentar esclarecer la capacidad de criopreservación de los eyaculados, datos mucho más relevantes que el análisis realizado sobre las muestras en el T0, ya que, por una parte, tampoco se observan muchos parámetros que se encuentren correlacionados con los cuatro índices posdescongelación calculados (y los que se encuentran, lo hacen únicamente a las 3 y a las 7 horas de incubación, sin que pueda derivarse una interpretación lógica) [tabla 4.61], y por otra, ninguno de los modelos de regresión configurados va a aportar explicaciones interesantes de la variabilidad del semen descongelado. No obstante, sí conviene reseñar la implicación de la BCF, que además de ser la única (y la más alta) correlación significativa en el T7, aparece, al igual que en el T0, en todos los modelos de regresión establecidos, lo que nos va a sugerir que la capacidad de los espermatozoides para mantener una elevada frecuencia de batido en condiciones de alta actividad metabólica, puede resultar un indicador interesante en

la resistencia al proceso de congelación/descongelación.

El sometimiento de las muestras seminales a un estrés por frío arroja correlaciones de los parámetros cinéticos con los índices calculados posdescongelación más interesantes, llegando a valores de 0,556 respecto de la congelabilidad, o de 0,589 respecto de la resistencia de la capacidad móvil a la criopreservación, tras la estimulación de las muestras con cafeína (tabla 4.65). Esta mayor relación responde, con toda probabilidad, a la gran similitud existente entre el daño celular provocado por el choque por frío y el ocasionado en la criopreservación, si bien los coeficientes calculados no llegan a alcanzar valores tan elevados como los reflejados en el primer experimento a partir de la resistencia de la membrana plasmática y de la acrosómica, o de la movilidad, con o sin cafeína.

Al analizar los promedios de los parámetros cinéticos de cada uno de los grupos de calidad (tabla 9.21 de los anexos), se comprueba que el grupo MC presenta las medias más bajas de velocidad celular en prácticamente toda la prueba. A medida que discurre el tiempo de incubación de las muestras a 20 °C, las diferencias entre los grupos BC y MC van disminuyendo, llegando incluso a desaparecer en el S5, algo que llama la atención, pues en el primer experimento el porcentaje total de espermatozoides móviles se comportaba de forma opuesta, incrementándose, de forma paulatina, las diferencias entre los citados grupos. Esta falta de sincronía pudiera responder al efecto del enfriamiento sobre las distintas estructuras celulares; así, aunque la principal afección del frío recae sobre la membrana plasmática (Parks y Graham, 1992; Parks, 1997), en aquellas células más susceptibles se van a producir también alteraciones sobre otros elementos celulares, como las mitocondrias (Watson, 1995; O'Connell *et al.*, 2002), que pueden manifestarse con deficiencias en el desarrollo de la movilidad y con movimientos poco veloces y vigorosos (Courstens *et al.*, 1989). El incremento de la velocidad celular tras el choque por frío se origina, con bastante probabilidad, por la influencia del aumento citosólico de calcio sobre las rutas metabólicas de los espermatozoides que presentan un correcto estado de las estructuras que permiten el desarrollo de la motilidad; sin embargo, en aquellos otros espermatozoides con lesiones a nivel del axonema, del flagelo o de las mitocondrias, el movimiento que manifiestan podría estar determinado por la presencia de las citadas lesiones, sin que se vea influenciado en absoluto por la variación de los niveles de calcio intracelular. La más que probable presencia de un mayor porcentaje de espermatozoides con una marcada sensibilidad al descenso térmico en los eyaculados del grupo MC, nos hace pensar en una mayor incidencia de lesiones mitocondriales, que justificaría, por ende, los bajos promedios de velocidad de este grupo, mientras que en los grupos más resistentes, como el BC, el porcentaje de células con este tipo de lesiones será presumiblemente muy inferior.

El incremento del tiempo de incubación eleva la resistencia celular al frío, lo cual se refleja en un aumento del número de espermatozoides que muestran movilidad en los tres grupos, pero también en una reducción, tanto de las lesiones mitocondriales (con mayor incidencia en el grupo MC), lo que provocaría una mayor presencia de patrones de movimiento característicos del incremento citosólico del calcio, como de lesiones a nivel de la membrana plasmática (principalmente en el grupo BC), lo que originará una limitación en la interiorización de iones calcio motivada por la reducción de la permeabilidad de la membrana plasmática, con la consecuente mengua de

las medias de los tres descriptores de velocidad analizados. Esta disminución de lesiones celulares en los diferentes grupos y su posible repercusión sobre la movilidad podría explicar en parte la equiparación de valores entre los tres grupos que se observa en el S5. La afectación en la criopreservación de estructuras claves para el movimiento espermático como el flagelo (Courstens *et al.*, 1989; O'Connell *et al.*, 2002; McClean *et al.*, 2007) o la mitocondria (O'Connell *et al.*, 2002; Peña *et al.*, 2003b; Nishizano *et al.*, 2004), también ha sido empleada para justificar la reducción de la velocidad y vigorosidad que manifiestan ciertas subpoblaciones en el semen descongelado (Tejerina, 2008).

Los resultados recogidos tras la incubación de las muestras con cafeína pueden explicarse con la misma teoría, ya que manifiestan más o menos el mismo efecto, fundamentalmente a nivel de la VSL (tabla 9.22 de los anexos). El incremento de la velocidad lineal que induce la cafeína (Abaigar *et al.*, 1999) se va a manifestar si hay un correcto funcionamiento de las estructuras mencionadas con anterioridad; así, mientras en el T0 las diferencias en los promedios de la VSL para los tres grupos son pequeñas, apareciendo significación estadística en el valor del grupo MC, que resulta algo superior al de los otros dos, la realización de los choques va a invertir su efecto, provocando que los promedios más altos radiquen en el grupo con una mayor resistencia al frío (al que se le presupone una menor incidencia de lesiones a ese nivel) y los más bajos al grupo MC, que debería ser el más afectado por el descenso térmico y, por tanto, el que presentara un peor funcionamiento. Al incrementar la resistencia celular con la incubación, se van reduciendo las diferencias entre los tres grupos hasta que, en el S5, desaparecen completamente llegando a mostrar incluso una tendencia a que los valores más altos correspondan al grupo MC, de forma similar a lo observado en el T0.

En muestras incubadas con cafeína, la importancia de la VSL en relación con la capacidad de congelación de un eyaculado, queda de manifiesto al comprobar que es el único parámetro que presenta coeficientes de correlación significativos con alguno de los índices establecidos post-descongelación tras todos los choques realizados a partir de la hora de permanencia a 20 °C, siendo éstos mucho mayores en los primeros momentos de incubación, ya que es donde existen las diferencias más evidentes entre grupos. Sin embargo, y a pesar de lo que sucedía con los descriptores de velocidad, las muestras sin cafeína reflejan una mayor importancia tanto de la ALH (otro de los parámetros que denotan el incremento de calcio intracelular), como del WOB, al ser los únicos parámetros que presentan correlaciones significativas en el S1, el S2, el S3 y el S5, si bien éstas, en la ALH, fueron menores a medida que transcurría el tiempo, debido con toda probabilidad, a la mencionada equiparación paulatina en el patrón cinético manifestado por los tres grupos a medida que los espermatozoides van incrementando su resistencia.

Otro efecto reseñable resulta la relación inversamente proporcional de los tres parámetros que cuantifican la linealidad del movimiento celular (LIN, STR y WOB) y la congelabilidad de los eyaculados, lo que sugiere que la aparición de un movimiento circular tras un enfriamiento brusco, no sólo no es un movimiento anómalo sino que resulta conveniente, pues es indicativo de una mayor resistencia de la célula, al ser capaz de responder al incremento de calcio con movimientos más asimétricos y con una mayor amplitud del batido flagelar (Cook *et al.*, 1994;

Ho *et al.*, 2002; Sakata *et al.*, 2003; Quill *et al.*, 2003). Los modelos multivariantes de regresión creados no muestran una preferencia por un determinado parámetro en particular, ni en las muestras tratadas con cafeína, ni en aquellas otras analizadas en ausencia de esta sustancia, pero sí se comprueba, al igual que se observó con las correlaciones o las diferencias entre grupos, que a medida que se incrementa la resistencia espermática con la incubación, disminuye la capacidad de estos modelos para justificar la variabilidad de las muestras descongeladas.

### 5.3.2. Estudio de subpoblaciones a partir de los parámetros cinéticos de los espermatozoides.

El desarrollo de los sistemas computarizados de análisis seminal ha proporcionado gran cantidad de datos objetivos acerca de las características cinemáticas de los espermatozoides (Verstegen *et al.*, 2002), lo cual ha supuesto un avance importante en esta materia, que sería notablemente mayor si se conociera el significado biológico de muchas de las variables calculadas, por lo que en los últimos años la comunidad científica está tratando de mejorar la información obtenida a partir de ellas (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2009). La combinación matemática de parámetros obtenidos en el análisis seminal es una de las herramientas utilizadas para este fin, ya que proporciona una información mucho más relevante que si se observan los diferentes parámetros de forma individual (Quintero-Moreno *et al.*, 2004) y, a su vez, constituye una vía imprescindible para definir subpoblaciones espermáticas al permitir sintetizar toda la información procedente de los descriptores cinéticos, aportando datos que de otra forma, considerando a la población espermática como un conjunto homogéneo, se obviarían o se malinterpretarían, con el consiguiente riesgo de alterar el significado de la relación entre la calidad seminal y la movilidad espermática y, por consiguiente, la de ésta última y la fecundación (Holt, 1996; Barratt *et al.*, 1993; Martínez-Pastor *et al.*, 2005b). La estructuración de los eyaculados de mamíferos en estas subpoblaciones es un enfoque que en la actualidad está ampliamente aceptado y ha sido descrito en numerosas especies, como el verraco (Abaigar *et al.*, 1999; Quintero-Moreno *et al.*, 2004; Rivera *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2006), el caballo (Quintero-Moreno *et al.*, 2003), el burro (Miro *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2008b), el perro (Rigau *et al.*, 2001), el ciervo (Martínez-Pastor *et al.*, 2005b), la gacela (Abaigar *et al.*, 1999), el Hamster (Holt, 1996) o el conejo (Quintero-Moreno *et al.*, 2007).

No obstante, las herramientas matemáticas utilizadas para clasificar los espermatozoides en grupos de características comunes constituyen una fuente de variación de los resultados, ya que éstos se van a ver condicionados por el método estadístico empleado en cada estudio (Quintero-Moreno, 2003); de hecho, la vía elegida para clasificar a las células espermáticas difiere notablemente entre los trabajos publicados. Numerosos investigadores (Quintero-Moreno, 2003, Quintero-Moreno *et al.*, 2004 y 2007; Martínez-Pastor *et al.*, 2005b, 2005a y 2006; Núñez-Martínez *et al.*, 2006; Rivera *et al.*, 2006; Ramio-Lluch *et al.*, 2006) optan por la realización de un análisis de componentes principales (PCA), con el objetivo de obtener un menor número de combinaciones lineales que conserven la mayor cantidad posible de información de las variables originales (Núñez-Martínez *et al.*, 2006), y a partir de ellas proceden a clasificar a los esperma-



tozoides en diferentes *clusters* o subpoblaciones. Aunque la realización del PCA permite evitar problemas en la ejecución de los diferentes análisis estadísticos, derivados de la alta correlación existente entre los descriptores, Tejerina (2008) no considera a esta prueba como la opción más adecuada para este fin, puesto que presupone de partida, la existencia de una única población normal multivariante y no la potencial existencia de múltiples subpoblaciones, lo que podría afectar a la clasificación realizada con posterioridad.

En nuestro estudio, al igual que otros autores como Abaigar *et al.* (1999), Cremades *et al.* (2005) o Tejerina (2008), se evitó utilizar un PCA de origen, efectuando directamente una clasificación no jerárquica de los valores recogidos para cada parámetro cinético, resultando de ésta un total de 40 subpoblaciones iniciales (también denominadas *preclusters* o *bins*), que es un número muy superior al obtenido en otros trabajos, que recogen 9 para el semen de cerdo y 11 para el de gacela (Abaigar *et al.*, 1999) ó 15 para el semen de ciervo (Martínez-Pastor *et al.*, 2005b y 2006). El agrupamiento previo de los espermatozoides en un número superior de *bins* confiere mayor consistencia a los resultados obtenidos, ya que se van a mostrar mucho más estables en la repetitividad de los análisis.

La posterior clasificación jerárquica a la que se sometió a los 40 *bins* también presenta diferencias con los trabajos de Abaigar *et al.* (1999) y Cremades *et al.* (2005) en cuanto a los algoritmos efectuados para su ejecución, ya que al igual que Tejerina (2008), recurrimos al algoritmo jerárquico aglomerativo de Ciampi *et al.* (2007) para extraer las subpoblaciones finales, mientras que los citados autores se decantaron por el UPGMA (Unweighted Pair Groups Median Average).

No obstante, a pesar de las diferencias con la mayoría de los trabajos publicados en cuanto al modelo estadístico empleado, el número de tres subpoblaciones que resultó idóneo en nuestro estudio, es similar al obtenido en la mayoría de los trabajos realizados con semen de mamífero, que está en un rango que va de tres a cuatro subpoblaciones. Esta proximidad en la estructuración del material seminal entre especies de la clase *Mammalia* responde, según Quintero-Moreno (2003), a la existencia de un cierto vínculo filogenético entre ellas, y aunque cabría esperar homogeneidad absoluta en el semen de una misma especie, en los diferentes estudios con semen de verraco unos abogan por una clasificación en tres subpoblaciones (Abaigar *et al.*, 1999; Quintero-Moreno, 2003; Cremades *et al.*, 2005) mientras que otros proponen cuatro (Rivera *et al.*, 2006; Ramio-Lluch *et al.*, 2006), posiblemente como consecuencia de las fuentes de variación que presentan los propios sistemas CASA, de la elección de material seminal de diferentes etapas fisiológicas o de las aludidas variaciones derivadas de la elección del método estadístico a utilizar.

Existen varias teorías sobre el origen de las subpoblaciones espermáticas; así, mientras Abaigar *et al.* (1999) defienden que su presencia responde a un genotipo heterogéneo de las células germinales, basándose en los estudios realizados sobre el haplotipo t de ratón por Olds-Clarke *et al.*, 1992a; 1992b, y en los cuales se describían alteraciones en la motilidad y en el transporte espermático achacables a mutaciones específicas, Quintero-Moreno (2003) se decanta más por un origen epididimario, defendiendo la presencia en el eyaculado de células con diferentes grados de desarrollo.

La distribución de los diferentes *clusters* en nuestro estudio (tabla 4.71) se asemeja a la de Abaigar *et al.* (1999), que definieron dos subpoblaciones principales de dimensiones similares y una tercera notablemente inferior a las otras dos, pues nosotros también nos encontramos con dos subpoblaciones principales (SP1 y SP3) que albergan al 44,23 y al 41,23 % de espermatozoides, respectivamente, y una subpoblación (SP2) que agrupa al resto de células espermáticas con un porcentaje del 14,54 %, notablemente inferior al de las otras dos. Estos resultados varían de forma considerable de los obtenidos por otros autores con semen de porcino, como Cremades *et al.* (2005) y Quintero-Moreno (2003), que describían una subpoblación principal con prácticamente el 90 % de los espermatozoides.

En cuanto a las características cinéticas de cada uno de los tres grupos (tabla 4.70), la SP3 refleja una capacidad móvil más bien limitada, con valores reducidos en los parámetros de progresividad (VSL, LIN, STR) y de vigorosidad (VCL, VAP, ALH y BCF); en cambio, la SP1 presenta trayectorias más rectilíneas y con movimientos más vigorosos, como demuestran sus mayores valores de VSL, STR y LIN, así como los de ALH, BCF, VCL y VAP; por su parte, la SP2 engloba a las células con los movimientos más vigorosos y zigzagueantes (a pesar de mostrar una menor BCF que la SP1), lo que les lleva a tener una larga trayectoria (altas VCL y VAP) pero a progresar poco (menor VSL), trazando trayectorias caracterizadas por su sinuosidad, reflejada en unos valores medios altos de ALH y bajos de LIN y STR; este último patrón de movimiento nos recuerda al definido por Yanagimachi (1994), Mortimer y Mortimer (1990) o Schmidt y Kamp (2004) como el típico que presentan aquellos espermatozoides hiperactivados, caracterizado por una VCL y ALH altas y un LIN bajo. El movimiento de los espermatozoides que integran la SP3, caracterizado por los bajos promedios obtenidos en prácticamente todos los parámetros, sugiere una baja actividad metabólica de los mismos, mientras los que forman parte de la SP1 tendrían una actividad metabólica normal, puesto que presentan valores considerados más “normales”. Estas conclusiones responden, como ya se indicó en la revisión bibliográfica, a que la movilidad es un reflejo de la capacidad metabólica de los espermatozoides, y por lo tanto ésta podría intuirse al analizar las características cinéticas de los mismos. Abaigar *et al.* (1999) y Quintero-Moreno (2003) obtuvieron evidencias de esto, los primeros, al comprobar que la respuesta de las distintas subpoblaciones a sustancias que modifican el metabolismo celular, como el bicarbonato o la cafeína, variaba notablemente, y el segundo al observar correlaciones entre los cambios de la distribución subpoblacional y los mostrados en pruebas funcionales realizadas a los espermatozoides como el ORT o la producción del L-Lactato.

Aunque nuestra distribución subpoblacional concuerda en parte con la de Abaigar *et al.* (1999), las características cinemáticas de los diversos grupos difieren considerablemente; así, mientras ellos observaron el patrón que hemos definido como de hiperactivación en uno de los grupos principales, nosotros lo recogimos en aquel que presentaba un menor porcentaje de células, que en su trabajo corresponde, por el contrario, al de menor actividad metabólica.

### **Respuesta de las subpoblaciones cinéticas al proceso de criopreservación.**

La criopreservación del semen produjo un cambio notable en la distribución subpoblacional

de las muestras (tabla 4.71), ya que incrementó en algo más de un 20 % los integrantes de la SP1, mientras que la SP3 sufrió una disminución drástica, pasando de un 41,23 % a un 17,52 %. Este paradójico incremento de la subpoblación que alberga, teóricamente, a las células cuyo movimiento es considerado, por su linealidad y rapidez, como el más “normal” de las tres, que también ha tenido lugar en otros trabajos, tanto con semen de verraco (Cremades *et al.*, 2005), como de ciervo (Martínez-Pastor *et al.*, 2005b, 2006), pudiera deberse a la incidencia de ciertos factores presentes en el desarrollo de nuestro trabajo; así, por ejemplo, los medios de dilución empleados para la valoración no son los mismos en el semen fresco y en el descongelado, puesto que en el primero se utilizó MR-A y en el análisis del segundo BTS, y la diferente composición de éste podría haber modificado las características del movimiento de las células favoreciendo el patrón característico de la SP1; en concreto, la concentración de EDTA, conocida en el BTS (tabla 5.2) y desconocida, por motivos comerciales, en el MR-A podría justificar cambios en el patrón de movimiento, dada la gran capacidad quelante que dicha sustancia ejerce sobre el calcio y teniendo en cuenta la influencia de este ión sobre la motilidad espermática (Wishart y Ashizawa, 1987; Goh y White, 1988; Tash y Bracho, 1994; Ashizawa *et al.*, 1999; Ho *et al.*, 2002).

Otros factores que han podido provocar cambios en la cinética de las células son la realización de una centrifugación previa a la congelación propiamente dicha, cuya influencia sobre las características cinéticas de los espermatozoides está demostrada (Carvajal *et al.*, 2004), y la adición de Equex al diluyente de congelación, ya que se ha determinado que favorece la manifestación de trayectorias rectilíneas (Abaigar *et al.*, 1999), pudiendo contribuir, por lo tanto, al incremento del porcentaje de la SP1. No obstante, hay que tener en cuenta que es probable que la reducción de espermatozoides móviles en el proceso de criopreservación haya afectado en mayor medida a aquellas células que presentaban una menor actividad en el T0 (SP3), ya que dicho proceso afecta claramente a dos estructuras fundamentales para el movimiento espermático, como son el flagelo y la mitocondria (Courstens *et al.*, 1989; O’Connell *et al.*, 2002; Peña *et al.*, 2003b; Nishizano *et al.*, 2004; McClean *et al.*, 2007), por lo que provocaría una pérdida de motilidad en mayor grado en aquellos espermatozoides cuya capacidad de movimiento estaba ya debilitada previamente, de forma que parte de la drástica reducción observada en la SP3 y los consiguientes incrementos detectados en las otras dos subpoblaciones (aunque en la SP2 no resultó estadísticamente significativo) serían consecuencia de esta mayor susceptibilidad de la SP3.

Otro dato que resulta llamativo es la ausencia de significación estadística en el incremento de la SP2, ya que al ser el grupo con características cinéticas más próximas a la hiperactivación, era de suponer que la mayor concentración de calcio intracelular originada en la congelación/descongelación de las muestras, elevara más el porcentaje de integrantes de este grupo. A este respecto, otros autores (Guthrie y Welch, 2005; Cremades *et al.*, 2005; Saravia *et al.*, 2007; Casas *et al.*, 2009), a pesar de recoger durante el enfriamiento a 5 °C un incremento en el promedio de esta subpoblación, observan que el porcentaje de la misma se ve disminuido significativamente tras la descongelación.

La adición de cafeína produjo casi el mismo efecto en el semen fresco y en el descongelado, observándose un incremento de la SP1 en detrimento de las otras dos subpoblaciones, que vieron

descender de forma significativa su porcentaje; la disminución de la SP3, la subpoblación cuyos integrantes presentan una aparente menor actividad metabólica, puede ser atribuida al incremento del AMPc (Garbers *et al.*, 1971a; Rees *et al.*, 1990) tras la inhibición de las fosfodiesterasa, que actuaría de estimulante de la motilidad en estas células, mientras que, por su parte, la reducción de la SP2, pudiera responder en mayor medida a la traslocación de calcio del interior de la célula (Rall, 1980; Hong *et al.*, 1985b), lo que conseguiría reducir el movimiento flagelar asimétrico (Cook *et al.*, 1994; Ho *et al.*, 2002; Sakata *et al.*, 2003), que origina la presencia de concentraciones altas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y que, posiblemente, sea uno de los principales responsables del patrón de movimiento que define a esta subpoblación. Este incremento en la subpoblación que alberga a las células con movimientos más lineales y rápidos también fue recogido por Abaigar *et al.* (1999).

### **Respuesta y evolución de las subpoblaciones cinéticas durante la prueba de la termorresistencia.**

Contrariamente a lo ocurrido después de la criopreservación, en la que parte de las variaciones en la distribución poblacional pudieran achacarse a una mayor disminución en el porcentaje de espermatozoides móviles de una determinada subpoblación, la escasa reducción que se refleja tras las primeras horas a 39 °C, sugiere que la inmensa mayoría de las variaciones detectadas en las diferentes subpoblaciones responden únicamente al cambio en el patrón de movimiento de las células que las integran en el T0. Durante las primeras cuatro horas y media de incubación se observa una respuesta inversa y paralela, entre las subpoblaciones 1 y 3 (tabla 4.49); así, mientras la primera experimenta una subida notable, la segunda sufre una caída que la mantiene en promedios cercanos al 20 % durante todo este tiempo. Esta coincidencia entre la disminución de los espermatozoides con una baja actividad metabólica, característica que define a los integrantes de la SP3, y el incremento de los que presentan una alta capacidad metabólica, propia de los de la SP1, nos sugiere la existencia de una estimulación térmica del metabolismo celular, como indicaban Zou y Yang (2000). Los resultados recogidos en el T7 no hacen más que reafirmar esto, a pesar de que por el transcurso del tiempo se vea mermada notablemente la capacidad móvil de los espermatozoides, observándose un menor incremento de la SP1 y una gran subida en los promedios de la SP3, que prácticamente se duplican respecto a los anteriores tiempos de incubación.

Por su parte, la SP2, que engloba a los espermatozoides excluidos de los grupos de alta y baja actividad metabólica por sus características cinéticas, sufre durante toda la incubación una reducción progresiva en su porcentaje, que pudiera responder a una disminución paulatina de las reservas energéticas del medio como consecuencia del aumento general en la actividad metabólica de las células espermáticas, dado el incremento del consumo energético provocado por el estado de hiperactivación sugerido para los integrantes de esta subpoblación (Ho *et al.*, 2002; Suárez y Ho, 2003; Ho y Suárez, 2003; Suárez, 2008), lo cual podría dar lugar a que el movimiento flagelar típico de la hiperactivación se viera imposibilitado con anterioridad, reflejándose en una disminución del porcentaje de espermatozoides con este patrón cinético.

La variación que se refleja en las diferentes subpoblaciones como consecuencia del tiempo en incubación se ve controlada al estimular las muestras con cafeína, la cual permite además man-

tener la capacidad de movimiento en las últimas horas de incubación, amortiguando el descenso de la SP1 y la SP2, a la vez que controla con ello el incremento de la SP3 en el T7 (tabla 4.50). El efecto de la estimulación en las muestras, que consigue aumentar la linealidad del movimiento en el T0 (Abaigar *et al.*, 1999), y que se refleja mediante un aumento de la SP1 y un descenso de la SP2 y la SP3, no se aprecia en las tres primeras horas al verse incrementada la actividad metabólica de los espermatozoides por medio del calor, lo que implicaría que la utilización de cafeína sobre muestras frescas en esos primeros momentos no va a provocar un incremento mayor que el que se obtiene mediante la elevación de la temperatura; en esta línea, diversos estudios indican que ambos factores favorecen la estimulación de la respiración espermática incrementando con ello el metabolismo celular (Garbers *et al.*, 1973; Clarke *et al.*, 1982; Rees *et al.*, 1990; Dimitriadis *et al.*, 2008).

### **Respuesta y evolución de las subpoblaciones cinéticas en la prueba del choque *a frigore*.**

La ausencia de variaciones en cuanto a la distribución subpoblacional calculada tras los choques realizados a partir de la hora de incubación, denota, como quedó reflejado al analizar los resultados de los descriptores cinéticos individualmente, que los patrones de movimiento no cambian a pesar de que se incremente el porcentaje total de células con movilidad como consecuencia de la menor susceptibilidad de éstas al frío. La aplicación de un descenso brusco de temperatura a las muestras seminales va a originar una caída en los valores de las dos subpoblaciones mayoritarias (SP1 y SP3), lo que repercute sobre la tercera (SP2), que manifiesta un incremento espectacular debido, con toda probabilidad, al consabido aumento intracelular de calcio que manifiestan las células tras el choque (tabla 4.51). A pesar de que el incremento porcentual de la SP2 fuera aproximadamente igual a la disminución sufrida por las otras dos subpoblaciones, no parece lógico suponer que se haya producido un trasvase de espermatozoides incluidos inicialmente en éstas, ya que se presupone que la reducción en el porcentaje de movilidad afecta en un mayor grado a los integrantes de la SP3, debido a que sus características de movilidad limitada se les supone una mayor debilidad, lo que para Fraser *et al.* (2001) se traduce en una mayor incapacidad que el resto para sobrevivir por un largo periodo de tiempo y, por consiguiente, en una probable menor capacidad de adaptación a situaciones de estrés.

El efecto de la cafeína sobre las células espermáticas, que va a incrementar de forma notable su velocidad y, fundamentalmente, como ya se ha indicado, su linealidad, hace que se produzca un aumento de la subpoblación que está caracterizada por estos rasgos; esta elevación en el porcentaje de espermatozoides de la SP1 conlleva la reducción de las otras dos (tabla 4.52), por las dos principales vías mencionadas con anterioridad: la traslocación del calcio intracelular (Rall, 1980; Hong *et al.*, 1985b), que presumiblemente presenta un mayor efecto sobre la SP2, y mediante el incremento del AMPc (Garbers *et al.*, 1971a; Rees *et al.*, 1990), que afectará con más probabilidad a los integrantes de la SP3.

### **Determinación de la congelabilidad de un eyaculado a partir del tamaño de las subpoblaciones cinéticas.**

La preferencia de los investigadores por la utilización de subpoblaciones al realizar el análisis cinético, en vez de efectuar un análisis de los parámetros de forma individualizada (Quintero-Moreno *et al.*, 2004), responde no sólo a que proporciona una información más relevante que la observación individualizada de los parámetros (Holt, 1996; Barratt *et al.*, 1993; Quintero-Moreno *et al.*, 2004; Martínez-Pastor *et al.*, 2005b), sino también a la notable simplificación que proporcionan a la hora de interpretar los resultados, frente a ésta, que resulta bastante más compleja y pueden dar lugar a conclusiones no ceñidas a la realidad, que han de ser tomadas con bastante precaución (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2008).

A pesar de la preferencia existente por el análisis subpoblacional, en nuestro estudio, la valoración de las muestras seminales frescas (T0) atendiendo a la distribución de los espermatozoides en las tres subpoblaciones, no nos proporcionó una mejor predicción que el análisis individual de los parámetros cinéticos, en cuanto a los modelos de regresión establecidos a partir de ellas, viéndose considerablemente reducida la explicación de la variabilidad posdescongelado, con respecto al estudio individualizado, al alcanzar sólo un débil 7,8 %. No obstante, a partir de ellas se pueden sacar evidencias interesantes, como la posible relación entre la congelabilidad seminal y la actividad metabólica de los espermatozoides recién eyaculados; en concreto, los interesantes coeficientes de correlación encontrados (tabla 4.74), positivos para los integrantes de la SP1 (aquellos considerados de actividad metabólica normal) y negativos para los de la SP3 (los de actividad metabólica baja), sugieren la importancia del metabolismo espermático en la capacidad de respuesta celular al proceso de criopreservación, lo cual también viene apoyado, a pesar de la ausencia de significación estadística, por la tendencia mostrada por el grupo BC a presentar valores medios más altos para la SP1 y más bajos para la SP3 que el grupo MC (tablas 4.72 y 4.73). Estos resultados distan notablemente de los obtenidos por Tejerina (2008) que, en la misma especie, no observó ninguna correlación significativa entre la congelabilidad y las subpoblaciones calculadas, lo cual podría estar motivado por el concepto de congelabilidad empleado en cada trabajo, pues mientras en el nuestro se recurre a la resistencia de la membrana plasmática al proceso de congelación/descongelación, determinada por la fórmula descrita por Peña *et al.* (2007) [pág. 101], el otro se basa en el porcentaje de vitalidad obtenido tras la descongelación, sin tener en cuenta los valores iniciales que presentaba cada eyaculado. En cambio, Davis *et al.* (1995) en semen humano, también encontraron correlaciones significativas entre el tamaño subpoblacional y la congelabilidad de los eyaculados.

El análisis del comportamiento de las subpoblaciones espermáticas después ser sometidas las muestras seminales a un estrés por calor tampoco proporciona una buena explicación de la variabilidad posdescongelado, al mostrar un máximo de un 10,3 % a partir de la SP2, en el T7 y tras estimular la movilidad con cafeína, siendo éste el único caso en que se presenta una correlación significativa con la congelabilidad. Sin embargo, al aplicar el choque por frío, la capacidad predictiva de las subpoblaciones cinéticas mejora ligeramente, como ya se expuso en otros apartados de este estudio, y también en otros trabajos (Casas *et al.*, 2009), donde al disminuir la temperatura de las muestras se incrementaban las correlaciones con la congelabilidad

encontradas, posiblemente por el hecho de que los primeros signos de la congelabilidad de un eyaculado se reflejan en la valoración seminal tras sufrir las muestras el descenso térmico (Watson, 2000; Andrabi, 2007).

No obstante, la capacidad de predicción de la congelabilidad tras los choques por frío a partir de las subpoblaciones cinéticas dista mucho de la derivada del primer experimento, ya que a partir de los modelos de regresión lineal calculados no se pudieron explicar más de un 24,7% de la variabilidad de las muestras tras el proceso de congelación/descongelación. A pesar de ello, queda de manifiesto que la aparición de un determinado tipo de movimiento tras el choque puede ser indicativo de la congelabilidad, como se deduce a partir de las correlaciones positivas que presenta la SP2 en la mayoría de los tiempos, o de la tendencia mostrada por los eyaculados del grupo BC a presentar valores superiores a los del MC, y por otro lado, se evidencian correlaciones negativas de la SP1 con el índice de congelabilidad en todos los tiempos analizados; esto nos sugiere que, aparte de la idoneidad de un movimiento rápido y circular tras un descenso brusco de temperatura, la presencia tras un choque por frío del patrón cinético considerado como “normal” para las muestras frescas va a ser indicativo de una baja congelabilidad de los eyaculados. Esta circunstancia responde a la misma explicación ya expuesta para los parámetros cinéticos individuales, donde se observaba una correlación negativa con los que cuantifican la linealidad del movimiento (LIN, STR y WOB), exponiendo la conveniencia del movimiento circular y rápido al considerarlo indicativo de una buena capacidad de respuesta de las células al incremento citosólico de calcio que inevitablemente se produce durante y después del choque *a frigore*.

#### **5.4. Experimento 3: Estudio de la resistencia al choque *a frigore*.**

##### **5.4.1. Influencia de la presencia de la gota citoplasmática en la resistencia celular al choque *a frigore*.**

A pesar de que durante la espermatogénesis se produce una gran pérdida del citoplasma celular a través de la formación de cuerpos residuales, que posteriormente resultan fagocitados por las células de Sertoli (de Krester y Kerr, 1994), los espermatozoides abandonan el testículo con una pequeña porción de citoplasma a la altura del cuello, denominada gota citoplasmática (GC), que va a desplazarse a lo largo de la pieza intermedia en el recorrido de las células a través del epidídimo, situándose finalmente en las proximidades del anillo de Jensen (Crabo, 1985), desde donde va a ser eliminada (Leidl *et al.*, 1999). Schulze (1963) determinó, en la especie porcina, la proporción de gotas citoplasmáticas, distales (GCD) y proximales (GCP), existentes en las células espermáticas del testículo, así como en las tres porciones del epidídimo y en el eyaculado, estableciendo los porcentajes que se reflejan en la tabla 5.1. Al analizarla, comprobamos cómo la migración de la GC parece ocurrir fundamentalmente entre la cabeza y el cuerpo del epidídimo, lo cual coincide con lo expuesto por Gustafsson *et al.* (1970), que sitúan la citada migración en una porción estrecha existente en la parte anterior del cuerpo epididimario.

Tipo de GC	Testículo	Cabeza Epid.	Cuerpo Epid.	Cola Epid.	Eyaculado
GCP	83 %	80 %	15 %	8 %	4 %
GCD	-	11 %	73 %	70 %	20 %

**Tabla 5.1:** Porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática en el testículo, el epidídimo y el eyaculado (Schulze, 1963).

En algunas especies, como la rata, la liberación de estos residuos de citoplasma sucede principalmente al acceder las células espermáticas a la cola del epidídimo, donde son fragmentados y eliminados por endocitosis celular (Hermo *et al.*, 1988; Robaire y Hermo, 1988). En cambio, en el verraco éste no es el principal mecanismo de liberación, como denotan los altos porcentajes de espermatozoides con GCD encontrados en este segmento (Schulze, 1963; Kato *et al.*, 1996), sino que en esta especie, al igual que en la ovina y la bovina, la mayor parte de la pérdida de estas estructuras se produce poco después de la eyaculación, supuestamente al contactar con ciertos componentes de los fluidos de las vesículas seminales, como el PBP (fosfolípido hemolítico vinculado a proteínas) en bovino y ovino (Matousek y Kysilka, 1984), o la D-fructosa en porcino (Harayama *et al.*, 1996).

Con base en los resultados obtenidos en nuestro estudio, puede afirmarse que la presencia del residuo citoplasmático en un espermatozoide eyaculado va a indicar una mayor resistencia del mismo al enfriamiento, ya que estos espermatozoides se incrementan en más de un 300 % en el conjunto de células vivas tras el choque, mientras que aquellos otros que ya se han desprendido de ella se reducen casi un 65 % (tabla 4.86). Por lo tanto, la consideración de inmadurez que se viene haciendo de forma habitual respecto a estas células (Saacke, 1970 en Leidl *et al.*, 1999), podría resultar adecuada teniendo en cuenta la mayor resistencia al choque por frío que muestran los espermatozoides epididimarios sobre los eyaculados (Lasley y Bogart, 1944), puesto que se ha determinado que el incremento de la susceptibilidad de las células epididimarias ocurre en las porciones distales del cuerpo del epidídimo como consecuencia de ciertos cambios acaecidos en su maduración, como la reducción del contenido total de fosfolípidos (Watson y Plummer, 1985).

La maduración espermática en el epidídimo es un proceso notablemente complejo y secuencial, donde los cambios que experimentan las células van a resultar necesarios para que adquieran la capacidad de fecundar los ovocitos (Briz *et al.*, 1995; Bassols *et al.*, 2005). Estos cambios afectan tanto a la morfología como a la funcionalidad de los espermatozoides, que modifican sus propiedades a medida que discurren por los diferentes segmentos del epidídimo; así, por ejemplo, los espermatozoides inmaduros que albergan una GCP (procedentes de la cabeza epididimaria) van a presentar mitocondrias con un tamaño y una disposición claramente irregular, lo que viene a ser un signo evidente de que no se ha completado la maduración celular, mientras que, sin embargo, las células inmaduras que presentan GCD (procedentes de la cola del epidídimo) muestran ya una disposición mitocondrial definitiva en hélice y su tamaño está perfectamente homogenizado (Briz *et al.*, 1995). En cambio, en cuanto a la resistencia al frío, el comportamiento de ambos tipos de células, a tenor de lo observado en nuestros resultados, no difiere, pues el incremento porcentual de células vivas en la muestra seminal experimentado tras el choque inicial resultó similar en ambas, hecho que esta en consonancia con lo expuesto por Watson y Plummer (1985),



que situaban la adquisición de la sensibilidad al frío en un segmento posterior al del descenso de la GC. El hecho de que la disminución de la resistencia al frío se produzca en una fase posterior al descenso de la GC y que durante el almacenamiento en la cola del epidídimo los espermatozoides maduros presenten, en su mayoría, una GCD a la espera de ser liberada en la eyaculación, no permite esclarecer si los espermatozoides con GCD que se observan en un eyaculado deben ser todos considerados categóricamente como inmaduros, como sí se hace con los que presentan una GCP (Briz *et al.*, 1995; Amann *et al.*, 2000; Cooper, 2005). Esta disyuntiva no se ha podido despejar desde la perspectiva de la influencia que muestran ambas sobre la fertilidad, ya que, mientras la existencia de más de un 5% de espermatozoides con GCP parece tener un efecto negativo evidente (Dausend, 1974; Amann *et al.*, 2000; Thundathil *et al.*, 2001), no está del todo claro que la presencia de un cierto porcentaje de espermatozoides con gota en localización distal repercuta negativamente en ella, como apuntan ciertos trabajos (Waberski *et al.*, 1994; Leidl *et al.*, 1999), a pesar de que en otros estudios se sugiera su efecto negativo sobre la conservación seminal y se desaconseje su aplicación en programas de IA (Larsson *et al.*, 1984; Waberski *et al.*, 1994; Amann *et al.*, 2000; Thundathil *et al.*, 2001).

La aparente facilidad con la que se desprende la gota citoplasmática de los espermatozoides maduros de porcino, proceso que se ha determinado que ocurre, además de por el contacto celular con los fluidos vesiculares (Schulze, 1963; Kato *et al.*, 1996; Harayama *et al.*, 1996), por una simple incubación de la fracción rica del eyaculado en ausencia de éstos (Kato *et al.*, 1996), sugiere que las células que han mantenido el resto de citoplasma podrían presentar algún tipo de incapacidad que les impide eliminarlo. El mecanismo por el cual se libera la GC todavía resulta desconocido, existiendo varias teorías que se suman a la del contacto con la D-fructosa procedente de las vesículas seminales expuesta por Harayama *et al.* (1996), proceso que estaría mediado por un incremento del AMPc intracelular; en concreto, Thundathil *et al.* (2001) propusieron la posibilidad de que, tanto el desplazamiento como la liberación, estuviesen provocados por cambios en la composición iónica de los fluidos que permanecen en contacto con las células, mientras que Cooper y Yeung (2003) sugirieron que las gotas citoplasmáticas se rompen y pierden por efecto de la presión osmótica del medio.

Sea como fuere, parece ser que el hecho de que en espermatozoides maduros la GC se libere o no, no va a suponer que los espermatozoides presenten una mayor resistencia al frío, sino que todo apunta a que los cambios de membrana que los sensibilizan frente al descenso de temperatura, van a ser además los que los capacitan para la liberación de sus restos citoplasmáticos. Así, en estudios realizados con eyaculados que no han estado en contacto con los fluidos vesiculares y que muestran, por tanto, una alta retención de gotas citoplasmáticas (Berger y Clegg, 1985), no se observa una mayor resistencia al frío de sus espermatozoides con respecto a los procedentes de eyaculados en los que el contacto con dichos fluidos sí ha provocado la liberación de las gotas (Moore y Hibbitt, 1977; Berger y Clegg, 1985).

Por otro lado, aunque asumamos que la presencia de la GCD en células eyaculadas indica que esos espermatozoides no han sufrido los mencionados cambios en la membrana, que podrían no ser decisivos desde el punto de vista de la fecundidad a tenor de lo afirmado por algunos autores (revisado por Amann *et al.*, 1993), que exponían que la maduración espermática y el consiguiente

desarrollo del potencial de fecundación es adquirido en la cabeza y el cuerpo epididimarios, se desconoce el grado de maduración en el que están, puesto que desde el momento en que se produce el descenso de la GC hasta que sufren la reducción de la resistencia al enfriamiento, se ha determinado que suceden otros muchos procesos que pueden tener una importancia vital para el desarrollo de la capacidad fecundante, entre los que destacan la adquisición de la capacidad para fusionarse al ovocito o para expresar la movilidad una vez diluidos (Amann *et al.*, 1993). Además, a pesar de las afirmaciones que descartan la cola del epidídimo como lugar de adquisición del potencial de fecundación de los espermatozoides, se ha determinado que entre las porciones finales del cuerpo y a lo largo de toda la cola, van a suceder procesos, como la secreción del factor de inhibición de la reacción acrosómica, que junto con las secreciones de las glándulas sexuales accesorias, estabilizan la membrana plasmática a nivel del acrosoma, previniendo la reacción de éste, y otros procesos que permiten la expresión de la capacidad de fecundación o la de producir energía de forma eficiente (Amann *et al.*, 1993), que resultan de gran importancia para la viabilidad de los espermatozoides. Por tanto, el último segmento del epidídimo no resulta simplemente un lugar donde se preservan y almacenan los espermatozoides “fértiles”, sino que en él se continúa el proceso de perfeccionamiento de las células, siendo, de hecho, los espermatozoides de su zona distal, ligeramente más fértiles que los de la zona proximal (Holtz y Smidt, 1976). Desde esta perspectiva, la presencia de espermatozoides con persistencia de GCD en un eyaculado, en ocasiones infravalorada, cobra un interés propio para los técnicos, puesto que su capacidad para resistir bajas temperaturas puede hacer que se sobrevalore la calidad de una muestra refrigerada o descongelada, con la consiguiente repercusión negativa sobre la fertilidad, si presentara defectos de maduración importantes.

#### **5.4.2. Efecto del diluyente comercial y de la presencia de plasma seminal en la resistencia al choque a frigore.**

A pesar de que la influencia del plasma seminal (PS) sobre la capacidad funcional del espermatozoide ha sido muy estudiada, hoy en día siguen existiendo numerosas contradicciones como consecuencia de la gran diversidad de resultados obtenidos. Así, mientras algunos trabajos publicados al respecto recogen la influencia positiva que ejerce sobre el mantenimiento de la movilidad espermática (Baas *et al.*, 1983; Graham, 1994), sobre el incremento de la viabilidad celular (Ashworth *et al.*, 1994; Maxwell *et al.*, 1996) o, incluso, sobre la adquisición de una mayor resistencia al choque a frigore, fundamentalmente en semen de verraco (Pursel *et al.*, 1973; Berger y Clegg, 1985) y de carnero (Maxwell *et al.*, 1999), otros trabajos se van a alejar de estas conclusiones, considerando que la influencia del plasma es escasa, tanto sobre la movilidad celular, como sobre la susceptibilidad al choque por frío (Moore y Hibbitt, 1977), o incluso recogiendo efectos perjudiciales del mismo sobre la movilidad (De Lamirande *et al.*, 1984; Iwamoto *et al.*, 1993), la viabilidad (Dott *et al.*, 1979; García y Graham, 1987a, 1987c, 1987b) o la supervivencia espermática al proceso de criopreservación (Ritar y Salamon, 1982; Schmehl *et al.*, 1986; Watson, 1995). Esta disparidad en los resultados responde, para algunos autores, a la gran amalgama de sustancias que componen el PS, algunas de las cuales van a provocar un efecto beneficioso sobre

la funcionalidad celular, mientras que el de otras va a ser, por el contrario, claramente perjudicial (Harayama *et al.*, 1998; Muiño-Blanco *et al.*, 2008).

Uno de los aspectos destacables de la incubación de los espermatozoides con plasma seminal es el aumento de su resistencia frente al enfriamiento, característica que recogen un gran número de estudios (Pursel *et al.*, 1972b; Church y Graves, 1976; Berger y Clegg, 1985). No obstante, existen otros trabajos que sugieren que el contacto que se produce en la eyaculación, entre las células espermáticas y la gran cantidad de fluidos que proceden de las glándulas accesorias (Moore *et al.*, 1976; Berger y Clegg, 1985; Metz *et al.*, 1990), y que a la postre van a constituir la fracción más abundante del denominado plasma seminal (Setchel y Brooks, 1988 en Harayama *et al.*, 1998), es lo que va a provocar la mayor susceptibilidad al frío que manifiestan los espermatozoides eyaculados sobre los epididimarios. Nuestros resultados corroboran el incremento de la resistencia celular, puesto que la tendencia mostrada es a que el grupo al que le fue eliminado el PS tras la extracción (CI) muestre una menor vitalidad e integridad de la membrana acrosómica que los otros dos, que permanecieron en contacto con el plasma, uno hasta los instantes previos a la realización del choque (CMto) y otro durante toda la prueba (SC).

Esta aparente mayor resistencia de los dos grupos que permanecieron con el PS podría ser consecuencia del contacto celular con ciertas sustancias presentes en el mismo, que de una u otra forma, colaborarían en la estabilización de las membranas celulares y en el mantenimiento de la funcionalidad celular (Maxwell y Johnson, 1999). Dentro de estas sustancias, se ha destacado la influencia de las proteínas plasmáticas (Metz *et al.*, 1990; Harayama *et al.*, 1998; Maxwell y Johnson, 1999; Barrios *et al.*, 2000; Pérez-Pe *et al.*, 2001; Muiño-Blanco *et al.*, 2008), que fundamentalmente, mediante su adsorción a la membrana plasmática (Metz *et al.*, 1990; Muiño-Blanco *et al.*, 2008), van a provocar ciertas modificaciones que confieren a los espermatozoides una mayor resistencia al frío, si bien, parece que no todas proporcionan el mismo efecto, puesto que se han observado notables diferencias en función del peso molecular de las distintas fracciones analizadas; así, Harayama *et al.* (1998), en semen de verraco, determinaron que únicamente las fracciones 2 y 4, de las cuatro en las que fue separado el PS, ejercieron un efecto protector significativo frente a un descenso brusco de temperatura. A su vez, en trabajos efectuados con semen de carnero, se ha determinado que la fracción proteica que presenta un peso de aproximadamente 20 kDa, es la causante de la recuperación, tras un choque por frío, de niveles de permeabilidad en la membrana similares a los que presentaban previamente las células vivas (Barrios *et al.*, 2000); por su parte, Ashworth *et al.* (1994) determinaron que la adición al diluyente de extractos de PS con componentes de bajo peso molecular, permitiría compensar, o incluso mejorar, los efectos beneficiosos que proporciona el PS completo. Esas modificaciones que se producen en la superficie de las células espermáticas a partir de la interacción con las proteínas del plasma (Harrison *et al.*, 1992) también se han observado mediante la utilización de péptidos sintéticos (Amann *et al.*, 1999) o con proteínas procedentes de las vesículas seminales (Carballada y Esponda, 1998), lo cual es lógico, puesto que entre un 80 y un 90 % de las proteínas del plasma proceden de los fluidos vesiculares (Davies *et al.*, 1975 en Berger y Clegg, 1985). No obstante, la pérdida de susceptibilidad no va a estar asociada exclusivamente a la presencia de fluidos de las glándulas vesiculares; en este sentido, Berger y Clegg (1985) determinaron que la resistencia de

los espermatozoides procedentes de verracos enteros era similar a la de aquellos otros animales que previamente habían sido vesiculectomizados y Metz *et al.* (1990), a su vez, comprobaron que la adsorción va a suceder de igual forma en aquellas células que no han tenido contacto previo con proteínas de origen vesicular.

Más allá del efecto beneficioso de la adsorción de ciertas proteínas sobre el descenso térmico, el PS tiene otros componentes que van a colaborar activamente en la protección celular, como pueden ser sustancias antioxidantes que limitan la incidencia de la peroxidación lipídica, fenómeno que incide especialmente en las células que sufren un choque *a frigore* (Chatterjee y Gagnon, 2001; Chatterjee *et al.*, 2001; Gadea *et al.*, 2005a; 2005b), minimizando su efecto sobre la viabilidad y la movilidad de las mismas. Existen varias evidencias de las bondades del efecto antioxidante sobre el descenso de temperatura, fundamentalmente de aquel asociado a la criopreservación, en las que ha quedado de manifiesto que producen un incremento de la resistencia celular al proceso en el semen de verraco (Hernández *et al.*, 2007a), contribuyendo de forma notable, por tanto, a la congelabilidad del mismo (Peña *et al.*, 2006) y a su capacidad de fecundación (Gadea *et al.*, 2004a; Funahashi y Sano, 2005). El efecto protector que a este respecto presenta el PS, queda de manifiesto al comprobar que su adición a muestras seminales de carnero, no sólo provoca el mantenimiento de la actividad enzimática, sino también la distribución de enzimas antioxidantes por la superficie celular (Martí *et al.*, 2008).

Otros componentes que actúan de forma activa en la protección frente al descenso térmico, son los llamados “factores decapacitantes”, posiblemente proteínas de la familia de las espermadhesinas, que previenen la capacitación y la criocapacitación celular (Davis y Niwa, 1974; Byrd y Wolf, 1986; Cross, 1993), llegando incluso a decapacitar espermatozoides que habían sido previamente capacitados (Chang, 1957), por lo que su presencia contribuirá a la disminución de la incidencia de la reacción acrosómica, y la consiguiente reducción de la vida fértil de los espermatozoides, tan habitual en el enfriamiento celular como consecuencia de la aparición del proceso llamado en la literatura anglosajona “*capacitation like changes*”. Recientemente, se ha determinado la presencia de proteínas específicas del PS en la región acrosómica de varias especies (Kamaruddin *et al.*, 2004; Caballero *et al.*, 2005, 2006), que serán retiradas para que pueda tener lugar la reacción acrosómica, requisito que resulta esencial para el éxito en la fecundación del ovocito (Yanagimachi, 1994; Fraser *et al.*, 1996; Roberts *et al.*, 2003). La capacidad que tiene el PS de contener la criocapacitación ha quedado de manifiesto en numerosos trabajos, donde se evidencia que su presencia reduce la proporción de espermatozoides criocapacitados (Maxwell *et al.*, 1998; Vadnais y Roberts, 2007), hecho que se refleja también por la disminución en la fosforilación de la tirosina, tanto en semen de carnero (Pérez-Pe *et al.*, 2002), como de humano (Tomes *et al.*, 1998), tras someter a las muestras a un choque *a frigore*.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo respecto a la integridad de la vesícula acrosómica reflejan una menor incidencia de acrosomas reaccionados en las muestras que contenían PS, si bien las diferencias calculadas entre los grupos resultaron menores que las observadas con la vitalidad, puesto que mientras en relación con ésta se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo CI y los grupos CMto y SC, en la integridad acrosómica sólo apa-

recen al comparar el grupo CI y CMto, resultando este último más resistente, si bien, el grupo SC muestra una tendencia a que sus promedios sean más elevados que los del grupo CI (figura 4.54).

En la mayoría de los trabajos revisados en los que el PS ejerció un efecto protector sobre las dos membranas, se utilizaron muestras seminales a las que se les había añadido un determinado porcentaje de plasma, en un intento de compensar el denominado “efecto dilución”, que se produce al diluir las muestras por la consiguiente disminución de la concentración de las sustancias beneficiosas que porta (Maxwell y Johnson, 1999; Maxwell *et al.*, 1996; Watson, 1995). En nuestro trabajo, del hecho de no haber añadido a las muestras PS exógeno, y atendiendo a las evidencias que indican que la adsorción proteica es un proceso dependiente de la concentración (Barrios *et al.*, 2000), puede hacerse una doble lectura; por una parte, podría explicar la ausencia de diferencias más evidentes entre los diversos grupos, ya que la presencia de este tipo de sustancias en los dos grupos que se mantuvieron en contacto con el PS tuvo que quedar seriamente reducida con la dilución en los diluyentes comerciales empleados, y por otra parte, podría indicar que incluso pequeñas porciones de plasma serían suficientes para proporcionar efectos beneficiosos a la hora de aplicar un descenso térmico, algo que concordaría con lo reflejado por Pursel y Johnson (1975b), que recomendaban que se mantuviera en las muestras durante el tiempo de espera de los protocolos de criopreservación.

No obstante, el contacto de las muestras con el PS no es el único el factor que determina la adquisición de resistencia celular al frío durante la incubación, puesto que se ha observado que el mero transcurso del tiempo ya la reporta; así, en nuestro trabajo, durante un periodo similar al empleado en el protocolo de criopreservación, hemos comprobado que son los tres grupos, incluido el CI, los que experimentan incrementos notables y progresivos en la integridad de ambas membranas a medida que transcurre el tiempo, si bien de los promedios superiores obtenidos en los grupos CMto y CS, se deduce que el PS proporciona una protección adicional a las células frente al choque *a frigore*, como recogieron Pursel *et al.* (1973), protección que se ha comprobado que comienza a partir de los 15 minutos (Dott *et al.*, 1979), si bien no hemos encontrado literatura que establezca el tiempo óptimo de contacto, aunque sí se ha apreciado que el incremento de resistencia proporcionado por el plasma a las tres horas de incubación no es estadísticamente superior al que se produce una vez transcurrida una hora.

Por otro lado, la utilización de la centrifugación como método para eliminar el PS puede que haya influido en los resultados ejerciendo un efecto negativo sobre las muestras que fueron sometidas a él, ya que aunque muchos autores lo hayan descrito como no perjudicial para los espermatozoides (Hammerstedt, 1975; Pickett *et al.*, 1975; Dott *et al.*, 1979; García y Graham, 1987b), existen evidencias de lo contrario (Salamon, 1973 ;Pickett *et al.*, 1975; Carvajal *et al.*, 2004). Las hipótesis existentes al respecto se basan, fundamentalmente, en una acción directa provocada por un efecto mecánico sobre las membranas celulares (Álvarez *et al.*, 1993) y en una indirecta, como consecuencia de una excesiva formación de ROS en el proceso, si bien este último punto no pudo ser corroborado por Carvajal *et al.* (2004) al medir los niveles de Malonildialdehído (MDA) de las diferentes muestras.

En nuestro trabajo, la utilización de un protocolo de centrifugación alejado notablemente del

considerado como recomendable, ya que tanto la velocidad (800g) como, sobre todo, el tiempo (10 minutos) estaban muy distanciados de las altas velocidades (2400g) y los tiempos cortos (3 minutos) propuestos por Carvajal *et al.* (2004) para minimizar el daño celular y maximizar la recuperación de espermatozoides, presupone la presencia de alteraciones en la estructura celular que, si bien no se van a manifestar inmediatamente, saldrán a la luz con el transcurso del tiempo (Álvarez *et al.*, 1993). Esta circunstancia sugiere que el hecho de que el grupo CI presentase los promedios más bajos de integridad en las dos membranas analizadas puede haber estado influenciado por alteraciones celulares originadas en este proceso, algo que posiblemente no se haya manifestado en el grupo CMto a partir de la hora de incubación, por una posible protección originada por el contacto previo con el PS. Teniendo en cuenta que ni en el grupo CI ni en el CMto, en la realización del S0, el tiempo de contacto entre las células y el plasma ha superado los 15 minutos que son requeridos, según Dott *et al.* (1979), para que se manifieste el efecto protector del PS frente al enfriamiento celular, puede que tampoco haya sido tiempo suficiente para contener los posibles efectos deletéreos de la centrifugación; así, en el S0, los promedios de integridad de ambas membranas del grupo CI y del CMto son muy similares entre sí, mientras que en el grupo SC, que permaneció en contacto con el plasma constantemente (en torno a 12 minutos más que el CMto en el momento de iniciar el choque), éstos fueron mayores que en los otros dos grupos, si bien, las diferencias encontradas no mostraron significación estadística alguna tras el análisis. La existencia de una posible protección del PS en la centrifugación puede deducirse del hecho de que, a partir de la hora de incubación, el grupo CMto no muestra diferencias significativas en los promedios de integridad de sus membranas con el SC, siendo el tiempo necesario para ello, por lo tanto, inferior a una hora. Por otra parte, la tendencia que presenta el grupo CMto a obtener mayores promedios que el SC, sugiere la posibilidad de que el plasma seminal también ejerza un efecto negativo sobre la resistencia celular al choque al permanecer en contacto con los espermatozoides justo en el momento del descenso de temperatura, dato que defendería la teoría de la presencia en el plasma, tanto de sustancias que protegen, como de otras que sensibilizan frente al descenso térmico; a este respecto, Moore *et al.* (1976) observaron que el contacto con secreciones de las glándulas vesiculares iba a incrementar la sensibilidad espermática, hecho que para Watson y Plummer (1985) respondería a la modificación de la funcionalidad de la membrana como consecuencia de la adhesión de ciertas proteínas vesiculares. Apoyando este punto de vista, se han encontrado otros trabajos como el de Shannon y Curson (1983) en Watson y Plummer (1985), que detectaron que la presencia en el plasma seminal de toro de una determinada sustancia, caracterizada por un alto peso molecular ( $>10000\text{Da}$ ), provocaba la desestabilización de la membrana plasmática, haciéndola más sensible al frío, mientras que en su ausencia se originaba la intervención de otras moléculas de bajo peso molecular que aumentaban notablemente la resistencia celular. Teniendo en cuenta que no existieron variaciones entre los grupos CMto y SC, en cuanto al contacto de los espermatozoides con el PS, puesto que éste presentaba la misma concentración y procedía del mismo verraco en los dos grupos, la diferencia en la respuesta puede radicar en el tipo de unión de las proteínas al espermatozoide; Russell *et al.* (1985) expusieron que la fuerza con la que éstas se unían a la superficie celular variaba en función del tipo de proteína, de forma que, mientras la adsorción de unas era tan fuerte que las hacía indistinguibles de las propias proteínas celulares, otras podían eliminarse con un simple lavado; no hay que olvidar que la modificación,

por parte de las proteínas plasmáticas, de las propiedades de la membrana se efectúa por una simple unión a su superficie o por la alteración, bien de su estructura o bien de la disposición molecular que ésta presente (Muiño-Blanco *et al.*, 2008). Por tanto, es posible que mientras que las que confieren una mayor resistencia se unen de una forma más permanente al espermatozoide, las otras que lo sensibilizan presenten una unión mucho menos estable y hayan sido eliminadas con el proceso de centrifugación, si bien no existen trabajos que confirmen esta posibilidad.

La presencia o ausencia de determinados componentes en el PS podría ser el factor que determine su efecto; en este sentido, estudios recientes comprueban que la respuesta espermática al PS depende claramente del donador, hasta el punto de que el efecto sobre muestras diluidas puede ser positivo o negativo en función del verraco del que proceda (Caballero *et al.*, 2004), del mismo modo que la tasa de penetración *in vitro* que presentan los espermatozoides de toro, que será mayor o menor en función de su procedencia (Henault y Killian, 1996) o, más en relación con el descenso térmico, que la calidad posdescongelado del semen de verraco también varía en función del animal (Hernández *et al.*, 2007a). Por su parte, Okazaki *et al.* (2009) observaron que la eliminación desde un principio del plasma de las muestras seminales procedentes de verracos con una mala congelabilidad, incrementa la calidad posdescongelado de las mismas, circunstancia que no sucedió en aquellos otros con una alta capacidad para la criopreservación, cuya respuesta no varió de los que se mantuvieron con el PS durante el enfriamiento. La importancia de la composición del PS en el devenir de las células en el enfriamiento va a resultar crucial, si bien las diferencias que presentan en cuanto a la capacidad de incrementar o disminuir la resistencia al frío, atendiendo a los resultados recogidos por Hernández *et al.* (2007a) en muestras criopreservadas, no van a estar determinadas por los perfiles proteicos ni por la capacidad antioxidante que presente, por lo que son necesarias más investigaciones que permitan dilucidar qué componentes son los causantes del efecto protector en el enfriamiento y en la criopreservación del semen.

Independientemente de la conveniencia de mantener o no el plasma seminal durante la incubación de las muestras seminales, todos los protocolos que se han desarrollado para la conservación del semen implican su dilución y, por consiguiente, la reducción drástica de la concentración de las sustancias presentes en el PS. La disminución de los componentes que, por medio de su adhesión a la membrana, van a colaborar en la estabilización de la misma, dada la mayor fluidez que ésta adquiere en las porciones finales del epidídimo, supone la aparición de ciertos efectos en los espermatozoides, como la alteración de su viabilidad, la mayor facilidad para experimentar la capacitación, o la mencionada sensibilidad frente al descenso térmico, por lo que el diluyente empleado va a adquirir una importancia vital, debiendo tratar de compensar estas deficiencias generadas con una formulación adecuada. Por todos es sabido que la composición del medio extracelular es un factor fundamental a la hora de conferir protección a los espermatozoides frente al frío, ya que la inclusión de ciertos aditivos ha demostrado ser claramente beneficiosa (Watson y Plummer, 1985), como pueden ser, por ejemplo, la yema de huevo (Watson, 1981a; Fiser y Fairfull, 1986), fundamentalmente si se acompaña de *Orvus Es Paste* (Pursel *et al.*, 1978; Strzezek *et al.*, 1984), la fosfatidilcolina (Simpson *et al.*, 1987) o el BHT (Pursel, 1979; Bamba y Miyagawa, 1992; Bamba y Cran, 1992; Roca *et al.*, 2004). No obstante, este tipo de sustancias no suelen emplearse en diluyentes comerciales de refrigeración, sino más bien en aquellos otros

diseñados para su uso en protocolos de congelación, donde las muestras seminales van a someterse a un importante descenso térmico.

En nuestro trabajo, la dilución en uno u otro de los dos diluyentes empleados no modificó el comportamiento de las muestras en cuanto a la presencia de PS se refiere, por lo que se deduce que ninguno fue capaz de compensar la acción de los componentes plasmáticos, aunque sí dejó fuertes evidencias de la importancia del diluyente empleado en la protección frente al choque por frío, al mostrarse las muestras diluidas en MR-A mucho más resistentes, en todos los grupos y tiempos analizados, que las que se diluyeron en BTS, tanto a nivel de la membrana plasmática como de la acrosómica. A pesar de que ambos diluyentes son considerados de refrigeración y que ambos tienen como finalidad básica preservar las características funcionales de las células, al mismo tiempo que incrementar el volumen del eyaculado a fin de conseguir el número de dosis requeridas, los resultados obtenidos a partir de ellos difieren al analizar trabajos previos (Johnson *et al.*, 1988; Hofmo *et al.*, 1998), donde se relata una mejor conservación seminal del MR-A, al comprobar que los resultados de fertilidad y prolificidad, a partir del cuarto día de almacenamiento, son significativamente superiores a los del BTS. Sin embargo, esta mayor capacidad de conservación no ha de implicar una mejor respuesta al descenso térmico, ya que, como hemos comentado, la inclusión de protectores específicos frente al frío en los diluyentes comerciales de refrigeración no es tan habitual, dadas las temperaturas relativamente altas a las que se almacenan las dosis seminales (15-20 °C). No obstante, a pesar de ello, algunas de las sustancias que habitualmente se incorporan con otros fines, pueden colaborar en esta protección; en concreto, la incorporación de azúcares, utilizada principalmente como fuente de energía y, en un segundo plano, por su implicación en el control de la presión osmótica (Gadea, 2003), puede modificar la respuesta espermática al choque *a frigore*, y así, se ha determinado, por ejemplo, que las sustancias con alto peso molecular, como la rafinosa, la lactosa o la sucrosa, proporcionan una mayor protección del acrosoma que monosacáridos como la glucosa o la fructosa (Pursel *et al.*, 1972b), o que la incorporación de trehalosa ejerce un papel importante como protector celular frente al frío (Rudolph y Crowe, 1985).

El desconocimiento de la composición cuantitativa del MR-A, protegida por motivos comerciales, nos dificulta la comparación de los resultados obtenidos en ambos diluyentes y la extracción de conclusiones; no obstante, a partir de su composición cualitativa, que sí ha sido publicada (Martín-Rillo, 1984), uno se percata de que, a pesar de que ambos diluyentes presentan muchas características comunes (tabla 5.2), como la incorporación de glucosa a modo de sustrato energético, la utilización de citrato y bicarbonato sódico como sustancias tampón (si bien, el MR-A incluye también para este fin el MOPS), y el uso de una fuente de potasio para mantener la actividad de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , o de Etilen Diamino Tetracético (EDTA) como quelante de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , el MR-A incorpora además otros elementos, como la cisteína o la BSA (Albúmina Sérica Bovina), que probablemente sean los que inclinen la balanza a su favor.

Se ha determinado que la presencia de grupos sulfhidrilo, tanto en la cisteína como en otros compuestos, parece proporcionar una mayor estabilización a las membranas celulares, protegiéndolas activamente de las ROS mediante la promoción de la síntesis intracelular del glutatión



	BTS	MR-A
Glucosa	37	+
Citrato Sódico	6.0	+
EDTA	1,25	+
Bicarbonato Sódico	1,25	+
Cloruro Potásico	0,75	-
BSA	-	+
Cisteína	-	+
Acetato Potásico	-	+
Osmolaridad (mOsm/Kg)	330	290
pH	7,2	6,9

**Tabla 5.2:** Composición (g/l) de los diluyentes BTS y MR-A (Gadea, 2003).

(Meister y Tate, 1976), hecho que no sólo le va a proporcionar una mayor resistencia a la membrana plasmática sobre la peroxidación lipídica característica del choque *a frigore*, sino que también se ha relatado que interviene en la reducción de la aparición de la capacitación (Johnson *et al.*, 2000), por lo que contribuirá al mantenimiento de la integridad acrosómica al disminuir la incidencia de la denominada criocapacitación. Estas características antioxidantes que posee la cisteína, hace que haya sido empleada como protector espermático en numerosos estudios dando muy buenos resultados, tanto para la protección del acrosoma y de la membrana plasmática, como para el mantenimiento de la capacidad móvil de células criopreservadas y refrigeradas (Bilodeau *et al.*, 2000; Szczesniak-Fabianczyk *et al.*, 2003; Funahashi y Sano, 2005; Uysal y Bucak, 2007; Bucak *et al.*, 2008; Sariözkan *et al.*, 2009).

A la BSA también se le han atribuido propiedades antioxidantes (Renard *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1997), mostrando incluso sobre semen criopreservado de carnero, valores de protección frente a la lipoperoxidación similares a los de la cisteína (Uysal y Bucak, 2007), sin embargo, su incorporación a los diluyentes seminales se estableció en 1990 con otra finalidad, la de compensar el “efecto dilución” que sufrían las proteínas plasmáticas (Weitze, 1990). Se ha determinado que su utilización en los diluyentes favorece notablemente el mantenimiento de la movilidad espermática en muestras almacenadas en refrigeración (Waberski *et al.*, 1989), además de ejercer un cierto control sobre el incremento de la fluidez de la membrana y con ello, sobre el efecto nocivo de lisofosfolípidos y ácidos grasos libres producido en el enfriamiento (Buhr, 1990). Esta reducción de la fluidez de la membrana, aunque va a estar claramente limitada en el tiempo, va a contribuir a la disminución de la entrada de iones calcio al interior de la célula, restringiendo también con ello, la aparición de fenómenos de capacitación espermática (Johnson *et al.*, 2000).

En definitiva, el mayor control que ejerce la formulación del MR-A sobre aspectos como la peroxidación lipídica o la estabilidad de las membranas celulares, dos puntos extremadamente importantes en la resistencia espermática al choque por frío y al enfriamiento en general, va a permitir a las células soportar mucho mejor los descensos de temperatura, y ello desde el mismo momento de su dilución, por lo que es evidente la gran importancia que tiene la elección del diluyente seminal en la elaboración de dosis con fines productivos.

### 5.4.3. Influencia del tiempo de incubación previo sobre la congelabilidad espermática.

La criopreservación de semen porcino conlleva una considerable reducción de células viables (Curry y Watson, 1994; Watson, 1995 y 2000; Bailey *et al.*, 2008), siendo el enfriamiento una de las etapas en las que ésta se hace más patente, con una clara reducción de la integridad de la membrana plasmática y de la movilidad celular (Parks y Graham, 1992; Maxwell y Johnson, 1997b; Peláez, 2003). El incremento de la resistencia celular al descenso térmico que se origina con la incubación de las muestras, ya reflejado en nuestro estudio en experimentos previos, puede ser empleado para tratar de reducir la pérdida manifiesta de viabilidad de las células espermáticas descongeladas. En este sentido han sido publicados diversos trabajos, como el de Nath *et al.* (1994), en el que al estudiar la influencia de la incubación de las muestras durante las 3 primeras horas, tanto frente a un choque *a frigore* a 5 °C, como frente a la congelación/descongelación, observan que en ambos casos se incrementan de forma similar los promedios de motilidad e integridad acrosómica. Esta mejora de la calidad posdescongelado a partir de la disminución de la susceptibilidad espermática al frío, es el fundamento en el que se basa la pausa esencial de entre dos y cuatro horas que se realiza en los protocolos de criopreservación de semen porcino, antes de proseguir con el descenso térmico por debajo de los 15 °C (Watson, 1979; Pursel y Park, 1985). Teniendo en cuenta la importancia de esta pausa, así como la alta relación encontrada en nuestro estudio entre la resistencia a la criopreservación y la resistencia al choque por frío, es probable que se consiga mejorar la calidad del semen descongelado mediante la incubación del material seminal por un periodo de tiempo más largo que el empleado habitualmente, ya que podría permitir un mayor desarrollo de la criorresistencia de las membranas celulares.

En los dos primeros experimentos de nuestro trabajo pudimos comprobar cómo, durante las primeras 5 horas de incubación, se produce un más que notable incremento progresivo de la resistencia espermática frente a una caída brusca de temperatura, pero no se ha podido despejar si la evolución de la adquisición de resistencia al frío continúa durante un periodo más prolongado de tiempo en incubación. A este respecto, los resultados obtenidos en el tercer experimento muestran un aumento constante de la resistencia de las dos membranas analizadas (acrosómica y plasmática) durante las primeras 24 horas, coincidiendo con los resultados que fueron recogidos por Tamuli y Watson (1992), que exponían que la adquisición de la resistencia al choque iba más allá de estas 24 horas, si bien también constataron la aparición de procesos degenerativos a nivel del acrosoma al final de este periodo de tiempo. La aparición de daños celulares como consecuencia de la incubación a 15 °C, es un nuevo dato a tener en cuenta, que va a resultar un factor clave en la determinación del tiempo de espera óptimo, puesto que en nuestro caso no sólo se evidenció a las 24 horas de incubación un leve descenso en el porcentaje de integridad acrosómica, sino que también se detectó una disminución, pequeña pero significativa, en el de la membrana plasmática y otra, notablemente más acusada, en el de espermatozoides móviles.

En un estudio posterior, Tamuli y Watson (1994a) determinaron que aquellos cambios degenerativos del acrosoma se van a iniciar a partir de las 16 horas de incubación, lo que podría

limitar la prolongación del tiempo a esta cifra. En nuestro trabajo, en cuanto a la resistencia de ambas membranas se refiere, no se obtienen evidencias para apoyar esta limitación, ya que el incremento en los porcentajes de integridad tras el choque de las 24 horas va a compensar sobradamente la disminución que manifiestan las células por su incubación a 15 °C. En cambio, el porcentaje de espermatozoides móviles no va a responder de la misma forma, convirtiéndose en el factor limitante de la prueba, dado el importante descenso que manifiestan sus promedios de las 12 a las 24 horas, lo que nos va a sugerir la conveniencia de no prolongar la incubación hasta este último tiempo.

Al igual que en el citado trabajo de Nath *et al.* (1994), que recogía el comportamiento de las muestras incubadas durante 3 horas, en nuestro trabajo la respuesta a la criopreservación de los espermatozoides incubados durante 24 horas resultó similar a la observada tras los diversos choques realizados, obteniendo los promedios más elevados en la integridad de ambas membranas a las 24 horas, mientras que el porcentaje de espermatozoides móviles alcanzó su punto máximo en el tiempo inmediatamente anterior, a las 12 horas. Esta reducción de la capacidad móvil de las células criopreservadas en el intervalo de 12 a 24 horas de incubación, también fue recogida de forma similar por Eriksson *et al.* (2001), que observaron que si se incrementaba el tiempo de 10 a 20 horas, el porcentaje de espermatozoides móviles tras la descongelación caía significativamente; además, este trabajo coincide con nuestros resultados en el sentido de que el porcentaje de vitalidad, tanto a las 20 como a las 10 horas, resulta superior que el de los espermatozoides que habían sido mantenidos a 15 °C únicamente 3 horas. La reducción del porcentaje de movilidad que se manifiesta si la incubación se lleva más allá de las 20 horas podría ser la causante de los resultados recogidos por Guthrie y Welch (2005), que a pesar de haber constatado una mayor resistencia de las membranas, no recogieron variaciones en el porcentaje de preñez entre las 3 y las 24 horas de incubación, produciéndose incluso, en este último tiempo, una reducción significativa en el tamaño de la camada.

Teniendo en cuenta todos estos resultados, podemos concluir que el tiempo de incubación óptimo para la criopreservación del semen porcino, va a estar comprendido en el intervalo que va de las 12 a las 24 horas desde la extracción seminal; más concretamente, la estimación realizada por Tamuli y Watson (1994a) sobre el momento de aparición de procesos degenerativos a nivel del acrosoma y la obtención de mejores promedios de movilidad e integridad acrosómica a las 16 horas por parte de Kotzias-Bandeira *et al.* (1997), sugieren que el citado punto puede estar más cerca de estas 16 horas que de las 12. No obstante, para lograr una determinación más exacta de dicho tiempo, va a ser necesario efectuar un mayor número de pruebas, en las que se acoten más los tiempos de referencia dentro de este intervalo. También sería interesante analizar la capacidad fecundante de las muestras seminales descongeladas, mediante la realización de inseminaciones artificiales o pruebas de FIV, para comprobar la incidencia que los diferentes tiempos ejercen sobre los porcentajes de fecundidad y fertilidad, así como sobre la prolificidad.



## Capítulo 6

# CONCLUSIONES



Teniendo en cuenta el planteamiento y desarrollo experimental llevado a cabo en el presente trabajo de investigación, y considerando los resultados obtenidos, podemos formular las siguientes conclusiones:

**Primera:** La mayoría de las pruebas convencionales utilizadas de forma rutinaria en la valoración del semen fresco tienen, individualmente consideradas, un valor limitado a la hora de explicar la alta variabilidad en la resistencia de los eyaculados de verraco a la criopreservación. No obstante, la combinación matemática mediante la regresión lineal de los resultados obtenidos, especialmente de la concentración seminal, el porcentaje de normalidad morfológica espermática y la integridad del plasmalema, incrementa su valor predictivo.

**Segunda:** El sometimiento de las muestras de semen fresco a diversas condiciones estresantes (estrés osmótico, por calor y por frío) no proporciona una notable mejoría en la predicción de la congelabilidad seminal respecto a las valoraciones convencionales; en cambio, la incubación de las dosis seminales previa a la realización del choque a frigore, aparte de aumentar la resistencia celular al mismo, incrementa la capacidad predictiva significativamente, convirtiendo a esta prueba en la más adecuada a la hora de estimar la aptitud de los eyaculados para la criopreservación.

**Tercera:** El proceso de criopreservación modifica de forma considerable el patrón de movimiento de los espermatozoides, caracterizándose por un incremento en la velocidad y linealidad de las trayectorias trazadas. La presencia de promedios de velocidad más altos en el semen recién descongelado (VCL, VSL y VAP) va a tener una mayor relevancia en la calidad seminal que los patrones lineales de movimiento.

**Cuarta:** A partir del estudio de la cinética espermática pueden establecerse relaciones interesantes con la congelabilidad de los eyaculados, fundamentalmente a través de la respuesta celular al choque a frigore. Dada la implicación de la modificación iónica intracelular y la transitoriedad de ésta en la cinética de los espermatozoides que han sufrido un descenso térmico, resultaría conveniente efectuar los análisis tras un periodo de tiempo en incubación que permita el restablecimiento de las funciones celulares y, por ende, la aparición de patrones de movimiento que puedan relacionarse de una forma más precisa con la resistencia celular al enfriamiento.

**Quinta:** La agrupación de las células espermáticas en subpoblaciones cinéticas no aporta una información más precisa en cuanto a la capacidad de predicción de la congelabilidad, que la obtenida directamente de los parámetros cinéticos de los que procede.

**Sexta:** La adición de cafeína (1 mM) induce en todos los casos (semen fresco, termorresistencia, choque a frigore y criopreservación) un cambio en la cinética espermática, presentando un patrón de movimiento más lineal y regular respecto a los controles sin cafeína.

**Séptima:** El incremento de la resistencia espermática al enfriamiento que se origina al aumentar el tiempo de estabilización a 15 °C utilizado en los protocolos de congelación seminal, va a proporcionar una mayor supervivencia celular a la criopreservación, si bien la disminución

---

de calidad que manifiestan las muestras al ser mantenidas durante varias horas a dicha temperatura desaconseja prolongar ese tiempo hasta las 24 horas.



## Capítulo 7

### RESUMEN



La utilización de semen porcino criopreservado para la IA comercial podría reportar numerosas ventajas, tales como el mayor control sanitario, la gran disponibilidad espacio/temporal, la estabilidad frente a variaciones climáticas o la posibilidad de incorporar a las explotaciones genética de alto valor con un coste más reducido, pero en la práctica su uso se ve muy restringido, principalmente por la sustancial reducción del rendimiento reproductivo que presenta con respecto a las dosis seminales refrigeradas. Por este motivo, y dado que la realización de una criopreservación óptima del semen ha sido considerada como un prerequisite esencial para la utilización de esta técnica de conservación a nivel comercial, los trabajos de investigación han ido dirigidos a intentar perfeccionarla.

La amplia variabilidad en los resultados obtenidos con semen de verraco en cuanto a la supervivencia celular frente a procesos de enfriamiento y descongelación, dadas las notables diferencias existentes no sólo entre razas sino también entre individuos, hace que sea necesario realizar una selección de animales basada en la capacidad de criopreservación de su semen, y aunque se ha apuntado una posible influencia genética en esta variabilidad posdescongelado, hasta el momento no existen publicaciones que recojan modelos de selección genética basados en la congelabilidad del semen; de hecho, únicamente se ha englobado a los diferentes animales estudiados en categorías de buenos y malos congeladores con base en las características seminales posdescongelado, sin haber conseguido extraer buenas relaciones entre éstas y otras que definan a los verracos de forma previa a la congelación/descongelación del semen. Por otro lado, la existencia de variaciones tras la descongelación entre eyaculados de un mismo verraco, hecho que parece responder a cambios de las propiedades bioquímicas de los espermatozoides como consecuencia, entre otras causas, de variaciones en la frecuencia de colección o de la época del año, hace que la determinación de algún indicador de la capacidad de criopreservación de un eyaculado en sus características seminales antes de congelar, resulte tanto o más interesante que la propia selección de animales.

En este sentido, el principal objetivo de este trabajo ha sido determinar la eficacia de sencillas pruebas de laboratorio en la predicción de la supervivencia espermática al proceso de criopreservación, para lo cual fueron desarrollados dos experimentos en un intento de identificar factores relacionados con la variabilidad posdescongelado en 40 eyaculados procedentes de 8 verracos (5 congelaciones por verraco) de dos razas diferentes (Large White [20 congelaciones] y Landrace [20 congelaciones]). En el primero de ellos, se evaluaron pruebas que habitualmente se emplean en las valoraciones seminales que se efectúan en los Centros de IA comerciales sobre el semen fresco, tratando mediante ellas de relacionar la adaptación de las células a determinadas situaciones de estrés (osmótico, por calor, o por frío) con la resistencia que manifiestan al proceso completo de criopreservación. La capacidad de adaptación a un estrés osmótico fue valorada por medio de pruebas de HOST (de 30 y 60 minutos de incubación) y de ORT (de 60 y 120 minutos de incubación) con soluciones hiposmóticas ajustadas a 100mOsm/kg, la de adaptación a un estrés por calor, mediante la incubación de las muestras seminales diluidas a 39 °C durante 7 horas, evaluando la integridad de las membranas plasmática y acrosómica, así como el porcentaje de movilidad (con y sin cafeína) a la hora y media (T1,5), a las tres (T3), a las cuatro horas y media (T4,5) y a las siete horas (T7); y finalmente, en la resistencia espermática a un descenso brusco de temperatura, se valoraron esos mismos parámetros tras someter las muestras a temperaturas

---

de 0 °C durante 5 minutos en diferentes momentos: a los 10 minutos de comenzar una incubación a 20 °C (S0), a la hora (S1), a las dos (S2), a las tres (S3) y a las cinco horas (S5).

Por su parte, en el segundo experimento se analiza si las características del movimiento de los espermatozoides en semen fresco, y en cada uno de esos puntos de referencia establecidos en el estrés por calor (termorresistencia) o por frío (choque por frío), muestran evidencias de la capacidad de criopreservación de los eyaculados; para ello, se efectuó un estudio pormenorizado de la cinética espermática a través del análisis individualizado de los parámetros que nos aporta el sistema ISAS® de PROISER R+D y también de forma conjunta mediante el estudio de subpoblaciones espermáticas, para lo cual utilizamos un procedimiento compuesto por un agrupamiento no jerárquico inicial mediante el método de las *K-means*, para posteriormente aplicar el algoritmo de agrupamiento jerárquico aglomerativo de Ciampi *et al.* (2007).

La aproximación a la relación existente entre la congelabilidad de los eyaculados y las características que éstos presentan en cada una de las pruebas realizadas, se ha efectuado analizando la respuesta que a ellas han tenido los eyaculados clasificados en función de su capacidad de congelación (buena, media o mala congelabilidad), así como por medio de coeficientes de correlación y análisis de regresión múltiple.

Dentro de la batería de pruebas que habitualmente se realizan de forma rutinaria a un eyaculado, la concentración, la normalidad morfológica de las células y la integridad de la membrana plasmática y la de la acrosómica fueron en este estudio las más relacionadas con la capacidad de criopreservación, presentando coeficientes de correlación de hasta  $r=0,677$  en el caso de la concentración del eyaculado. La utilización de este tipo de pruebas de rutina resultó muy interesante, ya que consiguió explicar por medio del análisis de regresión múltiple un 55,6 % de la variabilidad posdescongelado a partir de las tres primeras variables de las cuatro citadas.

En cuanto al estrés osmótico, la respuesta al ORT resultó más determinante que la del HOST, tanto por haber conseguido detectar de una forma más eficiente una respuesta estadísticamente diferente de los grupos de buenos, medios y malos congeladores, como por presentar una mayor relación con los índices posdescongelación calculados, mostrando coeficientes de correlación con todos ellos en un rango que oscila de  $r=0,412$  a  $r=0,557$ . Sin embargo, y a pesar de la importancia de adaptación de la célula a las variaciones osmóticas del proceso de criopreservación, en la supervivencia espermática al mismo, no pudimos determinar, a partir de estas pruebas, más de un 21,6 % de la variabilidad mostrada por las muestras seminales descongeladas.

Por su parte, la termorresistencia no parece ser una prueba recomendable para tratar de estimar la congelabilidad de los eyaculados, puesto que a medida que avanza el tiempo de permanencia a 39 °C, se ven disminuidos tanto los coeficientes de correlación como el porcentaje de variabilidad que es posible explicar por medio de la regresión múltiple (de un 25,8 % en el T1,5 a un 12,6 % en el T7). En cambio, el sometimiento de las muestras seminales a un descenso brusco de temperatura experimentó el efecto contrario, pues la incubación a 20 °C, aparte de conferir a las muestras una mayor resistencia al choque a *frigore*, permitía pasar de resultados no más importantes que los del resto de pruebas a, posiblemente, los más interesantes, tanto respecto al comportamiento de los grupos establecidos en función de su aptitud frente a la criopreservación,

como en cuanto a los coeficientes de correlación obtenidos (llegando a valores de  $r=0,803$ ) o a los resultados recogidos con la regresión múltiple que, con la inclusión de un único parámetro en los modelos establecidos, se incrementaron de un 29,5 % en el S0, a un 58,3 % en el S5.

En el segundo experimento se recoge en las muestras descongeladas un incremento con respecto al semen fresco de prácticamente todos los parámetros cinéticos (excepto el WOB), caracterizándose aquellos eyaculados con una mayor capacidad de criopreservación por velocidades (VCL, VSL y VAP) significativamente más elevadas. La capacidad de predicción de la congelabilidad que mostraron los parámetros cinéticos individualizados, tanto en semen fresco como en los diferentes tiempos de incubación de la termorresistencia no fueron esencialmente superiores a los obtenidos en el primer experimento con esas mismas muestras, si bien destaca la inclusión de la BCF en todos los modelos de regresión establecidos, sugiriendo una posible relevancia de este parámetro como indicador de la resistencia al proceso de congelación/descongelación. A partir de las características cinéticas de las células después de sufrir un choque por frío se recogieron coeficientes de correlación de hasta 0,589, probablemente por la similitud existente entre el daño celular provocado por este choque y el ocasionado por la criopreservación, si bien, al contrario que en el primer experimento, a medida que transcurre la incubación todos los indicadores analizados en busca de relaciones con la congelabilidad van disminuyendo de forma considerable, pasando de una explicación máxima de la variabilidad posdescongelado del 48,3 % en el S1 a un valor mínimo de 7,9 % tras el S5.

La determinación de subpoblaciones se efectuó a partir de los valores de los parámetros cinéticos de las muestras recién recogidas (T0), agrupando a los espermatozoides en tres subpoblaciones (SP1, SP2 y SP3) con características cinéticas diferenciadas, de modo que en la SP1 se incluyeron las células que presentaban movimientos progresivos y una alta velocidad lineal, en la SP2 las que describían trayectorias sinuosas y mostraban una velocidad circular elevada, mientras que la SP3 englobaba espermatozoides con unos parámetros cinéticos degradados. El porcentaje relativo de estas subpoblaciones varía tanto tras el proceso de criopreservación, incrementándose la SP1 y disminuyendo la SP3, como con la termorresistencia, caracterizándose por un aumento de la SP1 y una disminución de las otras dos, aunque la SP3 sufre un incremento considerable en el T7, así como tras los choques por frío, con los que sufre un incremento espectacular la SP2 y un descenso la SP1 y la SP3. No obstante, a partir de la variación de estas subpoblaciones no se obtuvo una mejor predicción de la congelabilidad que con los parámetros cinéticos analizados de forma individual, ni en el T0, ni en la termorresistencia, ni mediante los choques por frío, con explicaciones máximas de la variabilidad posdescongelado de un 7,8, un 10,3 y un 24,7 %, respectivamente, si bien se deduce a partir de las correlaciones calculadas, la importancia de un determinado tipo de movimiento espermático, fundamentalmente tras el choque por frío, como se evidencia en las correlaciones positivas con la congelabilidad de la SP2 y las negativas de la SP1.

Atendiendo a la importancia mostrada por el choque *a frigore* en cuanto a una posible predicción de la congelabilidad de un eyaculado, se desarrolló un tercer experimento con el fin de ahondar en algunos aspectos que pueden incidir en la resistencia espermática al enfriamiento,

---

como el estado de maduración espermática, el plasma seminal (PS) y el diluyente comercial empleado en la dilución de las muestras, además de determinar la influencia sobre la supervivencia espermática a la criopreservación del incremento de la resistencia al frío generado al aumentar el tiempo de incubación previo.

Para analizar la influencia de la presencia de gotas citoplasmáticas como indicadora de inmadurez, se evaluó a lo largo de tres horas de incubación a 20 °C la variación porcentual, con respecto a los valores del eyaculado, que experimentaban los espermatozoides vivos clasificados como morfológicamente normales, los que mantenían una gota citoplasmática distal o proximal en su estructura y los de otras categorías morfológicas, concluyendo que la presencia de una gota citoplasmática en la estructura de células eyaculadas puede ser considerada un indicador de inmadurez, como consecuencia de la menor sensibilidad mostrada por éstas frente al choque por frío, lo cual sería indicativo de que no han sufrido los procesos de maduración epididimaria que incrementan la susceptibilidad al descenso térmico, que tienen lugar en las porciones distales del cuerpo del epidídimo y, por tanto, tampoco los que acontecen en una zona posterior, con las posibles repercusiones negativas que ello tendría sobre la fertilidad.

Por otra parte, para analizar la influencia del diluyente comercial empleado así como de la presencia del PS, se dividió la fracción rica de los eyaculados empleados en seis porciones, tres diluidas con BTS y las otras tres con MR-A, y en cada caso a una de las tres le fue retirado el PS por centrifugación en un primer momento tras la eyaculación, a la segunda instantes antes de realizar cada choque y la tercera permaneció en contacto con él durante toda la prueba, concluyendo que tanto la composición del diluyente comercial empleado como la presencia del PS en las muestras influyen de forma determinante en la resistencia celular; así, la utilización de MR-A resultó mucho más adecuada que la de BTS para este fin, posiblemente por el contenido en BSA y cisteína del primero, y también resultó conveniente la presencia de plasma seminal, pues se obtuvieron mayores porcentajes de integridad de las membranas acrosómica y plasmática a partir de la hora de incubación en las muestras que se mantuvieron en contacto con él, pero mostrando una tendencia a empeorar si el PS continuaba durante la realización de los choques *a frigore*.

Por último, al modificar el protocolo de criopreservación aumentando el periodo de estabilización a 15 °C de 3 horas a 6, 12 y 24 horas, se observó un notable incremento en la resistencia de las membranas plasmática y acrosómica, tanto al choque por frío como al proceso completo de congelación/descongelación, a medida que aumentaban las horas de permanencia a la citada temperatura, si bien no sería positivo llegar hasta las 24 horas, a tenor del marcado descenso en la movilidad espermática observado en este punto, tanto tras el choque y tras la criopreservación, así como por el manifiesto descenso en la calidad de las muestras seminales por el mero hecho de mantenerlas en refrigeración durante tanto tiempo.

## Capítulo 8

### SUMMARY





The application of frozen-thawed boar semen in commercial AI programs could provide numerous advantages, such as a better health control, a much wider availability, better stability in face of climatic variation, or the possibility of a significant reduction of costs for those farms that wish to incorporate into their livestock high quality genetics. Nevertheless, this prospect bears a substantial limitation due to the poor output that this kind of preserved semen presents when compared to doses of refrigerated semen. For this reason, and the fact that optimal cryopreservation of sperm has been considered an essential prerequisite for its commercial use, the research in this field has tried to improve substantially this technique.

Provided the remarkable differences not just between breeds, but also between single individuals there has been a great variability in the results obtained with boar semen in connection with cellular survival in face of freezing and thawing processes. This makes necessary an animal selection based on semen resistance to freezing. However, though genetic factors have been pointed out in order to explain this variability in semen's resistance, there have not been published any models for genetic selection based on semen freezing resistance. Actually, the boars have only been classified as good or bad freezers according to their post-thaw seminal quality, but has not been able to find good relationships between post-thaw seminal characteristics and sperm quality assessments before freezing. Besides, the existence of individual variability after thawing in different ejaculates of the same boar<sup>1</sup> makes still more interesting the prospect of determining an indicator of the semen's resistance before it has been frozen.

The main aim of this work has been to determine the efficiency of straightforward laboratory tests in order to predict sperm cryosurvival. Two different sets of experiments have been developed in a try to identify variables related to differences after thawing. These two experiments have been tested with 40 ejaculates from 8 boars (5 frozen samples each) from two different breeds; Large White (20 ejaculates) and Landrace (20 ejaculates).

The first experiment tries to relate cell adaptation to certain stress situations (processes of osmosis variation, by cold or heat) with the semen resistance to the whole cryopreservation process. The potential of adaptation to osmotic stress was assessed by means of HOST tests (30 and 60 minutes of incubation) and ORT tests (60 and 120 minutes of incubation). We used hypo-osmotic solutions of 100 mOsm/kg. The test to heat-stress was carried out by incubating the seminal samples in a water bath at 39 °C for 7 hours, checking the integrity of plasma and acrosomal membranes as well as the percentage of sperm motility (with and without caffeine) after one hour and a half (T1,5), three hours (T3), four hours and a half (T4,5), and seven hours (T7). Finally, we measured the spermatozoa resistance to a sudden fall of temperature or "cold shock". These parameters have been evaluated after the samples were subjected to temperatures of 0 °C during 5 minutes at different times: 10 minutes after the beginning of incubation at 20° Celsius (S0), after one hour (S1), after two hours (S2), after three (S3), and after 5 hours (S5).

The second experiment analyses whether or not the features of the movement of spermatozoa in fresh semen (recently ejaculated), and in those instants previously settled along the induced processes of stress by heat (thermoreistance), or by cold (cold-shock) could show valuable data

---

<sup>1</sup>This is a fact, which apparently could be a consequence of changes in the biochemical properties of the spermatozoa under the influence of frequency and season in which the sperm is collected.

---

to estimate freezability of boar ejaculates. In order to set up the experiment with guarantees of results we have studied in detail the sperm kinetics through the individual analysis of the parameters afforded by the ISAS system from PROISER R+D. Besides and together with this, a research on sperm subpopulations was carried out using a procedure composed by a non hierarchical initial grouping using the K-means method. Then, we applied to it the algorithm of hierarchical gathering grouping by Ciampi *et al.* (2007).

The approach to the existing relation between samples' freezability and the qualities that these samples present after each of the tests have been evaluated examining the response that they had regarding freezability (good, moderate or poor freezability), as well as by correlation coefficients and multiple regression analyses.

In our comprehensive and routine scrutiny it has been proved that semen concentration, morphological normality of its cells, and the integrity of the plasma and acrosomal membrane in them were the most poignantly related features to cryopreservation capacity of the ejaculates. Just regarding semen concentration of a ejaculated sample a ratio  $r=0,677$  has been reached. The use of these type of scrutiny has proved very interesting, because it could explain 55,6 % of the variability after semen's unfreezing with three of the four above mentioned variables.

In relation to osmotic stress, we must say that the response to ORT tests was more decisive than to HOST's. The former set of tests showed more efficiency when we tried to detect a statistically different response between the 3 groups of good, moderate or poor freezability. Moreover, ORT tests afforded a narrower approximation to the calculated post-thawing data showing a range of correlation of rates with all of them that go from  $r=0'412$  to  $r=0'557$ . Nevertheless and despite the importance that cell adaptation have for the survival of spermatozoa when it is subject to osmotic variations in the cryopreservation process, we were unable to establish with the tests at hand more than 21,6 % of the variability of the thawed samples.

In our view, thermoresistance tests have proved a non advisable approach in order to measure semen's freezability. The reason is that the rates of correlation as well as the variability percentage that is possible to explain by means of multiple regression (25,8 % at T1,5 and 12,6 % at T7) decrease at 39 °C as time passes. On the other hand, when we subject the samples to a sudden fall in temperature, we obtained the opposite effect. Incubation at 20° Celsius does not just afford to the samples a greater resistance to a cold-shock, but it also permit us to obtain the possibly more interesting results when compared to the rest of the tests. As a matter of fact, this improved our results in the groups of samples classified according to their freezability as well as in the rates of correlation (reaching values of  $r=0,803$ ), or the results obtained by multiple regression that raised from a 29,5 % to a 58,3 % in the S5 after the introduction of a single parameter examined from each of the cold-shocks as predictive variable in the established models.

In the second experiment we observed a rise of practically all kinetic parameters of the thawed samples (except WOB) in relation to fresh semen. The former samples characterised by a better resistance to cryopreservation by velocity parameters (VCL,VSL, VAP) significantly higher. The ability to predict freezability showed by the individualized kinetic parameters with fresh semen

and in the different times of heat resistance incubation were not essentially superior to those obtained in the first experiment with the same sample. However, it must be emphasised the BCF inclusion in all the established models of regression. It suggest the possible prominence of this parameter as indicator of resistance to the freezing-thawing process.

We collected rates of correlation of up to 0,589 from the observation of the kinetic features in cells after cold-shocks. Probably it was so, because of the existing similarity between cell's damage by cold-shock and the one due to cryopreservation. Nevertheless, on the contrary of what we obtained in the first experiment, as on the incubation progress, all the analysed indicators connected with freezability decrease passing from the most thoroughly explanation of the variability of post-thawing sperm quality (48,3 % at S1) to a minimum value (7,9 % at S5).

The results on the subpopulations was done from those values of kinetic parameters that were just collected (T0), grouping spermatozoa around three sets of subpopulations (SP1, SP2 and SP3) that showed differentiated features. The set SP1 groups cells that presented progressive movements and a high straight-line velocity. SP2 was formed by those that described winding courses and show high curvilinear velocity. Finally SP3 include spermatozoa with degraded kinetic parameters. The relative percentage of these subpopulations varies after the process of cryopreservation, producing an increase in SP1 and a decrease in SP3. This happens for instance with the resistance to heat, that was characterised by an increase in SP1 and a decrease in the other two sets. However, the SP3 set bears a considerable increase at T7. The effect of the cold-shocks is that the SP2 set raises dramatically while SP1 and SP3 sets descend. Unfortunately the variability of these subpopulations did not help us to improve our predictions on the freezability when we compare it with the individually analysed kinetic parameters. It did not either help us to obtain better results at T0, neither with the test of thermoresistance, neither in the cold-shocks. Here we got respectively a top of accuracy on the explanations on the post-thawing variability of 7,8, 10,3 and 24,7 %. Nevertheless, it can be inferred from the calculated correlations the importance of certain type of spermatozoa movement, fundamentally after the cold-shock, which is apparent in the positive correlations of SP2's freezability and the negative correlations of SP1's freezability.

Provided the importance that the cold-shocks had for a possible improvement of our predictions on semen's resistance to freezing, we carried out a third experiment with the intention of deepening our knowledge on elements that may have an influence on sperm resistance to cold. The elements that deserved an exam are sperm maturation, seminal plasma (PS) and commercial extender, which is employed to dilute samples. The experiment helps us to determine as well how the increase of cold resistance as a result of the previous incubation time (15 °C) will influence the spermatozoa survival to cryopreservation.

This research attempted also to analyse the value of cytoplasmic droplets as a reliable indicator of sperm immaturity. We evaluated for a period of incubation of three hours the percentage variation experienced by ejaculated samples of living and morphological normal spermatozoa, those that kept a distal or proximal cytoplasmic droplet within their structure, and other morphological categories of spermatozoa. After this exam we could conclude that the presence of

---

cytoplasmic droplets in the structure of ejaculated cells can be considered an indicator of immaturity. This is inferred as a result of the diminished sensibility that these cells show under a cold-shock, a plausible response in cells that have not completed the epididymal maturation process. A process that increases susceptibility to thermic falls that take place in distal portions of the corpus epididymis, but also and consequently in the rear area, with possible negative consequences that will affect fertility.

When we proceed to evaluate the influence of the commercial extender utilised as well as the presence of SP (seminal plasma), we divided the sperm-rich fraction of the ejaculated samples in six portions; three diluted with BTS and the other three with MR-A. We removed the SP of one of the three from each set by centrifugation. The first portion just after the ejaculation was extracted, the second just before each shock, and the third kept in contact with it during all the time of the test. We concluded that the extender composition utilised as much as the presence of SP in the samples have a decisive influence on cells' resistance to cold. The use of MR-A proved to be much more suitable than BTS to this end. This might be so because of the ingredients of bovine serum albumin and cysteine that form part of the former. The presence of seminal plasma was convenient given the results. We obtained higher percentages concerning the integrity of acrosomal and plasma membranes once one hour of incubation has elapsed in those samples that were in contact with it, while these proportion showed an opposite trend if the SP that was not removed after the cold-shock tests.

Finally, when the procedure of cryopreservation was modified by augmenting the stabilising period to 15° Celsius from 3 hours to 6, 12 and 24, it was observed a remarkable increase in the plasma and acrosomal membranes resistance to cold-shock as well as to the whole process of freezing/thawing. This increase in resistance was relative to the increase of time (hours) under the above mentioned temperature. Nevertheless, it was considered unprofitable to reach the 24 hours, given the pronounced fall in the spermatozoa motility that is observed at this stage, and that takes place after the shock, the cryopreservation as well as for the lack of quality of the samples when the period of refrigeration is too long.

# Bibliografía

- AALSETH, E y SAACKE, R (1986). Vital staining and acrosomal evaluation of bovine sperm. *Gamete research*, 15:73–81.
- ABAD, M; GARCÍA, J; SPRECHER, D y KIRKWOOD, R (2006). Timing and supplemental seminal plasma effects on fertility of cryopreserved boar spermatozoa. *Reprod domest animals*, 41(4):323.
- ABAIGAR, T; HOLT, W; HARRISON, R y DEL BARRIO, G (1999). Sperm subpopulations in boar (*sus scrofa*) and gazelle (*gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol Reprod.*, 60:32–41.
- AITKEN, R (1994). A free radical theory of male infertility. *Fertility and Development*, 6(1):19–23.
- AITKEN, R; CLARKSON, J y FISHEL, S (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod.*, 41(1):183–97.
- AITKEN, R; GORDON, E; HARKISS, D; TWIGG, J; MILNE, P; JENNINGS, Z y IRVINE, D (1998). Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod.*, 59(5):1037–46.
- ALBERTS, B; BRAY, D; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K y WATSON, J (1989). *Molecular biology of the cell. Second edition*. Garland Publishing, New York, USA.
- ALMLID, T; CLARKE, R; PURSEL, V y JOHNSON, L (1989). Effectiveness of in vitro methods for predicting in vivo fertilizing capacity of boar spermatozoa cryopreserved with 2 *Zuchthyg.*, 24:8–15.
- ALMLID, T y HOFMO, P (1996). A brief review of frozen semen application under norwegian ai service conditions. *Reproduction in Domestic Animals*, 31 (Suppl.1):169–173.
- ALMLID, T y JOHNSON, L (1988). Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J. Anim. Sci.*, 66:2899–2905.
- ALTHOUSE, G y HOPKINS, S (1995). Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluorophores. *Theriogenology*, 43:595–603.

- AMANN, R (1988). Computerized evaluation of stallion sperm. En *Proceedings of the 32th Annual Convention of the American Association of Equine Practicioners. Lexington, Ky. 453-473*.
- AMANN, R (1989). Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J Androl*, 10:89–98.
- AMANN, R; HAMMERSTEDT, R y SHABANOWITZ, R (1999). Exposure of human, boar, or bull sperm to a synthetic peptide increases binding to an egg-membrane substrate. *J Androl.*, 20(1):34–41.
- AMANN, R; HAMMERSTEDT, R y VEERAMACHANENI, D (1993). The epididymis and sperm maturation: a perspective. *Reprod Fertil Dev.*, 5(4):361–81.
- AMANN, R y KATZ, D (2004). Reflections on casa after 25 years. *J. Androl.*, 25:317–325.
- AMANN, R; SEIDEL, GJ y RG, M (2000). Fertilizing potential in vitro of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. *Theriogenology*, 54, Issue 9:1499–1515.
- ANDRABI, S (2007). Fundamental principles of cryopreservation of bos taurus and bos indicus bull spermatozoa. *International Journal of Agriculture&Biology*, 9(2):367–369.
- ANZAR, M; HASSAN, M; GRAHAM, E; DEYO, R y SINGH, G (1991). Efficacy of the hamilton thorn motility analyzer (htm-2030) for the evaluation of bovine semen. *Theriogenology.*, 36:307–317.
- ANZAR, M; HE, L; BUHR, M; KROETSCH, T y PAULS, K (2002). Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol Reprod*, 66:354–360.
- ASHIZAWA, K; FUJIYAMA, A y TSUZUKI, Y (1999). Temperature-dependent immobilization and restoration of fowl sperm motility caused by intracellular free calcium. *Jpn Poult Sci.*, 36:9–18.
- ASHWORTH, P; HARRISON, R; MILLER, N; PLUMMER, J y WATSON, P (1994). Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reprod Fertil Dev.*, 6(2):173–80.
- ATHERTON, R; RADANY, E; BAND, G; RADANY, R; KITCHIN, R y POLAKOSKI, K (1979). A correlation between a spectrophotometric quantitation of rabbit spermatozoa motility and velocity. *Arch. Androl*, 3:301–308.
- AURICH, J; SCHÖNHERR, U; HOPPE, H y AURICH, C (1997). Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*, 48(2):185–92.
- AUSTIN, C y BISHOP, M (1958). Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization. En *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* 149:241-248.

- BAAS, J; MOLAN, P y SHANNON, P (1983). Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *J Reprod Fertil.*, 68(2):275–80.
- BAILEY, J y BUHR, M (1994). Cryopreservation alters the  $Ca^{2+}$  flux of bovine spermatozoa. *Can. J Anim Sci.*
- BAILEY, J y BUHR, M (1995). Regulation of internal  $Ca^{2+}$  by chilled bull and boar spermatozoa. *Cryobiology*, 32:259–269.
- BAILEY, J; LESSARD, C; JACQUES, J; BRÈQUE, C; DOBRINSKI, I; ZENG, W y GALANTINO-HOMER, H (2008). Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology*, 70(8):1251–1259.
- BAILEY, J; MORRIER, A y CORMIER, N (2003). Semen cryopreservation in farm species: an update. *Can J Anis Sci*, 83:393–401.
- BALLACHEY, B; SAACKE, R y EVENSON, D (1988). The sperm chromatin structure assay: relationship with alternate test of sperm quality and heterospermic performance of bulls. *J. Androl.*, 9:109–115.
- BALTES, T (1993). *Plasma membrane evaluation with fluorescent stains, and computer-measured motility as indicators of in vitro aging of boar spermatozoa*. Tesis Doctoral, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- BAMBA, K (1988). Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology*, 29:1245–1251.
- BAMBA, K y CRAN, D (1992). Effect of treatment with butylated hydroxytoluene on the susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution. *J. Reprod. Fertil.*, 95:69–77.
- BAMBA, K y MIYAGAWA, N (1992). Protective action of aromatic compounds against cold-shock injuries in boar spermatozoa. *Cryobiology*, 29:533–536.
- BARBAS, J y MASCARENHAS, R (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank.*, 10(1):49–62.
- BARRATT, C; TOMLINSON, M y COOKE, I (1993). Prognostic significance of computerized motility analysis for in vivo fertility. *Fertil Steril.*, 60(3):520–5.
- BARRIOS, B; PÉREZ-PÉ, R; GALLEGO, M; TATO, A; OSADA, J; MUÍÑO-BLANCO, T y CEBRIÁN-PÉREZ, J (2000). Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod.*, 63(5):1531–7.
- BASSOLS, J; KADAR, E; BRIZ, M; PINART, E; SANCHO, S; GARCÍA-GIL, N; BADÍA, E; PRUNEDA, A; BUSSALLEU, E; YESTE, M; CASAS, I y DACHEUX, S, JL AAD BERET (2005). Evaluation of boar sperm maturation after co-incubation with caput, corpus and cauda epididymal cultures : Evaluation of boar sperm maturation in vitro. *Theriogenology*, 64 (9):1995–2009.

- BATELLIER, F; VIDAMENT, M; FAUQUANT, J; DUCHAMP, G; ARNAUD, G; YVON, J y MAGISTRINI, M (2001). Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci.*, 68(3-4):181–90.
- BECONI, M; AFFRANCHINO, M; SCHANG, L y BEORLEGUI, N (1991). Influence of antioxidants on sod activity in bovine sperm. *Biochem Int.*, 23(3):545–53.
- BECONI, M; FRANCIA, C; MORA, N y AFFRANCHINO, M (1993). Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, 40(4):841–51.
- BELL, M; WANG, R; HELLSTROM, W y SIKKA, S (1993). Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human sperm. *J Androl.*, 14(6):472–8.
- BENCHAIB, M; BRAUN, V; LORNAGE, J; HADJ, S; SALLE, B y LEJEUNE, H (2003). Sperm dna fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Human Reprod*, 18:1023–1028.
- BERGER, B y FISCHERLEITNER, F (1992). On deep freezing of boar semen: investigations on the effects of different straw volumes, methods of freezing and thawing extenders. *Reprod. Dom. Anim.*, 27:266–270.
- BERGER, T y CLEGG, E (1985). Effect of male accessory gland secretions on sensitivity of porcine sperm acrosomes to cold shock, initiation of motility and loss of cytoplasmic droplets. *J Anim Sci.*, 60(5):1295–302.
- BERGER, T; TURNER, K; MEIZEL, S y HEDRIK, J (1989). Zona pellucida-induced acrosome reaction in boar sperm. *Biol Reprod*, 40:525–530.
- BIANCHI, P; MANICARDI, G; BIZZARO, D; BIANCHI, U y SAKKAS, D (1993). Effect of desoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick translation of murine and human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 49:1083–1088.
- BILODEAU, J; CHATTERJEE, S; SIRARD, M y GAGNON, C (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev.*, 55(3):282–8.
- BLANCO-PALAU, O (1998). *Análisis objetivo de la motilidad espermática: evaluación de los espermatozoides de verraco y su relación con la fertilidad*. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.
- BLEIL, J y WASSARMAN, P (1986). Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. *J. Cell Biol.*, 34:1–5.
- BOATMAN, D y ROBBINS, R (1991). Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biol Reprod.*, 44(5):806–13.
- BOIXO, J; RUIZ-POVEDA, M; RODRÍGUEZ, M; GONZALO, C y VIJIL, E (1987). Valoración espectrofotométrica de la concentración espermática del semen de verraco. En *III Jornadas internacionales sobre reproducción animal e inseminación artificial*, Córdoba, páginas 211–216.



- BOLARIN, A; ROCA, J; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H; HERNÁNDEZ, M; VÁZQUEZ, J y MARTÍNEZ, E (2006). Dissimilarities in sows ovarian status at the insemination time could explain differences in fertility between farms when frozen-thawed semen is used. *Theriogenology*, 65 (3):669–680.
- BONET, S; BRIZ, M y FRADERA, A (1994). Contrastación del esperma de porcino al microscopio electrónico de barrido. *Porci Aula Veterinaria*, Técnicas de contrastación seminal.:21–28.
- BORDIGNON, V y SMITH, L (1999). Ultraviolet-irradiated spermatozoa activate oocytes but arrest preimplantation development after fertilization and nuclear transplantation in cattle. *Biol Reprod*, 61:1513–1520.
- BORONCHUK, G; BALAN, I; SICHKAN, V, IA ADN GRANACH y NAUK, V (1996). Changes in glycolipids in the plasma membrane of boar sperm after cryopreservation. En *Proc. 13th Int. Cong. Anim. Reprod.*, 3, páginas 24–31.
- BOYERS, S; DAVIS, R y KATZ, D (1989). Automated semen analysis. *Curr. Probl. Obstet: Gynecol. Fertil.*, 5:167–200.
- BRAVO, M; APARICION, I; GARCÍA-HERREROS, M; GIL, M; PEÑA, F y GARCÍA-MARÍN, L (2005). Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation-like state in boar spermatozoa. *Molecular reproduction and development*, 71:88–96.
- BREININGER, E; BEORLEGUI, N; O´FLAHERTY, C y BECONI, M (2005). Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, 63(8):2126–2135.
- BRIZ, M; BONET, S; PINART, B; EGOZCUE, J y CAMPS, R (1995). Comparative study of boar sperm coming from the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis. *J Androl.*, 16(2):175–88.
- BROUWERS, J; SILVA, P y GADELLA, B (2005). New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after bts dilution or after freeze-thawing. *Theriogenology*, 63(2):458–469.
- BRUCKER, C; KASSNER, G; LOSER, C; HINRICHSSEN, M y LIPFORD, G (1994). Progesterone-induced acrosome reaction: potential role for sperm acrosome antigen-1 in fertilization. *Hum. Reprod.*, 9:1897–1902.
- BUCAK, M; ATESSAHIN, A y YÜCE, A (2008). Effect of antioxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Rumin. Res.*, 75:128–134.
- BUDWORTH, P; AMANN, R y CHAPMAN, P (1988). Relationships between computerized measurements of motion of froze-thawed bull spermatozoa and fertility. *J Androl*, 9:41–54.
- BUDWORTH, P; AMANN, R y HAMERSTEDT, R (1987). A microcomputer-photographic method for evaluation of motility and velocity in bull sperm. *J Dairy Sci*, 70:1927–1936.

- BUHR, M (1990). Preservation of boar sperm alters membrane molecular dynamics. *Reprod. Domest. Anim*, Suppl. 1:81–93.
- BUHR, M; CURTIS, E y KAKUDA, N (1994). Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*, 31:224–238.
- BURKMAN, L (1984). Characterization of hyperactivated motility of human spermatozoa during capacitation: comparison of fertile and oligozoospermic sperm populations. *Arch. Androl.*, 13:153–165.
- BWANGA, C (1991). Cryopreservation of boar semen. i: a literature review. *Acta Vet. Scand.*, 32:431–453.
- BWANGA, C; DE BRAGANCA, M; EINARSSON, S y RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H (1990). Cryopreservation of boar semen in mini- and maxi-straws. *J. Vet. Med. A.*, 37:651–658.
- BWANGA, C; EINARSSON, S y RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H (1991a). Cryopreservation of boar semen ii: effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini- and maxi-straws and plastic bags. *Acta Vet. Scand.*, 32:455–461.
- BWANGA, C; EINARSSON, S y RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H (1991b). Deep freezing of boar semen packaged in plastic bags and straws. *Reprod. Dom. Anim.*, 26:117–125.
- BYRD, W y WOLF, D (1986). Acrosomal status in fresh and capacitated human ejaculated sperm. *Biol. Reprod.*, 34:859–869.
- CABALLERO, I; VÁZQUEZ, J; CENTURIÓN, F; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H; PARRILLA, I; ROCA, J; CUELLO, C y MARTÍNEZ, E (2004). Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.*, 39:370–375.
- CABALLERO, I; VÁZQUEZ, J; GARCÍA, E; ROCA, J; MARTÍNEZ, E; CALVETE, J; SANZ, L; EKWALL, H y RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H (2006). Immunolocalization and possible functional role of psp-i/psp-ii heterodimer in highly extended boar spermatozoa. *J Androl.*, 27:766–773.
- CABALLERO, I; VÁZQUEZ, J; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H; GIL, M; CALVETE, J; SANZ, L; GARCÍA, E; ROCA, J y MARTÍNEZ, E (2005). Influence of seminal plasma psp-i/psp-ii spermadhesin on pig gamete interaction. *Zygote*, 13:11–16.
- CABODEVILA, J y TERUEL, M (2001). *Biotecnología de la Reproducción.*, capítulo Criopreservación de embriones bovinos., páginas 149–174. Ediciones INTA. Balcarce.
- CABRITA, E; ALVAREZ, R; ANEL, E y HERRÁEZ, M (1999). The hypoosmotic swelling test performed with counter coulter: a method assay functional integrity of sperm membrane in rainbow trout. *Animal Reproduction Science*, 55:279–287.
- CAIROLI, F; NISOLI, L; MARZANI, M; BATTOCCHIO, M; VIGO, D y MAFFEO, G (1991). Aspetti qualitativi degli embrioni suini ottenuti con seme fresco e congelato. *Sel. Vet.*, 32 (1):297–300.

- CAIZA DE LA CUEVA, F; PUJOL, M; RIGAU, T; BONET, S; MIRÓ, J; BRIZ, M y RODRÍGUEZ-GIL, J (1997). Resistance to osmotic stress of horse spermatozoa: the role of ionic pumps and their relationship to cryopreservation success. *Theriogenology*, 48(6):947–68.
- CAIZA DE LA CUEVA, F; RIGAU, T; PUJOL, R; PIEDRAFITA, J y RODRÍGUEZ-GIL, J (1997). Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of the ionic pumps and the relationship with cryosurvival. *Anim Reprod Sci.*, 48(2-4):301–15.
- CAMPI, S; GONZÁLEZ, L; BLASI, C; SVHEVIC, J y BONET, S (2007). Comparación entre distintos tiempos de lectura en el test de endósmosis. *Avances en Tecnología Porcina*, 4:48–54.
- CANVIN, A y BUHR, M (1989). Effect of temperature on the fluidity of boar sperm membranes. *J Reprod Fertil.*, 85(2):533–40.
- CARBALLADA, R y ESPONDA, P (1998). Binding of seminal vesicle proteins to the plasma membrane of rat spermatozoa in vivo and in vitro. *Int J Androl.*, 21(1):19–28.
- CARVAJAL, G; CUELLO, C; RUIZ, M; VÁZQUEZ, J; MARTÍNEZ, E y ROCA, J (2004). Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *J Androl.*, 25(3):389–96.
- CASAS, I; SANCHO, S; BRIZ, M; PINART, E; BUSSALLEU, E; YESTE, M y BONET, S (2009). Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology.*, 72(7):930–48.
- CASEY, P; GRAVANCE, C; DAVIS, R; CHABOT, D y LIU, I (1997). Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. *Theriogenology.*, 47:575–582.
- CATENA, M y CABODEVILA, J (1999). Evaluación de semen bovino congelado. *Taurus*, 1 (3):18–31.
- CEROLINI, S; MALDJIAN, A; PIZZI, F y GLIOZZI, T (2001). Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*, 121(3):395–401.
- CEROLINI, S; MALDJIAN, A; SURAI, P y NOBLE, R (2000). Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim Reprod Sci.*, 58(1-2):99–111.
- CHAN, S; FOX, E; CHAN, M; TSOI, W; WANG, C; TANG, L y HO, P (1985). The relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test, routine analysis, and the human sperm zona-free hamster ovum penetration assay. *Fertil. Steril.*, 44(5):668.
- CHAN, S; TSOI, W; LEUNG, J; NG, V; LO, T y WANG, C (1990). The accuracy of sperm concentration determination by the automated cellsoft semen analyzer before and after discontinuous percoll gradient centrifugation. *Andrologia.*, 22:55–61.
- CHANG, M (1957). A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature*, 179:258–259.

- CHATTERJEE, S; DE LAMIRANDE, E y GAGNON, C (2001). Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Mol Reprod Dev.*, 60(4):498–506.
- CHATTERJEE, S y GAGNON, C (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev*, 59(4):451–458.
- CHEN, Y; CANN, M; LITVIN, T; LOURGENKO, V; SINCLAIR, M; LEVIN, L y BUCK, J (2000). Soluble adenylyl cyclase as an evolutionary conserved bicarbonate sensor. *Science*, 289:625–628.
- CHENG, F; FAZELI, A; VOORHOUT, W; TREMOLEDA, J; BEVERS, M y COLENBRANDER, B (1998a). Progesterone in mare follicular fluid induces the acrosome reaction in stallion spermatozoa and enhances in vitro binding to the zona pellucida. *Int J Androl*, 21:57–66.
- CHENG, F; GADELLA, B; VOORHOUT, W; FAZELI, A; BEVERS, M y COLENBRANDER, B (1998b). Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. *Biol Reprod*, 59:733–742.
- CHESMEDJIEVA, S; VAISBERG, C y DIMOV, V (1996). Effect of cold shock and freezing on the phospholipid and cholesterol content of ram spermatozoa. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 2 (5):629–632.
- CHRISTENSEN, P; WHITFIELD, C y PARKINSON, T (1994). The use of bright-field microscopy in evaluating bovine acrosome reaction. *Theriogenology*, 42:655–662.
- CHURCH, K y GRAVES, C (1976). Loss of acrosin from bovine spermatozoa following cold shock: protective effects of seminal plasma. *Cryobiology*, 13(3):341–6.
- CIAMPI, A; LECHEVALLIER, Y; CASTEJÓN, M y GONZÁLEZ, A (2007). Hierarchical clustering of subpopulations with a dissimilarity based on the likelihood ratio statistic: Application to clustering massive data sets. pattern analysis and applications. *Springer-Verlag London Limited 2007*, doi:10.1007/s10044-007-0088-4.
- CLARKE, R; SEXTON, T y OTTINGER, M (1982). Effects of holding temperature and storage time on respiratory rate, motility, and fertility of chicken and turkey semen. *Poult Sci.*, 61(9):1912–7.
- COETZEE, K; BERMES, N; KRAUSE, W y MENKVELD, R (2001). Comparison of normal sperm morphology outcomes from two different computer-assisted semen analysis systems. *Andrologia*, 33:159–163.
- COLENBRANDER, B; FEITSMA, H y GROOTEN, H (1993). Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *J Reprod Fertil Suppl*, 48:207–215.
- COLENBRANDER, B; GADELLA, B y STOUT, T (2003). The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reprod Dom Anim*, 38:305–311.

- COLENBRANDER, B y KEMP, B (1990). Factors influencing semen quality in pigs. *J Reprod Fertil Suppl.*, 40:105–15.
- COMASCHI, V; LINDNER, L; FARRUGGIA, G; GESMUNDO, N; COLOMBI, L y MASOTTI, L (1989). An investigation on lipoperoxidation mechanisms in boar spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun.*, 158(3):769–75.
- COOK, S; BROKAW, C; MULLER, C y BABCOCK, D (1994). Sperm chemotaxis: egg peptides control cytosolic calcium to regulate flagellar responses. *Dev Biol.*, 165(1):10–9.
- COOPER, T (2005). Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Hum Reprod.*, 20(1):9–11.
- COOPER, T; ATKINSON, A y NIESCHLAG, E (1999). Experience with external quality control in spermatology. *Human Reproduction.*, 14:765–769.
- COOPER, T; BJORND AHL, L; VREEBURG, J y NIESCHLAG, E (2002). Semen analysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization. *International Journal Andrology*, 25:306–311.
- COOPER, T y YEUNG, C (2003). Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Tech.*, 61(1):28–38.
- CORMIER, N; SIRARD, M y BAILEY, J (1997). Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J. Androl.*, 18(4):461–468.
- CORONEL, C y LARDY, H (1987). Characterization of calcium uptake by guinea pig epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 37:1097–1107.
- CORREA, J y ZAVOS, P (1994). The hypoosmotic test its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*, 44:963.
- COURTENS, J; EK WALL, H; PAQUIGNON, M y PLÖEN, L (1989). Preliminary study of water and some elements contents in boar spermatozoa, before, during and after thawing. *J. Reprod. Fertil.*, 87:613–626.
- CRABO, B (1985). *Deep Freezing of boar semen.*, capítulo Post-testicular sperm maturation and its importance to deep freezing of boar semen., páginas 17–36. Swedish University of Agricultural Sciences.
- CRABO, B (1991). *Boar semen preservation II.*, capítulo Preservation of boar semen: a worldwide perspective., páginas 3–9. Paul Parey Sci. Publ.
- CRABO, B y EINARSSON, S (1971). Fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet. Scand.*, 12:125–127.
- CÓRDOVA-IZQUIERDO, A (2002). Biotecnología de la reproducción en la especie porcina: Papel de la criopreservación espermática. *Porci*, 72:11–20.

- CREMADES, T; ROCA, J; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H; ABAIGAR, T; VÁZQUEZ, J y MARTÍNEZ, E (2005). Kinematic changes during the criopreservation of boar spermatozoa. *Journal of Andrology*, 26 (5):610–618.
- CROSS, N (1993). Multiple effects of seminal plasma on the acrosome reaction of human sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, 35:316–323.
- CROSS, N y MEITZEL, S (1989). Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol. Reprod.*, 41:635–641.
- CROSS, N; MORALES, P; OVERSTREET, J y HANSON, F (1986). Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res.*, 15:213–216.
- CURRY, M (2000). Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews Reprod.*, 5:46–52.
- CURRY, M y WATSON, P (1994). Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology*, 31:39–46.
- DADOUNE, J (2003). Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc Res Tech*, 61:56–75.
- D’ALESSANDRO, A y MARTEMUCCI, G (2003). Evaluation of seasonal variations of semen freezability in leccese ram. *Anim Reprod Sci.*, 79(1-2):93–102.
- DAUSEND, P (1974). *Vorkommen und fertilitätsdiagnostische bedeutung von morphologisch abweichenden samenzellen im ebersperma unter besonderer berucksichtigung der sogenannten anhangenden protoplamatropfen*. Tesis Doctoral, Hannover.
- DAVID, G; SERRES, C y JOUANNET, P (1981). Kinematics of human spermatozoa. *Gamete Research*, 4:83–95.
- DAVIES, D; HALL, G; HIBBITT, G y MOORE, H (1975). The removal of the seminal vesicles from the boar and the effects on the semen characteristics. *J Reprod Fertil.*, 43(2):305–12.
- DAVIS, B y NIWA, K (1974). Inhibition of mammalian fertilization in vitro by membrane vesicles from seminal plasma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 146:11–16.
- DAVIS, R; DROBNIS, E y OVERSTREET, J (1995). Application of multivariate cluster, discriminate function, and stepwise regression analyses to variable selection and predictive modeling of sperm cryosurvival. *Fertil Steril.*, 63:1051–1057.
- DAVIS, R y KATZ, D (1992). Standardization and comparability of casa instruments. *J Androl.*, 13:81–86.
- DAVIS, R y KATZ, D (1993). Operational standard for casa instruments. *Journal of Andrology*, 14:385–394.
- DAVIS, R; ROTHMANN, S y OVERSTREET, J (1992). Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies. *Fertil Steril.*, 57:648–653.

- DE KRESTER, D y KERR, J (1994). *Physiology of reproduction*, capítulo The cytology of testis, páginas 1177–1290. Raven Press ltd., NY.
- DE LAMIRANDE, E; BELLES-ISLES, M y GAGNON, C (1984). Characteristics of a seminal plasma inhibitor of sperm motility. *Annal of New York Academy Sciences*, 438 Issue Hormonal-Control of Testicular Function:125–131.
- DE LAMIRANDE, E y GAGNON, C (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa. i. effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl.*, 13(5):368–78.
- DE LAMIRANDE, E; JIANG, H; ZINI, A; KODAMA, H y CAGNON, C (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction*, 2:48–54.
- DE LEEUW, F; CHEN, H; COLENBRANDER, B y VERKLEIJ, A (1990a). Cold induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, 27:171–183.
- DE LEEUW, F; COLENBRANDER, B y VERKLEIJ, A (1990b). The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. En *Proc. second international conference of boar semen preservation. US Department of Agriculture, Beltsville, USA, pp 95-104.*
- DECUADRO, G (2001). Avances en inseminación artificial porcina. *www.acontece.com.ar.*
- DELGADO, J (2000). La conservación de la biodiversidad de los animales domésticos locales para el desarrollo rural sostenible. *Arch. Zootec.*, 49:317–326.
- DEMOTT, R; LEFEBVRE, R y SUÁREZ, S (1995). Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium. *Biol. Reprod.*, 52(6):1395–1403.
- DIDION, B; DOBRINSKY, J; GILES, J y GRAVES, C (1989). Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res.*, 22:51–57.
- DIMITRIADIS, F; GIANNAKIS, D; PARDALIDIS, N; ZIKOPOULOS, K; PARASKEVAIDIS, E; GIOTITSAS, N; KALABOKI, V; TSOUNAPI, P; BALTOGIANNIS, D; GEORGIU, I; SAITO, M; WATANABE, T; MIYAGAWA, I y SOFIKITIS, N (2008). Effects of phosphodiesterase-5 inhibitors on sperm parameters and fertilizing capacity. *Asian J Androl.*, 10(1):115–133.
- DOMÍNGUEZ, J; ANEL, L; BOIXO, J y ABAD, M (1985). Influencia de la cafeína sobre la motilidad, supervivencia y acrosomía espermática del semen descongelado de morueco. *An. Fac. Vet. León.*, 31:233–243.
- DOMÍNGUEZ, J; CISALE, H; KIRKWOOD, R; BREININGER, E; GONZÁLEZ, R; TEJERINA, F; ALEGRE, B; PELÁEZ, J; GARCÍA, J; BERNAL, S; CÁRDENAS, S; CÓRDOVA, C; ABAD, M; ABAD, F; MANJARÍN, R y MARTÍN, D (2008). La criopreservación de semen porcino. *Albétar.*, 119:14–15.
- DOOHER, G y BENNET, D (1973). Fine structural observations on the development of the sperm head in the mouse. *Am J Anat*, 136:339–361.

- DORADO, J; HIDALGO, M; MUÑOZ, A y RODRÍGUEZ, I (2008). Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. *Anim Reprod Sci.*, 112(1-2):150–7.
- DOTT, H; HARRISON, R y FOSTER, G (1979). The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. *J Reprod Fertil.*, 55(1):113–24.
- DROBNIS, E; CROWE, L; BERGER, T; ANCHORDOGUY, T; OVERSTREET, J y CROWE, J (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool*, 265:432–437.
- DROBNIS, E; YUDIN, A; CHERR, G y KATZ, D (1988). Kinematics of hamster sperm during penetration of the cumulus cell matrix. *Gamete research*, 21:367–383.
- DUBE, C; BEAULIEU, C; REYES-MORENO, C; GUILLEMETTE, C y BAILEY, J (2004). Boar sperm storage capacity of bts and androhep plus: viability, motility, capacitation and tyrosine phosphorylation. *Theriogenology*, 62(5):874–886.
- DUBOIS, M; JOUANNET, P; BERGE, P y DAVID, G (1974). Spermatozoa motility in human cervical mucus. *Nature*, 252:711–713.
- DUKELOW, W y GRAHAM, E (1962). Freezing of porcine semen. *J Anim Sci.*, 19:926–31.
- DUNPHY, B; KAY, R; BORRAT, C y COOK, I (1989). Quality control during the conventional analysis of semen, as essential exercise. *Journal of Andrology*, 10:378.
- ELIOTT, F; SHERMAN, J; ELIOTT, E y SULLIVAN, J (1973). A photographic method of measuring percentage of progressively sperm cells using dark-field photography. En *Proceedings of the 8th international symposium on zootechnology. Milan. Italy. 160-168.*
- EMERIT, J; KLEIN, J; COUTELLIER, A y CONGY, F (1991). Free radicals and lipid peroxidation in cell biology: physiopathologic prospects. *Pathol Biol (Paris)*, 39(4):316–27.
- ENCISO, M; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C; FERNÁNDEZ, J; GARCÍA, P; GOSÁLBEZ, A y GOSÁLBEZ, J (2006). New method to analyze boar sperm dna fragmentation under bright-field or fluorescence microscopy. *Theriogenology*, 65:308–316.
- ENGLAND, G (1992). *The criopreservation of dog semen.* Tesis Doctoral, University of London.
- ENGLAND, G y PLUMMER, J (1993). Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *J Reprod Fertil*, Suppl 47:261–270.
- ERIKSSON, B (2000). *Cryopreservation of Boar Semen. Studies on sperm viability in vitro and fertility.* Tesis Doctoral, Swedish University of Agricultural Science (SLU). Uppsala.
- ERIKSSON, B; PETERSSON, H y RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H (2002). Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. *Theriogenology*, 58(6):1065–79.



- ERIKSSON, B y RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H (1999). Viabilidad y fertilidad del semen de verraco congelado en envases planos (single-doses pet-flat bags). En *II Cong. Ibérico Reprod. Anim., Libro de ponencias y comunicaciones: 364-368*.
- ERIKSSON, B y RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H (2000a). Deep-freezing of boar semen in plastic film çochettes". *J. Vet. Med. A*, 47:89-97.
- ERIKSSON, B y RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H (2000b). Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in flatpacks and maxi-straws. *Anim. Reprod. Sci.*, 63:205-220.
- ERIKSSON, B; VÁZQUEZ, J; MARTÍNEZ, E; ROCA, J; LUCAS, X y RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H (2001). Effect of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology.*, 55:1593-1605.
- ESHRE (1998). Guidelines on the application of casa technology in the analysis of spermatozoa. eshre andrology special interest group. european society for human reproduction and embryology. *Hum Reprod.*, 13:142-145.
- EVANS, G y MAXWELL, W (1987). *Salamon's artificial insemination of sheep and goats*.
- EVENSON, D; DARZYNKIEWICZ, Z y MELAMED, M (1982). Simultaneous measurement by flow cytometry of spem cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J. Histochem. Cytochem.*, 30:279-280.
- EVENSON, D; LARSSON, L y JOST, L (2002). Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting spem dna fragmentation in male infertility and. *J Androl*, 23:1:25-43.
- EVENSON, D; THOMPSON, L y JOST, L (1994). Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology*, 41:637-651.
- FARLIN, F; JASKO, D; GRAHAM, J y SQUIRES, E (1992). Assessment of pisum sativum agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, 32:23-27.
- FARRELL, P; FOOTE, R; MCARDLE, M; TROUERN-TREND, V y TARDIF, A (1996). Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (casa). *J Androl.*, 17:293-300.
- FARRELL, P; PRESICCE, G; BROCKETT, C y FOOTE, R (1998). Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (casa) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, 49:871-879.
- FATEHI, A; BEVERS, M; SCHOEVERS, E; ROELEN, B; COLENBRANDER, B y GADELLA, B (2006). Dna damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl*, 27:176-188.

- FATTOUH, E y ABDON, M (1991). Effect of caffeine on the post-thaw motility of buffalo spermatozoa. *Theriogenology*, 36:149–154.
- FERNÁNDEZ, J; MURIEL, L; RIVERO, M; GOYANES, V; VÁZQUEZ, R y ÁLVAREZ, J (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm dna fragmentation. *J Androl*, 24:59–66.
- FISER, P y FAIRFULL, R (1986). The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology*, 23:518–524.
- FISER, P y FAIRFULL, R (1990). Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml straws. *Mol. Reprod. Dev.*, 25:123–129.
- FISER, P; FAIRFULL, R; HANSEN, C; PANICH, P; SHRESTHA, J y UNDERHILL, L (1993). The effect of warming velocity on motility and acrosomal integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glycerol level. *Mol. Reprod. Dev.*, 34:190–195.
- FISER, P; FAIRFULL, R y PANICH, P (1995). Glycerol equilibration time revisited. *Reprod. Dom. Anim.*, 31(1):141–146.
- FISER, P; HANSEN, C; UNDERHILL, L y MARCUS, G (1991). New thermal stress test to assess the viability of cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*, 28:454–459.
- FLESCH, F; COLENBRANDER, B; VAN GOLDE, L y GAZELLA, B (1999). Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, 262(3):787–92.
- FLESCH, F; VOORHOUT, W; COLENBRANDER, B; VAN GOLDE, L y GADELLA, B (1998). Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa: a novel technique for monitoring membrane purity and quantity. *Biol. Reprod.*, 59:1530–1539.
- FLORES, E; CIFUENTES, D; FERNÁNDEZ-NOVELL, J; MEDRANO, A; BONET, S; BRIZ, M; PINART, E; PEÑA, A; RIGAU, T y RODRÍGUEZ-GIL, J (2008a). Freeze-thawing induces alterations in the protamine-1/dna overall structure in boar sperm. *Theriogenology*, 69(9):1083–94.
- FLORES, E; TABERNER, E; RIVERA, M; PEÑA, A; RIGAU, T; MIRÓ, J y RODRÍGUEZ-GIL, J (2008b). Effects of freezing/thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. *Theriogenology*, 70(6):936–945.
- FLOWERS, W (2002). Increasing fertilization rate of boars: influence of number and quality of spermatozoa inseminated. *J Anim Sci*, 80 (E. suppl. 1):47–53.
- FOOTE, R; ARRIOLA, J y WALL, R (1978). Principles and procedures of photometric measurement of sperm cell concentration. En *Proc. 7th. Tech. Conf. on Artif. Insem. And Repr. NAAB*.

- FOULKES, J (1977). The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil.*, 49(2):277–84.
- FOWLKES, E y MALLOWS, C (1983). A new method for comparing two hierarchical clusterings. *J. Ame. Stat. Assoc.*, 78:553–569.
- FRASER, L (1989). *Fertilization in mammals.*, capítulo Sperm capacitation and its modulation., páginas 141–153. Serono symposia. USA. Norwell, Massachusetts.
- FRASER, L; DASGUPTA, S y MILLS, C (1996). Fertilization calcium dependent events. *Fertil. Steril.*, 65:1258–1259.
- FRASER, L y STRZEZEK, J (2007). Is there a relationship between the chromatin status and dna fragmentation of boar spermatozoa following freezing-thawing? *Theriogenology*, 68:248–257.
- FRASER, L; STRZEZEK, J y SAIZ CIDONCHA, F (2001). Variaciones en el movimiento de los espermatozoides de verraco durante la administración de acetato de ciproterona. *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.*, 16 (1):135–142.
- FREUND, M y OLIVEIRA, N (1987). Visual versus cinemicrographic evaluation of human sperm motility and morphology. *Arch Androl.*, 19:25–32.
- FULLER, S y WHITTINGHAM, D (1996). Effect of cooling mouse spermatozoa to 4°C on fertilization and embryonic development. *J. Reprod. Fertil.*, 108:139–145.
- FULLER, S y WHITTINGHAM, D (1997). Capacitation-like changes occur in mouse spermatozoa cooled to low temperatures. *Mol Reprod Dev.*, 46(3):318–24.
- FUNAHASHI, H y SANO, T (2005). Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees c. *Theriogenology*, 63(6):1605–16.
- 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 vitro*. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.
- GADEA, J (2003). Los diluyentes de inseminación artificial porcina. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1(2):17–27.
- GADEA, J (2004). El uso de semen porcino congelado. *Mundo Ganadero*, 169:60–62.
- GADEA, J (2005). Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*, 63:431–444.
- GADEA, J; E, S; MARCO, M; COY, P; MATAS, C; ROMAR, R y RUIZ, S (2004a). Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology.*, 62:690–701.
- GADEA, J; GARCÍA-VAZQUEZ, F; MATÁS, C; GARDÓN, J; CÁNOVAS, S y GUMBAO, D (2005a). Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *J Androl.*, 26(3):396–404.

- GADEA, J; GUMBAO, D; CÁNOVAS, S; GARCÍA-VÁZQUEZ, F; GRULLÓN, L y GARDÓN, J (2008). Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. *nt J Androl.*, 31(1):40–9.
- GADEA, J; GUMBAO, D; MATÁS, C y ROMAR, R (2005b). Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *J Androl.*, 26(6):749–56.
- GADEA, J; MATÁS, C y LUCAS, X (1998). Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hivp) assay. *Anim Reprod Sci*, 54:95–108.
- GADEA, J; SELLÉS, E y MARCO, M (2004b). The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Reprod. Dom. Anim.*, 39:303–308.
- GADELLA, B; FLESH, F; VAN GOLDE, L y COLENBRANDER, B (1999). Dynamics in the membrane organization of the mammalian sperm cell and functionality in fertilization. *Vet Q*, 21(4):142–146.
- GADELLA, B y HARRISON, R (2000). The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase a-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development*, 127:2407–2420.
- GADELLA, B y HARRISON, R (2002). Capacitation induces cyclic adenosine 3', 5' - monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod*, 67:340–350.
- GADELLA, B; RATHI, R; BROUWERS, J; STOUT, T y COLENBRANDER, B (2001). Capacitation and the acrosome reaction in equine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 68:239–247.
- GALANTINO-HOMER, H; ZENG, W; MEGEE, S; DALLMEYER, M; VOELKL, D y DOBRINSKI, I (2006). Effects of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and cholesterol on porcine sperm viability and capacitation status following cold shock or incubation. *Mol Reprod Dev.*, 73(5):638–50.
- GAO, D; ASHWORTH, E; WATSON, P; KLEINHANS, F; MAZUR, P y CRITSER, J (1993a). Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biol Reprod.*, 49(1):112–23.
- GAO, D; ASHWORTH, E; WATSON, P; KLEINHANS, F; MAZUR, P y JK, C (1993b). Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: Effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biol. Reprod.*, 49:112–123.
- GAO, D y CRITSER, J (2000). Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J.*, 41(4):187–96.
- GAO, D; LIU, J; LIU, C; MCGANN, L; WATSON, P; KLEINHANS, F; MAZUR, P; CRITSER, E y CRITSER, J (1995). Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum Reprod.*, 10(5):1109–22.

- GAO, D; MAZUR, P y CRITSER, J (1997). *Reproductive tissue banking: scientific principles*, capítulo Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa, páginas 263–328. Academic Press, San Diego, USA.
- GARBERS, D; FIRST, N; GORMAN, S y LARDY, H (1973). The effects of cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors on ejaculated porcine spermatozoan metabolism. *Biol. Reprod.*, 8:599–606.
- GARBERS, D; FIRST, N; SULLIVAN, J y LARDY, H (1971a). Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoan respiration and motility by caffeine. *Biol. Reprod.*, 5:336–339.
- GARBERS, D; LUST, W; FIRST, N y LARDY, H (1971b). Effects of phosphodiesterase inhibitors and cyclic nucleotides on sperm respiration and motility. *Biochemistry*, 10:1825–1831.
- GARCÍA, M y GRAHAM, E (1987a). Dialysis of bovine semen and its effect on fresh and freeze-thawed spermatozoa. *Cryobiology*, 24(5):446–54.
- GARCÍA, M y GRAHAM, E (1987b). Effects of low-molecular-weight fractions (lmwf) from milk, egg yolk, and seminal plasma on freezability of bovine spermatozoa. *Cryobiology*, 24(5):429–36.
- GARCÍA, M y GRAHAM, E (1987c). Factors affecting the removal of low-molecular-weight fractions (lmwf) from egg yolk and seminal plasma in extended semen by dialysis: effect on post-thaw sperm survival. *Cryobiology*, 24(5):437–45.
- GARCÍA, P; PÉREZ, B y GOSÁLVEZ, J (2006). *Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino*, capítulo Estudio del nivel de fragmentación del ADN en semen de verraco, páginas 125–132. Universidad de Girona, Red temática nacional de reproducción porcina.
- GARCÍA-ARTIGA, C; FONTANILLAS, J; PÉREZ, J; GARCÍA-CUENCA, I; MARTÍN-RILLO, S y PÉREZ-GARCÍA, T (1994). Técnicas de tinción espermática. *Porci*, 21:11–18.
- GARCÍA-HERREROS, M; APARICIO, I; BARON, F; GARCÍA-MARÍN, L y GIL, M (2006). Standardization of sample preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. *Int J Androl.*, 29:553–563.
- GARCÍA-HERREROS, M; APARICIO, I; NÚÑEZ, I; GARCÍA-MARÍN, L; GIL, M y PEÑA VEGA, F (2005). Boar sperm velocity and motility patterns under capacitating and non-capacitating incubation conditions. *Theriogenology.*, 63:795–805.
- GARCÍA-MACÍAS, V; DE PAZ, P; MARTÍNEZ-PASTOR, F; ÁLVAREZ, M; GOMES-ALVES, S; BERNARDO, J; ANEL, E y ANEL, L (2007). Dna fragmentation assessment by flow cytometry and sperm-bos-halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. *Int J Androl*, 30:88–98.
- GARNER, D y JOHNSON, L (1995). Viability assessment of mammalian sperm using sybr-14 and propidium iodide. *Biol Reprod*, 53:276–284.

- GARNER, D; JOHNSON, L; YUE, S; ROTH, B y HAUGLAND, R (1994). Dual dna staining assessment of bovine sperm viability using sybr-14 and propidium iodide. *J Androl*, 15:620–629.
- GARNER, D; PINKEL, D; JOHNSON, L y PACE, M (1986). Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol Reprod*, 34:127–138.
- GARNER, D y THOMAS, C (1999). Organell-specific probe jc-1 identifies membrane differences in the mitochondrial function of bovine sperm. *Mol Reprod Dev*, 53:85–92.
- GEHRING, W (1986). Hos test and standard semen parameters as predictors of viability of cryopreserved human spermatozoa? *Hum. Reprod.*, 1 (Suppl 2):12.
- GERFEN, R; WHITE, B; COTTA, M y WHEELER, M (1994). Comparison of the semen of fengjing, meishan and yorkshire boars. *Theriogenology*, 41:461–469.
- GIBBONS, B y GIBBONS, I (1980a). Calcium-induced quiescence in reactivated sea urchin sperm. *J Cell Biol.*, 84(1):13–27.
- GIBBONS, I y GIBBONS, B (1980b). Transient flagellar wave forms during intermiteenet swimming in sea urchin sperm. i. wave parameters. *J. Muscle Res. Cell Motility.*, 1:31–59.
- GILL, H; VAN ARSDALEN, K; HYPOLITE, J; LEVIN, R y RUZICH, J (1988). Comparative study of two computerized semen motility analyzers. *Andrologia.*, 20:433–440.
- GILLAN, L; EVANS, G y MAXWELL, W (1997). Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*, 9:481–487.
- GILLAN, L; GARETH, E y MAXWELL, W (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63:445–457.
- GLOGOWSKI, J; DANFORTH, D y CIERESZKO, A (2002). Inhibition of alkaline phosphatase activity of boar semen by pentoxifylline, caffeine, and theophylline. *J Androl.*, 23(6):783–92.
- GOH, P y WHITE, I (1988). Control of ram sperm adenylate cyclase by divalent cations. *Aust J Biol Sci.*, 41(3):377–85.
- GONZÁLEZ-CHABARRI, E y MARTÍN-RILLO, S (1994). Técnicas de fluorescencia para la valoración espermática. *Porci*, 21:45–54.
- GONZÁLEZ-URDIALES, R; TEJERINA, F; DOMÍNGUEZ, J; ALEGRE, B; FERRERAS, A; PELAEZ, J; BERNAL, S y CARDENAS, S (2006). *Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino*, capítulo Técnicas de análisis rutinario de la calidad espermática: motilidad, vitalidad, concentración, resistencia osmótica y morfología espermática., páginas 19–38. Universidad de Girona. Red temática nacional de reproducción porcina.
- GOSÁLVEZ, L; VALDEVIRA, J; VIDAL, A y ALVARIÑO, J (2002). Assessment of suitable porcine semen for freezing, according to the ejaculate characteristics in the iberico x landrace breed. *Reprod.Dom. Anim.*, 37:282–284.

- GRAHAM, E; RAJAMANNAN, A; SCHMEHL, M; MAKI-LAURILA, M y BOWER, R (1971). Fertility studies with frozen boar spermatozoa. *A. I. Digest.*, 19:61.
- GRAHAM, E; SCHMEHL, M y DEYO, R (1984). Cryopreservation and fertility of fish, poultry and mammalian spermatozoa. En *Proceedings of the 10th NAAB Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction*. Pags 4-24.
- GRAHAM, J (1994). Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology.*, 41(5):1151-62.
- GRAHAM, J (1996). Cryopreservation in stallion spermatozoa. *Vet Clin North Ame*, 12:131-147.
- GRAHAM, J (2001). Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci*, 68:249-265.
- GRAHAM, J y FOOTE, R (1987). Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, 24(1):42-52.
- GRAHAM, J; KUNZE, E y HAMMERSTEDT, R (1990). Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol. Reprod.*, 43:55-64.
- GREEN, C y WATSON, P (2001). Comparison fo the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, 122(6):889-898.
- GROSS, M; TOSCANO, D y TOSCANO JR., W (1987). Calmodulin-mediated adenylate cyclase from mammalian sperm. *J. Biol. Chem.*, 262(18):8672-8676.
- GROSSFELD, R; SIEG, B; STRUCKMANN, C; FRENZEL, A; MAXWELL, W y RATH, D (2008). New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology*, 70(8):1225-33.
- GUILLAN, L; EVANS, G y MAXWELL, W (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63 (2):445-457.
- GUSTAFSSON, B; CRABO, B y EINARSSON, S (1970). Morphology of the spermatozoa and composition of the plasma in boar epididymis. En *Proc.11th Nordic Veterinary Congress. Bergen. 241*.
- GUTHRIE, H y WELCH, G (2005). Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenolgy*, 63(2):396-410.
- HAFEZ, E (2000). *Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición.*, capítulo Anatomía del aparato reproductor del macho. Parte I. Anatomía funcional de la reproducción., páginas 3-12. Mc. Graw Hill. México.
- HAMAMAH, S; ROYÈRE, D; MIRON, P; NICOLLE, J y LANSAC, J (1991). *Human sperm chromatin alterations after freezing-thawing and in vitro fertilization*, capítulo Human sperm

chromatin alterations after freezing-thawing and in vitro fertilization, páginas 899–903. Serrano symposia publications from Raven Press.

HAMAMAH, S; ROYÈRE, D; NICOLLE, J; PAQUIGNON, M y LANSAC, J (1990). Effects of freezing-thawing on the spermatozoon nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. *Reprod. Nutr. Dev.*, 30:59–64.

HAMMERSTEDT, R (1975). Use of high speed dialysis to prepare bovine sperm for metabolic studies. *Biol Reprod.*, 13(4):389–96.

HAMMERSTEDT, R; GRAHAM, J y NOLAN, J (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J Androl*, 11:1:73–88.

HAMMERSTEDT, R; KEITH, A; SNIPES, W; AMANN, R; ARRUDA, D y GRIEL, LJ (1978). Use of spin labels to evaluate effects of cold shock and osmolality on sperm. *Biol Reprod.*, 18(4):686–96.

HAMMITT, D y MARTIN, P (1989). Fertility of frozen-thawed porcine semen following controlled-rate freezing in straws. *Theriogenology*, 32:369–384.

HANCOCK, J y HOWELL, G (1959). The collection of boar semen. *Vet. Rec.*, 71:664–665.

HARAYAMA, H; IMANO, A; MIYAKE, M y KATO, S (1998). Effects of seminal plasma components on motility and acrosomal integrity of meishan boar spermatozoa after cooling treatments. *Animal science and technology*, 69(8):720–727.

HARAYAMA, H; SHIBUKAWA, T; MIYAKE, M; KANNAN, Y y KATO, S (1996). Fructose stimulates shedding of cytoplasmic droplets from epididymal boar spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, 8:1039–1043.

HARKEMA, W; HARRISON, R; MILLER, N; TOPPER, E y WOELDERS, H (1998). Enhanced binding of zona pellucida proteins to the acrosomal region of intact boar spermatozoa in response to fertilizing conditions: a flow cytometric study. *Biol Reprod*, 58:421–430.

HARRISON, R; ASHWORTH, P y MILLER, N (1996). Bicarbonate/co<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev.*, 45(3):378–391.

HARRISON, R y GADELLA, B (2005). Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology*, 63:342–351.

HARRISON, R; JACQUES, M; MINGUEZ, M y MILLER, N (1992). Behaviour of ejaculated spermatozoa from bull, boar and ram during thin-layer countercurrent partition in aqueous two-phase systems. *J Cell Sci.*, 102(1):123–32.

HARRISON, R; MAIRET, B y MILLER, N (1993). Flow cytometric studies of bicarbonate-mediated ca<sup>2+</sup> influx in boar sperm populations. *Mol Reprod Dev.*, 35(2):197–208.



- HARRISON, R y VICKERS, E (1990). Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal Reprod. Fertil.*, 88:343–352.
- HENAULT, M y KILLIAN, G (1996). Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. *Reprod Fertil.*, 108:199–204.
- HERMO, L; DWORKIN, J y OKO, R (1988). Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. *Am J Anat.*, 183(2):107–24.
- HERNÁNDEZ, M; ROCA, J; CALVETE, J; SANZ, L; MUIÑO-BLANCO, T; CEBRIÁN-PÉREZ, J; VÁZQUEZ, J y EA, M (2007a). Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *J Androl.*, 28(5):689–97.
- HERNÁNDEZ, M; ROCA, J; GIL, M; VÁZQUEZ, J y MARTÍNEZ, E (2007b). Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology*, 67:1436–1445.
- HINKOVSKA, V; PETKOVA, D y KOUMANOV, K (1989). Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. *Cryobiology*, 26:70–75.
- HINKOVSKA-GALCHEVA, V; PETKOVA, D y KOUMANOV, K (1989). Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. *Cryobiology*, 26(1):70–5.
- HIRAI, M; BOERSMA, A; HOEFLICH, A; WOLF, E; FOLL, J; AUMULLER, T y BRAUN, J (2001). Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. *J Androl.*, 22:104–110.
- HO, H; GRANISH, K y SUÁREZ, S (2002). Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by  $ca^{2+}$  and not camp. *Dev Biol.*, 250(1):208–17.
- HO, H y SUÁREZ, S (2003). Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol Reprod.*, 68(5):1590–6.
- HOFMO, P y ALMLID, T (1991). Recent developments in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. *Reprod. Dom. Anim.*, 1:111–122.
- HOFMO, P y ANDERSEN, K (1989). Electron microscopical studies of membrane injuries in blue fox spermatozoa subjected to the process of freezing and thawing. *Cryobiology*, 26:124–131.
- HOFMO, P; KOMMISRUUD, E y SEHESTED, E (1998). A field trial comparing the fertility of fresh semen stored in bts for 2-3 days and mr-a for 4-5 days. En *Proc. 15th IPVS Congress 3*, 64.

- HOLT, C; HOLT, W y MOORE, H (1996). Choice of operating conditions to minimize sperm subpopulation sampling bias in the assessment of boar semen by computer-assisted semen analysis. *J Androl.*, 17:587–596.
- HOLT, C; HOLT, W; MOORE, H; REED, H y CURNOCK, R (1997). Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J Androl.*, 18(3):312–323.
- HOLT, W (1996). Can we predict fertility rates? making sense of sperm motility. *Reprod. Dom. Anim.*, 31:17–24.
- HOLT, W (1997). Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, 9:309–319.
- HOLT, W (2000a). Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, 62:23–22.
- HOLT, W (2000b). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53:47–58.
- HOLT, W; HEAD, M y NORTH, R (1992). Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *Biol Reprod*, 46:1086–1094.
- HOLT, W; MEDRANO, A; THURSTON, L y WATSON, P (2005). The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology*, 63:370–382.
- HOLT, W; MOORE, H y HILLIER, S (1985). Computer-assisted measurement of sperm swimming speed in human semen: correlation of results with in vitro fertilization assays. *Fertil Steril.*, 44:112–119.
- HOLT, W y NORTH, R (1984). Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *J. Exp. Zool.*, 230:473–483.
- HOLT, W y NORTH, R (1991). Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 91:451–461.
- HOLT, W y NORTH, R (1994). Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol. Reprod*, 51:414–424.
- HOLT, W y PALOMO, M (1996). Optimization of a continuous real-time computerized semen analysis system for ram sperm motility assessment, and evaluation of four methods of semen preparation. *Reprod Fertil Dev.*, 8:219–230.
- HOLT, W y PICKARD, A (1999). Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Reviews Reprod.*, 4:143–150.

- HOLT, W; WATSON, P; CURRY, M y HOLT, C (1994). Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems used in a practical workshop. *Fertil Steril.*, 62:1277–1282.
- HOLTZ, W y SMIDT, D (1976). The fertilizing capacity of epididymal spermatozoa in the pig. *J Reprod Fertil.*, 46(1):227–9.
- HONG, C; CHIANG, B; KU, J y WEI, Y (1984). Calcium chelators stimulate sperm motility in ejaculated human semen. *Lancet.*, 1(8374):460–1.
- HONG, C; CHIANG, B; KU, J; WEI, Y y FONG, J (1985a). Calcium antagonists stimulate sperm motility in ejaculated human semen. *Br J Clin Pharmacol.*, 19(1):45–9.
- HONG, C; CHIANG, B; WU, P; WEI, Y y FONG, J (1985b). Involvement of calcium in the caffeine stimulation of human sperm motility. *Br J Clin Pharmacol.*, 19(6):739–43.
- HOSKINS, D; HALL, M y MUNSTERMAN, D (1975). Induction of motility in immature bovine spermatozoa by cyclic amp phosphodiesterase inhibitors and seminal plasma. *Biol Reprod.*, 13(2):168–76.
- HUNTER, R (1988). *The Falopian Tubes.*, capítulo Their role in fertility and infertility., páginas 53–80. Springer-Verlag (Berlin).
- IGUER-OUADA, M y VERSTEGEN, J (2001). Evaluation of the "hamilton thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. *Theriogenology.*, 55:733–749.
- IRITANI, A (1980). Problems of freezing spermatozoa of different species. En *Proc. 9th Int. Cong. Anim. A.I.*, 1: 115-132.
- IRVINE, D; TWIGG, J; GORDON, E; FULTON, N; MILNE, P y AITKEN, R (2000). Dna integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl.*, 21(1):33–44.
- ISHIJIMA, S; OSHIO, S y MOHRI, H (1986). Flagellar movement of human spermatozoa. *Gamete Res.*, 13:185–197.
- IWAMOTO, T; TANAKA, H; OSADA, T; SHINAGAWA, T; OSAMURA, Y y GAGNON, C (1993). Origin of a sperm motility inhibitor from boar seminal plasma. *Mol Reprod Dev.*, 36(4):475–81.
- JANETT, F; THUN, R; NIEDERER, K; BURGER, D y HÄSSIG, M (2003). Seasonal changes in semen quality and freezability in the warmblood stallion. *Theriogenology.*, 60(3):453–61.
- JANICK, J y MCLEOD, J (1970). The measurements of human spermatozoa motility. *Fertility and Sterility*, 21:140–146.
- JANUSKAUSKAS, A; GIL, J; SÖDERQUIST, L y RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H (2000a). Relationship between sperm response to glycosaminoglycans in vitro and non return rates of swedish dairy ai bulls. *Reprod. Dom. Anim.*, 35:207–212.

- JANUSKAUSKAS, A; JOHANNISSON, A y RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H (2003). Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation to sperm viability, chromatin structure and field fertility. *Theriogenology*, 60:743–758.
- JANUSKAUSKAS, A; JOHANNISSON, A; SÖDERQUIST, L y RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H (2000b). Assessment of the fertilizing potential of frozen-thawed bovine spermatozoa by calcium ionophore a23187- induced acrosome reaction in vitro. *Theriogenology.*, 3:859–875.
- JECHT, E y RUSSO, J (1973). A system for the quantitative analysis of human sperm motility. *Andrologie.*, 5:215–221.
- JEYENDRAN, R; VAN DER VEN, H; PÉREZ-PELÁEZ, M; GRABO, B y ZANEVELD, L (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil*, 70:219–228.
- JIANG, Z; LI, Q; LI, W; HU, J; ZHAO, H y ZHANG, S (2007). Effect of low density lipoprotein on dna integrity of freezing-thawing boar sperm by neutral comet assay. *Anim Reprod Sci*, 99:401–407.
- JOHNSON, L (1985). *Deep freezing of boar semen.*, capítulo Fertility results using frozen boar spermatozoa: 1970 to 1985, páginas 199–222. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- JOHNSON, L; AALBERS, J y ARTS, J (1982.). Use of boar spermatozoa for artificial insemination ii. fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in gilts inseminated either at a fixed time or according to walsmeta readings. *J. Anim Sci.*, 54:126–131.
- JOHNSON, L; AALBERS, J y GROOTE, H (1988). Artificial insemination of swine: Fecundity of boar semen stored in beltsville thawing solution (bts), modified modena (mm), or mr-a and inseminated on one, three and four days after collection. *Zuchthyg*, 23:49–55.
- JOHNSON, L; AALBERS, J; WILLEMS, C y SYBESMA, W (1981). Use of boar spermatozoa for artificial insemination. i. fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms. *J. Anim Sci.*, 52:1130–1136.
- JOHNSON, L; WEIZE, K; FISER, P y MAXWELL, W (2000). Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62:143–172.
- JONES, R y MARTIN, I (1973). The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5 degrees c on the ultrastructure of ram spermatozoa. *J Reprod Fertil.*, 35(2):311–20.
- JOUANNET, P; VOLOCHINE, B; DEGUENT, P; SERRES, C y DAVID, G (1977). Light scattering determination of various characteristics parameters of spermatozoa motility in a series of human sperm. *Andrologia*, 9:36–49.
- KADIRVEL, G; KUMAR, S y KUMARESAN, A (2009). Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and dna integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Anim Reprod Sci.*, 114(1-3):125–34.

- KAMARUDDIN, M; KROETSCH, T; BASRUR, P; HANSEN, T y KING, W (2004). Immunolocalization of heat shock protein 70 in bovine spermatozoa. *Andrologia*, 36:327–334.
- KANETO, M; HARAYAMA, H; MIYAKE, M y KATO, S (2002). Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins. *Animal reproduction science*, 73:197–209.
- KAROW, A (1997). *Pharmacological interventions in vitro*. Academic Press, San Diego, USA.
- KATKOV, I y LULAT, A (2000). Do conventional casa-parameters reflect recovery of kinematics after freezing? casa paradox in the analysis of recovery of spermatozoa after cryopreservation. *Cryo Letters*, 21(3):141–148.
- KATO, S; SHIBUKAWA, T; HARAYAMA, H y KANNAN, Y (1996). Timing of shedding disintegration of cytoplasmic droplets from boar and goat spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*, 42 (4):237–241.
- KATZ, D y DAVIS, R (1987). Automatic analysis of human sperm motion. *J. Androl.*, 8:170–181.
- KATZ, D; DAVIS, R; DELANDMETER, B y OVERSTREET, J (1985). Real-time analysis of sperm motion using automatic video image digitization. *Comput Methods Programs Biomed.*, 21:173–182.
- KATZ, D; YANAGIMACHI, R y DRESNER, R (1978). Movement characteristics and power output of guinea-pig and hamster spermatozoa in relation to activation. *J. Reprod. Fertil.*, 52:167–172.
- KING, G y MACPHERSON, J (1967). Boar semen studies ii. laboratory and fertility results of a method of deep freezing. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, 31:46–47.
- KONDRACKI, S; WYSOKINSKA, A; BANASZEWSKA, D y WOZNIAK, E (2006). Evaluation of males spermogram in domestic pigs. *Reprod Biol.*, 6 Suppl 2:93–8.
- KOTZIAS-BANDEIRA, E; WABERSKI, D y WEITZE, K (1997). Cooling of boar spermatozoa prior to freezing and post thaw quality and evaluation of membrane state using chlortetracycline (ctc) staining. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.*, 104(8):302–306.
- KOVÁCS, A y FOOTE, R (1992). Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotech. Histochem.*, 67:119–130. URL 67.
- KOVÁCS, A; FOOTE, R; NAGY, S; BOERSMA, A; LEIDL, W y R., S (2000). Live/dead and acrosome staining of stallion spermatozoa. En *Proc. 14th Int. Cong. Anim. Reprod.*, 1: 82., tomo 1, página 82.
- KOZUMPLIK, J y SOSNOVÁ, J (1985). The thermoresistance test of spermatozoa and fertility in bulls. *Vet. Med. (Praha)*, 30 (7):385–92.
- KOZUMPLÍK, J y ROUBAL, M (1990). Relation of heat resistance tests and sperm survival to pregnancy and fertility in sows. *Vet Med (Praha)*, 35(12):725–732.

- KRAEMER, M; FILLION, C; MARTIN-PONT, B y AUGER, J (1998). Factors influencing human sperm kinematic measurements by the celltrak computer-assisted sperm analysis system. *Hum Reprod.*, 13:611–619.
- KRAUSE, W y VIETHEN, G (1999). Quality assessment of computer-assisted semen analysis (casa) in the andrology laboratory. *Andrologia.*, 31:125–129.
- KUMAR, S; MILLAR, J y WATSON, P (2003). The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology.*, 46(3):246–53.
- LANGLAIS, J y ROBERTS, K (1985). A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res.*, 12:183–224.
- LARSSON, J y MILLER, D (1999). Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol. Reprod. Dev.*, 52:445–449.
- LARSSON, K; DARENTIUS, K y JOHANSSON, K (1984). Sperm morphology and in vitro viability in diluted semen in relation to fertility of ai boars. *Nord. Vet. Med.*, 32:533–542.
- LARSSON, K y EINARSSON, S (1976). Influence of boars on the relationship between fertility and post thawing sperm quality of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet. Scand.*, 17:83–100.
- LARSSON, K; EINARSSON, S y SWENSSON, T (1977). The development of a practicable method for deep freezing of boar spermatozoa. *Nord. Vet. Med.*, 29:113–118.
- LASLEY, J y BOGART (1944). A comparative study of epididymal and ejaculated spermatozoa of the boar. *Journal Animal Science*, 3:360–370.
- LASSO, J; NOILES, E; ÁLVAREZ, J y STOREY, B (1994). Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *J Androl*, 15(3):255–265.
- LE LANNOU, D; GRIVEAU, J; LE PICHON, J y QUERO, J (1992). Effects of chamber depth on the motion pattern of human spermatozoa in semen or in capacitating medium. *Hum Reprod.*, 10:1417–1421.
- LEBOEUF, B; RESTALL, B y SALAMON, S (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci.*, 62(1-3):113–41.
- LEIDL, R, W ANS STOLLA; SCHEFELS, W y SCHAD, C (1999). *Morphology of sperm: Description- Classification-, Assessment-. Part.2. Boar.* Minitüb of America Inc.
- LEIDL, W (1983). Gestörte fruchtbarkeit beim eber. En *Leidl, W. and Stolla, R. and Schefels, W. and Schad, C.: Morphology of sperm: Description- Classification- Assessement. Part2. Boar. (1999).* Minitüb of America Inc.
- LEVIN, R; SHOFR, J y GREENBERG, S (1980). A quantitative method for determining the effects of drugs on spermatozal motility. *Fertility and Sterility*, 33:631–635.

- LEWIS, S; STERLING, E; YOUNG, I y THOMPSON, W (1997). Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril.*, 67(1):142–7.
- LI, Y y LIU, J (2002). Influence of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on motility of sperm. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 8(6):398–400.
- LI, Z; LIN, Q; LIU, R; XIE, W y XIAO, W (2007). Reducing oxidative dna damage by adding antioxidants in human semen samples undergoing cryopreservation procedure. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 87(45):3174–7.
- LINDEMANN, C; GOLTZ, J y KANOUS, K (1987). Regulation of activation state and flagellar wave form in epididymal rat sperm: evidence for the involvement of both  $ca^{2+}$  and camp. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 8(4):324–332.
- LINDEMANN, C; O'BRIEN, J y GIBLIN, F (1988). An investigation of the effectiveness of certain antioxidants in preserving the motility of reactivated bull sperm models. *Biol Reprod.*, 38(1):114–20.
- LIU, D; CLARKE, G y BAKER, H (1991). Relationship between sperm motility assessed with the hamilton-thorn motility analyzer and fertilization rates in vitro. *J Androl.*, 12:231–239.
- LOUGHLIN, K y AGARWAL, A (1992). Use of theophylline to enhance sperm function. *Arch Androl.*, 28(2):99–103.
- LOVELOCK, J y POLGE, C (1954). The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. *Biochem. J.*, 58:618–622.
- ÁLVAREZ, J; LASSO, J; BLASCO, L; NUÑEZ, R; HEYNER, S; CABALLERO, P y STOREY, B (1993). Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without extends their motile life. *Hum. Reprod.*, 8:1087–1092.
- ÁLVAREZ, J y STOREY, B (1992). Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a model of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl*, 13(3):232–241.
- MACK, S; TASH, J y WOLF, D (1989). Effect of measurement conditions on quantification of hyperactivated human sperm subpopulations by digital image analysis. *Biol Reprod.*, 40:1162–1169.
- MACK, S; WOLF, D y TASH, J (1988). Quantitation of specific parameters of motility in large numbers of human sperm by digital image processing. *Biol Reprod.*, 38:270–281.
- MACQUEEN, J (1967). Some methods for classification an analysis of multivariate observations. *En Proceedings of 5th Berkeley symposium on mathematical statisics and probability. Berkeley, EEUU. Pp: 281-297.*

- MAGISTRINI, M; SATTLER, M; YVONE, J y VIDAMENT, M (1997). Freezability of stallion spermatozoa evaluated by motility, membrane integrity and atp. *Cryobiology*, 35 (4):88.
- MAHONY, M; LANZENDORF, S; GORDON, K y HODGEN, G (1996). Effects of caffeine and dbcamp on zona pellucida penetration by epididymal spermatozoa of cynomolgus monkeys (macaca fascicularis). *Mol Reprod Dev.*, 43(4):530-5.
- MAHONY, M; RICE, K; GOLDBERG, E y DONCEL, G (2000). Baboon spermatozoa-zona pellucida binding assay. *Contraception*, 61:235-240.
- MAKLER, A; MACLUSKY, N; CHODOS, A; HASELTINE, F y DECHERNEY, A (1984). Rapid microcomputer-based analysis of semen characteristics from photographs taken by the mep method.rapid microcomputer. *Arch Androl.*, 12:91-95.
- MAKLER, A; TATCHER, M y MOHILEVER, J (1980). Sperm semi-autoanalysis by a combination of multiple exposure photography (mep) and computer techniques. *Int J Fertil.*, 25:62-66.
- MALDJIAN, A; PIZZI, F; GLIOZZI, T; CEROLINI, S; PENNY, P y NOBLE, R (2005). Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology*, 63 (2):411-421.
- MANN, T y LUTWAK-MANN, C (1981). *Male reproductive function and semen*. Springer-Verlag. New York.
- MAPA (2006). (ministerio de agricultura pesca y alimentación). Informe técnico, WWW.mapa.es/es/ganaderia/pags/hechoscifras/cifras.htm.
- MARÍN, S; CHIANG, K; BASSILIAN, S; LEE, W; BOROS, L; FERNÁNDEZ-NOVELL, J y COLS. (2003). Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Lett*, 554:342-346.
- MARTÍ, E; MARTÍ, J; MUIÑO-BLANCO, T y CEBRIÁN-PÉREZ, J (2008). Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. *J.Androl.*, 29(4):459-67.
- MARTÍN-RILLO, S (1982). *Reproducción e inseminación artificial porcina*.
- MARTÍN-RILLO, S (1984). How ai is progresing in spain. En *Pig Inter. May*. pp:24-28.
- MARTÍN-RILLO, S; DE ALBA-ROMERO, C; CORCUERA, B; GARCÍA-ARTIGA, C y LLEÓ-CASANOVA, B (1999). Efecto del semen congelado porcino sobre el desarrollo embrionario. En *II Congreso Ibérico de Reproducción Animal. Lugo, España. Libro de ponencias y comunicaciones*, páginas 396-376.
- MARTÍN-RILLO, S; E, M; GARCÍA ARTIGA, C y DE ALBA, C (1996). Boar semen evaluation in practise. *Reprod. Dom. Anim.*, 31:519-526.



- MARTÍNEZ, E; ROCA, J; VÁZQUEZ, J; LUCAS, X y GIL, M (2001). Inseminación intrauterina profunda en la especie porcina: una nueva tecnología. En *III Cong. Ibérico Reprod. Anim., Livro de Resumos: 41-49*.
- MARTÍNEZ, E; RUIZ, S; ROCA, J; VÁZQUEZ, J y COY, P (1992). Nuevas técnicas en contras-tación seminal. *Med Vet*, 9:71–83.
- MARTÍNEZ, E; RUIZ, S; SEBASTIAN, J; SÁNCHEZ, R; GARCÍA, C y MARTÍN, S (1986). Factores que afectan a la inseminación artificial porcina. *An. Vet (Murcia)*, 2:115–120.
- MARTÍNEZ-PASTOR, F; DÍAZ-CORUJO, A; ANEL, E; HERRÁEZ, P; ANEL, L y DE PAZ, P (2005a). Postmortem time and season alter subpopulation characteristics of iberian red deer epididymal sperm. *Theriogenology*, 64:985–974.
- MARTÍNEZ-PASTOR, F; GARCÍA-MACÍAS, V; ÁLVAREZ, M; CHAMORRO, C; HERRAEZ, P; DE PAZ, P y ANEL, L (2006). Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of iberian red deer. *Theriogenology.*, 65:471–485.
- MARTÍNEZ-PASTOR, F; GARCÍA-MACÍAS, V; ÁLVAREZ, M; HERRAEZ, P; ANEL, L y DE PAZ, P (2005b). Sperm subpopulations in iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. *Biol Reprod.*, 72:316–327.
- MATOUSEK, J y KYSILKA, C (1984). The phospholipid-binding protein of the reproductive tract of the bull effect on the removal of spermatozoal cytoplasm droplets in the other species and influence of antibodies on its reactivity,. *Anim. Reprod. Sci.*, 7:433–440.
- MATÁS, C; GADEA, J; RUIZ, S; ROMAR, R; COY, P y GARCÍA, E (2006). *Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino*, capítulo Técnicas para la evaluación de la capacitación espermática, páginas 153–164. Universidad de Gerona. Red temática nacional de reproducción porcina.
- MATÁS, M (1997). *Análisis mediante citometría de flujo de la respuesta de los espermatozoides de verraco a diferentes medios de incubación*. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia. Spain.
- MATTIOLI, M; BARBONI, B; LUCIDI, P y SEREN, E (1996). Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. *Theriogenology*, 45:373–381.
- MAXWELL, W; EVANS, G; MORTIMER, S; GILLAN, L; GELLATLY, E y MCPHIE, C (1999). Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reprod Fertil Dev.*, 11(2):123–6.
- MAXWELL, W y JOHNSON, L (1997a). Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.*, 46:408–418.
- MAXWELL, W y JOHNSON, L (1997b). Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, 48:209–219.

- MAXWELL, W y JOHNSON, L (1999). Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*, 52(8):1353–62.
- MAXWELL, W; LONG, C; JOHNSON, L; DOBRINSKY, J y WELCH, G (1998). The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev*, 10:347–357.
- MAXWELL, W; WELCH, G y JOHNSON, L (1996). Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev.*, 8(8):1165–78.
- MAZUR, P (1965). Causes of injury in frozen and thawed cells. *Fed. Proc.*, 24(suppl.15):S175–S182.
- MAZUR, P (1985). *Deep freezing of boar semen*, capítulo Basic concepts in freezing cells, páginas 91–111. Swedish university of agricultural sciences.
- MAZUR, P; LEIBO, S y SEIDEL, GJ (2008). Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. *Biol Reprod.*, 78(1):2–12.
- MCCLEAN, R; HOLT, W y JOHNSTON, S (2007). Ultrastructural observations of cryoinjury in kangaroo spermatozoa. *Cryobiology*, 54:271–280.
- MCKINNEY, K; LEWIS, S y THOMPSON, W (1996). The effects of pentoxifylline on the generation of reactive oxygen species and lipid peroxidation in human spermatozoa. *Andrologia*, 28(1):15–20.
- MEDRANO, A; ANDERSON, J; MILLAR, J; HOLT, W y PF, W (2002a). A custom-built controlled-rate freezer for small sample cryopreservation studies. *Cryo Letters.*, 23(6):397–404.
- MEDRANO, A y HOLT, W (1998). Variación individual en la susceptibilidad del semen porcino al congelado-descongelado. *Arch. Zootec.*, 47:319–327.
- MEDRANO, A; HOLT, W y WATSON, P (2009). Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation. *Andrologia*, 41(4):246–50.
- MEDRANO, A; WATSON, P y HOLT, W (2002b). Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Society for Reproduction and Fertility*, 123:315–322.
- MEISTER, A y TATE, S (1976). Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annu. Rev. Biochem.*, 45:559–604.
- MELENDREZ, C; MEITZEL, S y BERGER, T (1994). Comparison of the ability of progesterone and heat solubilized porcine zona pellucida to initiate the porcine sperm acrosome reaction in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, 39:433–438.

- MEMBRILLO ORTEGA, A; CÓRDOVA IZQUIERDO, A; HICKS GÓMEZ, J; OLIVARES-CORICHI, I; MARTÍNEZ TORRES, V y VALENCIA MÉNDEZ, J (2003). Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. una revisión. *Interciencia*, 28(12):699.
- METZ, K; BERGER, T y CLEGG, E (1990). Adsorption of seminal plasma proteins by boar spermatozoa. *Theriogenology*, 34(4):691–700.
- MEYERS, S; OVERSTREET, J; LIU, I y DROBNIS, E (1995). Capacitation in vitro of stallion spermatozoa: comparison of progesterone induced acrosome reactions in fertile and subfertile males. *J. Androl.*, 16:47–54.
- MILOVANOV, V (1934). *Iskustvennoe osemenerie. (Artificial Insemination in livestock)*. Selijhozviz, Moscow.
- MIRO, J; LOBO, V; QUINTERO-MORENO, A; MEDRANO, A; PEÑA, A y RIGAU, T (2005). Sperm motility patterns and metabolism in catalonian donkey semen. *Theriogenology.*, 63:1706–1716.
- MISHRA, O; DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M; CAHILLANE, G y WAGERLE, L (1989). Lipid peroxidation as the mechanism of modification of the affinity of the na<sup>+</sup>, k<sup>+</sup>-atpase active sites for atp, k<sup>+</sup>, na<sup>+</sup>, and strophanthidin in vitro. *Neurochemical research*, 14(9):845–51.
- MIXNER, J y SAROFF, J (1954). Interference by glicerol with differential staining of bull spermatozoa. *J. Dairy Sci*, 37:652.
- MÜLLER, K; POMORSKI, T; MÜLLER, P; ZACHOWSKI, A y A, H (1994). Protein-dependent translocation of aminophospholipids and asymmetric transbilayer distribution of phospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells. *Biochemistry*, 33(33):9968–74.
- MÜLLER, K; POMORSKI, T; MÜLLER, P; ZACHOWSKI, A y HERRMANN, A (1999). Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryo treatment. *J Cell Sci*, 112:11–20.
- MOCÉ, E y GRAHAM, J (2006). Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *J Anim Sci.*, 84(4):826–33.
- MOORE, H; HALL, G y HIBBITT, K (1976). Seminal plasma proteins and the reaction of spermatozoa from intact boars and from boars without seminal vesicles to cooling. *J Reprod Fertil.*, 47(1):39–45.
- MOORE, H y HIBBITT, K (1977). Fertility of boar spermatozoa after freezing in the absence of seminal vesicular proteins. *J Reprod Fertil.*, 50(2):349–52.
- MORTIMER, D; AITKEN, R; MORTIMER, S y PACEY, A (1995). Workshop report: clinical casa—the quest for consensus. *Reprod Fertil Dev.*, 7:951–959.
- MORTIMER, D y MORTIMER, S (1988). Influence of system parameter settings on human sperm motility analysis using cellsoft. *Hum Reprod.*, 3:621–625.

- MORTIMER, S (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movements in mammals. *Human Reproduction Update*, 3:403–439.
- MORTIMER, S (2000). Casa-practical aspects. *J Androl*, 21:515–524.
- MORTIMER, S y MORTIMER, D (1990). Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J Androl.*, 11:195–203.
- MORTIMER, S; SCHOËVAËRT, D; SWAN, M y MORTIMER, D (1997). Quantitative observations of flagellar motility of capacitating human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 12:1006–1012.
- MORTIMER, S y SWAM, M (1999a). The development of smoothing-independent kinematic measures of capacitating human sperm movement. *Hum Reprod.*, 14:986–996.
- MORTIMER, S y SWAM, M (1999b). Effect of image sampling frequency on established and smoothing-independent kinematic values of capacitating human spermatozoa. *Hum Reprod.*, 14:997–1004.
- MORTIMER, S; SWAM, M y MORTIMER, D (1998). Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Hum Reprod.*, 13:2139–2146.
- MORTIMER, S y SWAN, M (1995). Kinematics of capacitating human spermatozoa analysed at 60 hz. *Hum. Reprod.*, 10:873–879.
- MORTIMER, S; SWAN, M y MORTIMER, D (1996). Fractal analysis of capacitating human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 11:1049–1054.
- MORTON, B; HARRIGAN-LUM, J; ALBAGLI, L y JOOSS, T (1974). The activation of motility in quiescent hamster sperm from the epididymis by calcium and cyclic nucleotides. *Biochem Biophys Res Commun*, 56(2):372–379.
- MOUSTAFA, M; SHARMA, R; THORNTON, J; MASCHA, E; ABDEL-HAFEZ, M y JR, AA (2004). Relationship between ros production, apoptosis and dna denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod.*, 19(1):129–38.
- MUIÑO-BLANCO, T; PÉREZ-PÉ, R y CEBRIÁN-PÉREZ, J (2008). Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod Domest Anim.*, 43(4):18–31.
- MURGAS, L; SELLÉS, E; GADEA, J y RUIZ, S (2001). Crioconservación espermática en la especie porcina: estudio de dos sistemas de congelación con semen heterospermico. En *X Congresso Brasileiro da Associacao Brasileira de Veterinarios Especialistas em Suínos (ABRAVES)*.
- NAGAI, T; TAKENAKA, A; MORI, T y HIRAYAMA, M (1994). Effects of caffeine and casein phosphopeptides on fertilization in vitro of pig oocytes matured in culture. *Mol Reprod Dev.*, 37(4):452–6.
- NASCIMENTO, J; NASCIMENTO; EF y MELO, M (2001). Modification of the short osmotic resistance test for evaluating the funtional integrity of boar spermatozoa. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 53, nº3:393–395.

- NATH, M; DEKA, B y BORGOHAIN, B (1994). Effect of holding time on quality of frozen boar semen. *Indian Vet. J.*, 71:250–252.
- NEILD, D; FLORES, M y AGÜERO, A (1999). Espermatozoides equinos: inducción de la capacitación por efecto de la criopreservación. *Rev. Bras Reprod. Anim.*, 23:293–295.
- NEUWINGER, J; KNUTH, U y NIESCHLAG, E (1990). Evaluation of the hamilton-thorn 2030 motility analyser for routine semen analysis in an infertility clinic. *Int J Androl.*, 13:100–109.
- NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I; MORÁN, J y PEÑA, F (2006). A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. *Reprod Domest Anim.*, 41:408–415.
- NIKOLOPOULOU, M; SOUCEK, D y VARY, J (1985). Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Biochim Biophys Acta.*, 815(3):486–98.
- NISHIZANO, H; SHIODA, M; TAKEO, T; IRIE, T y NAGAKA, N (2004). Decrease of fertilizing ability of mouse spermatozoa after freezing and thawing is related to cellular injury. *Biol. Reprod.*, 71:973–978.
- O'CONNELL, M; MCCLURE, N y LEWIS, S (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction.*, 17(3):704–709.
- OKADA, H; TATSUMI, N; KANZAKI, M; FUJISAWA, M; ARAKAWA, S y KAMIDONO, S (1997). Formation of reactive oxygen species by spermatozoa from asthenospermic patients: response to treatment with pentoxifylline. *J Urol.*, 157(6):2140–6.
- OKAMURA, N; TAJIMA, Y; SOEJIMA, A; MASUDA, H y SUGITA, Y (1985). Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem*, 260:9699–9705.
- OKAZAKI, T; ABE, S; YOSHIDA, S y SHIMADA, M (2009). Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. *Theriogenology*, 71(3):491–8.
- OLIVA, R (2006). Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update*, 12(4):417–35.
- OMBELET, W; MENKVELD, R; KRUGER, T y STEENO, O (1995). Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. *Human Reproduction Update*, 1:543–557.
- ORFAO, A y GÓNZALEZ DE BUITRAGO, J (1995). La citometría en laboratorio clínico. *Comité de Publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular*.
- ORTEGA-FERRUSOLA, C; MACÍAS GARCÍA, B; SUÁREZ RAMA, V; GALLARDO-BOLAÑOS, J; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L; TAPIA, J; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H y PEÑA, F (2009). Identification of sperm subpopulations in stallion ejaculates: changes after cryopreservation and comparison with traditional statistics. *Reprod Domest Anim.*, 44(3):419–23.

- ORTMAN, K y RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H (1994). Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa package in plastic bags. *J. Vet. Med. A*, 41:37–47.
- OVERSTREET, J; KATZ, D; HANSON, F y FONSECA, J (1979). A simple, inexpensive method for objective assessment of human sperm movement characteristics. *Fertility and Sterility*, 31:162–172.
- PACE, M (1980). Fundamentals of assay of spermatozoa. En *Proc. 9th Int. Cong. Anim. Reprod. A. I.*, tomo 1, páginas 133–146.
- PAQUIGNON, M y COUROT, M (1976). Fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa. En *Proc. 8th Int. Cong. Anim. Reprod. A.I.*, 4:1041-1044.
- PAQUIGNON, P (1985). *Deep freezing of boar semen.*, capítulo Freezing and thawing extenders for boar spermatozoa., páginas 199–222. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- PARK, C y PURSEL, V (1985). *Deep freezing of boar semen.*, capítulo Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar sperm frozen in maxi-straws., página 267. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- PARKS, J (1997). *Reproductive tissue banking:scientific principles*, capítulo Hypothermian and mammalian gametes, páginas 229–261. Academic Press, San Diego, USA.
- PARKS, J; ARION, J y FOOTE, R (1987). Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biol Reprod*, 37 (5):1249–1258.
- PARKS, J y GRAHAM, J (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38:209–222.
- PARKS, J y LINCH, D (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29:255–266.
- PAULENZ, H; GREVLE, I; ANDERSEN-BERG, K y THOMASSEN, R (1995). The use of a dichromatic stain method (spermac®) for determining changes in the acrosomal integrity of boar semen during cryopreservation. *Reprod. Dom. Anim.*, 30:113–116.
- PAULENZ, H y HOFMO, P (1996). Routine assesment of sperm concentration at a boar a.i. station using a coulter counter. *Reprod Dom Anim*, 31 (1):257–258.
- PAWSON, T (2004). Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-sh2 domain interactions to cellular complex systems. *Cell.*, 116(2):191–203.
- PEÑA, F; JOHANNISSON, A; WALLGREN, M y RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H (2003a). Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an annexin-v assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theriogenology*, 60 (4):677–689.

- PEÑA, F; JOHANNISSON, A; WALLGREN, M y RODRIGUEZ-MARTINEZ, H (2004). Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. *Zygote*, 12(2):117–24.
- PEÑA, F; JOHANNISSON, A; WALLGREN, M y RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H (2003b). Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim. Reprod. Sci.*, 78:85–98.
- PEÑA, F; SARAVIA, F; JOHANNISSON, A; WALLGREN, M y RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H (2007). Detection of early changes in sperm membrane integrity pre-freezing can estimate post-thaw quality of boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci.*, 97(1-2):74–83.
- PEÑA, F; SARAVIA, F; NUÑEZ-MARTÍNEZ, I; JOHANNISSON, A; WALLGREEN, M y MARTÍNEZ, H (2006). Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation? *Anim. Reprod. Sci.*, 93:101–113.
- PEÑA, J y RODRÍGUEZ, H (2006). *Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino*, capítulo Citometría de flujo: aplicaciones en el estudio del espermatozoide, páginas 133–144. Universidad de Girona. Red temática nacional de reproducción porcina.
- PEDIGO, N; VERNON, M y CURRY, TJ (1989). Characterization of a computerized semen analysis system. *Fertil Steril.*, 52:659–666.
- PELÁEZ, J (2003). *Criopreservación de semen porcino: aportaciones al estudio de la calidad seminal y la capacidad fecundante*. Tesis Doctoral, Universidad de León.
- PELÁEZ, J; DOMÍNGUEZ, J; PEÑA, F y ALEGRE, B (1999). Les méthodes d'examen de la semence dans l'especie porcine. *Revue Méd Vét*, 150 (3):241–254.
- PELÁEZ, J; DOMÍNGUEZ, J; PEÑA, F; ROBLES, P; FERRERAS, A y ALEGRE, B (2002). Conceptos básicos en criobiología del espermatozoide. *Porci.*, 72:23–36.
- PERIS, S; MORRIER, A; DUFOUR, M y BAILEY, J (2004). Cryopreservation of ram semen facilitates sperm dna damage: Relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *Journal of Andrology*, 25(2).
- PETERSON, R; SEYLER, D; BUNDMAN, D y FREUND, M (1979). The effect of teophylline and dibutyryl cyclic amp on the uptake of radioactive calcium and phosphate ions by boar and human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 55:385–390.
- PETRUNKINA, A; GRÖPPER, B; GÜNZEL-APEL, A y TÖPFER-PETERSEN, E (2004). Functional significance of the cell volume for detecting sperm membrane changes and predicting freezability in dog semen. *Reproduction*, 128(6):829–42.
- PETZOLDT, R; SIEME, H y KOHNE, C (1996). Relationship between stallion sperm swelling in hypoosmotic medium (host) and liquid and deep freeze preservation. En *2nd International Symposium on production, evaluation and preservation of stallion semen*.

- PICKETT, B; SULLIVAN, J; BYERS, W; PACE, M y REMMENGA, E (1975). Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. *Fertil Steril.*, 26(2):167–74.
- PINART, E; BUSSALLEU, E; YESTE, M; BRIZ, M; SANCHO, S; GARCÍA-GIL, N; BASSOLS, J; PRUNEDA, A; CASAS, I y BONET, S (2006). *Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino*, capítulo Protocolo de triple marcaje con fluorocromos para el análisis funcional de los espermatozoides de porcino, páginas 81–92. Universidad de Gerona. Red tematica nacional de reproducción porcina.
- PINTADO, B; DE LA FUENTE, J y ROLDAN, E (2000). Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *J. Reprod. Fertil.*, 118:145–152.
- POLGE, C (1951). Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at  $-79^{\circ}\text{C}$ . *Nature*, 167:949–950.
- POLGE, C (1956). Artificial insemination in pigs. *Vet. Rec.*, 68:62.
- POLGE, C; SALOMON, S y WILMUT, I (1970). Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet. Rec.*, 87:424–428.
- PÉREZ, L; VALCÁRCEL, A; DE LAS HERAS, M; MOSES, D y BALDASSARRE, H (1996). Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology*, 46:131–140.
- PÉREZ-LLANO, B; GARCÍA-CASADO, P; LORENZO, J y SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, R (1998a). The response of boar sperm to the host test and relationship between host and ort results. En *Proceedings of the 15th IPVS Congress, Birmingham, England*.
- PÉREZ-LLANO, B; GONZÁLEZ, J; CLEMENTE, M y GARCÍA-CASADO, P (1999). El test de endósmosis (host) en semen de ganado porcino. *Albéitar*, 30:16–17.
- PÉREZ-LLANO, B; GONZÁLEZ, J y GARCÍA-CASADO, P (1998b). Nueva técnica de ort corta para su evaluación. *Albéitar*, 21:6–7.
- PÉREZ-LLANO, B; LORENZO, J; YENES, P; TREJO, A y GARCÍA-CASADO, P (2001). A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology*, 56:387–398.
- PÉREZ-LLANO, B; SÁNCHEZ, R; LORENZO, J y GARCÍA-CASADO, P (1998c). A short version of the osmotic resistance test for boar semen. En *15th IPVS Congress, Birmingham, England, Abstr 61*.
- PÉREZ-PE, R; CEBRIÁN-PÉREZ, J y MUÑO-BLANCO, T (2001). Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*, 56(3):425–34.



- PÉREZ-PE, R; GRASA, P; FERNÁNDEZ-JUAN, M; PELEATO, M; CEBRIÁN-PÉREZ, J y MUÑO-BLANCO, T (2002). Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, 61:226–233.
- PURDY, P y GRAHAM, J (2004a). Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biol Reprod.*, 71(2):522–7.
- PURDY, P y GRAHAM, J (2004b). Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, 48(1):36–45.
- PURSEL, V (1979). Effect of cold shock of boar sperm treated with butylated hydroxytoluene. *Biol. Reprod.*, 21:319–324.
- PURSEL, V; JHONSON, L y RAMPACEK, G (1972a). Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *Journal of Animal Science*, 34:278–283.
- PURSEL, V y JOHNSON, L (1971). Procedure for the preservation of boar spermatozoa by freezing. *USDA ARS, bull*, 44-227:1–5.
- PURSEL, V y JOHNSON, L (1974). Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology*, 1:63–67.
- PURSEL, V y JOHNSON, L (1975a). Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci.*, 40(1):99–102.
- PURSEL, V y JOHNSON, L (1975b). Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.*, 40:99–102.
- PURSEL, V y JOHNSON, L (1976). Frozen boar spermatozoa: methods of thawing pellets. *J Anim Sci.*, 42(4):927–31.
- PURSEL, V; JOHNSON, L y SCHULMAN, L (1972b). Interaction of extender composition and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J Anim Sci.*, 35(3):580–4.
- PURSEL, V; JOHNSON, L y SCHULMAN, L (1973). Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J Anim Sci.*, 37(2):528–31.
- PURSEL, V y PARK, C (1985). Freezing and procedures for boar spermatozoa. En LJ and K Larsson (Eds), ed., *First Int. Conf. on Deep Freezing of Boar Semen. Uppsala, Sweden. pp 147-166.*, páginas 147–166.
- PURSEL, V; SCHULMAN, L y JOHNSON, L (1978). Effect of orvus es paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar spermatozoa. *J. Anim. Sci.*, 47:198–202.
- QUILL, T; SUGDEN, S; ROSSI, K; DOOLITTLE, L; HAMMER, R y GARBERS, D (2003). Hyperactivated sperm motility driven by catsper2 is required for fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(25):14869–74.

- QUINN, P; CHOW, P y WHITE, I (1980). Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J Reprod Fertil.*, 60(2):403–7.
- QUINN, P y WHITE, I (1966). The effect of cold shock and deep-freezing on the concentration of major cations in spermatozoa. *J Reprod Fertil.*, 12(2):263–70.
- QUINN, P; WHITE, I y CLELAND, K (1969). Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *J Reprod Fertil.*, 18(2):209–20.
- QUINTERO-MORENO, A (2003). *Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo*. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona.
- QUINTERO-MORENO, A; MIRÓ, J; RIGAU, T y RODRÍGUEZ-GIL, J (2003). Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, 59:1973–1990.
- QUINTERO-MORENO, A; RIGAU, T y RODRÍGUEZ-GIL, J (2004). Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology.*, 61:673–690.
- QUINTERO-MORENO, A; RIGAU, T y RODRÍGUEZ-GIL, J (2007). Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulations in rabbit semen and to predict semen fertility and litter size. *Reprod Domest Anim.*, 42(3):312–9.
- RALL, T (1980). *The xanthines.*, capítulo The pharmacological basis of therapeutics., páginas 592–607. Mcmillan. New York.
- RAMESHA, K; KRISHNAMURTHY, L; REDDY, A; RAO, M y BALAKRISHNAN, C (2000). Simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa by dual staining technique. *Indian J. Anim. Reprod.*, 21:46–48.
- RAMIO-LLUCH, L; RIVERA, M; RIGAU, T; BALASCH, S y RODRÍGUEZ-GIL, J (2006). Oc5 filtration through sephadex columns does not alter subpopulation characteristics in fresh boar semen. *Reprod. Dom. Anim.*, 41:104.
- RATH, D y NIEMANN, H (1997). In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology*, 47(4):785–93.
- REED, H (1985). *Deep freezing of boar semen*, capítulo Current use of frozen boar semen - Future need of frozen boar semen, páginas 225–237. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- REES, J; FORD, W y HULL, M (1990). Effect of caffeine and of pentoxifylline on the motility and metabolism of human spermatozoa. *J Reprod Fertil.*, 90(1):147–156.
- RENARD, P; DUMONT, E; GRIVEAU, J; CALLEGARI, J y LE LANNOU, D (1995). An overall lipoperoxidation is not involved in the loss of boar sperm motility during storage under

- anaerobic conditions. in: third conference on boar semen preservation. *Marienense*, páginas 255–270.
- RIGAU, T; FARRÉ, M; BALLESTER, J; MOGAS, T; PEÑA, A y RODRIGUEZ-GIL, J (2001). Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*, 56:801–815.
- RIJSSELAERE, T; VAN SOOM, A; MAES, D y DE KRUIF, A (2003). Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the hamilton-thorne analyzer. *Theriogenology*, 60:1553–1568.
- RITAR, A y 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):305–12.
- RIVERA, M; QUINTERO-MORENO, A; BARRERA, X; PALOMO, M; RIGAU, T y RODRÍGUEZ-GIL, J (2005). Natural mediterranean photoperiod does not affect the main parameters of boar-semen quality analysis. *Theriogenology*, 64:934–946.
- RIVERA, M; QUINTERO-MORENO, A; BARRERA, X; RIGAU, T y RODRÍGUEZ-GIL, J (2006). Effects of constant, 9 and 16-h light cycles on sperm quality, semen storage ability and motile sperm subpopulations structure of boar semen. *Reprod Domest Anim.*, 41:386–393.
- ROBAIRE, B y HERMO, L (1988). *Physiology of reproduction*, capítulo Efferent duct, epididymis and vas deferens: structure, functions and their regulation, páginas 999–1080. Raven Press Ltd., NY.
- ROBERTS, K; WAMSTAD, J; ENSRUD, K y HAMILTON, D (2003). Inhibition of capacitation associated tyrosine phosphorylation signaling in rat sperm by epididymal protein crisp-1. *Biol. Reprod.*, 69:572–581.
- ROBERTSON, L y WATSON, P (1986). Calcium transport in diluted or cooled ram semen. *J Reprod Fertil.*, 77(1):177–85.
- ROBERTSON, L; WATSON, P y PLUMMER, J (1988). Prior incubation reduces calcium uptake and membrane disruption in boar spermatozoa subjected to cold shock. *Cryo-Letters*, 9(4):286–293.
- ROCA, J; GIL, M; HERNÁNDEZ, M; PARRILLA, I; VÁZQUEZ, J y MARTÍNEZ, E (2004). Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *J. Androl*, 25:397:405.
- ROCA, J; HERNÁNDEZ, M; CARVAJAL, G; VÁZQUEZ, J y MARTÍNEZ, E (2006a). Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J. Anim. Sci.*, 84:2692–2699.
- ROCA, J; LUCAS, X; GIL, M; VÁZQUEZ, J; CARVAJAL, G y MARTÍNEZ, E (2000a). Motility and in vitro penetrating ability of cooled and frozen-thawed spermatozoa from identical boars. En L Johnson y H Guthrie, eds., *Boar semen preservation IV*, capítulo Motility and in vitro

- penetrating ability of cooled and frozen-thawed spermatozoa from identical boars., página 260. Johnson, LA and Guthrie, HD eds. Allen Press, Lawrence, KS.
- ROCA, J; MARTÍNEZ, E; VÁZQUEZ, J y VÁZQUEZ, J (2000b). Cryopreservation of pig spermatozoa: new trends for its commercial application. En *4th Annual Conf. European Soc. Dom. Anim. Reprod.; ESDAR newsletter* 5:7.
- ROCA, J; RODRÍGUEZ, M; GIL, M; CARVAJAL, G; GARCÍA, E; CUELLO, C; VÁZQUEZ, J y MARTÍNEZ, E (2005). Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J. Androl*, 26(1):15–24.
- ROCA, J; RODRÍGUEZ, M; MARTÍNEZ, E; GIL, M; LUCAS, X y VÁZQUEZ, J (1999). Criopreservación espermática en porcino: variabilidad individual. En *II Cong. Ibérico Reprod. Anim., Libro de ponencias y comunicaciones: 400-402*.
- ROCA, J; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H; VÁZQUEZ, J; BOLARIN, A; HERNÁNDEZ, M; SARAIVIA, F; WALLGREN, M y MARTÍNEZ, E (2006b). Strategies to improve the fertility of frozen-thawed boar semen for artificial insemination. En *Control in Pig Reproduction VII. Pags. 261-275*. C.J. Ashworth and R.R. Kraeling, ed. Nottingham Univ. Press, Nottingham, UK.
- RODRÍGUEZ, J; RIGAU, T; MIRÓ, J; MOGAS, T; PALOMO, M; RIVERA DEL ÁLAMO, M y RAMIÓ, L (2006). *Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino*, capítulo Pruebas de funcionalidad espermática., páginas 69–80. Universidad de Girona. Red temática nacional de reproducción porcina.
- RODRÍGUEZ-GIL, J; MONTSERRAT, A y RIGAU, T (1994). Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology*, 42:815–829.
- RODRÍGUEZ-GIL, J y RIGAU, T (1995). Effects of slight agitation on the quality of refrigerated boar sperm. *Animal Reproduction Science*, 39:141–146.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H (2001). Sperm function in cattle and pigs: morphological and functional aspects. *Arch Animal Breed*, 44:102–113.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H (2003). Laboratorio semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Dom Anim*, 38:312–318.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H (2005). Predicción in vitro de la fertilidad de los verracos. *Porci*, 85:7–19.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H (2006). Can we increase the estimative value of semen assessment? *Reprod Dom Anim*, 41 (suppl.2):2–10.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H; SARAIVIA, F; WALLGREN, M; ROCA, J y PEÑA, F (2008). Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 70(8):1242–1250.

- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H; WALLGREN, M; SELLES, E y TIENHAI, P (2000). Aspectos de función espermática en cerdos. En *OPORTO*.
- ROTA, A; PEÑA, A; LINDE-FORSBERG, C y RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H (1999). In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim. Reprod. Sci.*, 57:199–215.
- ROWLEY, D; ALTHOUSE, G; SHIPLEY, C y TAMASSIA, M (1997). The hypoosmotic swelling test in relation to routine spermogram parameters and longevity of chilled extended stallion semen. En *Proceeding for annual meeting, Society for Theriogenology. Montreal*.
- ROYÈRE, D; HAMAMAH, S; NICOLLE, J y LANSAC, J (1991). *Comparative spermatology twenty years after*, capítulo Cryopreservation and chromatin alterations during freezing-thawing human sperm, páginas 893–987. Serono symposia publications from Raven Press, Vol 75, New York, USA; pp 893-897.
- RUDOLPH, A y CROWE, J (1985). Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology*, 22(4):367–77.
- RUIZ, S; SELLES, E; GADEA, J; MARCO, M y MURGAS, L (2002). Effect of freezing rate on boar semen frozen: preliminary results of ai. *Theriogenology.*, 57:480.
- RUSSELL, L; MONTAG, B; HUNT, W y PETERSON, R (1985). Properties of boar sperm plasma-membranes (pm) proteins released by washing and differential solubility in salts, detergents and sensitivity to surface radiolabeling. *Gamete Res.*, 11:237–252.
- SAACKE, R (1970). Morphology of the sperm and its relationship to fertility. En *Proc. 3rd Tech. Conf. Artificial Insemination Reprod.*
- SAACKE, SNR, R. AND NADIR (1994). Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. *Theriogenology*, 41:45–50.
- SAIZ, F; DE ALBA, C; MARIGORTA, P; CORCUERA, B y MARTÍN, S (1994). Estudio de la calidad del semen a través de la evaluación de parámetros bioquímicos. En *Técnicas de contrastación seminal. Porci. nº24. 57-76*.
- SAKATA, Y; SHIMIZU, Y; MINAGUCHI, R y ASO, T (2003). Cav 2.3 (a1e) ca<sup>2+</sup> channel participates in the control of sperm function. *Fertil Steril*, 80:236.
- SAKKAS, D; MANICARDI, G; BIANCHI, P; BIZZARO, D y BIANCHI, U (1995). Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing an fertilizig mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 52:1149–1155.
- SALA-ECHAVE, R; REGUERA, G; GARCÍA-CASADO, P y PÉREZ-LLANO, B (2008). Influencia del calentamiento de las dosis seminales porcinas sobre la calidad espermática durante la i.a. *Avances en tecnología porcina*, páginas 34–42.

- SALAMON, S (1973). Deep freezing of boar semen. 3. effects of centrifugation, diluent and dilution rate, pellet volume, and method of thawing on survival of spermatozoa. *Aust J Biol Sci.*, 26(1):239–47.
- SALAMON, S y MAXWELL, W (2000). Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci.*, 62(1-3):77–111.
- SALAMON, S; WILMUT, I y POLGE, C (1973). Deep freezing of boar semen. i. effects of diluent composition, protective agents, and method of thawing on survival of spermatozoa. *Aust J Biol Sci.*, 26(1):219–30.
- SALING, P y STOREY, B (1979). Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J Cell Biol*, 83:544–555.
- SALISBURY, G y VANDERMARK, N (1961). *Physiology of reproduction and artificial insemination in cattle*. Freeman and Co.
- SANCHO, S; PINART, E; BRIZ, M; GARCÍA-GIL, N; BADÍA, E; BASSOLS, J; KÁDÁR, E; PRUNEDA, A; BUSSALLEU, E y YESTE, M (2004). Semen quality of postpubertal boars during increasing and decreasing natural photoperiods. *Theriogenology*, 62, Issue 7:1271 – 1282.
- SANOCKA, D y KURPISZ, M (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol*, 23:2–12.
- SANSEGUNDO, M (2008). *Estudio de la capacitación in vitro de espermatozoides epididimarios y eyaculados en la especie porcina*. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.
- SARAVIA, F; HERNÁNDEZ, M; WALLGREN, M; JOHANNISSON, A y RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H (2007). Controlled cooling during semen cryopreservation does not induce capacitation of spermatozoa from two portions of the boar ejaculate. *Int J Androl*, 30(6):485–499.
- SARAVIA, F; WALLGREN, M; NAGY, S y JOHANNISSON, AYRMH (2005). Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology*, 63:1320–1333.
- SARAVIA, J (2004). *Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination*. Tesis Doctoral, Swedish University of Agricultural Science (SLU). Uppsala.
- SARIÖZKAN, S; BUCAK, M; TUNCER, P; ULUTA?, P y BILGEN, A (2009). The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology*, 58(2):134–8.
- SCHEMBRE, M; MAYOR, D; SUTTIE, J; MAXWELL, W y EVANS, G (2002). Capacitation-like changes in equine spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, 14(3-4):225–233.
- SCHILLING, E y VENGUST, M (1985). Determination of osmotic resistance of boar spermatozoa and its relationship with the storage ability of semen samples. *Zuchthygiene*, 20:61–78.

- SCHILLING, E; VENGUST, M; BAJT, G y TOMCIC, M (1986). The osmotic resistance (ort) of boar spermatozoa and the relation to pregnancy rate and litter size. En *Proc 9th IPVS Congress, Barcelona, pp 77*.
- SCHILLING, E; VENGUST, M y SMIDT, D (1984). Ort: A new test to predict the freezability and storge of boar spermatozoa. En *Proc 8th IPVS Congress, Belgica pp346*.
- SCHMEHL, M; ANDERSON, S; VÁZQUEZ, I y GRAHAM, E (1986). The effect of dialysis of extended ram semen prior to freezing on post-thaw survival and fertility. *Cryobiology*, 23(5):406–14.
- SCHMIDT, H y KAMP, G (2004). Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction*, 128:171–179.
- SCHOBER, D; AURICH, C; NOHL, H y GILLE, L (2007). Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 68(5):745–54.
- SCHULZE, K (1963). Vergleichende untersuchungen über morphologie der hoden-, nebenhoden-, samenleiter und ejakulatspermien vom eber. En *Vet. Med. Diss. Hannover*.
- SCHWARZ, M y KOEHLER, J (1979). Alteration in lectin binding to guinea pig spermatozoa accompanying in vitro capacitation and the acrosomal reaction. *Biol. Reprod.*, 21:1295–1307.
- SÖDERQUIST, L; MADRID-BURY, N y RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H (1997). Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology*, 48:1115–1125.
- SELI, E; GARDNER, D; SCHOOLCRAFT, W; MOFFATT, O y SAKKAS, D (2004). Extent of nuclear dna damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst developmet after in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 82:378–383.
- SELLES, E; GADEA, J; ROMAR, R; MATÁS, C y RUIZ, S (2003). Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Reprod. Domest. Anim.*, 38:66–72.
- SELLES, E; WALLGREN, M; GADEA, J; RUIZ, S y RODRIGUEZ-MARTINEZ, H (2001). Sperm viability and capacitation-like changes in fractions of boar semen after storage and freezing. En *6th International Conference on Pig Reproduction. P:51. Columbia (Missouri-EEUU)*.
- SENGER, P (2005). *Pathways to pregnancy and parturation, second edition*. Current Conceptions, inc.
- SERRES, C; FENEUX, D y BERTHON, B (1991). Decrease of internal free calcium and human sperm movement. *Cell Motility Cytoskeleton*, 18:228–240.
- SERRES, C; JOUANNET, P y DAVID, G (1984). Influence of the flagelar wave development and propagation on the human sperm movement in seminal plasma. *Gamete Research*, 9:183–185.

- SETCHEL, B y BROOKS, D (1988). *The Physiology of Reproduction*, capítulo Anatomy, Vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract., páginas 753–836. Raven press, Ltd. New York.
- SHAMSI, M; KUMAR, R y DADA, R (2008). Evaluation of nuclear dna damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res.*, 127(2):115–23.
- SHANNON, S y CURSON, B (1983). Effect of egg yolk, amaranth, dna and seminal plasma on resistance of washed and unwashed bovine sperm to cold shock. *NZ J. Agric. Res.*, 26:455–460.
- SILVA, P y GADELLA, B (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65:958–978.
- SIMMET, C (1993). *Kaltepysikalische Aspekte der Gefrierkonservierung von Ebersperma in ihrer Auswirkung auf Samenqualität und Befruchtungsrate*. Tesis Doctoral, Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- SIMPSON, A; SWAN, M y WHITE, I (1987). Susceptibility of epididymal boar sperm to cold shock and protective action of phosphatidylcholine. *Gamete Res.*, 17(4):355–73.
- SIMPSON, A y WHITE, I (1986). Effect of cold shock and cooling rate on calcium uptake of ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci.*, 12:131–143.
- SMIKLE, C y TUREK, P (1997). Hypo-osmotic swelling can accurately assess the viability of nonmotile sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, 47:200–203.
- SÁNCHEZ, R (1991). Control de calidad espermática. *Anaporc.*, 104:27–33.
- SOKOŁOSKI, J; BLASCO, L; STOREY, B y WOLF, D (1977). Turbidometric analysis of human sperm motility. *Fertility and Sterility*, 28:1337–1341.
- SOLER, C; NUÑEZ, J; NUÑEZ, M; SANCHO, M y GUTIÉRREZ, R (2006). *Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino*, capítulo Técnicas de análisis computerizado de semen, páginas 51–68. Universitat de Girona y Red Temática Nacional de Reproducción Porcina.
- SPUNGIN, B; MARGALIT, I y BREITBART, H (1995). Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase c and actin filaments in membrane fusion. *J Cell Sci.*, 108(6):2525–35.
- STAUSS, C; VOTTA, T y SUÁREZ, S (1995). Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol Reprod.*, 53(6):1280–5.
- STEINHOLT, H; CHANDLER, J y TIRADO, V (1991). Evaluating acrosome reaction steps with brightfield and differential interference contrast microscopy techniques. *J Dairy Sci*, 74:3822–3826.
- STEWART, D (1951). Storage of bull spermatozoa at low temperatures. *Vet. Rec.*, 63:65–66.



- STORNELLI, M; TITTARELLI, C; SAVIGNONE, C y STORNELLI, M (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria*, 25 (2):28–35.
- STRZEZEK, J; GLOGOWSKI, J; MAGIERKA, E; LUBERA, Z y JABBONOSVSKA, C (1984). Some aspects of cryobiochemistry of boar semen. En *Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. AI. Urbana, IL*.
- SUÁREZ, S (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update*, 14(6):647–57.
- SUÁREZ, S y HO, H (2003). Hyperactivated motility in sperm. *Reprod Domest Anim.*, 38(2):119–24.
- SUÁREZ, S; KATZ, D y OVERSTREET, J (1983). Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization. *Biol Reprod.*, 29:1277–1287.
- SZASZ, F; SIRIVAIDYAPONG, S; CHENG, F; VOORHOUT, W; MARKS, A; COLENBRANDER, B y COLS (2000). Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as simple method to predict the cryopreservability of dog semen. *Mol. Reprod. Dev.*, 55:289–298.
- SZCZESNIAK-FABIANCZYK, B; BOCHENEK, M; SMORAG, Z y RYSZKA, F (2003). Effect of antioxidants added to boar semen extender on the semen survival time and sperm chromatin structure. *Reprod Biol.*, 3(1):81–7.
- TAKAHASI, K; UCHIDA, A y KITAO, M (1990). Hypoosmotic swelling test in sperm. *Arch. Androl*, 25:225.
- TAMULI, M y WATSON, P (1992). Effect of temperature of incubation on the development of resistance to cold stress and hypoosmotic stress in boar spermatozoa incubed for up to 24 hours. En *Proc. 12th Int Cong Anim Reprod 1992*, páginas 1484–1486.
- TAMULI, M y WATSON, P (1994a). Cold resistance of live boar spermatozoa during incubation after ejaculation. *Vet. Rec.*, 135:160–162.
- TAMULI, M y WATSON, P (1994b). Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Anim. Reprod. Sci.*, 35:247–254.
- TARDIF, S; DUBÉ, C y BAILEY, J (2003). Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium. *Biol Reprod.*, 68(1):207–13.
- TARDIF, S; DUBÉ, C; CHEVALIER, S y BAILEY, J (2001). Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol Reprod.*, 65(3):784–92.
- TARDIF, S; LAFOREST, J; CORMIER, N y BAILEY, L (1999). The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology*, 52:447–459.

- TASH, J y BRACHO, G (1994). Regulation of sperm motility: emerging evidence for a major role for protein phosphatases. *J Androl.*, 15(6):505–9.
- TASH, J y MEANS, A (1982). Regulation of protein phosphorylation and motility of sperm by cyclic adenosine monophosphate and calcium. *Biol. Reprod.*, 26:745–763.
- TEJERINA, F (2008). *Valoración mediante imágenes digitales del semen descongelado de verraco*. Tesis Doctoral, Universidad de León. Spain.
- TEJERINA, F; GONZÁLEZ, R; ALEGRE, B; ALEGRE, E; CASTEJÓN, M; FERRERAS, A; CÁRDENAS, S; BERNAL, S; CAMPOS, J y DOMÍNGUEZ, J (2005). Morphometric characterization of the boar sperm head by using a computer-assisted semen analysis (casa) programme. *Reproduction in domestic animals*, 40:368–369.
- TEJERINA, F; GONZÁLEZ, R; ALEGRE, B; ALEGRE, E; CASTEJÓN, M; MARTÍN, A; CÁRDENAS, S; GARCÍA, J; ABAD, F y DOMÍNGUEZ, J (2006a). Video camera as source of variation of the motility parameters from computer analysis of boar semen. *Reproduction in domestic animals*, 41:114.
- TEJERINA, F; GONZÁLEZ, R; ALEGRE, B; CASTEJÓN, M; MARTÍN, A; CÁRDENAS, S; GARCÍA, J; BERNAL, S y DOMÍNGUEZ, J (2006b). Measure of sperm concentration in boar ejaculates: Traditional systems versus the new nucleocounter. *Reproduction in domestic animals*, 41:113.
- THILMANT, P (1997). Congélation du sperme de verrat en paillette de 0,5 ml. résultats sur le terrain. *Ann. Méd. Vét.*, 141:457–462.
- THOMAS, A; MEYERS, S y BALL, B (2006). Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology*, 65 (8):1531–1550.
- THOMAS, C; GARNER, D; DEJARNETTE, J y MARSHALL, C (1997). Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 56:991–998.
- THOMAS, C; GARNER, D; DEJARNETTE, J y MARSHALL, C (1998). Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod*, 58:786–793.
- THOMSON, L; FLEMING, S; AITKEN, R; DE IULIIS, G; ZIESCHANG, J y CLARK, A (2009). Cryopreservation-induced human sperm dna damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum Reprod.*, 24(9):2061–70.
- THUNDATHIL, J; PALASZ, A; BARTH, A y MAPLETOFT, R (2001). The use of in vitro fertilization techniques to investigate the fertilizing ability of bovine sperm with proximal cytoplasmic droplets. *Animal Reproduction Science*, 65:181–192.
- THURSTON, L; SIGGINS, K; MILEHAM, A; WATSON, P y HOLT, W (2002). Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biology of Reproduction*, 66:545–554.

- THURSTON, L; WATSON, P; MILEHAM, A y HOLT, W (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.
- TOMES, C; CARBALLADA, R; MOSES, D; KATZ, D y SALING, P (1998). Treatment of human spermatozoa with seminal plasma inhibits protein tyrosine phosphorylation. *Mol. Hum. Reprod.*, 4:17–25.
- TOPFER-PETERSEN, E; JANUSCHKE, E; SCHMOECKEL, C y SCHILL, W (1984). Ultrastructural localization of lectin binding sites of the acrosomal membrane system of boar spermatozoa. *Andrologia*, 16:322–332.
- TORRES-BIANCHINI, L; BLASI, C; GARCÍA, C; JORGE, A; FISCHMAN, M y CISALE, H (2003). Evaluación de una prueba de resistencia térmica para espermatozoides porcinos. informe preliminar. En *Fac. Cs. Vet. UBA. www.aapa.org.ar/congresos/2003/RfPdf/Rf5.PDF*.
- UPRETI, G; PAYNE, S; DUGANZICH, D; OLIVER, J y SMITH, J (1996). Enzyme leakage during cryopreservation of ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 41:27–36.
- UYVAL, O y BUCAK, N (2007). Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Vet Brno*, 76:383–390.
- VADNAIS, M y ROBERTS, K (2007). Effects of seminal plasma on cooling induced capacitative changes in boar sperm. *J. Andol.*, 28:416–422.
- VALCÁRCEL, A; DE LAS HERAS, M; PÉREZ, L; DF, M y BALDASSARRE, H (1994). Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. *Theriogenology*, 41:483–489.
- VAN DER SCHANS, G; HARING, R; VAN DIJK-KNIJNENBURG, H; BRUIJNZEEL, P y DEN DERS, N (2000). An immunochemical assay to detect dna damage in bovine sperm. *J. Androl*, 21 (2):250–257.
- VAN DER VEN, H; JEYENDRAN, R; AL-HASANI, S; PÉREZ-PELÁEZ, M; DIDERICJ, K y LJD, Z (1986). Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and in vitro fertilitation. *J. Androl.*, 7:190–196.
- VAN DUIJIN, C y RIKMENSPOEL, R (1960). The mean velocity and velocity distributions of normal bull spermatozoa at different hydrogenion concentrations, derives from photoelectric measurements. *J. Agric. Sci.*, 54:300–309.
- VANDEMARK, N; ASLISBURY, G; MOELLER, A y BERKLEY, C (1958). Exploration of electronic methods for evaluating sperm motility. *Science.*, 127:286–288.
- VANTMAN, D; KOUKOULIS, G; DENNISON, L; ZINAMAN, M y SHERINS, R (1988). Computer-assisted semen analysis: evaluation of method and assessment of the influence of sperm concentration on linear velocity determination. *Fertil Steril.*, 49:510–515.

- VARNER, D; VAUGHAN, S y JOHNSTON, L (1991). Ude a computerized system for evaluation of equine spermatozoal motility. *Am J Vet Res*, 52:224–228.
- VERHOVEN, B; SCHLEGEL, R y WILLIAMSON, P (1992). Rapid loss and restoration of lipid asymmetry by different pathways in resealed erythrocyte ghosts. *Biochim Biophys Acta*, 1104(1):15–23.
- VERSTEGEN, J; IGUER-OUADA, M y ONCLIN, K (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology reserch and veterinary practice. *Theriogenology*, 57:149–179.
- VISCONTI, P; GALANTINO-HOMER, H; NING, X; MOORE, G; VALENZUELA, J; JORGEZ, C; ALVAREZ, J y KOPF, G (1999a). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem.*, 274(5):3235–42.
- VISCONTI, P; NING, X; FORNÉS, M; ÁLVAREZ, J; STEIN, P; CONNORS, S y KOPF, G (1999b). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol.*, 214(2):429–43.
- VYT, P; MAES, D; DEJONCKHEERE, E; CASTRYCK, F y VAN SOOM, A (2004a). Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. *Reprod Domest Anim*, 39(1):8–12.
- VYT, P; MAES, D; RIJSSELAERE, T; DEJONCKHEERE, E; CASTRYCK, F y VAN SOOM, A (2004b). Motility assessment of porcine spermatozoa: a comparison of methods. *Reprod Dom Anim*, 39:447–453.
- VÁZQUEZ, I (1980). *Nuevos métodos de valoración del semen en reproductores ovinos y porcinos*. Tesis Doctoral, University de León. León. España.
- VÁZQUEZ, J; MARTÍNEZ, E; MARTÍNEZ, P; GARCÍA-ARTIGA, C y ROCA, J (1997). Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology*, 47:913–922.
- VÁZQUEZ, J; MARTÍNEZ, E; ROCA, J; COY, P y RUIZ, S (1992). Use of a triple stain technique for simultaneous assessment of vitality and acrosomal status in boar spermatozoa. *Theriogenology*, 38:843–852.
- VÁZQUEZ, J; MARTÍNEZ, E; ROCA, J; VÁZQUEZ, J; LUCAS, X y GIL, M (2000). A.i. in swine: new strategy for deep insemination with a low number of spermatozoa using a non-surgical methodology. En *Proc. 14th Int. Cong. Anim. Reprod.*, 2:289.
- WABERSKI, D; MEDING, S; DIRKSON, G; WEITZE, K; LEIDING, C y HAHN, R (1994). Fertility of long-term stored boar semen: influence of extender (androhep and kiev), storage time and plasma droplets in the semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 36:145–151.
- WABERSKI, D; WEITZE, K; RATH, D y SALLMAN, H (1989). Effect of bovine serum albumin and zwitterionic buffers on stored liquid boar semen. *Zuchthygiene*, 24:128–133.

- WAGNER, H y TIBIER, M (2000). World statistics for artificial insemination in small ruminants and swine. En *Proc. 14th Int. Cong. Anim. Reprod.*, 2:77.
- WANG, A; ZHANG, H; IKEMOTO, I; ANDERSON, D y LOGHLIN, K (1997). Reactive oxygen species generation by seminal cell during cryopreservation. *Urology*, 49(6):921–925.
- WANG, R; SIKKA, S; VEERARAGAVAN, K; BELL, M y HELLSTROM, W (1993). Platelet activating factor and pentoxifylline as human sperm cryoprotectants. *Fertil Steril.*, 60(4):711–5.
- WANG, X; SHARMA, R; SIKKA, S; THOMAS, AJ; FALCONE, T y AGARWAL, A (2003). Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa dna damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril.*, 80(3):531–5.
- WARD, C y STOREY, B (1984). Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescent assay. *Dev. Biol.*, 104:287–296.
- WARD, W y COFFEY, D (1991). Dna packaging and organization in mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cells. *Biol. Reprod.*, 44:569–574.
- WATSON, P (1975). Use of a giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet Rec*, 97:12–15.
- WATSON, P (1976). The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5-8°C and deep-freezing. *J Therm Biol.*, 1:137–41.
- WATSON, P (1979). *Oxford Reviews of Reproductive Biology Vol.1.*, capítulo The preservation of semen in mammals., páginas 283–351. Oxford University Press.
- WATSON, P (1981a). *Effects of low temperature on biological membranes.*, capítulo The effects of cold shock on sperm cell membranes, páginas 189–218. Academic Press, London.
- WATSON, P (1981b). The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees c by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil.*, 62(2):483–92.
- WATSON, P (1990). *Marshall 's physiology of reproduction. 4th edition. Vol. 2: Reproduction in the male.*, capítulo Artificial insemination and the preservation of semen, páginas 747–869. Churchill Livingstone, New York, USA.
- WATSON, P (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa nad the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7:871–891.
- WATSON, P (1996). Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reproduction in domestic animals*, 31:135–140.
- WATSON, P (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61:481–492.
- WATSON, P (2001). Towards an understanding of cryo-injury in spermatozoa and its influence on subsequent fertilizing ability. En *5th Annual Conf. European Soc. Dom Anim. Reprod. ESDAR newsletter 6:24-25.*

- WATSON, P y DUNCAN, A (1988). Effects of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Cryobiology*, 25:131–142.
- WATSON, P y MORRIS, G (1987). Cold shock injury in animal cells. *Symp Soc Exp Biol.*, 41:311–40.
- WATSON, P y PLUMMER, J (1985). *Deep freezing of boar semen*, capítulo The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling, páginas 113–127. Swedish University of Agricultural Sciences.
- WAY, A y KILLIAN, G (2002). Capacitation and induction of the acrosome reaction in bull spermatozoa with norepinephrine. *J. Androl.*, 23:352–357.
- WEITZE, K (1990). Long-term storage of extended boar semen. *Reprod. Domest. Anim.*, Suppl. 1:231–253.
- WEITZE, K; RATH, D y LEPS, H (1988). Influence of volume / surface ratio of plastic packages upon freeze-thaw rate and fertility of boar semen. En *Proc. 11th Int. Cong. Anim. Reprod. A. I. 3*, página 312.
- WELLS, M y AWA, O (1970). New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa. *J Dairy Sci*, 53:227–233.
- WESTENDORF, P; RICHTER, L y TREU, H (1975). Zur tiefgefrierung von ebersperma labor- und besamungsergebnisse mit dem hulsenberger pailletten-verfahren. *Dtsch. Tierarztl. Wschr.*, 82:261–300.
- WETZELS, A; JANSSEN, H; GOVERDE, H; BASTIAANS, B; TAKAHASHI, K y ROLLAND, R (1993). The influence of sperm density on the motility characteristics of washed human spermatozoa. *Int J Androl.*, 16:15–19.
- WHITE, D y AITKEN, R (1989). Relationship between calcium, cyclic amp, atp, and intracellular ph and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res.*, 22:163–177.
- WHITE, I (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fert Dev*, 5:639–658.
- WILKINS, J y KENNEDY, B (1985). *Breed, boar and environmental effects on frozen-thawed semen.*, páginas 299–302. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- WILLIAMSON, P; MATTOCKS, K y SCHLEGAL, R (1983). Merocyanine 540, a fluorescent probe sensitive to lipid packaging. *Biochim Biophys Acta*, 732:387–393.
- WILLOUGHBY, D y COOPER, D (2007). Organization and ca<sup>2+</sup> regulation of adenylyl cyclases in camp microdomains. *Physiol Rev.*, 87(3):965–1010.
- WILMUT, I y POLGE, C (1974). The fertilizing capacity of boar semen stored in the presence of glycerol at 20, 5 and -79 degrees c. *J Reprod Fertil.*, 38(1):105–13.

- WISHART, G y ASHIZAWA, K (1987). Regulation of the motility of fowl spermatozoa by calcium and camp. *Journal of Reproduction and Fertility*, 80:607–611.
- WOELDERS, H (1990). Overviev of in vitro methods for evaluation of semen quality. En *11th Int Conf Boar Semen Press 1*, 145-165.
- WOELDERS, H (1997). Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Vet. Quart.*, 19:135–138.
- WOELDERS, H y DEN BESTEN, M (1993). Cryopreservation of boar semen with small between-boar variation of post-thaw sperm survival. *Cryobiology*, 30:645.
- WOELDERS, H; MATTHIJS, A y DEN BESTEN, M (1996). Boar variation in freezability of the semen. *Reprod. Dom. Anim.*, 31 (Suppl.1):153–159.
- WOELDERS, H; MATTHIJS, A; ZUIDBERG, C y CHAVEIRO, A (2005). Cryopreservation of boar semen: equilibrium freezing in the cryomicroscope and in straws. *Theriogenology*, 63(2):383–95.
- WORKING, P y HURTT, M (1987). Computerized videomicrographic analysis of rat sperm motility. *J. Androl*, 8:330–337.
- XU, X; POMMIER, S; ARBOV, T; HUTCHINGS, B; SOTTO, W y FOXCROFT, G (1998). In vitro maturation and fertilization techniques fos assesment of semen quality and boar fertility. *J Anim Sci*, 76:3079–3089.
- YANAGIDA, K; HOSHI, K; SATO, A y BURKMAN, L (1990). Automated semen analysis shows an increase in sperm concentration and motility with time in makler chambers having excess sample volume. *Hum Reprod.*, 5:193–196.
- YANAGIMACHI, R (1969). In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J Reprod Fertil.*, 18(2):275–86.
- YANAGIMACHI, R (1970). The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J Reprod. Fertil*, 23:193.196.
- YANAGIMACHI, R (1988). *The physiology of reproduction*, capítulo Mamalian fertilization, páginas 189–317. Raven Press, New York.
- YANAGIMACHI, R (1994). *Physiology of reproduction second edition*, capítulo Mammalian fetilization, páginas 189–317. Raven Press Ltd, New York.
- YESTE, M; BRIZ, M; PINART, E; SANCHO, S; GARCÍA-GIL, N; BADÍA, E; BASSOLS, J; PRUNEDA, A; BUSSALLEU, E; CASAS, I y BONET, S (2008). Boar spermatozoa and prostaglandin f2a: Quality of boar sperm after the addition of prostaglandin f2a to the short-term extender over cooling time. *Animal Reproduction Science*, 108(1-2):180–195.
- YEUNG, C y NIESCHLAG, E (1993). Performance and comparison of casa systems equipped with different phase-contrast optics. *J Androl.*, 14:222–228.

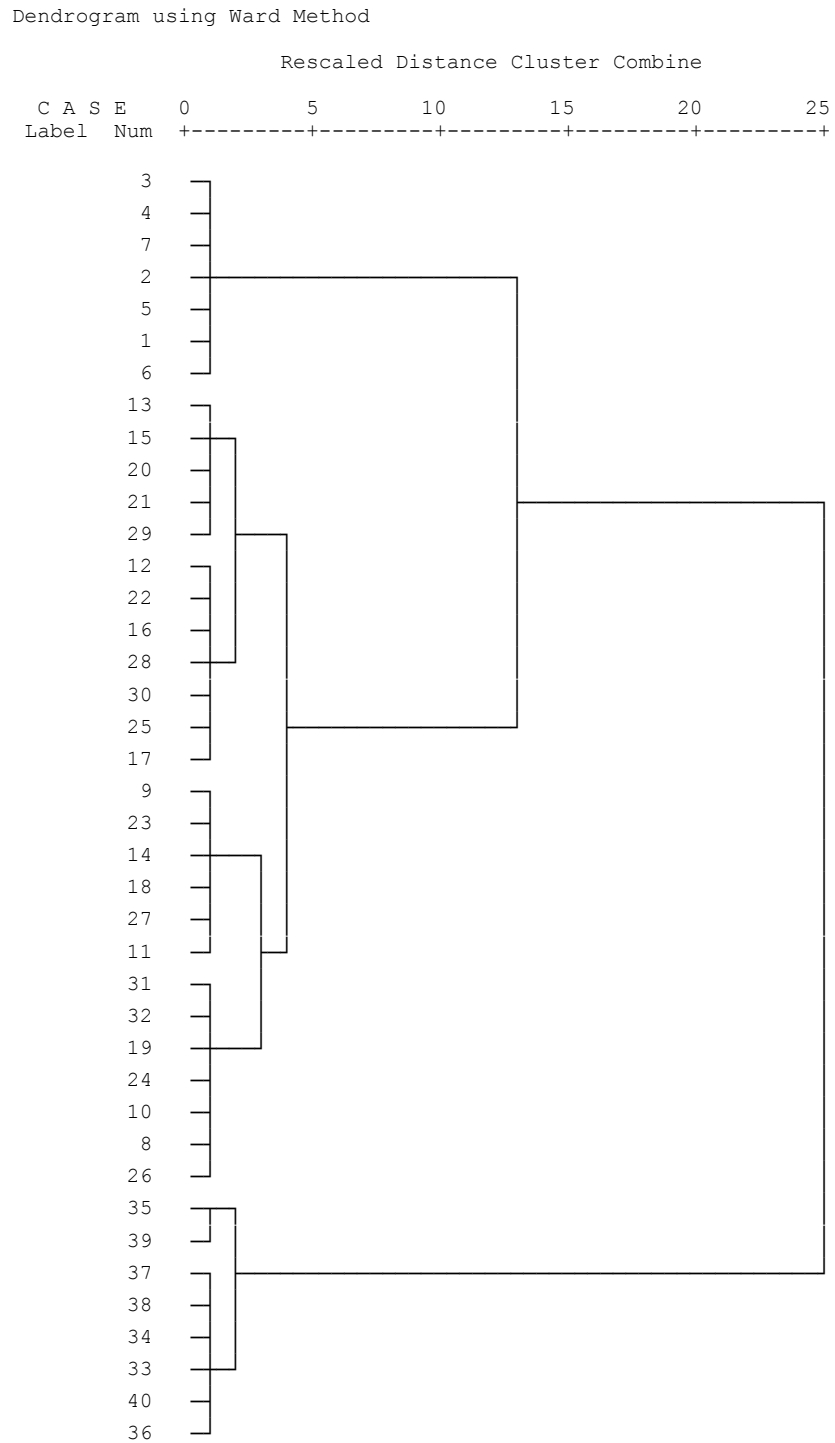
- YI, Y; CHEON, Y y PARK, C (2002). Effect of n-acetyl-d-glucosamine, and glycerol concentration and equilibration time on acrosome morphology and motility of frozen-thawed boar sperm. *Anim Reprod Sci.*, 69(1-2):91–7.
- YOGEV, L; HOMONNAI, Z; GAMZU, R; AMIT, A; LESSING, J; PAZ, G y YAVETZ, H (1995). The use of hemizona assay in the evaluation of the optimal sperm preparation technique. *Hum. Reprod.*, 10:851–854.
- YOSHIDA, M (2000). Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61:349–355.
- ZENG, W y TERADA, T (2000). Freezability of boar spermatozoa is improved by exposure to 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Reprod Fertil Dev.*, 12(3-4):223–8.
- ZENG, W y TERADA, T (2001). Effects of methyl-beta-cyclodextrin on cryosurvival of boar. *J Androl.*, 22:111–118.
- ZINAMAN, M; UHLER, M; VERTUNO, E; FISHER, S y CLEGG, E (1996). Evaluation of computer-assisted semen analysis (casa) with ident stain to determine sperm concentration. *J Androl.*, 17:288–292.
- ZINI, A y LIBMAN, J (2006). Sperm dna damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ*, 175(5):495–500.
- ZOU, C y YANG, Z (2000). Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during in vitro storage under different temperatures. *Theriogenology*, 53(7):1477–1488.
- ZRIBI, N; CHAKROUN, N; EL EUCH, H; GARGOURI, J; BAHLOUL, A y KESKES, L (2008). Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril.*, Nov 20. [Epub ahead of print].



## Capítulo 9

### ANEXOS





**Figura 9.1:** Dendrograma resultante de la vinculación de Ward donde se establece el número óptimo de grupos en los que se dividen los eyaculados en función de su aptitud para la congelación.

Historial de conglomeración

Etapa	Conglomerado que se combina		Coeficientes	Etapa en la que el conglomerado aparece por primera vez		Próxima etapa
	Conglomerado 1	Conglomerado 2		Conglomerado 1	Conglomerado 2	
1	3	4	6,763	0	0	13
2	13	15	8,998	0	0	14
3	20	21	16,634	0	0	4
4	20	29	19,989	3	0	14
5	37	38	20,419	0	0	11
6	18	27	23,745	0	0	24
7	2	5	23,784	0	0	26
8	31	35	24,745	0	0	31
9	19	24	26,250	0	0	17
10	28	30	26,307	0	0	20
11	33	37	35,624	0	5	22
12	9	23	36,236	0	0	19
13	3	7	36,949	1	0	32
14	13	20	40,736	2	4	27
15	12	22	45,036	0	0	21
16	32	40	59,614	0	0	22
17	10	19	60,229	0	9	27
18	34	39	69,703	0	0	35
19	9	14	73,817	12	0	25
20	16	28	85,516	0	10	23
21	12	26	105,134	15	0	30
22	32	33	108,271	16	11	29
23	16	17	111,191	20	0	28
24	11	18	118,490	0	6	25
25	9	11	132,276	19	24	34
26	1	2	138,648	0	7	32
27	10	13	157,778	17	14	30
28	16	25	163,708	23	0	34
29	32	36	174,119	22	0	35
30	10	12	217,235	27	21	36
31	8	31	224,370	0	8	37
32	1	3	226,540	26	13	33
33	1	6	264,604	32	0	38
34	9	16	304,412	25	28	36
35	32	34	321,127	29	18	39
36	9	10	350,987	34	30	37
37	8	9	549,185	31	36	38
38	1	8	1038,622	33	37	39
39	1	32	1723,745	38	35	0

Tabla 9.1: Vinculación de Ward obtenida para establecer el número óptimo de grupos en los que se dividen los eyaculados en función de su aptitud para la congelación.

RESULTADOS MEDIOS OBTENIDOS EN LA PRUEBAS DEL HOST.																	
1ª CONGELACIÓN			2ª CONGELACIÓN			3ª CONGELACIÓN			4ª CONGELACIÓN			5ª CONGELACIÓN					
HOST 30'	Media	Desv. tip.	HOST 60'	Media	Desv. tip.	HOST 30'	Media	Desv. tip.	HOST 60'	Media	Desv. tip.	HOST 30'	Media	Desv. tip.	HOST 60'	Media	Desv. tip.
G2552	56,00	1,41	59,25	4,60	48,00	4,24	52,25	3,35	64,50	2,12	66,25	1,77	61,50	4,95	61,50	4,95	4,95
G5223	73,00	1,41	75,50	7,71	65,50	7,71	68,25	1,06	64,50	2,12	66,25	3,35	75,00	1,41	73,50	5,66	5,66
G6328	42,50	6,36	47,00	2,12	34,00	0,00	48,25	1,06	50,50	3,54	53,50	2,12	41,50	4,95	45,25	3,35	3,35
T475	22,50	3,54	24,00	2,12	64,00	1,41	77,75	3,35	36,00	5,66	39,50	2,83	34,50	12,02	39,25	4,60	4,60
L437	45,00	5,66	50,75	1,77	45,00	7,07	58,00	1,41	51,50	2,12	54,75	3,35	31,00	1,41	32,75	3,35	3,35
R3846	77,50	7,71	76,75	3,35	64,00	1,41	63,75	5,30	47,00	4,24	51,50	1,41	51,50	7,71	54,50	7,71	7,71
R4052	52,50	3,54	56,75	1,77	78,50	7,71	80,25	1,06	86,00	1,41	86,75	1,06	86,00	1,41	88,25	1,06	1,06
R5487	86,00	1,41	88,25	1,06	67,50	3,54	70,50	1,41	61,50	4,95	65,25	3,18	76,50	2,12	80,25	1,06	3,54

Tabla 9.2: Valores medios obtenidos tras realizar las pruebas del HOST a los 40 eyaculados empleados.

RESULTADOS MEDIOS OBTENIDOS EN LA PRUEBAS DEL ORT.																	
1ª CONGELACIÓN			2ª CONGELACIÓN			3ª CONGELACIÓN			4ª CONGELACIÓN			5ª CONGELACIÓN					
ORT 60'	Media	Desv. tip.	ORT 120'	Media	Desv. tip.	ORT 60'	Media	Desv. tip.	ORT 120'	Media	Desv. tip.	ORT 60'	Media	Desv. tip.	ORT 120'	Media	Desv. tip.
G2552	85,75	2,47	81,75	1,06	67,75	1,06	65,25	1,77	78,75	3,89	74,00	7,71	84,00	2,12	81,00	7,71	78,25
G5223	91,75	3,35	87,75	3,35	89,25	2,47	87,00	7,71	89,75	3,35	86,00	7,71	88,50	2,12	85,25	3,35	90,50
G6328	86,00	1,41	81,75	1,06	69,00	4,24	69,75	3,18	79,50	0,00	76,25	3,35	79,75	1,06	75,75	3,35	86,25
T475	90,25	1,06	88,50	7,71	88,25	1,77	85,25	2,47	79,75	1,77	79,50	3,54	81,50	1,41	78,75	1,77	83,25
L437	75,75	1,06	72,75	1,77	81,00	2,83	78,25	3,35	77,00	7,71	74,00	1,41	83,25	3,18	79,25	3,35	83,75
R3846	93,00	1,41	88,00	2,12	86,75	3,35	83,75	2,47	88,75	1,06	84,50	7,71	91,50	3,54	86,25	4,60	86,25
R4052	87,25	3,35	83,25	3,35	81,50	7,71	78,50	1,41	84,25	1,06	81,25	1,77	90,00	2,83	83,25	1,06	86,75
R5487	94,00	7,71	89,25	1,06	93,75	3,35	89,00	7,71	93,25	2,47	89,50	2,12	92,50	2,12	88,25	1,06	93,50

Tabla 9.3: Valores medios obtenidos tras realizar las pruebas del ORT a los 40 eyaculados empleados.

		RESISTENCIA DE LA MEMB. PLASMÁTICA (S0)	RESISTENCIA ACROSOMA (S0)	RESISTENCIA MOVILIDAD (S0)	RESISTENCIA MOVILIDAD + CAF. (S0)
RESISTENCIA DE LA MEMB. PLASMÁTICA (S0)	Coef. Correl.	1	<u>.655</u>	<u>.888</u>	<u>.912</u>
	Sig. (bilat.)		,000	,000	,000
RESISTENCIA ACROSOMA (S0)	Coef. Correl.	<u>.655</u>	1	<u>.610</u>	<u>.571</u>
	Sig. (bilat.)	,000		,000	,000
RESISTENCIA MOVILIDAD (S0)	Coef. Correl.	<u>.888</u>	<u>.610</u>	1	<u>.918</u>
	Sig. (bilat.)	,000	,000		,000
RESISTENCIA MOVILIDAD + CAF. (S0)	Coef. Correl.	<u>.912</u>	<u>.571</u>	<u>.918</u>	1
	Sig. (bilat.)	,000	,000	,000	

Tabla 9.4: Coeficientes de correlación entre los parámetros analizados tras el S0.  
Los coeficientes subrayados y en negrita presentan significación estadística ( $p < 0,05$ ).

		RESISTENCIA DE LA MEMB. PLASMÁTICA (S1)	RESISTENCIA ACROSOMA (S1)	RESISTENCIA MOVILIDAD (S1)	RESISTENCIA MOVILIDAD + CAF. (S1)
RESISTENCIA DE LA MEMB. PLASMÁTICA (S1)	Coef. Correl.	1	<u>.764</u>	<u>.821</u>	<u>.834</u>
	Sig. (bilat.)		,000	,000	,000
RESISTENCIA ACROSOMA (S1)	Coef. Correl.	<u>.764</u>	1	<u>.625</u>	<u>.616</u>
	Sig. (bilat.)	,000		,000	,000
RESISTENCIA MOVILIDAD (S1)	Coef. Correl.	<u>.821</u>	<u>.625</u>	1	<u>.943</u>
	Sig. (bilat.)	,000	,000		,000
RESISTENCIA MOVILIDAD + CAF. (S1)	Coef. Correl.	<u>.834</u>	<u>.616</u>	<u>.943</u>	1
	Sig. (bilat.)	,000	,000	,000	

Tabla 9.5: Coeficientes de correlación entre los parámetros analizados tras el S1.  
Los coeficientes subrayados y en negrita presentan significación estadística ( $p < 0,05$ ).

		RESISTENCIA DE LA MEMB. PLASMÁTICA (S2)	RESISTENCIA ACROSOMA (S2)	RESISTENCIA MOVILIDAD (S2)	RESISTENCIA MOVILIDAD + CAF. (S2)
RESISTENCIA DE LA MEMB. PLASMÁTICA (S2)	Coef. Correl.	1	<u>.852</u>	<u>.813</u>	<u>.848</u>
	Sig. (bilat.)		,000	,000	,000
RESISTENCIA ACROSOMA (S2)	Coef. Correl.	<u>.852</u>	1	<u>.682</u>	<u>.738</u>
	Sig. (bilat.)	,000		,000	,000
RESISTENCIA MOVILIDAD (S2)	Coef. Correl.	<u>.813</u>	<u>.682</u>	1	<u>.883</u>
	Sig. (bilat.)	,000	,000		,000
RESISTENCIA MOVILIDAD + CAF. (S2)	Coef. Correl.	<u>.848</u>	<u>.738</u>	<u>.883</u>	1
	Sig. (bilat.)	,000	,000	,000	

Tabla 9.6: Coeficientes de correlación entre los parámetros analizados tras el S2.  
Los coeficientes subrayados y en negrita presentan significación estadística ( $p < 0,05$ ).

		RESISTENCIA DE LA MEMB. PLASMÁTICA (S3)	RESISTENCIA ACROSOMA (S3)	RESISTENCIA MOVILIDAD (S3)	RESISTENCIA MOVILIDAD + CAF. (S3)
RESISTENCIA DE LA MEMB. PLASMÁTICA (S3)	Coef. Correl.	1	<u>.883</u>	<u>.825</u>	<u>.829</u>
	Sig. (bilat.)		,000	,000	,000
RESISTENCIA ACROSOMA (S3)	Coef. Correl.	<u>.883</u>	1	<u>.705</u>	<u>.760</u>
	Sig. (bilat.)	,000		,000	,000
RESISTENCIA MOVILIDAD (S3)	Coef. Correl.	<u>.825</u>	<u>.705</u>	1	<u>.880</u>
	Sig. (bilat.)	,000	,000		,000
RESISTENCIA MOVILIDAD + CAF. (S3)	Coef. Correl.	<u>.829</u>	<u>.760</u>	<u>.880</u>	1
	Sig. (bilat.)	,000	,000	,000	

Tabla 9.7: Coeficientes de correlación entre los parámetros analizados tras el S3.  
Los coeficientes subrayados y en negrita presentan significación estadística ( $p < 0,05$ ).

		RESISTENCIA DE LA MEMB. PLASMÁTICA (S5)	RESISTENCIA ACROSOMA (S5)	RESISTENCIA MOVILIDAD (S5)	RESISTENCIA MOVILIDAD + CAF. (S5)
RESISTENCIA DE LA MEMB. PLASMÁTICA (S5)	Coef. Correl.	1	<u>.874</u>	<u>.822</u>	<u>.806</u>
	Sig. (bilat.)		,000	,000	,000
RESISTENCIA ACROSOMA (S5)	Coef. Correl.	<u>.874</u>	1	<u>.702</u>	<u>.707</u>
	Sig. (bilat.)	,000		,000	,000
RESISTENCIA MOVILIDAD (S5)	Coef. Correl.	<u>.822</u>	<u>.702</u>	1	<u>.862</u>
	Sig. (bilat.)	,000	,000		,000
RESISTENCIA MOVILIDAD + CAF. (S5)	Coef. Correl.	<u>.806</u>	<u>.707</u>	<u>.862</u>	1
	Sig. (bilat.)	,000	,000	,000	

Tabla 9.8: Coeficientes de correlación entre los parámetros analizados tras el S5.  
Los coeficientes subrayados y en negrita presentan significación estadística ( $p < 0,05$ ).

		SIN CAFEÍNA				CON CAFEÍNA			
		LD		LW		LD		LW	
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
T0	VCL (µm/s)	55,26	37,18	51,64*	32,81	47,91	34,61	50,62*	31,14
	VSL (µm/s)	32,54	28,63	30,95	25,42	32,32	28,60	33,96*	26,11
	VAP (µm/s)	45,33	34,17	42,75*	31,04	41,08	32,36	43,34*	29,77
	LIN (%)	54,87	24,37	55,66	24,64	62,65	25,03	62,60	24,31
	STR (%)	68,73	23,02	69,86	22,30	74,73	21,95	75,12	21,15
	WOB (%)	77,75	15,59	77,28	16,89	81,49	15,82	81,13	15,96
	ALH (µm)	1,87	1,05	1,72*	0,85	1,57	0,95	1,63*	0,82
	BCF (Hz)	6,44	2,97	6,66*	2,86	6,23	2,80	6,66*	2,79
T1,5	VCL (µm/s)	56,27	32,07	55,16	29,71	55,12	32,80	60,49*	29,48
	VSL (µm/s)	39,71	26,73	38,47	24,34	40,12	28,75	43,42*	26,15
	VAP (µm/s)	48,66	30,17	47,67	27,96	48,15	31,33	53,34*	28,41
	LIN (%)	68,05	21,78	68,03	22,07	68,87	22,56	69,71	22,25
	STR (%)	79,83	18,91	80,00	18,82	80,54	18,80	79,73	19,45
	WOB (%)	83,72	13,13	83,47	13,84	83,72	14,11	85,83*	12,55
	ALH (µm)	1,79	0,89	1,73	0,81	1,70	0,84	1,81*	0,82
	BCF (Hz)	7,28	2,76	7,55*	2,87	6,96	2,76	7,25*	2,70
T3	VCL (µm/s)	53,52	30,25	53,66	31,99	56,73	33,59	61,30*	31,46
	VSL (µm/s)	38,66	26,39	37,57	25,70	41,53	29,12	43,39*	26,29
	VAP (µm/s)	45,78	28,39	46,02	28,99	49,55	31,31	53,99*	29,17
	LIN (%)	68,94	21,21	68,69	21,45	70,40	20,93	70,09	22,17
	STR (%)	81,75	17,98	80,99	18,56	81,57	17,91	79,93	19,97
	WOB (%)	82,74	13,40	83,41*	13,33	84,94	12,72	86,31*	12,04
	ALH (µm)	1,78	0,88	1,74*	0,97	1,79	0,95	1,85*	0,91
	BCF (Hz)	7,35	2,91	7,33	2,79	6,98	2,59	7,20*	2,69
T4,5	VCL (µm/s)	55,64	31,68	44,53*	27,68	60,92	34,87	69,81*	34,68
	VSL (µm/s)	41,23	28,07	32,25*	22,95	45,14	30,73	49,49*	28,38
	VAP (µm/s)	48,10	29,50	37,72*	24,93	53,07	32,47	61,09*	31,09
	LIN (%)	70,98	20,42	69,75	21,62	71,45	20,02	71,49	21,47
	STR (%)	83,23	17,10	83,01	17,41	82,87	16,71	81,42	19,72
	WOB (%)	83,93	12,76	82,20*	14,33	84,98	12,52	86,69*	11,16
	ALH (µm)	1,80	0,90	1,52*	0,85	1,91	0,98	2,09*	1,10
	BCF (Hz)	7,52	2,86	7,14*	2,77	7,13	2,64	7,11	2,76
T7	VCL (µm/s)	37,58	26,68	32,61*	25,26	53,36	32,35	65,21*	35,56
	VSL (µm/s)	26,08	22,81	22,48*	20,42	40,46	29,65	47,42*	28,91
	VAP (µm/s)	30,54	24,33	26,37*	22,59	46,54	30,75	57,48*	32,35
	LIN (%)	63,14	23,73	64,84	23,43	72,55	21,60	73,36	20,97
	STR (%)	79,91	18,57	81,59	17,27	84,10	17,43	83,32	18,78
	WOB (%)	76,48	17,19	77,08	17,57	84,62	13,68	86,96*	11,36
	ALH (µm)	1,38	0,78	1,21*	0,74	1,65	0,82	1,88*	1,00
	BCF (Hz)	6,95	3,03	6,50*	2,85	7,38	2,73	7,33	2,72
Descong.	VCL (µm/s)	95,42	41,51	91,51*	43,77	110,37	39,76	103,70*	38,84
	VSL (µm/s)	71,01	38,83	66,80*	40,62	88,70	39,86	84,82*	38,10
	VAP (µm/s)	78,03	38,56	73,76*	40,44	95,91	38,04	90,97*	36,81
	LIN (%)	70,79	21,23	67,80*	22,54	78,26	19,52	79,08*	19,40
	STR (%)	87,83	16,13	86,12*	17,35	90,29	14,87	90,54	14,70
	WOB (%)	79,10	15,54	76,82*	16,21	85,52	13,07	86,07*	12,88
	ALH (µm)	2,90	1,36	2,89	1,45	2,80	1,25	2,68*	1,21
	BCF (Hz)	8,72	3,58	8,20*	3,24	9,15	3,78	8,89*	3,48

Tabla 9.9: Valores medios de los parámetros cinéticos, en presencia y en ausencia de cafeína, en el T0, en el descongelado y durante la prueba de la termorresistencia. La presencia de \* revela diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre razas.



		SIN CAFEÍNA				CON CAFEÍNA			
		LD		LW		LD		LW	
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
T0	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	<b>55,26</b>	37,18	<b>51,64*</b>	32,81	<b>47,91</b>	34,61	<b>50,62*</b>	31,14
	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	<b>32,54</b>	28,63	<b>30,95</b>	25,42	<b>32,32</b>	28,60	<b>33,96*</b>	26,11
	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	<b>45,33</b>	34,17	<b>42,75*</b>	31,04	<b>41,08</b>	32,36	<b>43,34*</b>	29,77
	LIN (%)	<b>54,87</b>	24,37	<b>55,66</b>	24,64	<b>62,65</b>	25,03	<b>62,60</b>	24,31
	STR (%)	<b>68,73</b>	23,02	<b>69,86</b>	22,30	<b>74,73</b>	21,95	<b>75,12</b>	21,15
	WOB (%)	<b>77,75</b>	15,59	<b>77,28</b>	16,89	<b>81,49</b>	15,82	<b>81,13</b>	15,96
	ALH ( $\mu\text{m}$ )	<b>1,87</b>	1,05	<b>1,72*</b>	0,85	<b>1,57</b>	0,95	<b>1,63*</b>	0,82
	BCF (Hz)	<b>6,44</b>	2,97	<b>6,66*</b>	2,86	<b>6,23</b>	2,80	<b>6,66*</b>	2,79
S0	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	<b>79,04</b>	42,24	<b>85,32</b>	44,96	<b>103,83</b>	44,23	<b>95,17*</b>	45,06
	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	<b>44,18</b>	28,19	<b>43,53</b>	28,60	<b>61,01</b>	36,48	<b>54,70*</b>	34,01
	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	<b>56,17</b>	30,33	<b>55,76</b>	30,36	<b>81,07</b>	36,39	<b>71,48*</b>	34,30
	LIN (%)	<b>55,98</b>	20,11	<b>52,04*</b>	19,60	<b>60,01</b>	23,75	<b>58,57</b>	24,67
	STR (%)	<b>77,32</b>	19,61	<b>76,32</b>	17,55	<b>75,39</b>	24,22	<b>75,62</b>	24,28
	WOB (%)	<b>71,08</b>	13,97	<b>66,38*</b>	14,55	<b>78,62</b>	13,48	<b>75,92*</b>	14,02
	ALH ( $\mu\text{m}$ )	<b>2,98</b>	1,70	<b>3,55*</b>	2,12	<b>3,31</b>	1,77	<b>3,40</b>	1,82
	BCF (Hz)	<b>7,55</b>	3,25	<b>6,94</b>	3,23	<b>6,98</b>	3,78	<b>7,05</b>	3,47
S1	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	<b>104,45</b>	37,66	<b>104,52</b>	42,35	<b>107,90</b>	39,42	<b>111,36</b>	41,31
	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	<b>53,20</b>	25,81	<b>49,13*</b>	25,03	<b>62,86</b>	31,41	<b>66,22</b>	33,00
	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	<b>68,38</b>	24,97	<b>64,57</b>	26,02	<b>78,45</b>	29,20	<b>81,17</b>	30,80
	LIN (%)	<b>52,12</b>	19,06	<b>48,09*</b>	18,53	<b>59,00</b>	21,57	<b>60,11</b>	22,84
	STR (%)	<b>76,80</b>	19,55	<b>74,96*</b>	19,51	<b>78,79</b>	21,12	<b>79,36</b>	21,48
	WOB (%)	<b>66,81</b>	13,01	<b>63,19*</b>	13,99	<b>73,69</b>	13,41	<b>74,20</b>	14,65
	ALH ( $\mu\text{m}$ )	<b>4,29</b>	1,80	<b>4,36</b>	1,99	<b>3,84</b>	1,75	<b>3,99</b>	1,91
	BCF (Hz)	<b>7,40</b>	3,20	<b>7,08</b>	3,03	<b>7,65</b>	3,63	<b>7,19*</b>	3,56
S2	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	<b>101,93</b>	37,17	<b>108,13*</b>	42,46	<b>113,43</b>	41,77	<b>104,37*</b>	44,24
	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	<b>53,02</b>	24,07	<b>49,24*</b>	24,60	<b>64,89</b>	31,78	<b>61,29*</b>	30,80
	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	<b>67,54</b>	24,40	<b>67,57</b>	25,59	<b>81,10</b>	30,51	<b>74,12*</b>	31,37
	LIN (%)	<b>53,91</b>	19,30	<b>47,63*</b>	20,46	<b>57,97</b>	20,43	<b>60,05*</b>	20,96
	STR (%)	<b>78,24</b>	18,78	<b>72,40*</b>	21,63	<b>78,69</b>	20,39	<b>81,45*</b>	18,13
	WOB (%)	<b>67,91</b>	13,46	<b>64,68*</b>	15,28	<b>72,51</b>	12,87	<b>72,39</b>	15,04
	ALH ( $\mu\text{m}$ )	<b>4,15</b>	1,80	<b>4,50*</b>	2,11	<b>4,08</b>	1,84	<b>3,88*</b>	2,05
	BCF (Hz)	<b>7,39</b>	3,12	<b>6,86*</b>	3,03	<b>7,67</b>	3,51	<b>7,48</b>	3,52
S3	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	<b>101,44</b>	38,64	<b>105,15*</b>	43,35	<b>107,35</b>	39,38	<b>109,78</b>	46,26
	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	<b>52,61</b>	26,34	<b>48,76</b>	25,20	<b>63,38</b>	30,84	<b>62,66</b>	32,34
	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	<b>66,97</b>	25,92	<b>65,52</b>	26,45	<b>77,71</b>	29,30	<b>77,63</b>	32,31
	LIN (%)	<b>53,20</b>	19,29	<b>48,90*</b>	20,00	<b>59,46</b>	20,47	<b>58,55</b>	21,77
	STR (%)	<b>77,14</b>	18,38	<b>73,75*</b>	19,23	<b>80,11</b>	20,01	<b>79,35</b>	20,36
	WOB (%)	<b>67,83</b>	14,11	<b>65,08*</b>	15,84	<b>73,08</b>	13,26	<b>72,55</b>	14,95
	ALH ( $\mu\text{m}$ )	<b>4,10</b>	1,84	<b>4,35*</b>	2,20	<b>3,88</b>	1,72	<b>4,01</b>	2,12
	BCF (Hz)	<b>7,46</b>	2,97	<b>6,59*</b>	2,97	<b>7,98</b>	3,35	<b>7,13*</b>	3,45
S5	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	<b>96,02</b>	39,83	<b>103,64*</b>	45,80	<b>92,74</b>	46,23	<b>99,77*</b>	44,64
	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	<b>47,97</b>	26,44	<b>46,38</b>	24,80	<b>55,47</b>	33,05	<b>56,13</b>	28,35
	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	<b>63,20</b>	27,02	<b>63,20</b>	26,70	<b>67,50</b>	33,83	<b>70,40*</b>	29,10
	LIN (%)	<b>51,72</b>	20,46	<b>47,80*</b>	20,84	<b>60,09</b>	20,95	<b>58,65</b>	21,24
	STR (%)	<b>74,96</b>	20,36	<b>72,97*</b>	19,92	<b>79,81</b>	19,27	<b>78,79</b>	20,05
	WOB (%)	<b>67,77</b>	15,05	<b>64,10*</b>	16,21	<b>74,00</b>	14,36	<b>73,13</b>	14,25
	ALH ( $\mu\text{m}$ )	<b>3,91</b>	1,86	<b>4,34*</b>	2,22	<b>3,42</b>	1,91	<b>3,73*</b>	2,05
	BCF (Hz)	<b>6,94</b>	3,08	<b>6,68</b>	3,17	<b>7,52</b>	3,37	<b>7,55</b>	3,26

Tabla 9.10: Valores medios de los parámetros cinéticos para cada raza, tanto en presencia como en ausencia de cafeína, en el T0 y durante la prueba del choque "a frigore".

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre razas.

		SIN CAFEÍNA								
		VCL ( $\mu\text{m/s}$ )		VSL ( $\mu\text{m/s}$ )		VAP ( $\mu\text{m/s}$ )		LIN (%)		
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	
PRUEBA	T0	G2552	47,25 <sup>a</sup>	33,60	28,96 <sup>a</sup>	26,27	38,82 <sup>a</sup>	31,93	54,86 <sup>abc</sup>	24,72
		G5223	49,75 <sup>ab</sup>	30,83	31,19 <sup>ab</sup>	24,95	41,53 <sup>ab</sup>	29,89	57,59 <sup>c</sup>	25,54
		G6328	60,52 <sup>c</sup>	34,94	35,34 <sup>b</sup>	25,77	50,94 <sup>d</sup>	32,62	56,72 <sup>bc</sup>	23,01
		T475	48,99 <sup>ab</sup>	30,82	28,36 <sup>a</sup>	24,48	39,70 <sup>ab</sup>	28,80	53,41 <sup>ab</sup>	24,90
		L437	59,86 <sup>c</sup>	44,67	34,12 <sup>b</sup>	34,09	48,13 <sup>cd</sup>	40,71	51,60 <sup>a</sup>	24,20
		R3846	49,22 <sup>ab</sup>	31,74	29,03 <sup>a</sup>	25,69	40,56 <sup>ab</sup>	29,58	54,39 <sup>abc</sup>	23,88
		R4052	57,82 <sup>c</sup>	36,54	35,01 <sup>b</sup>	27,11	48,30 <sup>cd</sup>	33,49	58,02 <sup>c</sup>	23,61
		R5487	54,84 <sup>bc</sup>	35,12	32,28 <sup>ab</sup>	27,50	44,82 <sup>bc</sup>	32,56	55,07 <sup>abc</sup>	25,28
	T1,5	G2552	54,16 <sup>a</sup>	29,44	37,48 <sup>a</sup>	22,88	46,99 <sup>a</sup>	27,57	67,77 <sup>ab</sup>	20,90
		G5223	49,60 <sup>a</sup>	31,02	34,91 <sup>a</sup>	26,87	42,54 <sup>a</sup>	29,91	64,95 <sup>a</sup>	25,60
		G6328	65,51 <sup>a</sup>	28,43	43,54 <sup>b</sup>	23,96	56,02 <sup>b</sup>	26,80	66,18 <sup>a</sup>	21,27
		T475	49,63 <sup>a</sup>	27,05	37,02 <sup>a</sup>	22,80	43,68 <sup>a</sup>	25,59	73,19 <sup>c</sup>	19,58
		L437	53,28 <sup>a</sup>	34,87	37,23 <sup>a</sup>	28,76	45,88 <sup>a</sup>	32,19	66,07 <sup>a</sup>	21,79
		R3846	51,08 <sup>b</sup>	31,63	37,84 <sup>a</sup>	26,57	44,92 <sup>a</sup>	30,29	70,98 <sup>bc</sup>	19,60
		R4052	63,29 <sup>b</sup>	29,18	43,88 <sup>b</sup>	25,31	54,15 <sup>b</sup>	27,50	68,41 <sup>ab</sup>	21,42
		R5487	54,15 <sup>a</sup>	31,35	38,10 <sup>a</sup>	25,69	47,25 <sup>a</sup>	30,32	67,04 <sup>a</sup>	24,04
	T3	G2552	46,56 <sup>b</sup>	26,96	33,63 <sup>bc</sup>	22,68	40,60 <sup>bc</sup>	25,13	69,93 <sup>bcd</sup>	20,86
		G5223	44,40 <sup>b</sup>	26,92	31,68 <sup>b</sup>	25,02	37,76 <sup>b</sup>	26,39	66,14 <sup>a</sup>	24,71
		G6328	65,58 <sup>d</sup>	37,19	42,42 <sup>e</sup>	27,23	55,69 <sup>e</sup>	32,19	66,49 <sup>ab</sup>	20,67
		T475	54,85 <sup>c</sup>	28,98	41,31 <sup>d</sup>	25,27	47,49 <sup>d</sup>	26,80	73,09 <sup>d</sup>	18,27
		L437	62,14 <sup>d</sup>	32,98	45,49 <sup>e</sup>	29,60	54,14 <sup>e</sup>	31,61	69,67 <sup>abcd</sup>	20,86
		R3846	38,53 <sup>a</sup>	24,57	28,62 <sup>a</sup>	22,83	32,85 <sup>a</sup>	23,52	68,52 <sup>abc</sup>	21,78
		R4052	55,02 <sup>c</sup>	28,09	39,93 <sup>d</sup>	24,30	46,50 <sup>d</sup>	25,64	70,51 <sup>cd</sup>	21,03
		R5487	53,63 <sup>c</sup>	28,79	37,53 <sup>cd</sup>	24,61	45,43 <sup>cd</sup>	26,87	67,32 <sup>abc</sup>	21,22
	T4,5	G2552	42,96 <sup>b</sup>	26,14	32,23 <sup>b</sup>	22,45	36,84 <sup>b</sup>	23,61	71,47 <sup>bc</sup>	21,50
		G5223	40,65 <sup>ab</sup>	24,96	29,58 <sup>b</sup>	21,60	34,77 <sup>b</sup>	23,33	69,61 <sup>ab</sup>	22,91
		G6328	35,98 <sup>a</sup>	23,89	24,01 <sup>a</sup>	17,58	29,22 <sup>a</sup>	20,85	65,84 <sup>a</sup>	21,10
		T475	56,57 <sup>d</sup>	30,27	41,58 <sup>d</sup>	25,21	48,27 <sup>d</sup>	26,94	71,68 <sup>bc</sup>	20,45
L437		57,14 <sup>d</sup>	30,95	42,67 <sup>d</sup>	27,58	49,53 <sup>d</sup>	29,03	71,33 <sup>bc</sup>	19,62	
R3846		45,58 <sup>bc</sup>	28,37	32,23 <sup>bc</sup>	22,94	38,21 <sup>bc</sup>	25,20	68,49 <sup>ab</sup>	19,60	
R4052		67,86 <sup>e</sup>	33,28	52,15 <sup>e</sup>	31,43	59,87 <sup>e</sup>	31,40	74,06 <sup>c</sup>	20,36	
R5487		49,02 <sup>c</sup>	28,42	35,23 <sup>c</sup>	24,03	41,93 <sup>c</sup>	26,33	69,30 <sup>ab</sup>	21,56	
T7	G2552	30,31 <sup>a</sup>	20,75	21,09 <sup>abc</sup>	18,34	24,20 <sup>a</sup>	19,10	65,92 <sup>b</sup>	25,88	
	G5223	29,54 <sup>a</sup>	18,80	20,39 <sup>ab</sup>	16,47	23,41 <sup>a</sup>	17,02	64,96 <sup>b</sup>	25,99	
	G6328	35,60 <sup>ab</sup>	30,28	24,02 <sup>bc</sup>	23,10	28,93 <sup>ba</sup>	26,78	63,11 <sup>b</sup>	20,91	
	T475	32,32 <sup>ab</sup>	24,15	22,96 <sup>abc</sup>	20,45	26,60 <sup>ba</sup>	21,67	66,72 <sup>b</sup>	22,85	
	L437	37,99 <sup>bc</sup>	26,56	27,12 <sup>cd</sup>	24,29	31,32 <sup>bc</sup>	25,44	63,26 <sup>b</sup>	24,31	
	R3846	29,89 <sup>a</sup>	25,06	17,19 <sup>a</sup>	17,51	22,28 <sup>a</sup>	20,79	52,01 <sup>a</sup>	24,11	
	R4052	33,27 <sup>ab</sup>	24,01	23,50 <sup>bc</sup>	21,62	26,99 <sup>ba</sup>	22,25	63,22 <sup>b</sup>	23,95	
	R5487	44,22 <sup>c</sup>	27,75	31,82 <sup>d</sup>	23,63	36,78 <sup>c</sup>	25,22	68,55 <sup>b</sup>	21,15	
Descongel.	G2552	73,27 <sup>a</sup>	41,80	52,55 <sup>a</sup>	37,47	58,07 <sup>a</sup>	37,83	64,18 <sup>ab</sup>	24,60	
	G5223	98,91 <sup>de</sup>	43,91	81,50 <sup>c</sup>	43,58	86,62 <sup>d</sup>	42,78	76,34 <sup>e</sup>	22,19	
	G6328	81,95 <sup>b</sup>	39,64	56,03 <sup>a</sup>	34,88	63,24 <sup>a</sup>	35,81	63,78 <sup>a</sup>	21,21	
	T475	103,69 <sup>e</sup>	43,21	71,89 <sup>b</sup>	39,42	80,89 <sup>bcd</sup>	38,60	66,25 <sup>ab</sup>	20,98	
	L437	90,86 <sup>c</sup>	41,96	69,63 <sup>b</sup>	39,40	74,28 <sup>b</sup>	39,10	71,43 <sup>cd</sup>	21,52	
	R3846	96,72 <sup>cde</sup>	42,35	71,56 <sup>b</sup>	38,80	78,61 <sup>bc</sup>	38,51	70,45 <sup>cd</sup>	20,45	
	R4052	96,53 <sup>cde</sup>	40,42	68,70 <sup>b</sup>	38,17	76,43 <sup>bc</sup>	37,86	67,81 <sup>bc</sup>	21,08	
	R5487	96,01 <sup>cd</sup>	41,60	74,11 <sup>b</sup>	39,09	81,88 <sup>cd</sup>	38,78	74,10 <sup>de</sup>	21,38	

Tabla 9.11: Valores medios de los parámetros VCL, VSL, VAP y LIN para cada verraco, en ausencia de cafeína, en el T0, en el descongelado y durante la prueba de la termorresistencia.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre verracos.

		SIN CAFEÍNA								
		STR (%)		WOB (%)		ALH (µm)		BCF (Hz)		
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	
PRUEBA	T0	G2552	70,57 <sup>abc</sup>	21,69	75,09 <sup>a</sup>	18,08	1,59 <sup>a</sup>	0,83	6,53 <sup>b</sup>	2,93
		G5223	72,10 <sup>c</sup>	21,88	77,29 <sup>ab</sup>	18,50	1,64 <sup>a</sup>	0,80	6,38 <sup>ab</sup>	2,89
		G6328	69,07 <sup>abc</sup>	22,24	80,49 <sup>d</sup>	13,79	1,91 <sup>cd</sup>	0,90	7,19 <sup>c</sup>	2,99
		T475	67,84 <sup>ab</sup>	23,00	76,06 <sup>ab</sup>	16,40	1,73 <sup>ab</sup>	0,85	6,56 <sup>b</sup>	2,62
		L437	66,84 <sup>a</sup>	23,01	75,05 <sup>a</sup>	15,63	2,06 <sup>d</sup>	1,23	5,89 <sup>a</sup>	2,76
		R3846	68,03 <sup>ab</sup>	22,64	77,96 <sup>bcd</sup>	15,30	1,66 <sup>a</sup>	0,85	6,82 <sup>bc</sup>	2,98
		R4052	70,95 <sup>cd</sup>	22,35	80,04 <sup>cd</sup>	14,77	1,95 <sup>cd</sup>	1,08	6,42 <sup>b</sup>	2,91
		R5487	68,87 <sup>abc</sup>	23,81	77,63 <sup>abc</sup>	16,22	1,84 <sup>bc</sup>	0,99	6,53 <sup>b</sup>	3,10
	T1,5	G2552	79,47 <sup>ab</sup>	18,03	83,96 <sup>bc</sup>	13,10	1,72 <sup>b</sup>	0,83	7,15 <sup>ab</sup>	2,74
		G5223	78,78 <sup>a</sup>	19,87	79,86 <sup>a</sup>	18,45	1,54 <sup>a</sup>	0,80	6,85 <sup>a</sup>	2,92
		G6328	77,89 <sup>a</sup>	20,29	83,85 <sup>bc</sup>	10,90	2,04 <sup>c</sup>	0,80	8,14 <sup>d</sup>	2,86
		T475	84,02 <sup>c</sup>	16,10	85,91 <sup>c</sup>	11,74	1,56 <sup>a</sup>	0,69	7,91 <sup>cd</sup>	2,78
		L437	78,07 <sup>a</sup>	19,45	83,11 <sup>b</sup>	12,88	1,73 <sup>b</sup>	0,96	6,72 <sup>a</sup>	2,61
		R3846	82,50 <sup>bc</sup>	16,64	84,84 <sup>bc</sup>	12,10	1,61 <sup>ab</sup>	0,77	7,57 <sup>bc</sup>	2,76
		R4052	80,20 <sup>ab</sup>	18,90	83,94 <sup>bc</sup>	12,07	2,03 <sup>c</sup>	0,89	7,47 <sup>bc</sup>	2,69
		R5487	78,76 <sup>a</sup>	20,10	83,01 <sup>b</sup>	15,79	1,65 <sup>ab</sup>	0,80	7,38 <sup>b</sup>	2,98
	T3	G2552	81,21 <sup>abc</sup>	18,02	84,81 <sup>c</sup>	12,96	1,51 <sup>a</sup>	0,75	6,90 <sup>a</sup>	2,53
		G5223	79,69 <sup>ab</sup>	19,71	80,48 <sup>a</sup>	17,37	1,46 <sup>a</sup>	0,71	6,99 <sup>a</sup>	2,92
		G6328	78,35 <sup>a</sup>	20,04	83,99 <sup>bc</sup>	10,54	2,11 <sup>d</sup>	1,20	7,59 <sup>bc</sup>	2,78
		T475	85,57 <sup>d</sup>	14,54	84,46 <sup>bc</sup>	11,33	1,79 <sup>b</sup>	0,88	7,77 <sup>c</sup>	2,78
		L437	81,32 <sup>abc</sup>	18,28	84,33 <sup>bc</sup>	12,56	1,99 <sup>cd</sup>	0,90	7,14 <sup>ab</sup>	2,72
		R3846	82,26 <sup>bc</sup>	17,97	81,38 <sup>a</sup>	14,17	1,36 <sup>a</sup>	0,65	7,37 <sup>abc</sup>	2,94
		R4052	83,66 <sup>cd</sup>	17,83	82,63 <sup>abc</sup>	12,93	1,85 <sup>bc</sup>	0,89	7,68 <sup>c</sup>	3,01
		R5487	80,39 <sup>ab</sup>	17,71	82,17 <sup>ab</sup>	13,89	1,79 <sup>b</sup>	0,90	7,30 <sup>abc</sup>	2,98
	T4,5	G2552	83,87 <sup>a</sup>	17,39	83,41 <sup>b</sup>	13,74	1,48 <sup>ab</sup>	0,83	6,65 <sup>a</sup>	2,61
		G5223	81,91 <sup>a</sup>	18,03	82,68 <sup>b</sup>	15,69	1,41 <sup>a</sup>	0,75	6,65 <sup>a</sup>	2,72
		G6328	81,79 <sup>a</sup>	17,08	78,89 <sup>a</sup>	14,36	1,34 <sup>a</sup>	0,76	7,42 <sup>bc</sup>	2,80
		T475	84,36 <sup>a</sup>	16,99	83,41 <sup>b</sup>	12,96	1,82 <sup>c</sup>	0,93	7,81 <sup>c</sup>	2,76
L437		83,41 <sup>a</sup>	16,23	84,15 <sup>bc</sup>	12,60	1,87 <sup>c</sup>	0,91	7,23 <sup>b</sup>	2,74	
R3846		82,43 <sup>a</sup>	16,31	81,77 <sup>b</sup>	12,58	1,60 <sup>b</sup>	0,87	7,67 <sup>bc</sup>	3,04	
R4052		84,76 <sup>a</sup>	17,80	86,21 <sup>c</sup>	11,06	2,05 <sup>d</sup>	0,91	7,57 <sup>bc</sup>	2,65	
R5487		82,00 <sup>a</sup>	17,77	83,00 <sup>b</sup>	14,41	1,60 <sup>b</sup>	0,84	7,63 <sup>bc</sup>	3,04	
T7	G2552	81,95 <sup>b</sup>	18,89	77,11 <sup>b</sup>	19,56	1,15 <sup>a</sup>	0,69	6,26 <sup>a</sup>	2,80	
	G5223	81,67 <sup>b</sup>	18,05	76,25 <sup>b</sup>	20,42	1,14 <sup>a</sup>	0,58	6,31 <sup>a</sup>	2,79	
	G6328	80,93 <sup>b</sup>	16,28	76,37 <sup>b</sup>	15,41	1,30 <sup>ab</sup>	0,87	6,69 <sup>ab</sup>	2,89	
	T475	82,33 <sup>b</sup>	16,85	78,98 <sup>b</sup>	16,38	1,16 <sup>a</sup>	0,66	6,56 <sup>ab</sup>	2,88	
	L437	80,26 <sup>b</sup>	18,76	76,27 <sup>b</sup>	18,57	1,39 <sup>bc</sup>	0,74	6,75 <sup>ab</sup>	2,83	
	R3846	71,38 <sup>a</sup>	20,08	69,67 <sup>a</sup>	17,90	1,26 <sup>ab</sup>	0,87	6,58 <sup>ab</sup>	3,15	
	R4052	80,65 <sup>b</sup>	18,15	75,85 <sup>b</sup>	17,43	1,25 <sup>ab</sup>	0,68	6,80 <sup>ab</sup>	2,96	
	R5487	83,45 <sup>b</sup>	16,65	80,41 <sup>b</sup>	14,77	1,53 <sup>c</sup>	0,81	7,33 <sup>b</sup>	3,07	
Descongel.	G2552	83,54 <sup>a</sup>	19,44	73,95 <sup>ab</sup>	17,98	2,49 <sup>a</sup>	1,32	7,98 <sup>ab</sup>	3,05	
	G5223	89,48 <sup>c</sup>	16,06	83,41 <sup>e</sup>	15,42	2,63 <sup>ab</sup>	1,21	8,62 <sup>cd</sup>	3,30	
	G6328	85,41 <sup>ab</sup>	17,49	73,25 <sup>a</sup>	15,77	2,76 <sup>bc</sup>	1,32	8,53 <sup>bcd</sup>	3,26	
	T475	85,30 <sup>ab</sup>	16,72	76,09 <sup>bc</sup>	14,60	3,45 <sup>e</sup>	1,64	7,67 <sup>a</sup>	3,17	
	L437	89,50 <sup>c</sup>	16,00	77,91 <sup>cd</sup>	15,63	2,72 <sup>abc</sup>	1,21	9,88 <sup>e</sup>	3,84	
	R3846	87,88 <sup>bc</sup>	15,40	78,80 <sup>d</sup>	15,29	2,92 <sup>cd</sup>	1,46	8,79 <sup>d</sup>	3,52	
	R4052	86,94 <sup>bc</sup>	16,31	76,61 <sup>cd</sup>	15,72	3,10 <sup>d</sup>	1,37	8,53 <sup>bcd</sup>	3,39	
	R5487	87,73 <sup>bc</sup>	16,56	83,04 <sup>e</sup>	14,72	2,76 <sup>bc</sup>	1,33	8,09 <sup>abc</sup>	3,49	

Tabla 9.12: Valores medios de los parámetros STR, WOB, ALH y BCF para cada verraco, en ausencia de cafeína, en el T0, en el descongelado y durante la prueba de la termorresistencia.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre verracos.

		CON CAFÉINA								
		VCL ( $\mu\text{m/s}$ )		VSL ( $\mu\text{m/s}$ )		VAP ( $\mu\text{m/s}$ )		LIN (%)		
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	
PRUEBA	T0	G2552	52,51 <sup>cd</sup>	35,61	35,16 <sup>cd</sup>	27,65	45,72 <sup>cd</sup>	33,67	62,99 <sup>ab</sup>	23,74
		G5223	49,73 <sup>bc</sup>	32,09	34,40 <sup>bcd</sup>	28,75	42,43 <sup>bc</sup>	31,44	61,74 <sup>ab</sup>	26,15
		G6328	50,06 <sup>bc</sup>	26,60	32,99 <sup>bc</sup>	21,57	42,88 <sup>bc</sup>	24,85	64,29 <sup>a</sup>	22,39
		T475	50,76 <sup>bc</sup>	31,28	33,72 <sup>bcd</sup>	26,63	43,06 <sup>bc</sup>	29,89	61,43 <sup>ab</sup>	24,71
		L437	50,54 <sup>bc</sup>	39,74	35,40 <sup>cd</sup>	33,77	44,03 <sup>c</sup>	37,98	63,96 <sup>ab</sup>	25,23
		R3846	38,83 <sup>a</sup>	28,47	25,86 <sup>a</sup>	23,90	32,92 <sup>a</sup>	26,88	60,62 <sup>ab</sup>	24,55
		R4052	57,10 <sup>d</sup>	37,79	38,33 <sup>d</sup>	29,21	49,65 <sup>d</sup>	34,11	65,18 <sup>b</sup>	23,96
		R5487	45,72 <sup>b</sup>	29,88	30,33 <sup>ab</sup>	26,18	38,39 <sup>b</sup>	28,25	61,19 <sup>ab</sup>	26,02
	T1,5	G2552	59,26 <sup>c</sup>	31,59	41,17 <sup>bc</sup>	25,45	52,14 <sup>c</sup>	29,68	68,33 <sup>ab</sup>	22,33
		G5223	52,56 <sup>b</sup>	27,75	38,97 <sup>b</sup>	26,21	46,24 <sup>b</sup>	27,79	69,30 <sup>ab</sup>	24,17
		G6328	68,56 <sup>d</sup>	28,88	46,47 <sup>e</sup>	25,82	59,98 <sup>d</sup>	27,59	66,73 <sup>a</sup>	22,00
		T475	59,77 <sup>c</sup>	27,46	45,93 <sup>de</sup>	26,41	53,37 <sup>c</sup>	27,05	74,39 <sup>c</sup>	19,98
		L437	59,23 <sup>c</sup>	38,00	45,27 <sup>cde</sup>	33,96	53,28 <sup>c</sup>	36,92	71,57 <sup>bc</sup>	22,47
		R3846	43,88 <sup>a</sup>	28,57	32,82 <sup>a</sup>	26,73	38,51 <sup>a</sup>	28,30	68,10 <sup>ab</sup>	23,31
		R4052	61,25 <sup>c</sup>	32,65	41,99 <sup>bcd</sup>	26,57	52,79 <sup>c</sup>	30,01	67,42 <sup>a</sup>	21,82
		R5487	54,01 <sup>b</sup>	29,92	40,14 <sup>b</sup>	27,83	46,84 <sup>b</sup>	29,17	69,29 <sup>ab</sup>	22,73
	T3	G2552	54,19 <sup>b</sup>	31,67	40,34 <sup>b</sup>	27,51	48,40 <sup>b</sup>	30,19	71,55 <sup>b</sup>	21,55
		G5223	48,38 <sup>a</sup>	26,84	35,01 <sup>a</sup>	23,78	41,90 <sup>a</sup>	26,04	68,67 <sup>b</sup>	23,82
		G6328	75,76 <sup>d</sup>	29,74	47,63 <sup>c</sup>	24,14	65,65 <sup>d</sup>	26,37	64,47 <sup>a</sup>	22,49
		T475	63,44 <sup>c</sup>	30,17	48,97 <sup>c</sup>	27,28	57,06 <sup>c</sup>	28,43	76,15 <sup>c</sup>	18,97
		L437	63,40 <sup>c</sup>	37,57	46,62 <sup>c</sup>	33,82	56,08 <sup>c</sup>	35,61	69,55 <sup>b</sup>	20,88
		R3846	44,15 <sup>a</sup>	28,45	33,66 <sup>a</sup>	25,09	39,11 <sup>a</sup>	27,21	72,21 <sup>b</sup>	20,79
		R4052	66,74 <sup>c</sup>	31,42	47,22 <sup>c</sup>	27,16	57,31 <sup>c</sup>	28,62	69,71 <sup>b</sup>	19,91
		R5487	45,75 <sup>a</sup>	28,46	34,28 <sup>a</sup>	25,62	39,96 <sup>a</sup>	27,31	70,68 <sup>b</sup>	22,53
	T4,5	G2552	64,99 <sup>b</sup>	34,82	48,24 <sup>b</sup>	30,12	57,17 <sup>b</sup>	31,36	73,19 <sup>c</sup>	20,06
		G5223	51,50 <sup>a</sup>	28,33	37,32 <sup>a</sup>	24,94	44,52 <sup>a</sup>	26,66	69,65 <sup>b</sup>	22,62
		G6328	90,08 <sup>d</sup>	34,68	55,79 <sup>c</sup>	28,47	78,09 <sup>d</sup>	30,23	64,67 <sup>a</sup>	23,80
		T475	70,58 <sup>c</sup>	29,01	54,82 <sup>c</sup>	25,82	62,61 <sup>c</sup>	26,41	77,75 <sup>d</sup>	17,04
		L437	69,77 <sup>bc</sup>	37,20	51,50 <sup>bc</sup>	33,12	60,92 <sup>bc</sup>	34,73	71,18 <sup>bc</sup>	19,06
		R3846	49,24 <sup>a</sup>	30,96	36,91 <sup>a</sup>	27,63	42,39 <sup>a</sup>	28,82	71,00 <sup>bc</sup>	20,49
		R4052	70,17 <sup>bc</sup>	33,74	51,99 <sup>bc</sup>	31,00	61,31 <sup>bc</sup>	31,58	72,30 <sup>bc</sup>	20,19
		R5487	52,41 <sup>a</sup>	31,28	38,56 <sup>a</sup>	26,83	45,87 <sup>a</sup>	29,30	71,26 <sup>bc</sup>	20,41
	T7	G2552	53,83 <sup>cd</sup>	32,16	42,70 <sup>b</sup>	28,58	47,89 <sup>c</sup>	29,92	76,94 <sup>de</sup>	18,82
		G5223	40,34 <sup>a</sup>	24,46	31,41 <sup>a</sup>	23,01	35,43 <sup>a</sup>	23,58	74,12 <sup>cde</sup>	22,64
		G6328	84,26 <sup>f</sup>	35,10	54,61 <sup>c</sup>	28,41	73,10 <sup>e</sup>	31,24	66,68 <sup>a</sup>	22,36
		T475	65,73 <sup>e</sup>	31,45	51,57 <sup>c</sup>	28,64	59,00 <sup>d</sup>	29,92	77,85 <sup>e</sup>	17,86
L437		55,76 <sup>cd</sup>	34,23	43,27 <sup>b</sup>	32,42	49,80 <sup>c</sup>	33,35	73,04 <sup>bcd</sup>	21,95	
R3846		47,37 <sup>b</sup>	28,34	34,77 <sup>a</sup>	23,30	40,63 <sup>ab</sup>	25,58	72,61 <sup>bc</sup>	20,26	
R4052		58,47 <sup>d</sup>	33,48	43,25 <sup>b</sup>	31,78	50,20 <sup>c</sup>	32,32	69,65 <sup>ab</sup>	22,69	
R5487		51,29 <sup>bc</sup>	31,99	40,46 <sup>b</sup>	29,50	45,3 <sup>4bc</sup>	30,32	75,48 <sup>cde</sup>	20,92	
Descongel.	G2552	100,58 <sup>a</sup>	41,30	83,78 <sup>ab</sup>	39,47	88,92 <sup>ab</sup>	38,81	80,18 <sup>cd</sup>	18,72	
	G5223	104,95 <sup>ab</sup>	37,53	89,64 <sup>cd</sup>	38,84	94,88 <sup>cd</sup>	37,08	82,49 <sup>d</sup>	19,20	
	G6328	99,73 <sup>a</sup>	38,31	78,32 <sup>a</sup>	35,79	84,85 <sup>a</sup>	34,85	76,18 <sup>ab</sup>	19,39	
	T475	109,45 <sup>bc</sup>	37,95	88,78 <sup>bcd</sup>	37,88	96,05 <sup>cd</sup>	36,12	78,58 <sup>bc</sup>	19,56	
	L437	111,45 <sup>cd</sup>	40,92	92,98 <sup>d</sup>	41,71	98,33 <sup>d</sup>	40,22	80,89 <sup>cd</sup>	18,32	
	R3846	108,46 <sup>bc</sup>	41,53	88,10 <sup>bcd</sup>	40,87	94,76 <sup>cd</sup>	39,53	78,31 <sup>bc</sup>	19,71	
	R4052	116,68 <sup>d</sup>	37,09	90,08 <sup>cd</sup>	38,38	98,56 <sup>d</sup>	35,66	75,52 <sup>a</sup>	20,22	
	R5487	104,36 <sup>ab</sup>	39,09	85,07 <sup>bc</sup>	39,01	92,55 <sup>bc</sup>	37,43	79,74 <sup>c</sup>	18,82	

Tabla 9.13: Valores medios de los parámetros VCL, VSL, VAP y LIN para cada verraco, en presencia de cafeína, en el T0, en el descongelado y durante la prueba de la termorresistencia.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre verracos.

		CON CAFEÍNA								
		STR (%)		WOB (%)		ALH (µm)		BCF (Hz)		
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	
PRUEBA	T0	G2552	75,07 <sup>a</sup>	20,88	82,00 <sup>bc</sup>	15,90	1,63 <sup>b</sup>	0,91	6,15 <sup>b</sup>	2,73
		G5223	75,12 <sup>a</sup>	21,25	79,13 <sup>a</sup>	18,42	1,62 <sup>b</sup>	0,83	6,12 <sup>b</sup>	2,74
		G6328	75,78 <sup>a</sup>	20,82	83,32 <sup>cd</sup>	12,81	1,63 <sup>b</sup>	0,72	7,48 <sup>d</sup>	2,66
		T475	74,47 <sup>a</sup>	21,59	80,19 <sup>ab</sup>	16,10	1,66 <sup>b</sup>	0,83	6,68 <sup>c</sup>	2,81
		L437	75,87 <sup>a</sup>	21,45	81,71 <sup>abc</sup>	16,22	1,60 <sup>b</sup>	1,01	5,57 <sup>a</sup>	2,70
		R3846	73,77 <sup>a</sup>	21,32	79,92 <sup>ab</sup>	16,42	1,30 <sup>a</sup>	0,75	6,68 <sup>c</sup>	2,94
		R4052	75,35 <sup>a</sup>	22,20	84,85 <sup>d</sup>	12,81	1,82 <sup>c</sup>	1,09	6,21 <sup>b</sup>	2,72
		R5487	74,16 <sup>a</sup>	22,63	79,69 <sup>ab</sup>	16,92	1,56 <sup>b</sup>	0,85	6,35 <sup>bc</sup>	2,72
	T1,5	G2552	78,19 <sup>ab</sup>	19,93	85,88 <sup>bcd</sup>	12,51	1,83 <sup>de</sup>	0,93	6,82 <sup>ab</sup>	2,80
		G5223	80,50 <sup>bcd</sup>	19,35	83,74 <sup>ab</sup>	15,88	1,56 <sup>b</sup>	0,70	6,87 <sup>b</sup>	2,74
		G6328	76,23 <sup>a</sup>	20,53	86,07 <sup>cd</sup>	10,68	2,04 <sup>f</sup>	0,84	7,51 <sup>cd</sup>	2,51
		T475	84,12 <sup>e</sup>	16,91	87,28 <sup>d</sup>	10,96	1,75 <sup>cd</sup>	0,69	7,67 <sup>d</sup>	2,67
		L437	81,97 <sup>de</sup>	18,24	85,54 <sup>bcd</sup>	13,90	1,72 <sup>cd</sup>	0,86	6,42 <sup>a</sup>	2,71
		R3846	80,48 <sup>bcd</sup>	18,88	82,60 <sup>a</sup>	15,21	1,38 <sup>a</sup>	0,66	6,96 <sup>b</sup>	2,80
		R4052	78,73 <sup>abc</sup>	19,48	84,19 <sup>abc</sup>	12,21	1,93 <sup>ef</sup>	0,93	7,16 <sup>bc</sup>	2,56
		R5487	81,64 <sup>cde</sup>	18,20	82,87 <sup>a</sup>	15,20	1,67 <sup>bc</sup>	0,76	7,11 <sup>bc</sup>	2,92
	T3	G2552	81,02 <sup>bc</sup>	18,76	86,77 <sup>cd</sup>	12,04	1,64 <sup>b</sup>	0,83	6,79 <sup>abc</sup>	2,62
		G5223	80,79 <sup>bc</sup>	18,93	82,83 <sup>a</sup>	16,45	1,53 <sup>ab</sup>	0,73	6,76 <sup>ab</sup>	2,60
		G6328	73,72 <sup>a</sup>	22,72	86,55 <sup>c</sup>	8,82	2,29 <sup>e</sup>	0,98	7,61 <sup>e</sup>	2,77
		T475	84,94 <sup>cd</sup>	16,82	88,75 <sup>d</sup>	9,46	1,83 <sup>c</sup>	0,86	7,51 <sup>e</sup>	2,62
		L437	79,89 <sup>b</sup>	18,85	85,86 <sup>c</sup>	11,30	1,98 <sup>d</sup>	1,00	6,49 <sup>a</sup>	2,51
		R3846	83,30 <sup>d</sup>	16,53	85,15 <sup>bc</sup>	13,65	1,39 <sup>a</sup>	0,71	7,22 <sup>cde</sup>	2,64
		R4052	81,18 <sup>bc</sup>	17,97	84,85 <sup>abc</sup>	11,04	2,15 <sup>e</sup>	0,99	7,24 <sup>de</sup>	2,46
		R5487	82,56 <sup>bcd</sup>	17,76	83,66 <sup>ab</sup>	15,48	1,44 <sup>a</sup>	0,76	6,96 <sup>bcd</sup>	2,74
	T4,5	G2552	82,91 <sup>b</sup>	17,61	87,11 <sup>cd</sup>	11,05	2,04 <sup>bc</sup>	1,17	6,76 <sup>a</sup>	2,55
		G5223	81,34 <sup>b</sup>	18,56	83,80 <sup>ab</sup>	15,05	1,63 <sup>a</sup>	0,84	6,96 <sup>ab</sup>	2,75
		G6328	73,61 <sup>a</sup>	24,34	86,94 <sup>cd</sup>	8,66	2,64 <sup>d</sup>	1,19	6,99 <sup>ab</sup>	3,03
		T475	87,37 <sup>c</sup>	14,78	88,42 <sup>d</sup>	8,91	2,00 <sup>b</sup>	0,90	7,71 <sup>c</sup>	2,60
L437		82,26 <sup>b</sup>	16,37	85,43 <sup>bc</sup>	11,62	2,19 <sup>c</sup>	1,05	6,91 <sup>ab</sup>	2,70	
R3846		83,59 <sup>b</sup>	16,21	83,41 <sup>a</sup>	13,35	1,64 <sup>a</sup>	0,87	7,10 <sup>ab</sup>	2,70	
R4052		83,17 <sup>b</sup>	17,54	85,91 <sup>c</sup>	11,50	2,09 <sup>bc</sup>	0,94	7,34 <sup>bc</sup>	2,50	
R5487		82,35 <sup>b</sup>	16,64	85,14 <sup>abc</sup>	13,61	1,64 <sup>a</sup>	0,91	7,19 <sup>ab</sup>	2,63	
T7	G2552	87,14 <sup>d</sup>	14,43	87,10 <sup>cd</sup>	12,29	1,59 <sup>b</sup>	0,87	6,90 <sup>a</sup>	2,60	
	G5223	85,19 <sup>bcd</sup>	17,85	84,95 <sup>abc</sup>	15,43	1,31 <sup>a</sup>	0,67	6,95 <sup>a</sup>	2,49	
	G6328	76,33 <sup>a</sup>	22,28	86,47 <sup>bcd</sup>	9,06	2,43 <sup>d</sup>	1,10	7,17 <sup>ab</sup>	2,81	
	T475	87,37 <sup>d</sup>	15,35	88,49 <sup>d</sup>	10,15	1,77 <sup>c</sup>	0,82	8,06 <sup>d</sup>	2,67	
	L437	83,28 <sup>bc</sup>	18,03	86,12 <sup>bc</sup>	13,78	1,65 <sup>bc</sup>	0,79	7,01 <sup>ab</sup>	2,71	
	R3846	84,77 <sup>bcd</sup>	16,50	84,23 <sup>ab</sup>	12,43	1,56 <sup>b</sup>	0,83	7,72 <sup>cd</sup>	2,74	
	R4052	82,32 <sup>b</sup>	18,23	82,69 <sup>a</sup>	14,78	1,81 <sup>c</sup>	0,82	7,47 <sup>bc</sup>	2,69	
	R5487	86,26 <sup>cd</sup>	16,59	86,00 <sup>bc</sup>	13,19	1,54 <sup>b</sup>	0,81	7,26 <sup>abc</sup>	2,75	
Descongel.	G2552	91,28 <sup>bc</sup>	13,57	86,60 <sup>bc</sup>	12,62	2,54 <sup>ab</sup>	1,16	9,06 <sup>bcd</sup>	3,42	
	G5223	91,73 <sup>bc</sup>	15,06	88,68 <sup>d</sup>	12,09	2,46 <sup>a</sup>	1,02	9,30 <sup>cd</sup>	3,74	
	G6328	89,71 <sup>ab</sup>	14,66	83,60 <sup>a</sup>	13,26	2,79 <sup>d</sup>	1,29	9,01 <sup>bcd</sup>	3,30	
	T475	89,90 <sup>ab</sup>	15,18	86,21 <sup>bc</sup>	12,83	2,84 <sup>d</sup>	1,25	8,28 <sup>a</sup>	3,42	
	L437	92,42 <sup>c</sup>	12,55	86,44 <sup>bc</sup>	12,91	2,68 <sup>bcd</sup>	1,17	9,93 <sup>e</sup>	3,81	
	R3846	90,25 <sup>ab</sup>	14,47	85,48 <sup>b</sup>	13,62	2,72 <sup>cd</sup>	1,26	8,81 <sup>bc</sup>	3,74	
	R4052	89,20 <sup>a</sup>	16,10	83,43 <sup>a</sup>	13,36	3,15 <sup>e</sup>	1,31	9,39 <sup>d</sup>	3,72	
	R5487	90,28 <sup>ab</sup>	14,99	87,42 <sup>cd</sup>	11,82	2,57 <sup>abc</sup>	1,14	8,75 <sup>ab</sup>	3,80	

Tabla 9.14: Valores medios de los parámetros STR, WOB, ALH y BCF para cada verraco, en presencia de cafeína, en el T0, en el descongelado y durante la prueba de la termorresistencia.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre verracos.

		SIN CAFEÍNA								
		VCL ( $\mu\text{m/s}$ )		VSL ( $\mu\text{m/s}$ )		VAP ( $\mu\text{m/s}$ )		LIN (%)		
		Media	Desv.	Media	Desv.	Media	Desv.	Media	Desv.	
			típ.		típ.		típ.		típ.	
PRUEBA	T0	G2552	47,25 <sup>a</sup>	33,60	28,96 <sup>a</sup>	26,27	38,82 <sup>a</sup>	31,93	54,86 <sup>abc</sup>	24,72
		G5223	49,75 <sup>ab</sup>	30,83	31,19 <sup>ab</sup>	24,95	41,53 <sup>ab</sup>	29,89	57,59 <sup>c</sup>	25,54
		G6328	60,52 <sup>c</sup>	34,94	35,34 <sup>b</sup>	25,77	50,94 <sup>d</sup>	32,62	56,72 <sup>bc</sup>	23,01
		T475	48,99 <sup>ab</sup>	30,82	28,36 <sup>a</sup>	24,48	39,70 <sup>ab</sup>	28,80	53,41 <sup>ab</sup>	24,90
		L437	59,86 <sup>c</sup>	44,67	34,12 <sup>b</sup>	34,09	48,13 <sup>cd</sup>	40,71	51,60 <sup>a</sup>	24,20
		R3846	49,22 <sup>ab</sup>	31,74	29,03 <sup>a</sup>	25,69	40,56 <sup>ab</sup>	29,58	54,39 <sup>abc</sup>	23,88
		R4052	57,82 <sup>c</sup>	36,54	35,01 <sup>b</sup>	27,11	48,30 <sup>cd</sup>	33,49	58,02 <sup>c</sup>	23,61
		R5487	54,84 <sup>bc</sup>	35,12	32,28 <sup>ab</sup>	27,50	44,82 <sup>bc</sup>	32,56	55,07 <sup>abc</sup>	25,28
	S0	G2552	86,97 <sup>a</sup>	45,04	44,61 <sup>a</sup>	28,15	56,54 <sup>a</sup>	29,92	54,76 <sup>abc</sup>	19,09
		G5223	68,96 <sup>a</sup>	43,12	40,32 <sup>a</sup>	30,12	47,76 <sup>a</sup>	31,51	55,90 <sup>abc</sup>	20,63
		G6328	85,28 <sup>a</sup>	40,77	44,35 <sup>a</sup>	24,68	56,85 <sup>a</sup>	27,18	53,55 <sup>abc</sup>	16,34
		T475	94,56 <sup>a</sup>	45,42	44,80 <sup>a</sup>	29,43	59,91 <sup>a</sup>	30,46	48,24 <sup>ab</sup>	19,82
		L437	86,99 <sup>a</sup>	48,62	47,25 <sup>a</sup>	33,10	61,45 <sup>a</sup>	35,13	54,86 <sup>abc</sup>	20,60
		R3846	76,62 <sup>a</sup>	35,06	46,64 <sup>a</sup>	26,19	57,95 <sup>a</sup>	27,56	60,72 <sup>c</sup>	19,30
		R4052	76,30 <sup>a</sup>	41,95	30,26 <sup>a</sup>	21,16	49,48 <sup>a</sup>	31,07	40,09 <sup>a</sup>	18,86
		R5487	79,26 <sup>a</sup>	44,30	45,54 <sup>a</sup>	28,78	55,74 <sup>a</sup>	30,40	57,50 <sup>abc</sup>	19,01
	S1	G2552	78,17 <sup>a</sup>	49,91	35,77 <sup>a</sup>	25,06	53,76 <sup>a</sup>	33,81	46,73 <sup>ab</sup>	19,09
		G5223	96,79 <sup>b</sup>	41,31	49,31 <sup>b</sup>	25,50	64,33 <sup>abc</sup>	27,69	52,45 <sup>ab</sup>	19,31
		G6328	107,11 <sup>bc</sup>	40,98	51,74 <sup>b</sup>	26,33	64,74 <sup>abc</sup>	25,50	48,02 <sup>ab</sup>	18,36
		T475	117,01 <sup>c</sup>	38,09	49,36 <sup>b</sup>	21,51	67,81 <sup>bc</sup>	21,34	43,99 <sup>a</sup>	16,93
		L437	104,33 <sup>bc</sup>	42,83	55,42 <sup>b</sup>	33,61	73,00 <sup>c</sup>	31,31	54,51 <sup>b</sup>	24,18
		R3846	104,16 <sup>bc</sup>	34,67	52,79 <sup>b</sup>	23,23	67,86 <sup>bc</sup>	22,07	51,87 <sup>ab</sup>	17,93
		R4052	93,95 <sup>ab</sup>	34,49	44,50 <sup>ab</sup>	23,80	59,03 <sup>ac</sup>	22,66	47,72 <sup>ab</sup>	18,44
		R5487	107,49 <sup>bc</sup>	39,93	55,58 <sup>b</sup>	26,92	70,70 <sup>bc</sup>	26,51	53,19 <sup>b</sup>	19,34
	S2	G2552	75,07 <sup>a</sup>	38,91	40,85 <sup>a</sup>	24,94	51,74 <sup>a</sup>	25,88	56,11 <sup>b</sup>	21,83
		G5223	99,17 <sup>bc</sup>	42,27	53,31 <sup>b</sup>	26,86	66,10 <sup>b</sup>	26,91	54,87 <sup>b</sup>	19,49
		G6328	113,13 <sup>cd</sup>	41,24	48,22 <sup>ab</sup>	22,91	64,48 <sup>b</sup>	22,72	42,93 <sup>a</sup>	17,28
		T475	120,88 <sup>d</sup>	38,04	49,34 <sup>ab</sup>	23,77	78,27 <sup>c</sup>	23,84	44,12 <sup>a</sup>	22,12
L437		100,03 <sup>bc</sup>	40,57	47,43 <sup>ab</sup>	25,55	68,67 <sup>b</sup>	29,06	49,30 <sup>ab</sup>	19,78	
R3846		95,07 <sup>b</sup>	37,83	49,66 <sup>ab</sup>	22,96	63,35 <sup>b</sup>	24,40	54,35 <sup>b</sup>	19,86	
R4052		104,76 <sup>bc</sup>	32,68	53,61 <sup>b</sup>	25,36	66,72 <sup>b</sup>	23,57	51,68 <sup>b</sup>	17,88	
R5487		105,60 <sup>bc</sup>	37,47	55,75 <sup>b</sup>	23,76	70,54 <sup>bc</sup>	23,74	55,12 <sup>b</sup>	19,33	
S3	G2552	74,95 <sup>a</sup>	39,90	43,70 <sup>a</sup>	24,89	56,69 <sup>a</sup>	29,53	61,14 <sup>d</sup>	21,02	
	G5223	91,25 <sup>b</sup>	44,64	50,89 <sup>abc</sup>	28,50	64,03 <sup>abc</sup>	29,55	57,31 <sup>cd</sup>	20,89	
	G6328	119,31 <sup>d</sup>	39,23	48,93 <sup>ab</sup>	24,01	67,46 <sup>ab</sup>	23,60	41,85 <sup>a</sup>	17,71	
	T475	105,36 <sup>c</sup>	40,37	48,02 <sup>ab</sup>	23,62	66,65 <sup>bc</sup>	26,15	48,22 <sup>ab</sup>	17,26	
	L437	103,30 <sup>bc</sup>	35,59	58,27 <sup>c</sup>	26,28	72,68 <sup>c</sup>	24,74	57,87 <sup>cd</sup>	20,68	
	R3846	101,33 <sup>bc</sup>	34,56	47,40 <sup>ab</sup>	21,55	63,34 <sup>bc</sup>	20,48	48,18 <sup>ab</sup>	17,95	
	R4052	109,15 <sup>cd</sup>	38,55	54,16 <sup>bc</sup>	26,64	67,38 <sup>bc</sup>	25,11	51,37 <sup>bc</sup>	19,08	
	R5487	97,26 <sup>bc</sup>	41,07	54,27 <sup>bc</sup>	28,49	68,18 <sup>bc</sup>	29,23	56,61 <sup>cd</sup>	19,20	
S5	G2552	76,80 <sup>a</sup>	40,33	40,55 <sup>a</sup>	22,44	53,03 <sup>a</sup>	25,74	56,28 <sup>c</sup>	20,98	
	G5223	84,69 <sup>a</sup>	42,48	49,86 <sup>bc</sup>	28,15	60,14 <sup>ab</sup>	29,78	59,82 <sup>c</sup>	19,90	
	G6328	121,14 <sup>c</sup>	41,85	44,98 <sup>ab</sup>	22,03	65,59 <sup>bc</sup>	24,38	38,53 <sup>a</sup>	16,76	
	T475	107,96 <sup>b</sup>	44,72	46,61 <sup>ab</sup>	25,11	66,65 <sup>bc</sup>	25,59	45,30 <sup>b</sup>	19,69	
	L437	99,33 <sup>b</sup>	40,69	55,44 <sup>c</sup>	31,06	71,67 <sup>c</sup>	29,94	58,01 <sup>c</sup>	22,23	
	R3846	101,11 <sup>b</sup>	37,22	45,27 <sup>ab</sup>	23,04	62,50 <sup>b</sup>	23,25	46,32 <sup>b</sup>	19,89	
	R4052	106,63 <sup>b</sup>	36,89	49,86 <sup>bc</sup>	23,93	64,58 <sup>bc</sup>	23,07	48,04 <sup>b</sup>	17,66	
	R5487	85,54 <sup>a</sup>	40,68	46,90 <sup>ab</sup>	28,43	60,83 <sup>ab</sup>	30,27	56,05 <sup>c</sup>	20,62	

Tabla 9.15: Valores medios de los parámetros VCL, VSL, VAP y LIN para cada verraco, en ausencia de cafeína, en el T0 y durante la prueba del choque a frigore.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre verracos.

		SIN CAFEÍNA							
		STR (%)		WOB (%)		ALH (µm)		BCF (Hz)	
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
T0	G2552	70,57 <sup>abc</sup>	21,69	75,09 <sup>a</sup>	18,08	1,59 <sup>a</sup>	0,83	6,53 <sup>b</sup>	2,93
	G5223	72,10 <sup>c</sup>	21,88	77,29 <sup>ab</sup>	18,50	1,64 <sup>a</sup>	0,80	6,38 <sup>ab</sup>	2,89
	G6328	69,07 <sup>abc</sup>	22,24	80,49 <sup>d</sup>	13,79	1,91 <sup>cd</sup>	0,90	7,19 <sup>c</sup>	2,99
	T475	67,84 <sup>ab</sup>	23,00	76,06 <sup>ab</sup>	16,40	1,73 <sup>ab</sup>	0,85	6,56 <sup>b</sup>	2,62
	L437	66,84 <sup>a</sup>	23,01	75,05 <sup>a</sup>	15,63	2,06 <sup>d</sup>	1,23	5,89 <sup>a</sup>	2,76
	R3846	68,03 <sup>ab</sup>	22,64	77,96 <sup>bcd</sup>	15,30	1,66 <sup>a</sup>	0,85	6,82 <sup>bc</sup>	2,98
	R4052	70,95 <sup>cd</sup>	22,35	80,04 <sup>cd</sup>	14,77	1,95 <sup>cd</sup>	1,08	6,42 <sup>b</sup>	2,91
	R5487	68,87 <sup>abc</sup>	23,81	77,63 <sup>abc</sup>	16,22	1,84 <sup>bc</sup>	0,99	6,53 <sup>b</sup>	3,10
S0	G2552	79,48 <sup>b</sup>	16,27	67,82 <sup>ab</sup>	15,56	3,37 <sup>ab</sup>	1,84	7,68 <sup>ab</sup>	2,81
	G5223	80,17 <sup>b</sup>	16,62	67,67 <sup>ab</sup>	15,66	2,73 <sup>a</sup>	1,98	6,88 <sup>ab</sup>	2,85
	G6328	78,32 <sup>b</sup>	17,09	67,48 <sup>ab</sup>	10,35	3,48 <sup>ab</sup>	1,73	7,83 <sup>ab</sup>	3,98
	T475	72,21 <sup>ab</sup>	18,13	64,72 <sup>a</sup>	14,79	4,13 <sup>b</sup>	2,26	6,43 <sup>a</sup>	3,26
	L437	75,88 <sup>b</sup>	21,31	70,51 <sup>ab</sup>	12,48	3,16 <sup>ab</sup>	1,81	7,80 <sup>ab</sup>	3,52
	R3846	79,53 <sup>b</sup>	18,77	75,19 <sup>b</sup>	13,10	2,84 <sup>a</sup>	1,42	8,57 <sup>b</sup>	3,26
	R4052	63,72 <sup>a</sup>	23,30	62,51 <sup>a</sup>	14,40	3,14 <sup>ab</sup>	1,69	7,48 <sup>ab</sup>	3,21
	R5487	79,66 <sup>b</sup>	17,47	71,10 <sup>ab</sup>	13,77	2,97 <sup>ab</sup>	1,82	7,00 <sup>ab</sup>	3,09
S1	G2552	68,06 <sup>a</sup>	19,92	67,43 <sup>cd</sup>	14,26	2,94 <sup>a</sup>	1,78	7,63 <sup>a</sup>	3,13
	G5223	76,37 <sup>ab</sup>	18,43	67,39 <sup>cd</sup>	13,91	4,02 <sup>b</sup>	1,84	7,45 <sup>a</sup>	2,94
	G6328	76,84 <sup>ab</sup>	19,35	61,06 <sup>ab</sup>	12,99	4,48 <sup>bc</sup>	1,94	6,94 <sup>a</sup>	3,16
	T475	72,95 <sup>ab</sup>	20,31	60,42 <sup>a</sup>	14,15	4,97 <sup>c</sup>	2,00	6,73 <sup>a</sup>	2,90
	L437	75,00 <sup>ab</sup>	25,57	70,67 <sup>d</sup>	12,99	3,90 <sup>b</sup>	2,05	7,58 <sup>a</sup>	3,60
	R3846	76,83 <sup>ab</sup>	18,44	66,65 <sup>abcd</sup>	12,63	4,35 <sup>bc</sup>	1,73	7,46 <sup>a</sup>	3,13
	R4052	73,99 <sup>ab</sup>	22,18	63,50 <sup>abc</sup>	11,60	3,98 <sup>b</sup>	1,64	7,76 <sup>a</sup>	3,10
	R5487	77,75 <sup>b</sup>	18,86	67,30 <sup>bcd</sup>	13,55	4,37 <sup>bc</sup>	1,86	7,22 <sup>a</sup>	3,24
S2	G2552	76,98 <sup>bc</sup>	20,16	70,88 <sup>c</sup>	15,78	2,84 <sup>a</sup>	1,64	7,34 <sup>a</sup>	2,79
	G5223	78,36 <sup>c</sup>	17,62	68,64 <sup>bc</sup>	13,87	3,96 <sup>b</sup>	1,95	7,52 <sup>a</sup>	2,85
	G6328	72,20 <sup>abc</sup>	20,24	58,42 <sup>a</sup>	14,09	4,96 <sup>c</sup>	2,14	6,49 <sup>a</sup>	3,14
	T475	65,36 <sup>a</sup>	25,23	67,19 <sup>bc</sup>	15,25	4,94 <sup>c</sup>	1,96	6,55 <sup>a</sup>	3,00
	L437	70,74 <sup>ab</sup>	23,13	68,93 <sup>bc</sup>	11,82	3,99 <sup>b</sup>	1,61	7,19 <sup>a</sup>	2,94
	R3846	78,31 <sup>bc</sup>	19,58	68,63 <sup>bc</sup>	13,89	3,83 <sup>b</sup>	1,86	7,52 <sup>a</sup>	3,11
	R4052	78,79 <sup>c</sup>	17,83	64,45 <sup>b</sup>	12,77	4,41 <sup>bc</sup>	1,51	7,58 <sup>a</sup>	2,83
	R5487	78,94 <sup>c</sup>	17,84	68,71 <sup>bc</sup>	13,45	4,27 <sup>bc</sup>	1,87	7,25 <sup>a</sup>	3,25
S3	G2552	77,69 <sup>bc</sup>	19,65	77,85 <sup>d</sup>	16,11	2,59 <sup>a</sup>	1,66	7,47 <sup>bc</sup>	2,89
	G5223	77,97 <sup>bc</sup>	19,72	72,23 <sup>c</sup>	14,87	3,56 <sup>b</sup>	2,06	7,18 <sup>bc</sup>	3,35
	G6328	70,98 <sup>a</sup>	19,22	57,88 <sup>a</sup>	13,59	5,17 <sup>e</sup>	2,13	6,07 <sup>a</sup>	2,79
	T475	72,88 <sup>ab</sup>	17,78	65,71 <sup>b</sup>	14,18	4,37 <sup>cd</sup>	1,98	6,57 <sup>ab</sup>	2,73
	L437	79,55 <sup>c</sup>	19,32	71,60 <sup>c</sup>	13,78	3,94 <sup>bcd</sup>	1,70	7,62 <sup>c</sup>	3,25
	R3846	73,52 <sup>abc</sup>	18,73	64,43 <sup>b</sup>	13,06	4,32 <sup>cd</sup>	1,78	7,39 <sup>bc</sup>	2,78
	R4052	78,87 <sup>bc</sup>	16,93	63,90 <sup>b</sup>	14,68	4,51 <sup>de</sup>	1,92	6,93 <sup>abc</sup>	3,13
	R5487	78,21 <sup>bc</sup>	18,45	71,42 <sup>c</sup>	13,47	3,77 <sup>bc</sup>	1,79	7,76 <sup>c</sup>	2,92
S5	G2552	76,70 <sup>bc</sup>	18,71	71,78 <sup>c</sup>	15,19	3,16 <sup>a</sup>	1,84	6,83 <sup>abc</sup>	2,88
	G5223	81,50 <sup>c</sup>	17,61	72,19 <sup>c</sup>	13,82	3,24 <sup>a</sup>	1,86	7,75 <sup>c</sup>	3,19
	G6328	68,24 <sup>a</sup>	18,75	55,76 <sup>a</sup>	14,65	5,33 <sup>c</sup>	2,09	6,04 <sup>a</sup>	3,09
	T475	69,10 <sup>a</sup>	21,21	64,98 <sup>b</sup>	15,15	4,50 <sup>b</sup>	2,17	6,37 <sup>ab</sup>	3,07
	L437	77,60 <sup>c</sup>	22,92	73,37 <sup>c</sup>	12,95	3,65 <sup>a</sup>	1,77	7,18 <sup>bc</sup>	3,60
	R3846	71,00 <sup>ab</sup>	20,80	64,22 <sup>b</sup>	15,55	4,33 <sup>b</sup>	1,90	6,50 <sup>ab</sup>	2,84
	R4052	75,92 <sup>bc</sup>	18,76	62,07 <sup>b</sup>	13,23	4,56 <sup>b</sup>	1,78	7,00 <sup>abc</sup>	2,79
	R5487	76,47 <sup>bc</sup>	20,00	72,19 <sup>c</sup>	14,37	3,31 <sup>a</sup>	1,69	7,15 <sup>bc</sup>	3,25

Tabla 9.16: Valores medios de los parámetros STR, WOB, ALH y BCF para cada verraco, en ausencia de cafeína, en el T0 y durante la prueba del choque a frigore.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre verracos.

		CON CAFEÍNA								
		VCL (µm/s)		VSL (µm/s)		VAP (µm/s)		LIN (%)		
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	
PRUEBA	T0	G2552	52,51 <sup>cd</sup>	35,61	35,16 <sup>cd</sup>	27,65	45,72 <sup>cd</sup>	33,67	62,99 <sup>ab</sup>	23,74
		G5223	49,73 <sup>bc</sup>	32,09	34,40 <sup>bcd</sup>	28,75	42,43 <sup>bc</sup>	31,44	61,74 <sup>ab</sup>	26,15
		G6328	50,06 <sup>bc</sup>	26,60	32,99 <sup>bc</sup>	21,57	42,88 <sup>bc</sup>	24,85	64,29 <sup>a</sup>	22,39
		T475	50,76 <sup>bc</sup>	31,28	33,72 <sup>bcd</sup>	26,63	43,06 <sup>bc</sup>	29,89	61,43 <sup>ab</sup>	24,71
		L437	50,54 <sup>bc</sup>	39,74	35,40 <sup>cd</sup>	33,77	44,03 <sup>c</sup>	37,98	63,96 <sup>ab</sup>	25,23
		R3846	38,83 <sup>a</sup>	28,47	25,86 <sup>a</sup>	23,90	32,92 <sup>a</sup>	26,88	60,62 <sup>ab</sup>	24,55
		R4052	57,10 <sup>d</sup>	37,79	38,33 <sup>d</sup>	29,21	49,65 <sup>d</sup>	34,11	65,18 <sup>b</sup>	23,96
		R5487	45,72 <sup>b</sup>	29,88	30,33 <sup>ab</sup>	26,18	38,39 <sup>b</sup>	28,25	61,19 <sup>ab</sup>	26,02
	S0	G2552	85,89 <sup>a</sup>	38,76	52,49 <sup>ab</sup>	28,99	64,98 <sup>ab</sup>	29,25	62,50 <sup>b</sup>	20,98
		G5223	94,53 <sup>a</sup>	43,39	59,33 <sup>b</sup>	36,48	73,98 <sup>ab</sup>	36,07	62,31 <sup>b</sup>	24,62
		G6328	85,32 <sup>a</sup>	47,89	38,15 <sup>a</sup>	29,05	58,99 <sup>a</sup>	33,72	47,04 <sup>a</sup>	25,40
		T475	104,19 <sup>a</sup>	46,73	57,53 <sup>b</sup>	32,21	76,57 <sup>ab</sup>	32,26	57,99 <sup>ab</sup>	24,00
		L437	96,06 <sup>a</sup>	44,84	52,02 <sup>ab</sup>	34,59	76,25 <sup>ab</sup>	39,33	55,50 <sup>ab</sup>	24,10
		R3846	97,70 <sup>a</sup>	44,64	58,20 <sup>b</sup>	36,26	82,01 <sup>b</sup>	37,56	60,90 <sup>b</sup>	24,93
		R4052	105,94 <sup>a</sup>	36,81	55,61 <sup>ab</sup>	26,69	77,96 <sup>ab</sup>	29,05	55,95 <sup>ab</sup>	23,71
		R5487	107,85 <sup>a</sup>	45,26	65,42 <sup>b</sup>	38,52	82,24 <sup>b</sup>	36,93	61,39 <sup>b</sup>	22,97
	S1	G2552	116,23 <sup>bc</sup>	42,03	46,19 <sup>a</sup>	26,04	79,65 <sup>ab</sup>	28,27	43,49 <sup>a</sup>	24,95
		G5223	103,21 <sup>ab</sup>	33,12	67,60 <sup>bc</sup>	29,85	81,31 <sup>ab</sup>	26,34	66,21 <sup>b</sup>	21,99
		G6328	115,53 <sup>abc</sup>	46,08	66,45 <sup>bc</sup>	34,89	79,13 <sup>ab</sup>	33,74	57,76 <sup>b</sup>	21,47
		T475	115,39 <sup>abc</sup>	43,35	70,26 <sup>c</sup>	34,58	83,98 <sup>b</sup>	33,19	60,12 <sup>b</sup>	22,12
		L437	104,10 <sup>ab</sup>	40,26	56,98 <sup>ab</sup>	31,61	79,24 <sup>ab</sup>	29,20	57,81 <sup>b</sup>	27,21
		R3846	99,32 <sup>a</sup>	39,39	56,79 <sup>ab</sup>	28,77	71,57 <sup>a</sup>	28,18	58,55 <sup>b</sup>	20,85
		R4052	125,74 <sup>c</sup>	38,33	72,95 <sup>c</sup>	33,82	88,67 <sup>b</sup>	29,39	58,06 <sup>b</sup>	19,53
		R5487	110,98 <sup>abc</sup>	37,76	66,32 <sup>bc</sup>	31,69	81,14 <sup>ab</sup>	28,86	59,83 <sup>b</sup>	21,38
	S2	G2552	84,24 <sup>a</sup>	47,52	44,95 <sup>a</sup>	28,28	60,80 <sup>a</sup>	33,27	58,48 <sup>abc</sup>	25,95
		G5223	101,00 <sup>b</sup>	41,39	64,86 <sup>bc</sup>	34,09	77,62 <sup>bc</sup>	33,37	64,98 <sup>c</sup>	22,55
		G6328	104,91 <sup>b</sup>	44,98	56,68 <sup>b</sup>	28,05	69,07 <sup>ab</sup>	29,79	54,71 <sup>a</sup>	18,78
		T475	110,46 <sup>b</sup>	43,53	67,00 <sup>bc</sup>	29,75	79,74 <sup>bc</sup>	29,53	62,47 <sup>bc</sup>	19,56
L437		114,36 <sup>b</sup>	40,69	65,87 <sup>bc</sup>	33,92	82,63 <sup>c</sup>	29,61	59,84 <sup>abc</sup>	23,91	
R3846		112,37 <sup>b</sup>	44,12	62,41 <sup>bc</sup>	31,25	79,26 <sup>bc</sup>	31,27	56,86 <sup>ab</sup>	19,73	
R4052		114,07 <sup>b</sup>	39,86	68,12 <sup>c</sup>	30,63	81,22 <sup>c</sup>	29,45	59,91 <sup>abc</sup>	18,06	
R5487		113,74 <sup>b</sup>	41,22	64,97 <sup>bc</sup>	32,31	82,08 <sup>c</sup>	30,61	57,61 <sup>ab</sup>	21,36	
S3	G2552	82,88 <sup>a</sup>	42,01	42,28 <sup>a</sup>	22,93	60,22 <sup>a</sup>	27,53	57,28 <sup>abc</sup>	24,61	
	G5223	102,15 <sup>b</sup>	37,98	66,65 <sup>b</sup>	31,86	78,94 <sup>b</sup>	31,52	66,04 <sup>d</sup>	21,93	
	G6328	122,76 <sup>d</sup>	49,01	63,08 <sup>b</sup>	33,12	81,72 <sup>b</sup>	33,34	51,98 <sup>a</sup>	20,12	
	T475	109,51 <sup>bc</sup>	46,16	65,09 <sup>b</sup>	32,16	76,69 <sup>b</sup>	31,34	60,11 <sup>bcd</sup>	19,89	
	L437	111,13 <sup>bcd</sup>	37,73	62,40 <sup>b</sup>	26,84	81,82 <sup>b</sup>	26,04	59,36 <sup>bc</sup>	22,56	
	R3846	108,23 <sup>bc</sup>	41,58	60,38 <sup>b</sup>	32,83	76,95 <sup>b</sup>	31,15	55,36 <sup>ab</sup>	20,66	
	R4052	116,34 <sup>cd</sup>	34,73	66,59 <sup>b</sup>	28,42	80,68 <sup>b</sup>	26,08	57,80 <sup>abc</sup>	17,83	
	R5487	101,74 <sup>b</sup>	39,61	63,76 <sup>b</sup>	31,28	76,01 <sup>b</sup>	30,05	62,79 <sup>cd</sup>	20,72	
S5	G2552	76,22 <sup>a</sup>	48,31	42,11 <sup>a</sup>	27,03	56,37 <sup>a</sup>	31,12	60,28 <sup>bc</sup>	22,96	
	G5223	91,30 <sup>bc</sup>	38,02	60,62 <sup>cd</sup>	27,53	70,42 <sup>bcd</sup>	27,94	67,67 <sup>d</sup>	19,61	
	G6328	114,99 <sup>e</sup>	44,47	57,38 <sup>abc</sup>	28,26	75,94 <sup>cd</sup>	28,53	51,12 <sup>a</sup>	19,31	
	T475	93,36 <sup>bcd</sup>	41,01	55,97 <sup>abc</sup>	28,08	67,53 <sup>bc</sup>	27,83	61,64 <sup>bc</sup>	20,82	
	L437	104,42 <sup>de</sup>	50,39	64,03 <sup>d</sup>	34,60	76,84 <sup>d</sup>	34,57	63,12 <sup>cd</sup>	21,69	
	R3846	94,52 <sup>bcd</sup>	40,80	51,42 <sup>b</sup>	24,86	65,15 <sup>ab</sup>	26,32	56,49 <sup>ab</sup>	20,19	
	R4052	100,45 <sup>cd</sup>	44,15	60,60 <sup>cd</sup>	33,20	70,81 <sup>bcd</sup>	33,10	60,00 <sup>bc</sup>	19,55	
	R5487	86,49 <sup>ab</sup>	47,67	53,41 <sup>bc</sup>	35,24	65,39 <sup>ab</sup>	36,46	61,15 <sup>bc</sup>	21,59	

Tabla 9.17: Valores medios de los parámetros VCL, VSL, VAP y LIN para cada verraco, en presencia de cafeína, en el T0 y durante la prueba del choque a frigore.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre verracos.



		CON CAFEÍNA							
		STR (%)		WOB (%)		ALH ( $\mu\text{m}$ )		BCF (Hz)	
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
T0	G2552	75,07 <sup>a</sup>	20,88	82,00 <sup>bc</sup>	15,90	1,63 <sup>b</sup>	0,91	6,15 <sup>b</sup>	2,73
	G5223	75,12 <sup>a</sup>	21,25	79,13 <sup>a</sup>	18,42	1,62 <sup>b</sup>	0,83	6,12 <sup>b</sup>	2,74
	G6328	75,78 <sup>a</sup>	20,82	83,32 <sup>cd</sup>	12,81	1,63 <sup>b</sup>	0,72	7,48 <sup>d</sup>	2,66
	T475	74,47 <sup>a</sup>	21,59	80,19 <sup>ab</sup>	16,10	1,66 <sup>b</sup>	0,83	6,68 <sup>c</sup>	2,81
	L437	75,87 <sup>a</sup>	21,45	81,71 <sup>abc</sup>	16,22	1,60 <sup>b</sup>	1,01	5,57 <sup>a</sup>	2,70
	R3846	73,77 <sup>a</sup>	21,32	79,92 <sup>ab</sup>	16,42	1,30 <sup>a</sup>	0,75	6,68 <sup>c</sup>	2,94
	R4052	75,35 <sup>a</sup>	22,20	84,85 <sup>d</sup>	12,81	1,82 <sup>c</sup>	1,09	6,21 <sup>b</sup>	2,72
	R5487	74,16 <sup>a</sup>	22,63	79,69 <sup>ab</sup>	16,92	1,56 <sup>b</sup>	0,85	6,35 <sup>bc</sup>	2,72
S0	G2552	80,18 <sup>b</sup>	19,61	76,58 <sup>a</sup>	12,04	3,03 <sup>ab</sup>	1,34	7,25 <sup>b</sup>	3,46
	G5223	78,58 <sup>b</sup>	22,81	77,71 <sup>ab</sup>	14,83	3,23 <sup>ab</sup>	1,67	7,59 <sup>b</sup>	3,38
	G6328	64,96 <sup>a</sup>	26,48	70,75 <sup>a</sup>	15,22	3,05 <sup>ab</sup>	1,86	5,24 <sup>a</sup>	3,52
	T475	75,47 <sup>ab</sup>	25,29	75,86 <sup>a</sup>	12,31	3,93 <sup>b</sup>	2,04	7,16 <sup>ab</sup>	3,32
	L437	70,50 <sup>ab</sup>	26,30	77,89 <sup>ab</sup>	13,14	3,00 <sup>ab</sup>	1,38	7,86 <sup>b</sup>	3,58
	R3846	72,01 <sup>ab</sup>	26,50	83,73 <sup>b</sup>	10,28	2,90 <sup>a</sup>	1,48	7,59 <sup>b</sup>	3,50
	R4052	73,91 <sup>ab</sup>	24,41	74,51 <sup>a</sup>	14,25	3,84 <sup>b</sup>	1,71	6,63 <sup>ab</sup>	4,11
	R5487	78,37 <sup>b</sup>	22,22	77,17 <sup>ab</sup>	14,10	3,45 <sup>ab</sup>	1,93	6,59 <sup>ab</sup>	3,82
S1	G2552	60,44 <sup>a</sup>	27,88	70,11 <sup>a</sup>	12,26	4,65 <sup>c</sup>	1,78	6,07 <sup>a</sup>	3,58
	G5223	81,87 <sup>c</sup>	20,13	79,60 <sup>c</sup>	12,47	3,51 <sup>a</sup>	1,61	7,40 <sup>ab</sup>	3,70
	G6328	81,03 <sup>bc</sup>	19,21	69,76 <sup>a</sup>	15,31	4,37 <sup>bc</sup>	2,06	6,80 <sup>ab</sup>	3,44
	T475	79,78 <sup>bc</sup>	21,04	73,86 <sup>ab</sup>	14,94	3,94 <sup>abc</sup>	1,99	7,73 <sup>b</sup>	3,42
	L437	72,92 <sup>b</sup>	28,18	77,56 <sup>bc</sup>	13,22	3,42 <sup>a</sup>	1,74	7,19 <sup>ab</sup>	3,99
	R3846	78,54 <sup>bc</sup>	20,48	73,63 <sup>ab</sup>	13,78	3,62 <sup>ab</sup>	1,80	7,80 <sup>b</sup>	3,35
	R4052	80,78 <sup>bc</sup>	20,32	70,89 <sup>a</sup>	12,01	4,42 <sup>c</sup>	1,85	7,60 <sup>b</sup>	4,33
	R5487	79,69 <sup>bc</sup>	19,99	73,64 <sup>ab</sup>	13,34	3,95 <sup>abc</sup>	1,65	7,63 <sup>b</sup>	3,58
S2	G2552	75,35 <sup>a</sup>	22,73	74,89 <sup>bc</sup>	18,32	3,08 <sup>a</sup>	2,03	6,54 <sup>a</sup>	3,64
	G5223	82,71 <sup>b</sup>	20,19	76,92 <sup>c</sup>	13,94	3,42 <sup>ab</sup>	1,70	7,47 <sup>ab</sup>	3,57
	G6328	80,27 <sup>ab</sup>	16,47	66,98 <sup>a</sup>	14,49	4,26 <sup>c</sup>	2,15	7,41 <sup>ab</sup>	3,48
	T475	83,07 <sup>b</sup>	16,84	74,34 <sup>bc</sup>	13,98	3,98 <sup>bc</sup>	2,08	7,75 <sup>ab</sup>	3,47
	L437	78,04 <sup>ab</sup>	21,98	74,69 <sup>bc</sup>	16,12	3,54 <sup>ab</sup>	1,94	7,63 <sup>ab</sup>	3,96
	R3846	78,16 <sup>ab</sup>	20,27	71,81 <sup>b</sup>	12,61	4,08 <sup>bc</sup>	1,95	7,77 <sup>ab</sup>	3,50
	R4052	82,50 <sup>b</sup>	18,02	71,80 <sup>b</sup>	10,95	4,25 <sup>c</sup>	1,72	8,02 <sup>b</sup>	3,69
	R5487	77,41 <sup>ab</sup>	21,09	73,02 <sup>bc</sup>	13,35	4,08 <sup>bc</sup>	1,79	7,46 <sup>ab</sup>	3,38
S3	G2552	72,91 <sup>a</sup>	23,16	76,74 <sup>d</sup>	15,62	3,00 <sup>a</sup>	1,87	7,37 <sup>ab</sup>	3,17
	G5223	83,56 <sup>d</sup>	18,96	77,58 <sup>d</sup>	14,53	3,44 <sup>ab</sup>	1,62	7,89 <sup>b</sup>	3,31
	G6328	75,75 <sup>ab</sup>	20,96	67,83 <sup>a</sup>	14,16	4,60 <sup>d</sup>	2,35	6,39 <sup>a</sup>	3,30
	T475	82,18 <sup>cd</sup>	18,44	72,18 <sup>bc</sup>	14,13	4,18 <sup>cd</sup>	2,07	7,27 <sup>ab</sup>	3,71
	L437	77,06 <sup>abc</sup>	22,18	75,34 <sup>cd</sup>	12,95	3,89 <sup>bc</sup>	1,69	7,99 <sup>b</sup>	3,67
	R3846	76,41 <sup>abc</sup>	21,93	71,68 <sup>abc</sup>	13,47	4,00 <sup>bc</sup>	1,86	7,75 <sup>b</sup>	3,34
	R4052	81,52 <sup>bcd</sup>	17,60	70,12 <sup>ab</sup>	12,46	4,40 <sup>cd</sup>	1,68	7,80 <sup>b</sup>	3,27
	R5487	82,15 <sup>cd</sup>	19,20	75,01 <sup>cd</sup>	13,24	3,54 <sup>ab</sup>	1,58	8,20 <sup>b</sup>	3,34
S5	G2552	75,13 <sup>a</sup>	20,99	78,68 <sup>d</sup>	16,14	2,76 <sup>a</sup>	2,08	6,66 <sup>a</sup>	3,00
	G5223	85,12 <sup>c</sup>	16,69	78,33 <sup>cd</sup>	12,52	3,08 <sup>ab</sup>	1,56	8,42 <sup>c</sup>	3,43
	G6328	74,46 <sup>a</sup>	20,70	67,88 <sup>a</sup>	13,68	4,54 <sup>e</sup>	2,13	7,20 <sup>ab</sup>	3,16
	T475	81,43 <sup>bc</sup>	19,55	74,34 <sup>bc</sup>	12,85	3,46 <sup>bcd</sup>	1,84	7,68 <sup>bc</sup>	3,18
	L437	82,09 <sup>bc</sup>	20,25	75,62 <sup>cd</sup>	13,51	3,67 <sup>d</sup>	2,17	8,25 <sup>c</sup>	3,92
	R3846	78,14 <sup>ab</sup>	19,80	71,15 <sup>ab</sup>	13,91	3,65 <sup>cd</sup>	1,88	7,60 <sup>abc</sup>	3,39
	R4052	82,95 <sup>bc</sup>	16,43	70,93 <sup>ab</sup>	14,40	3,83 <sup>d</sup>	1,80	7,87 <sup>bc</sup>	3,47
	R5487	78,72 <sup>ab</sup>	19,87	76,30 <sup>cd</sup>	14,24	3,09 <sup>abc</sup>	1,87	7,19 <sup>ab</sup>	3,18

Tabla 9.18: Valores medios de los parámetros STR, WOB, ALH y BCF para cada verraco, en presencia de cafeína, en el T0 y durante la prueba del choque a frigore.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre verracos.

		MUESTRAS INCUBADAS SIN CAFEÍNA						
		GRUPO BC		GRUPO CM		GRUPO MC		
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	
PRUEBA	T0	VCL (µm/s)	54,79 <sup>a</sup>	34,88	52,60 <sup>a</sup>	33,31	54,62 <sup>a</sup>	39,64
		VSL (µm/s)	32,55 <sup>a</sup>	27,03	31,19 <sup>a</sup>	25,67	32,52 <sup>a</sup>	30,54
		VAP (µm/s)	44,91 <sup>a</sup>	32,43	43,61 <sup>a</sup>	31,14	44,51 <sup>a</sup>	36,58
		LIN (%)	55,82 <sup>a</sup>	24,57	55,60 <sup>a</sup>	24,47	53,88 <sup>a</sup>	24,51
		STR (%)	69,70 <sup>a</sup>	23,05	69,22 <sup>a</sup>	22,69	69,09 <sup>a</sup>	22,30
		WOB (%)	77,89 <sup>a</sup>	15,83	78,14 <sup>a</sup>	16,08	75,59 <sup>b</sup>	16,86
		ALH (µm)	1,86 <sup>a</sup>	0,98	1,76 <sup>b</sup>	0,91	1,84 <sup>ab</sup>	1,05
		BCF (Hz)	6,53 <sup>a</sup>	3,01	6,69 <sup>a</sup>	2,89	6,17 <sup>b</sup>	2,87
	T1,5	VCL (µm/s)	56,47 <sup>a</sup>	30,31	56,49 <sup>a</sup>	30,26	53,43 <sup>b</sup>	32,86
		VSL (µm/s)	40,31 <sup>a</sup>	25,53	39,66 <sup>a</sup>	25,14	36,94 <sup>b</sup>	26,61
		VAP (µm/s)	49,28 <sup>a</sup>	29,16	48,77 <sup>b</sup>	28,42	46,00 <sup>b</sup>	30,58
		LIN (%)	68,58 <sup>a</sup>	22,91	68,74 <sup>a</sup>	21,49	65,99 <sup>b</sup>	22,07
		STR (%)	80,09 <sup>a</sup>	19,45	80,54 <sup>a</sup>	18,50	78,30 <sup>b</sup>	19,22
		WOB (%)	83,87 <sup>a</sup>	14,29	83,90 <sup>a</sup>	13,04	82,71 <sup>a</sup>	13,87
		ALH (µm)	1,73 <sup>a</sup>	0,80	1,78 <sup>a</sup>	0,84	1,73 <sup>a</sup>	0,91
		BCF (Hz)	7,51 <sup>a</sup>	2,89	7,57 <sup>a</sup>	2,84	6,96 <sup>b</sup>	2,66
	T3	VCL (µm/s)	51,68 <sup>a</sup>	28,22	53,37 <sup>b</sup>	31,70	55,51 <sup>b</sup>	31,78
		VSL (µm/s)	36,30 <sup>a</sup>	24,00	37,75 <sup>b</sup>	25,72	40,45 <sup>b</sup>	28,16
		VAP (µm/s)	43,64 <sup>a</sup>	26,14	45,65 <sup>b</sup>	28,72	48,17 <sup>b</sup>	30,28
		LIN (%)	67,73 <sup>a</sup>	21,16	69,11 <sup>a</sup>	21,18	69,11 <sup>a</sup>	21,71
		STR (%)	80,95 <sup>a</sup>	17,76	81,73 <sup>a</sup>	18,28	81,06 <sup>a</sup>	18,56
		WOB (%)	82,06 <sup>a</sup>	13,70	83,13 <sup>a</sup>	13,10	83,67 <sup>b</sup>	13,61
		ALH (µm)	1,75 <sup>a</sup>	0,88	1,75 <sup>a</sup>	0,96	1,78 <sup>a</sup>	0,87
		BCF (Hz)	7,29 <sup>ab</sup>	2,96	7,49 <sup>a</sup>	2,90	7,07 <sup>b</sup>	2,67
	T4,5	VCL (µm/s)	52,76 <sup>a</sup>	29,32	49,59 <sup>b</sup>	30,97	50,79 <sup>ab</sup>	29,86
		VSL (µm/s)	39,12 <sup>a</sup>	26,20	35,99 <sup>b</sup>	26,23	37,95 <sup>ab</sup>	26,09
		VAP (µm/s)	45,58 <sup>a</sup>	27,55	42,31 <sup>b</sup>	28,21	43,76 <sup>ab</sup>	27,62
		LIN (%)	70,81 <sup>a</sup>	21,26	69,94 <sup>a</sup>	20,97	71,19 <sup>a</sup>	20,80
STR (%)		83,15 <sup>a</sup>	17,62	82,91 <sup>a</sup>	17,23	83,60 <sup>a</sup>	16,97	
WOB (%)		83,68 <sup>a</sup>	13,71	82,78 <sup>a</sup>	13,45	83,48 <sup>a</sup>	13,57	
ALH (µm)		1,69 <sup>a</sup>	0,83	1,65 <sup>a</sup>	0,90	1,69 <sup>a</sup>	0,90	
BCF (Hz)		7,64 <sup>a</sup>	2,92	7,39 <sup>a</sup>	2,84	7,00 <sup>b</sup>	2,70	
T7	VCL (µm/s)	42,00 <sup>a</sup>	27,13	32,36 <sup>b</sup>	25,66	34,91 <sup>b</sup>	24,55	
	VSL (µm/s)	30,04 <sup>a</sup>	23,39	21,83 <sup>b</sup>	20,53	24,53 <sup>b</sup>	21,93	
	VAP (µm/s)	34,71 <sup>a</sup>	24,76	25,96 <sup>b</sup>	22,82	28,27 <sup>b</sup>	22,93	
	LIN (%)	67,19 <sup>a</sup>	21,83	62,38 <sup>b</sup>	23,70	64,19 <sup>ab</sup>	25,18	
	STR (%)	82,81 <sup>a</sup>	16,98	79,73 <sup>b</sup>	18,05	80,73 <sup>ab</sup>	18,92	
	WOB (%)	79,31 <sup>a</sup>	15,35	75,71 <sup>b</sup>	17,50	76,47 <sup>b</sup>	19,15	
	ALH (µm)	1,48 <sup>a</sup>	0,78	1,22 <sup>b</sup>	0,76	1,29 <sup>b</sup>	0,75	
	BCF (Hz)	7,20 <sup>a</sup>	3,04	6,60 <sup>b</sup>	2,93	6,54 <sup>b</sup>	2,85	
Descongel.	VCL (µm/s)	97,05 <sup>a</sup>	40,85	94,44 <sup>b</sup>	42,95	86,40 <sup>b</sup>	42,86	
	VSL (µm/s)	73,21 <sup>a</sup>	38,79	68,36 <sup>b</sup>	39,78	66,21 <sup>b</sup>	40,30	
	VAP (µm/s)	81,30 <sup>a</sup>	38,41	75,59 <sup>b</sup>	39,51	71,06 <sup>c</sup>	40,09	
	LIN (%)	72,44 <sup>a</sup>	21,29	67,98 <sup>a</sup>	21,72	70,46 <sup>a</sup>	22,81	
	STR (%)	87,41 <sup>a</sup>	16,67	86,60 <sup>a</sup>	16,70	88,05 <sup>a</sup>	16,87	
	WOB (%)	81,51 <sup>a</sup>	14,95	76,85 <sup>a</sup>	15,83	77,78 <sup>a</sup>	16,65	
	ALH (µm)	2,90 <sup>a</sup>	1,36	2,97 <sup>a</sup>	1,45	2,63 <sup>a</sup>	1,23	
	BCF (Hz)	8,24 <sup>a</sup>	3,43	8,37 <sup>a</sup>	3,36	9,13 <sup>b</sup>	3,62	

Tabla 9.19: Valores medios de los parámetros cinéticos para cada grupo de calidad, establecidos en función de su aptitud para la congelación, en ausencia de cafeína, en el T0, en el descongelado y durante la prueba de la termorresistencia.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos de calidad.

		MUESTRAS INCUBADAS CON CAFEÍNA						
		GRUPO BC		GRUPO CM		GRUPO MC		
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	
PRUEBA	T0	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	48,19 <sup>a</sup>	31,25	48,85 <sup>ab</sup>	31,70	51,75 <sup>b</sup>	37,84
		VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	32,40 <sup>a</sup>	26,47	32,71 <sup>a</sup>	26,45	35,28 <sup>b</sup>	30,83
		VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	41,25 <sup>a</sup>	29,71	41,69 <sup>a</sup>	29,85	44,88 <sup>b</sup>	35,78
		LIN (%)	63,07 <sup>a</sup>	25,28	62,25 <sup>a</sup>	24,54	63,37 <sup>a</sup>	24,48
		STR (%)	75,01 <sup>a</sup>	22,25	74,77 <sup>a</sup>	21,45	75,34 <sup>a</sup>	21,17
		WOB (%)	81,65 <sup>a</sup>	15,93	81,03 <sup>a</sup>	15,86	81,85 <sup>a</sup>	15,94
		ALH ( $\mu\text{m}$ )	1,60 <sup>a</sup>	0,89	1,60 <sup>a</sup>	0,85	1,63 <sup>a</sup>	0,99
		BCF (Hz)	6,42 <sup>a</sup>	2,69	6,66 <sup>a</sup>	2,83	5,82 <sup>b</sup>	2,72
	T1,5	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	56,82 <sup>a</sup>	31,24	57,71 <sup>ab</sup>	29,90	59,57 <sup>b</sup>	34,55
		VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	40,68 <sup>a</sup>	27,34	41,90 <sup>a</sup>	26,60	42,78 <sup>a</sup>	29,84
		VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	49,13 <sup>a</sup>	29,74	50,77 <sup>ab</sup>	28,70	52,76 <sup>b</sup>	33,24
		LIN (%)	68,25 <sup>a</sup>	22,56	69,95 <sup>a</sup>	22,26	68,55 <sup>a</sup>	22,59
		STR (%)	80,26 <sup>a</sup>	18,96	80,43 <sup>a</sup>	19,10	79,10 <sup>a</sup>	19,41
		WOB (%)	83,25 <sup>a</sup>	14,26	85,30 <sup>b</sup>	12,96	85,03 <sup>b</sup>	13,44
		ALH ( $\mu\text{m}$ )	1,77 <sup>a</sup>	0,83	1,74 <sup>a</sup>	0,81	1,79 <sup>a</sup>	0,89
		BCF (Hz)	7,07 <sup>a</sup>	2,79	7,30 <sup>b</sup>	2,69	6,63 <sup>c</sup>	2,73
	T3	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	52,63 <sup>a</sup>	30,02	61,39 <sup>b</sup>	32,04	57,68 <sup>c</sup>	35,15
		VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	38,19 <sup>a</sup>	25,94	43,59 <sup>b</sup>	26,79	42,74 <sup>b</sup>	31,01
		VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	45,47 <sup>a</sup>	28,06	53,85 <sup>b</sup>	29,52	51,12 <sup>c</sup>	33,23
		LIN (%)	69,93 <sup>a</sup>	21,36	70,19 <sup>a</sup>	21,74	70,60 <sup>a</sup>	21,21
		STR (%)	81,96 <sup>a</sup>	17,60	80,41 <sup>a</sup>	19,47	80,76 <sup>a</sup>	18,68
		WOB (%)	83,75 <sup>a</sup>	13,95	86,01 <sup>b</sup>	12,07	86,02 <sup>b</sup>	11,88
		ALH ( $\mu\text{m}$ )	1,70 <sup>a</sup>	0,88	1,87 <sup>b</sup>	0,94	1,78 <sup>c</sup>	0,94
		BCF (Hz)	7,09 <sup>a</sup>	2,63	7,24 <sup>a</sup>	2,67	6,71 <sup>b</sup>	2,54
	T4,5	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	60,25 <sup>a</sup>	33,94	67,05 <sup>b</sup>	35,01	64,68 <sup>b</sup>	35,58
		VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	44,41 <sup>a</sup>	30,19	47,79 <sup>a</sup>	28,74	48,09 <sup>a</sup>	31,35
		VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	52,80 <sup>a</sup>	31,91	58,42 <sup>b</sup>	31,60	56,69 <sup>b</sup>	32,92
		LIN (%)	71,31 <sup>a</sup>	20,50	71,21 <sup>a</sup>	21,27	72,19 <sup>a</sup>	19,64
STR (%)		82,24 <sup>a</sup>	17,49	81,87 <sup>a</sup>	19,08	82,75 <sup>a</sup>	16,78	
WOB (%)		85,46 <sup>a</sup>	12,73	85,84 <sup>a</sup>	11,67	86,05 <sup>a</sup>	11,84	
ALH ( $\mu\text{m}$ )		1,85 <sup>a</sup>	0,95	2,03 <sup>b</sup>	1,07	2,01 <sup>b</sup>	1,04	
BCF (Hz)		7,21 <sup>a</sup>	2,57	7,18 <sup>a</sup>	2,74	6,93 <sup>b</sup>	2,67	
T7	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	54,75 <sup>a</sup>	33,84	62,60 <sup>a</sup>	34,99	54,61 <sup>a</sup>	32,86	
	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	42,63 <sup>a</sup>	32,00	44,88 <sup>a</sup>	28,44	42,80 <sup>a</sup>	30,06	
	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	48,12 <sup>a</sup>	32,70	54,63 <sup>b</sup>	31,92	48,63 <sup>a</sup>	31,21	
	LIN (%)	73,55 <sup>ab</sup>	22,00	71,97 <sup>a</sup>	21,33	75,16 <sup>b</sup>	20,40	
	STR (%)	84,99 <sup>a</sup>	17,24	82,69 <sup>b</sup>	18,88	85,40 <sup>a</sup>	16,53	
	WOB (%)	84,79 <sup>a</sup>	14,32	85,82 <sup>b</sup>	11,95	86,64 <sup>a</sup>	12,80	
	ALH ( $\mu\text{m}$ )	1,65 <sup>a</sup>	0,82	1,85 <sup>b</sup>	0,97	1,62 <sup>a</sup>	0,84	
	BCF (Hz)	7,29 <sup>ab</sup>	2,83	7,49 <sup>a</sup>	2,72	7,04 <sup>b</sup>	2,62	
Descongel.	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	108,26 <sup>a</sup>	39,03	106,96 <sup>a</sup>	39,16	106,38 <sup>a</sup>	40,90	
	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	87,32 <sup>ab</sup>	39,02	86,00 <sup>a</sup>	38,64	89,05 <sup>b</sup>	40,43	
	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	94,90 <sup>a</sup>	37,18	92,85 <sup>a</sup>	37,07	94,25 <sup>a</sup>	39,37	
	LIN (%)	78,91 <sup>a</sup>	19,07	77,90 <sup>a</sup>	19,89	81,02 <sup>b</sup>	18,13	
	STR (%)	90,19 <sup>a</sup>	15,11	89,99 <sup>a</sup>	15,26	92,12 <sup>b</sup>	12,47	
	WOB (%)	86,50 <sup>a</sup>	12,23	85,26 <sup>a</sup>	13,26	86,87 <sup>a</sup>	12,65	
	ALH ( $\mu\text{m}$ )	2,72 <sup>a</sup>	1,23	2,79 <sup>a</sup>	1,25	2,60 <sup>a</sup>	1,15	
	BCF (Hz)	8,90 <sup>a</sup>	3,76	8,94 <sup>a</sup>	3,59	9,46 <sup>b</sup>	3,64	

Tabla 9.20: Valores medios de los parámetros cinéticos para cada grupo de calidad, establecidos en función de su aptitud para la congelación, en presencia de cafeína, en el T0, en el descongelado y durante la prueba de la termorresistencia.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos de calidad.

		MUESTRAS INCUBADAS SIN CAFÉINA						
		GRUPO BC		GRUPO CM		GRUPO MC		
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	
PRUEBA	T0	VCL (µm/s)	54,79 <sup>a</sup>	34,88	52,60 <sup>a</sup>	33,31	54,62 <sup>a</sup>	39,64
		VSL (µm/s)	32,55 <sup>a</sup>	27,03	31,19 <sup>a</sup>	25,67	32,52 <sup>a</sup>	30,54
		VAP (µm/s)	44,91 <sup>a</sup>	32,43	43,61 <sup>a</sup>	31,14	44,51 <sup>a</sup>	36,58
		LIN (%)	55,82 <sup>a</sup>	24,57	55,60 <sup>a</sup>	24,47	53,88 <sup>a</sup>	24,51
		STR (%)	69,70 <sup>a</sup>	23,05	69,22 <sup>a</sup>	22,69	69,09 <sup>a</sup>	22,30
		WOB (%)	77,89 <sup>a</sup>	15,83	78,14 <sup>a</sup>	16,08	75,59 <sup>b</sup>	16,86
		ALH (µm)	1,86 <sup>a</sup>	0,98	1,76 <sup>b</sup>	0,91	1,84 <sup>ab</sup>	1,05
		BCF (Hz)	6,53 <sup>a</sup>	3,01	6,69 <sup>a</sup>	2,89	6,17 <sup>b</sup>	2,87
	S0	VCL (µm/s)	78,41 <sup>a</sup>	43,56	82,91 <sup>a</sup>	41,77	81,70 <sup>a</sup>	47,05
		VSL (µm/s)	44,14 <sup>a</sup>	28,56	43,73 <sup>a</sup>	27,40	44,38 <sup>a</sup>	30,88
		VAP (µm/s)	54,44 <sup>a</sup>	30,20	57,17 <sup>b</sup>	29,59	56,44 <sup>ab</sup>	33,20
		LIN (%)	56,00 <sup>a</sup>	19,60	53,50 <sup>a</sup>	20,19	55,52 <sup>a</sup>	20,56
		STR (%)	78,78 <sup>a</sup>	17,91	75,39 <sup>a</sup>	19,67	77,78 <sup>a</sup>	19,05
		WOB (%)	69,82 <sup>a</sup>	14,47	69,37 <sup>a</sup>	14,17	69,67 <sup>a</sup>	14,60
		ALH (µm)	2,97 <sup>a</sup>	1,80	3,34 <sup>a</sup>	1,92	3,03 <sup>a</sup>	1,80
		BCF (Hz)	7,10 <sup>a</sup>	3,10	7,44 <sup>a</sup>	3,37	7,79 <sup>a</sup>	3,20
	S1	VCL (µm/s)	105,31 <sup>a</sup>	39,70	105,78 <sup>a</sup>	38,26	91,77 <sup>b</sup>	44,28
		VSL (µm/s)	54,19 <sup>a</sup>	26,97	51,23 <sup>ab</sup>	24,11	46,31 <sup>b</sup>	29,80
		VAP (µm/s)	68,99 <sup>a</sup>	26,51	66,59 <sup>a</sup>	23,85	62,66 <sup>a</sup>	31,25
		LIN (%)	52,68 <sup>a</sup>	19,34	49,55 <sup>a</sup>	18,36	51,43 <sup>a</sup>	21,32
		STR (%)	77,43 <sup>a</sup>	19,20	75,87 <sup>a</sup>	19,29	73,26 <sup>a</sup>	22,34
		WOB (%)	66,91 <sup>ab</sup>	13,49	64,38 <sup>a</sup>	13,41	68,54 <sup>b</sup>	13,09
		ALH (µm)	4,31 <sup>a</sup>	1,83	4,42 <sup>a</sup>	1,87	3,57 <sup>b</sup>	1,88
		BCF (Hz)	7,30 <sup>a</sup>	3,24	7,27 <sup>a</sup>	3,06	7,30 <sup>a</sup>	3,40
	S2	VCL (µm/s)	103,68 <sup>a</sup>	36,73	107,04 <sup>a</sup>	40,39	89,26 <sup>b</sup>	39,67
		VSL (µm/s)	54,93 <sup>a</sup>	23,85	50,71 <sup>a</sup>	24,25	44,54 <sup>b</sup>	25,04
		VAP (µm/s)	69,10 <sup>a</sup>	23,78	67,78 <sup>a</sup>	24,92	60,41 <sup>b</sup>	27,36
		LIN (%)	54,95 <sup>a</sup>	19,02	49,45 <sup>b</sup>	20,23	51,75 <sup>ab</sup>	20,32
STR (%)		79,15 <sup>a</sup>	17,62	74,47 <sup>b</sup>	21,11	73,84 <sup>b</sup>	21,02	
WOB (%)		68,31 <sup>a</sup>	13,32	65,40 <sup>b</sup>	14,78	68,75 <sup>a</sup>	13,63	
ALH (µm)		4,22 <sup>a</sup>	1,82	4,44 <sup>a</sup>	2,01	3,51 <sup>b</sup>	1,68	
BCF (Hz)		7,26 <sup>a</sup>	3,16	7,15 <sup>a</sup>	3,10	7,04 <sup>a</sup>	2,78	
S3	VCL (µm/s)	99,85 <sup>ab</sup>	40,26	106,16 <sup>a</sup>	40,83	93,28 <sup>b</sup>	40,20	
	VSL (µm/s)	54,32 <sup>a</sup>	27,60	48,99 <sup>b</sup>	24,82	52,75 <sup>ab</sup>	26,28	
	VAP (µm/s)	68,10 <sup>a</sup>	27,91	65,38 <sup>a</sup>	25,06	66,98 <sup>a</sup>	27,28	
	LIN (%)	55,46 <sup>a</sup>	19,17	48,07 <sup>b</sup>	19,13	59,11 <sup>c</sup>	20,57	
	STR (%)	78,30 <sup>a</sup>	18,07	73,87 <sup>b</sup>	18,82	78,83 <sup>a</sup>	19,84	
	WOB (%)	69,85 <sup>a</sup>	14,02	63,89 <sup>b</sup>	14,80	74,06 <sup>c</sup>	14,29	
	ALH (µm)	3,95 <sup>a</sup>	1,82	4,45 <sup>b</sup>	2,07	3,49 <sup>c</sup>	1,87	
	BCF (Hz)	7,58 <sup>a</sup>	2,97	6,78 <sup>b</sup>	2,96	7,42 <sup>a</sup>	3,10	
S5	VCL (µm/s)	89,50 <sup>a</sup>	41,04	104,95 <sup>b</sup>	42,72	94,02 <sup>a</sup>	42,90	
	VSL (µm/s)	47,71 <sup>ab</sup>	28,09	46,20 <sup>a</sup>	23,96	51,54 <sup>b</sup>	28,38	
	VAP (µm/s)	61,40 <sup>a</sup>	29,38	63,43 <sup>ab</sup>	25,13	66,03 <sup>b</sup>	29,39	
	LIN (%)	54,68 <sup>a</sup>	20,39	46,38 <sup>b</sup>	20,01	57,58 <sup>a</sup>	20,98	
	STR (%)	76,71 <sup>a</sup>	19,69	72,07 <sup>b</sup>	20,10	78,27 <sup>a</sup>	20,39	
	WOB (%)	70,08 <sup>a</sup>	14,85	63,18 <sup>b</sup>	15,71	72,15 <sup>a</sup>	13,66	
	ALH (µm)	3,56 <sup>a</sup>	1,79	4,44 <sup>b</sup>	2,10	3,63 <sup>a</sup>	1,92	
	BCF (Hz)	7,13 <sup>a</sup>	3,15	6,63 <sup>a</sup>	3,07	7,10 <sup>a</sup>	3,31	

Tabla 9.21: Valores medios de los parámetros cinéticos para cada grupo de calidad, establecidos en función de su aptitud para la congelación, en ausencia de cafeína, en el T0 y durante la prueba del choque a frigore.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos de calidad.

		MUESTRAS INCUBADAS CON CAFEÍNA						
		GRUPO BC		GRUPO CM		GRUPO MC		
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	
PRUEBA	T0	VCL (µm/s)	48,19 <sup>a</sup>	31,25	48,85 <sup>ab</sup>	31,70	51,75 <sup>b</sup>	37,84
		VSL (µm/s)	32,40 <sup>a</sup>	26,47	32,71 <sup>a</sup>	26,45	35,28 <sup>b</sup>	30,83
		VAP (µm/s)	41,25 <sup>a</sup>	29,71	41,69 <sup>a</sup>	29,85	44,88 <sup>b</sup>	35,78
		LIN (%)	63,07 <sup>a</sup>	25,28	62,25 <sup>a</sup>	24,54	63,37 <sup>a</sup>	24,48
		STR (%)	75,01 <sup>a</sup>	22,25	74,77 <sup>a</sup>	21,45	75,34 <sup>a</sup>	21,17
		WOB (%)	81,65 <sup>a</sup>	15,93	81,03 <sup>a</sup>	15,86	81,85 <sup>a</sup>	15,94
		ALH (µm)	1,60 <sup>a</sup>	0,89	1,60 <sup>a</sup>	0,85	1,63 <sup>a</sup>	0,99
		BCF (Hz)	6,42 <sup>a</sup>	2,69	6,66 <sup>a</sup>	2,83	5,82 <sup>b</sup>	2,72
	S0	VCL (µm/s)	107,76 <sup>a</sup>	44,18	96,53 <sup>b</sup>	45,20	97,01 <sup>b</sup>	41,54
		VSL (µm/s)	64,59 <sup>a</sup>	37,29	55,62 <sup>b</sup>	34,82	53,95 <sup>b</sup>	32,41
		VAP (µm/s)	82,18 <sup>a</sup>	36,23	75,34 <sup>a</sup>	35,86	74,50 <sup>a</sup>	34,60
		LIN (%)	60,96 <sup>a</sup>	22,81	59,03 <sup>a</sup>	25,12	56,95 <sup>a</sup>	23,44
		STR (%)	78,00 <sup>a</sup>	22,39	73,89 <sup>a</sup>	25,38	73,55 <sup>a</sup>	24,72
		WOB (%)	77,09 <sup>a</sup>	13,92	78,59 <sup>a</sup>	13,71	76,37 <sup>a</sup>	12,91
		ALH (µm)	3,48 <sup>a</sup>	1,86	3,25 <sup>a</sup>	1,79	3,26 <sup>a</sup>	1,44
		BCF (Hz)	6,58 <sup>a</sup>	3,87	7,19 <sup>ab</sup>	3,54	7,62 <sup>b</sup>	3,50
	S1	VCL (µm/s)	111,26 <sup>a</sup>	37,57	108,01 <sup>a</sup>	41,52	109,67 <sup>a</sup>	39,66
		VSL (µm/s)	66,48 <sup>a</sup>	31,68	64,37 <sup>a</sup>	32,39	55,28 <sup>b</sup>	29,62
		VAP (µm/s)	81,25 <sup>a</sup>	28,87	78,39 <sup>a</sup>	30,67	80,16 <sup>a</sup>	27,47
		LIN (%)	59,77 <sup>a</sup>	21,16	60,14 <sup>a</sup>	21,54	54,04 <sup>b</sup>	26,63
		STR (%)	79,86 <sup>a</sup>	19,95	80,05 <sup>a</sup>	20,40	70,24 <sup>b</sup>	27,28
		WOB (%)	73,47 <sup>a</sup>	13,15	73,91 <sup>a</sup>	14,28	74,89 <sup>a</sup>	13,70
		ALH (µm)	3,97 <sup>a</sup>	1,64	3,86 <sup>a</sup>	1,91	3,87 <sup>a</sup>	1,79
		BCF (Hz)	7,56 <sup>a</sup>	3,61	7,53 <sup>a</sup>	3,54	6,92 <sup>a</sup>	3,95
	S2	VCL (µm/s)	112,96 <sup>a</sup>	41,13	108,86 <sup>ab</sup>	43,72	101,43 <sup>b</sup>	44,17
		VSL (µm/s)	65,18 <sup>a</sup>	32,25	63,16 <sup>ab</sup>	30,74	57,43 <sup>b</sup>	32,89
		VAP (µm/s)	81,55 <sup>a</sup>	30,75	77,06 <sup>ab</sup>	30,95	72,95 <sup>b</sup>	32,19
		LIN (%)	58,05 <sup>a</sup>	20,92	59,20 <sup>a</sup>	20,07	59,37 <sup>a</sup>	24,41
STR (%)		78,22 <sup>a</sup>	20,71	80,94 <sup>a</sup>	18,58	77,64 <sup>a</sup>	21,36	
WOB (%)		72,91 <sup>a</sup>	12,98	72,03 <sup>a</sup>	13,79	74,21 <sup>a</sup>	17,18	
ALH (µm)		4,08 <sup>a</sup>	1,78	4,04 <sup>a</sup>	1,99	3,33 <sup>b</sup>	1,93	
BCF (Hz)		7,50 <sup>a</sup>	3,46	7,69 <sup>a</sup>	3,47	7,04 <sup>a</sup>	4,03	
S3	VCL (µm/s)	103,11 <sup>a</sup>	38,53	113,02 <sup>b</sup>	43,96	96,79 <sup>a</sup>	40,66	
	VSL (µm/s)	63,84 <sup>a</sup>	30,32	64,22 <sup>a</sup>	32,64	54,19 <sup>b</sup>	26,26	
	VAP (µm/s)	76,00 <sup>a</sup>	29,14	79,74 <sup>a</sup>	31,58	70,52 <sup>b</sup>	27,70	
	LIN (%)	62,14 <sup>a</sup>	20,06	57,40 <sup>b</sup>	21,03	59,93 <sup>ab</sup>	22,77	
	STR (%)	82,40 <sup>a</sup>	18,58	78,80 <sup>b</sup>	20,51	77,95 <sup>b</sup>	21,77	
	WOB (%)	74,11 <sup>a</sup>	13,14	71,79 <sup>b</sup>	14,31	75,33 <sup>a</sup>	14,13	
	ALH (µm)	3,64 <sup>a</sup>	1,57	4,16 <sup>b</sup>	2,03	3,46 <sup>a</sup>	1,79	
	BCF (Hz)	8,16 <sup>a</sup>	3,35	7,29 <sup>b</sup>	3,44	7,91 <sup>a</sup>	3,29	
S5	VCL (µm/s)	88,73 <sup>a</sup>	46,89	100,18 <sup>b</sup>	43,67	95,12 <sup>ab</sup>	48,79	
	VSL (µm/s)	54,27 <sup>a</sup>	34,62	56,16 <sup>a</sup>	28,28	58,02 <sup>a</sup>	33,06	
	VAP (µm/s)	65,99 <sup>a</sup>	35,57	69,92 <sup>ab</sup>	28,87	71,04 <sup>b</sup>	33,90	
	LIN (%)	60,58 <sup>ab</sup>	21,26	58,02 <sup>a</sup>	20,66	63,03 <sup>b</sup>	21,95	
	STR (%)	79,31 <sup>a</sup>	19,48	79,23 <sup>a</sup>	19,58	80,20 <sup>a</sup>	20,15	
	WOB (%)	75,05 <sup>a</sup>	14,45	71,97 <sup>a</sup>	13,98	77,20 <sup>a</sup>	14,43	
	ALH (µm)	3,24 <sup>a</sup>	1,86	3,81 <sup>a</sup>	1,99	3,28 <sup>a</sup>	2,05	
	BCF (Hz)	7,32 <sup>a</sup>	3,23	7,62 <sup>a</sup>	3,31	7,73 <sup>a</sup>	3,62	

Tabla 9.22: Valores medios de los parámetros cinéticos para cada grupo de calidad, establecidos en función de su aptitud para la congelación, en presencia de cafeína, en el T0 y durante la prueba del choque a frigore.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos de calidad.

		SIN CAFEÍNA				CON CAFEÍNA			
		LD		LW		LD		LW	
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
T0	SP1	43,06	8,18	45,10	7,15	56,89	7,61	57,61	6,81
	SP2	15,36	5,63	13,78	7,30	7,87	5,00	9,81	3,68
	SP3	41,60	8,97	41,11	8,30	35,26	8,97	32,59	8,32
T1,5	SP1	66,39	7,44	66,95	8,58	66,76	6,64	70,22	8,63
	SP2	9,29	5,81	10,63	7,06	7,27	5,61	11,60*	7,48
	SP3	24,35	6,20	22,43	8,41	25,99	7,48	18,18*	6,37
T3	SP1	69,81	6,83	68,91	9,25	70,46	5,25	71,04	10,25
	SP2	7,48	4,25	9,64	11,81	8,14	5,31	13,43	12,61
	SP3	22,71	7,82	21,46	9,59	21,39	5,95	15,54*	10,02
T4,5	SP1	73,35	7,53	69,76	12,53	72,76	6,29	72,07	13,19
	SP2	7,26	4,59	5,37	3,41	9,34	6,11	16,83*	14,64
	SP3	19,41	9,01	24,88	12,53	17,93	8,37	11,16*	9,80
T7	SP1	51,27	15,51	57,72	14,60	74,62	5,90	76,63	11,86
	SP2	4,01	3,96	2,96	3,43	5,76	2,87	11,35	13,22
	SP3	44,73	15,36	39,33	14,81	19,64	5,51	12,03*	8,96
Descong.	SP1	68,17	6,70	60,50*	10,71	76,20	10,31	80,46	5,31
	SP2	17,49	6,20	18,81	9,89	17,81	11,33	12,11*	4,73
	SP3	14,36	3,99	20,68*	8,40	6,01	3,03	7,45	2,55

**Tabla 9.23:** Valores medios de las tres subpoblaciones para cada raza, tanto en presencia como en ausencia de cafeína, en el T0, en el descongelado y durante la prueba de la termorresistencia.  
Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre razas.

MUESTRAS INCUBADAS CON CAFEÍNA													
	T0		T1,5		T3		T4,5		T7		Descong.		
	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	
SP1	G2552	57,22 <sup>a</sup>	5,82	67,18 <sup>ab</sup>	4,15	74,46 <sup>bc</sup>	3,61	77,12 <sup>b</sup>	6,20	83,38 <sup>b</sup>	4,01	81,92 <sup>b</sup>	5,36
	G5223	55,16 <sup>a</sup>	5,13	68,72 <sup>ab</sup>	9,16	68,74 <sup>ab</sup>	9,85	68,48 <sup>ab</sup>	9,12	76,00 <sup>ab</sup>	10,37	85,84 <sup>b</sup>	3,96
	G6328	62,32 <sup>a</sup>	9,55	64,76 <sup>a</sup>	4,10	59,50 <sup>a</sup>	5,51	59,06 <sup>a</sup>	16,25	63,10 <sup>a</sup>	12,09	76,02 <sup>ab</sup>	3,57
	T475	55,72 <sup>a</sup>	5,37	80,20 <sup>b</sup>	7,74	81,44 <sup>c</sup>	5,96	83,60 <sup>b</sup>	3,96	84,04 <sup>b</sup>	6,56	78,04 <sup>ab</sup>	2,44
	L437	59,14 <sup>a</sup>	5,18	68,46 <sup>ab</sup>	7,82	68,64 <sup>ab</sup>	3,44	72,14 <sup>ab</sup>	5,37	75,02 <sup>ab</sup>	5,58	82,84 <sup>b</sup>	4,16
	R3846	52,78 <sup>a</sup>	4,91	64,80 <sup>a</sup>	5,21	71,94 <sup>abc</sup>	7,21	72,82 <sup>ab</sup>	6,40	75,70 <sup>ab</sup>	7,86	76,80 <sup>ab</sup>	2,86
	R4052	60,60 <sup>a</sup>	10,81	64,02 <sup>a</sup>	3,90	70,66 <sup>abc</sup>	4,39	73,14 <sup>ab</sup>	7,78	69,54 <sup>ab</sup>	4,57	72,48 <sup>a</sup>	4,87
	R5487	55,04 <sup>a</sup>	7,63	69,74 <sup>ab</sup>	8,79	70,60 <sup>abc</sup>	6,41	72,92 <sup>b</sup>	7,54	78,20 <sup>b</sup>	1,35	80,22 <sup>ab</sup>	5,86
	G2552	11,30 <sup>ab</sup>	5,47	14,22 <sup>b</sup>	3,02	5,96 <sup>ab</sup>	4,13	10,94 <sup>a</sup>	7,93	4,94 <sup>a</sup>	3,50	10,28 <sup>a</sup>	5,00
SP2	G5223	8,26 <sup>ab</sup>	3,48	5,86 <sup>a</sup>	4,53	5,58 <sup>ab</sup>	2,72	7,94 <sup>a</sup>	2,96	1,84 <sup>a</sup>	1,31	8,14 <sup>a</sup>	2,79
	G6328	10,00 <sup>ab</sup>	2,39	21,16 <sup>c</sup>	3,53	32,56 <sup>c</sup>	8,03	36,36 <sup>b</sup>	16,94	30,56 <sup>b</sup>	12,88	15,16 <sup>ab</sup>	4,44
	T475	9,66 <sup>ab</sup>	3,28	5,14 <sup>a</sup>	2,75	9,60 <sup>ab</sup>	6,61	12,06 <sup>a</sup>	3,43	8,06 <sup>a</sup>	3,40	14,84 <sup>ab</sup>	2,97
	L437	7,58 <sup>ab</sup>	3,93	7,84 <sup>ab</sup>	2,00	9,40 <sup>ab</sup>	3,80	13,68 <sup>a</sup>	8,16	5,28 <sup>a</sup>	1,65	11,16 <sup>a</sup>	4,45
	R3846	3,66 <sup>a</sup>	2,27	2,16 <sup>a</sup>	1,90	4,92 <sup>ab</sup>	1,88	4,26 <sup>a</sup>	3,41	6,22 <sup>a</sup>	3,78	15,00 <sup>ab</sup>	1,92
	R4052	13,42 <sup>b</sup>	5,19	13,68 <sup>bc</sup>	6,65	14,38 <sup>b</sup>	4,88	12,88 <sup>a</sup>	3,82	7,92 <sup>a</sup>	2,73	22,08 <sup>b</sup>	4,74
	R5487	6,82 <sup>ab</sup>	3,00	5,38 <sup>a</sup>	2,92	3,86 <sup>a</sup>	2,36	6,52 <sup>a</sup>	1,80	3,62 <sup>a</sup>	1,61	14,24 <sup>ab</sup>	3,86
	G2552	31,48 <sup>ab</sup>	6,50	18,56 <sup>a</sup>	2,42	19,56 <sup>ab</sup>	4,57	11,96 <sup>abc</sup>	4,73	11,68 <sup>abc</sup>	1,04	7,82 <sup>a</sup>	1,33
	G5223	36,58 <sup>ab</sup>	8,28	25,40 <sup>ab</sup>	5,59	25,70 <sup>b</sup>	11,46	23,60 <sup>c</sup>	10,88	22,18 <sup>c</sup>	11,65	6,02 <sup>a</sup>	3,16
SP3	G6328	27,68 <sup>a</sup>	9,87	14,10 <sup>a</sup>	4,55	7,94 <sup>a</sup>	6,21	4,56 <sup>a</sup>	1,60	6,34 <sup>a</sup>	2,18	8,84 <sup>a</sup>	2,74
	T475	34,62 <sup>ab</sup>	8,01	14,64 <sup>a</sup>	5,76	8,94 <sup>a</sup>	3,21	4,34 <sup>a</sup>	2,54	7,90 <sup>ab</sup>	7,00	7,10 <sup>a</sup>	2,53
	L437	33,28 <sup>ab</sup>	4,76	23,72 <sup>ab</sup>	6,83	21,92 <sup>b</sup>	3,52	14,20 <sup>ab</sup>	6,81	19,72 <sup>bc</sup>	6,44	6,00 <sup>a</sup>	2,32
	R3846	43,58 <sup>b</sup>	5,24	33,06 <sup>b</sup>	6,10	23,12 <sup>b</sup>	5,55	22,92 <sup>b</sup>	7,55	18,06 <sup>abc</sup>	6,09	8,24 <sup>a</sup>	4,27
	R4052	26,02 <sup>a</sup>	7,72	22,30 <sup>ab</sup>	5,87	14,96 <sup>ab</sup>	4,29	13,98 <sup>ab</sup>	8,86	22,58 <sup>c</sup>	6,53	5,44 <sup>a</sup>	1,02
	R5487	38,14 <sup>ab</sup>	8,02	24,88 <sup>ab</sup>	7,77	25,54 <sup>b</sup>	5,41	20,60 <sup>b</sup>	8,60	18,18 <sup>abc</sup>	2,55	5,56 <sup>a</sup>	2,33

**Tabla 9.24:** Valores medios de las tres subpoblaciones para cada verraco, en presencia de cafeína, en el T0, en el descongelado y durante la prueba de la termorresistencia.

Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre verracos.

MUESTRAS INCUBADAS SIN CAFEÍNA													
		T0		T1,5		T3		T4,5		T7		Descong.	
	Media	Desv típ.	Media	Desv típ.	Media	Desv típ.	Media	Desv típ.	Media	Desv típ.	Media	Desv típ.	Desv típ.
SP1	G2552	43,14 <sup>a</sup>	3,14	66,90 <sup>ab</sup>	7,54	71,14 <sup>a</sup>	7,12	72,92 <sup>a</sup>	9,18	60,32 <sup>ab</sup>	13,90	59,02 <sup>abc</sup>	9,50
	G5223	48,56 <sup>a</sup>	7,22	58,82 <sup>a</sup>	2,40	64,54 <sup>a</sup>	6,41	69,94 <sup>a</sup>	4,36	58,38 <sup>ab</sup>	13,93	74,68 <sup>d</sup>	7,20
	G6328	46,20 <sup>a</sup>	7,43	65,98 <sup>ab</sup>	7,16	64,32 <sup>a</sup>	13,14	60,68 <sup>a</sup>	20,92	51,72 <sup>ab</sup>	15,85	55,58 <sup>ab</sup>	4,46
	T475	43,74 <sup>a</sup>	10,11	76,08 <sup>b</sup>	6,92	75,62 <sup>a</sup>	5,38	75,48 <sup>a</sup>	6,95	60,44 <sup>ab</sup>	17,64	52,72 <sup>a</sup>	4,76
	L437	35,24 <sup>a</sup>	2,74	62,46 <sup>ab</sup>	7,47	71,18 <sup>a</sup>	6,68	74,84 <sup>a</sup>	10,32	55,66 <sup>ab</sup>	11,00	71,44 <sup>cd</sup>	7,97
	R3846	43,72 <sup>a</sup>	4,20	70,34 <sup>ab</sup>	6,55	69,14 <sup>a</sup>	9,54	70,02 <sup>a</sup>	6,54	33,48 <sup>a</sup>	13,15	66,34 <sup>bcd</sup>	1,84
	R4052	48,12 <sup>a</sup>	7,87	69,66 <sup>ab</sup>	6,60	72,76 <sup>a</sup>	3,52	78,04 <sup>a</sup>	4,54	52,20 <sup>ab</sup>	11,08	62,12 <sup>abcd</sup>	5,24
R5487	45,14 <sup>a</sup>	10,79	63,08 <sup>ab</sup>	7,42	66,16 <sup>a</sup>	6,55	70,50 <sup>a</sup>	6,73	63,74 <sup>b</sup>	10,53	72,78 <sup>d</sup>	5,39	
SP2	G2552	10,94 <sup>a</sup>	3,36	10,54 <sup>a</sup>	6,91	6,50 <sup>ab</sup>	4,44	4,02 <sup>a</sup>	1,16	1,90 <sup>ab</sup>	3,05	13,84 <sup>abc</sup>	3,75
	G5223	11,28 <sup>a</sup>	8,63	8,58 <sup>a</sup>	3,87	4,16 <sup>a</sup>	3,44	4,62 <sup>a</sup>	2,81	1,72 <sup>ab</sup>	2,38	8,64 <sup>a</sup>	2,44
	G6328	21,22 <sup>a</sup>	7,68	16,90 <sup>a</sup>	9,33	21,34 <sup>b</sup>	19,64	4,90 <sup>a</sup>	3,64	6,42 <sup>ab</sup>	3,86	20,30 <sup>cd</sup>	5,45
	T475	11,44 <sup>a</sup>	4,32	6,48 <sup>a</sup>	3,31	6,56 <sup>ab</sup>	3,50	7,92 <sup>a</sup>	4,63	1,80 <sup>ab</sup>	2,46	32,44 <sup>e</sup>	4,40
	L437	19,56 <sup>a</sup>	5,97	8,64 <sup>a</sup>	6,05	9,36 <sup>ab</sup>	2,78	7,30 <sup>a</sup>	1,03	4,52 <sup>ab</sup>	4,15	11,12 <sup>ab</sup>	3,70
	R3846	11,10 <sup>a</sup>	2,42	5,80 <sup>a</sup>	4,56	2,22 <sup>a</sup>	1,94	5,14 <sup>a</sup>	2,71	7,38 <sup>b</sup>	4,11	19,58 <sup>bcd</sup>	3,51
	R4052	16,70 <sup>a</sup>	6,40	11,70 <sup>a</sup>	7,13	8,82 <sup>ab</sup>	4,59	9,14 <sup>a</sup>	7,32	,58 <sup>a</sup>	1,30	23,40 <sup>d</sup>	6,37
R5487	14,08 <sup>a</sup>	4,39	11,00 <sup>a</sup>	5,03	9,50 <sup>ab</sup>	2,62	7,44 <sup>a</sup>	5,31	3,56 <sup>ab</sup>	3,06	15,84 <sup>abcd</sup>	3,60	
SP3	G2552	45,90 <sup>a</sup>	4,37	22,58 <sup>abc</sup>	5,91	22,34 <sup>ab</sup>	7,75	23,04 <sup>ab</sup>	9,33	37,80 <sup>a</sup>	15,42	27,12 <sup>c</sup>	10,5
	G5223	40,14 <sup>a</sup>	3,97	32,60 <sup>c</sup>	6,12	31,30 <sup>b</sup>	8,80	25,44 <sup>ab</sup>	5,79	39,90 <sup>a</sup>	14,99	16,66 <sup>abc</sup>	7,43
	G6328	32,56 <sup>a</sup>	2,94	17,12 <sup>a</sup>	5,16	14,36 <sup>a</sup>	7,78	34,42 <sup>b</sup>	19,85	41,86 <sup>a</sup>	16,08	24,10 <sup>bc</sup>	4,61
	T475	44,82 <sup>a</sup>	11,24	17,42 <sup>ab</sup>	6,38	17,82 <sup>ab</sup>	6,08	16,62 <sup>ab</sup>	5,24	37,76 <sup>a</sup>	17,51	14,84 <sup>ab</sup>	4,16
	L437	45,24 <sup>a</sup>	4,70	28,90 <sup>bc</sup>	1,68	19,48 <sup>ab</sup>	6,58	17,86 <sup>ab</sup>	10,18	39,82 <sup>a</sup>	12,34	17,44 <sup>abc</sup>	5,13
	R3846	45,16 <sup>a</sup>	6,35	23,86 <sup>abc</sup>	3,73	28,62 <sup>ab</sup>	9,90	24,90 <sup>ab</sup>	7,73	59,16 <sup>a</sup>	15,32	14,10 <sup>ab</sup>	2,13
	R4052	35,20 <sup>a</sup>	6,11	18,72 <sup>ab</sup>	3,92	18,40 <sup>ab</sup>	2,52	12,82 <sup>a</sup>	5,65	47,22 <sup>a</sup>	11,88	14,50 <sup>ab</sup>	4,08
R5487	40,78 <sup>a</sup>	14,06	25,90 <sup>abc</sup>	9,03	24,34 <sup>ab</sup>	7,73	22,06 <sup>ab</sup>	9,31	32,72 <sup>a</sup>	10,69	11,40 <sup>a</sup>	2,28	

**Tabla 9.25:** Valores medios de las tres subpoblaciones para cada verraco, en ausencia de cafena, en el T0, en el descongelado y durante la prueba de la termorresistencia. Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre verracos.



		PRUEBA											
		T0		T1,5		T3		T4,5		T7		Descong.	
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
SP1	SIN CAFEÍNA	44,23 <sup>a</sup>	7,68	66,67 <sup>a</sup>	7,93	69,36 <sup>a</sup>	8,03	71,55 <sup>a</sup>	10,36	54,49 <sup>a</sup>	15,22	64,34 <sup>a</sup>	9,63
	CON CAFEÍNA	57,25 <sup>b</sup>	7,14	68,49 <sup>a</sup>	7,80	70,75 <sup>a</sup>	8,04	72,41 <sup>a</sup>	10,21	75,62 <sup>b</sup>	9,30	79,27 <sup>b</sup>	5,61
SP2	SIN CAFEÍNA	14,54 <sup>a</sup>	6,52	9,96 <sup>a</sup>	6,42	8,56 <sup>a</sup>	8,83	6,31 <sup>a</sup>	4,11	3,49 <sup>a</sup>	3,70	18,15 <sup>a</sup>	8,17
	CON CAFEÍNA	8,84 <sup>b</sup>	4,44	9,43 <sup>a</sup>	6,88	10,78 <sup>a</sup>	9,92	13,08 <sup>b</sup>	11,70	8,56 <sup>b</sup>	9,86	13,86 <sup>a</sup>	5,34
SP3	SIN CAFEÍNA	41,23 <sup>a</sup>	8,42	23,39 <sup>a</sup>	7,35	22,08 <sup>a</sup>	8,66	22,15 <sup>a</sup>	11,12	42,03 <sup>a</sup>	15,14	17,52 <sup>a</sup>	7,24
	CON CAFEÍNA	33,92 <sup>b</sup>	8,65	22,08 <sup>a</sup>	7,92	18,46 <sup>a</sup>	8,66	14,52 <sup>b</sup>	9,64	15,83 <sup>b</sup>	8,29	6,88 <sup>b</sup>	2,69

Tabla 9.26: Valores medios de las tres subpoblaciones, en presencia y en ausencia de cafeína, en el T0, en el descongelado y durante la prueba de la termorresistencia.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre muestras incubadas con cafeína o sin ella.

		PRUEBA											
		T0		S0		S1		S2		S3		S5	
		Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.	Media	Desv. típ.
SP1	SIN CAFEÍNA	44,23 <sup>a</sup>	7,68	35,10 <sup>a</sup>	21,26	25,60 <sup>a</sup>	18,34	27,15 <sup>a</sup>	15,77	27,18 <sup>a</sup>	16,92	27,71 <sup>a</sup>	16,18
	CON CAFEÍNA	57,25 <sup>b</sup>	7,14	42,10 <sup>a</sup>	14,69	38,30 <sup>b</sup>	16,78	39,89 <sup>b</sup>	14,33	38,46 <sup>b</sup>	15,12	43,14 <sup>b</sup>	16,67
SP2	SIN CAFEÍNA	14,54 <sup>a</sup>	6,52	40,45 <sup>a</sup>	20,29	62,11 <sup>a</sup>	20,08	62,05 <sup>a</sup>	20,32	62,14 <sup>a</sup>	19,75	58,03 <sup>a</sup>	18,24
	CON CAFEÍNA	8,84 <sup>b</sup>	4,44	44,17 <sup>a</sup>	15,58	54,24 <sup>a</sup>	16,86	50,41 <sup>b</sup>	15,72	53,52 <sup>b</sup>	15,62	43,87 <sup>b</sup>	17,94
SP3	SIN CAFEÍNA	41,23 <sup>a</sup>	8,42	24,46 <sup>a</sup>	18,59	12,30 <sup>a</sup>	13,79	10,82 <sup>a</sup>	9,23	10,68 <sup>a</sup>	7,16	14,27 <sup>a</sup>	7,65
	CON CAFEÍNA	33,92 <sup>b</sup>	8,65	13,73 <sup>b</sup>	11,69	7,46 <sup>b</sup>	6,41	9,69 <sup>a</sup>	6,61	8,01 <sup>a</sup>	5,48	13,00 <sup>a</sup>	8,13

Tabla 9.27: Valores medios de las tres subpoblaciones, en presencia y en ausencia de cafeína, en el T0 y durante la prueba del choque a frigore.

Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre muestras incubadas con cafeína o sin ella.

SIN CAFEÍNA						CON CAFEÍNA					
LD			LW			LD			LW		
	Media	Desv. típica	Media	Desv. típica	Media	Desv. típica	Media	Desv. típica	Media	Desv. típica	
<b>S0</b>	SP1	36,82	19,94	33,38	22,90	44,79	12,38	39,55	16,50	16,50	
	SP2	37,39	16,95	43,52	23,20	42,92	13,32	45,37	17,73	17,73	
	SP3	25,82	14,64	23,10	22,16	12,29	11,07	15,10	12,38	12,38	
<b>S1</b>	SP1	26,30	14,72	24,91	21,75	38,29	14,23	38,32	19,38	19,38	
	SP2	63,74	16,71	60,47	23,30	54,80	13,63	53,68	19,92	19,92	
	SP3	9,97	8,42	14,64	17,55	6,90	4,97	8,02	7,67	7,67	
<b>S2</b>	SP1	26,91	11,90	27,39	19,20	35,44*	11,18	44,34	15,96	15,96	
	SP2	63,16	17,12	60,93	23,49	56,81*	10,72	44,02	17,50	17,50	
	SP3	9,96	8,67	11,68	9,90	7,74	3,96	11,64	8,12	8,12	
<b>S3</b>	SP1	27,05	13,54	27,31	20,11	37,43	13,59	39,50	16,80	16,80	
	SP2	64,14	16,04	60,14	23,13	55,27	16,32	51,76	15,11	15,11	
	SP3	8,81	6,30	12,56	7,63	7,29	5,99	8,74	4,97	4,97	
<b>S5</b>	SP1	27,91	12,28	27,51	19,66	42,68	11,77	43,60	20,77	20,77	
	SP2	59,12	13,98	56,95	22,02	44,60	13,78	43,15	21,66	21,66	
	SP3	12,98	6,05	15,55	8,94	12,75	8,18	13,26	8,29	8,29	

**Tabla 9.28:** Valores medios de las tres subpoblaciones para cada raza, tanto en presencia como en ausencia de cafeína durante la prueba del choque a frígore. Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre razas.

MUESTRAS INCUBADAS SIN CAFEÍNA															
	T0		S0		S1		S2		S3		S5				
	Media	Desv típ.	Media	Desv típ.	Media	Desv típ.	Media	Desv típ.	Media	Desv típ.	Media	Desv típ.			
SP1	G2552	43,14 <sup>a</sup>	3,14	38,34 <sup>a</sup>	26,10	36,62 <sup>a</sup>	39,85	46,74 <sup>b</sup>	10,39	42,68 <sup>b</sup>	18,16	43,46 <sup>b</sup>	17,84		
	G5223	48,56 <sup>a</sup>	7,22	44,42 <sup>a</sup>	35,65	30,04 <sup>a</sup>	10,43	35,14 <sup>ab</sup>	21,97	40,22 <sup>b</sup>	20,06	43,42 <sup>b</sup>	10,00		
	G6328	46,20 <sup>a</sup>	7,43	27,98 <sup>a</sup>	7,28	19,04 <sup>a</sup>	8,04	10,50 <sup>a</sup>	3,48	8,06 <sup>a</sup>	4,31	7,48 <sup>a</sup>	2,27		
	T475	43,74 <sup>a</sup>	10,11	22,76 <sup>a</sup>	11,17	13,92 <sup>a</sup>	9,31	17,18 <sup>a</sup>	10,91	18,26 <sup>ab</sup>	10,07	15,66 <sup>a</sup>	10,05		
	L437	35,24 <sup>a</sup>	2,74	45,12 <sup>a</sup>	20,55	41,28 <sup>a</sup>	13,27	26,38 <sup>ab</sup>	12,54	36,08 <sup>b</sup>	15,89	40,16 <sup>b</sup>	9,95		
	R3846	43,72 <sup>a</sup>	4,20	52,20 <sup>a</sup>	10,29	21,14 <sup>a</sup>	12,55	32,28 <sup>ab</sup>	12,97	17,44 <sup>ab</sup>	7,92	18,10 <sup>a</sup>	5,01		
SP2	R4052	48,12 <sup>a</sup>	7,87	13,88 <sup>a</sup>	10,94	19,02 <sup>a</sup>	16,21	18,72 <sup>a</sup>	9,97	21,06 <sup>ab</sup>	9,34	16,50 <sup>a</sup>	3,26		
	R5487	45,14 <sup>a</sup>	10,79	36,06 <sup>a</sup>	14,14	23,74 <sup>a</sup>	6,69	30,24 <sup>ab</sup>	10,68	33,62 <sup>ab</sup>	12,34	36,86 <sup>b</sup>	3,24		
	G2552	10,94 <sup>a</sup>	3,36	33,34 <sup>a</sup>	29,46	36,92 <sup>a</sup>	22,09	31,54 <sup>a</sup>	11,39	38,76 <sup>a</sup>	10,54	40,08 <sup>a</sup>	11,42		
	G5223	11,28 <sup>a</sup>	8,63	28,30 <sup>a</sup>	27,28	51,52 <sup>abc</sup>	18,88	53,78 <sup>ab</sup>	18,32	45,88 <sup>ab</sup>	23,54	36,24 <sup>a</sup>	11,88		
	G6328	21,22 <sup>a</sup>	7,68	57,34 <sup>a</sup>	7,24	71,44 <sup>bc</sup>	4,21	77,56 <sup>b</sup>	5,61	81,26 <sup>c</sup>	4,74	80,64 <sup>b</sup>	6,32		
	T475	11,44 <sup>a</sup>	4,32	55,10 <sup>a</sup>	8,14	82,00 <sup>c</sup>	13,90	80,84 <sup>b</sup>	11,80	74,64 <sup>bc</sup>	14,38	70,82 <sup>b</sup>	12,55		
SP3	L437	19,56 <sup>a</sup>	5,97	27,12 <sup>a</sup>	18,24	47,76 <sup>ab</sup>	13,91	62,86 <sup>b</sup>	21,19	59,58 <sup>abc</sup>	21,51	49,72 <sup>a</sup>	6,42		
	R3846	11,10 <sup>a</sup>	2,42	35,16 <sup>a</sup>	10,24	71,30 <sup>bc</sup>	12,41	55,28 <sup>ab</sup>	17,88	72,62 <sup>bc</sup>	7,16	71,10 <sup>b</sup>	8,81		
	R4052	16,70 <sup>a</sup>	6,40	49,48 <sup>a</sup>	20,02	68,46 <sup>abc</sup>	21,20	71,62 <sup>b</sup>	15,68	70,00 <sup>bc</sup>	13,04	70,98 <sup>b</sup>	6,34		
	R5487	14,08 <sup>a</sup>	4,39	37,78 <sup>a</sup>	14,32	67,44 <sup>abc</sup>	9,70	62,88 <sup>b</sup>	14,48	54,34 <sup>abc</sup>	16,13	44,68 <sup>a</sup>	6,51		
	G2552	45,90 <sup>a</sup>	4,37	28,34 <sup>a</sup>	41,50	26,48 <sup>a</sup>	26,60	21,76 <sup>b</sup>	12,45	18,56 <sup>b</sup>	9,12	16,46 <sup>a</sup>	8,56		
	G5223	40,14 <sup>a</sup>	3,97	27,28 <sup>a</sup>	16,74	18,46 <sup>a</sup>	17,00	11,02 <sup>ab</sup>	6,61	13,90 <sup>ab</sup>	7,67	20,34 <sup>a</sup>	13,51		
SP3	G6328	32,56 <sup>a</sup>	2,94	14,68 <sup>a</sup>	8,37	9,52 <sup>a</sup>	8,10	11,96 <sup>ab</sup>	4,22	10,66 <sup>ab</sup>	4,41	11,88 <sup>a</sup>	7,17		
	T475	44,82 <sup>a</sup>	11,24	22,10 <sup>a</sup>	10,70	4,08 <sup>a</sup>	6,00	1,98 <sup>a</sup>	1,89	7,12 <sup>ab</sup>	5,12	13,52 <sup>a</sup>	4,57		
	L437	45,24 <sup>a</sup>	4,70	27,80 <sup>a</sup>	13,38	10,98 <sup>a</sup>	10,09	10,76 <sup>ab</sup>	14,98	4,34 <sup>a</sup>	7,24	10,12 <sup>a</sup>	4,36		
	R3846	45,16 <sup>a</sup>	6,35	12,66 <sup>a</sup>	10,33	7,58 <sup>a</sup>	3,16	12,46 <sup>ab</sup>	6,92	9,92 <sup>ab</sup>	3,86	10,76 <sup>a</sup>	6,86		
	R4052	35,20 <sup>a</sup>	6,11	36,64 <sup>a</sup>	14,97	12,50 <sup>a</sup>	13,62	9,68 <sup>ab</sup>	7,08	8,94 <sup>ab</sup>	4,97	12,54 <sup>a</sup>	6,06		
	R5487	40,78 <sup>a</sup>	14,06	26,16 <sup>a</sup>	11,85	8,82 <sup>a</sup>	4,58	6,92 <sup>ab</sup>	3,83	12,02 <sup>ab</sup>	7,57	18,50 <sup>a</sup>	4,02		

**Tabla 9.29:** Valores medios de las tres subpoblaciones para cada verraco, en ausencia de cafeína, en el T0 y durante la prueba del choque a frigore. Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre verracos.

MUESTRAS INCUBADAS CON CAFEÍNA													
	T0		S0		S1		S2		S3		S5		
	Media	Desv típ.	Media	Desv típ.	Media	Desv típ.	Media	Desv típ.	Media	Desv típ.	Media	Desv típ.	
SP1	G2552	57,22 <sup>a</sup>	5,82	50,58 <sup>b</sup>	6,10	18,76 <sup>a</sup>	20,73	48,28 <sup>ab</sup>	18,59	42,22 <sup>ab</sup>	16,32	51,20 <sup>b</sup>	12,25
	G5223	55,16 <sup>a</sup>	5,13	49,74 <sup>b</sup>	9,57	59,26 <sup>c</sup>	14,57	57,60 <sup>b</sup>	9,48	55,94 <sup>b</sup>	13,57	61,28 <sup>b</sup>	15,78
	G6328	62,32 <sup>a</sup>	9,55	18,02 <sup>a</sup>	7,96	38,06 <sup>abc</sup>	9,11	25,78 <sup>a</sup>	8,46	24,80 <sup>a</sup>	12,50	18,10 <sup>a</sup>	10,34
	T475	55,72 <sup>a</sup>	5,37	39,84 <sup>ab</sup>	15,49	37,20 <sup>abc</sup>	5,55	45,70 <sup>ab</sup>	5,57	35,02 <sup>ab</sup>	9,58	43,80 <sup>ab</sup>	16,34
	L437	59,14 <sup>a</sup>	5,18	40,34 <sup>ab</sup>	17,01	47,62 <sup>bc</sup>	15,68	41,86 <sup>ab</sup>	17,36	41,66 <sup>ab</sup>	16,84	49,22 <sup>b</sup>	12,99
	R3846	52,78 <sup>a</sup>	4,91	51,18 <sup>b</sup>	9,41	37,24 <sup>abc</sup>	10,94	31,68 <sup>a</sup>	8,66	30,80 <sup>ab</sup>	11,16	37,24 <sup>ab</sup>	15,49
	R4052	60,60 <sup>a</sup>	10,81	40,80 <sup>ab</sup>	10,80	28,06 <sup>ab</sup>	10,19	34,16 <sup>ab</sup>	6,69	29,80 <sup>a</sup>	11,12	40,02 <sup>ab</sup>	5,93
R5487	55,04 <sup>a</sup>	7,63	46,06 <sup>b</sup>	11,42	40,22 <sup>abc</sup>	15,71	34,04 <sup>ab</sup>	9,95	47,46 <sup>ab</sup>	8,33	44,24 <sup>ab</sup>	10,56	
SP2	G2552	11,30 <sup>ab</sup>	5,47	34,24 <sup>a</sup>	12,37	70,68 <sup>b</sup>	27,96	35,36 <sup>ab</sup>	20,27	49,28 <sup>ab</sup>	13,62	29,04 <sup>a</sup>	11,97
	G5223	8,26 <sup>ab</sup>	3,48	38,44 <sup>a</sup>	15,60	38,60 <sup>a</sup>	14,67	31,40 <sup>a</sup>	14,44	37,76 <sup>a</sup>	12,90	29,88 <sup>a</sup>	14,50
	G6328	10,00 <sup>ab</sup>	2,39	53,82 <sup>a</sup>	13,83	50,16 <sup>ab</sup>	10,13	61,68 <sup>c</sup>	9,05	64,24 <sup>ab</sup>	12,63	71,12 <sup>b</sup>	10,79
	T475	9,66 <sup>ab</sup>	3,28	54,98 <sup>a</sup>	22,03	55,26 <sup>ab</sup>	10,98	47,62 <sup>abc</sup>	7,35	55,76 <sup>ab</sup>	10,27	42,54 <sup>ab</sup>	17,64
	L437	7,58 <sup>ab</sup>	3,93	40,82 <sup>a</sup>	22,20	48,78 <sup>ab</sup>	12,14	53,20 <sup>abc</sup>	15,47	55,54 <sup>ab</sup>	18,22	40,18 <sup>a</sup>	16,94
	R3846	3,66 <sup>a</sup>	2,27	39,50 <sup>a</sup>	9,25	53,74 <sup>ab</sup>	11,63	60,76 <sup>bc</sup>	8,55	57,16 <sup>ab</sup>	18,22	50,70 <sup>ab</sup>	10,43
	R4052	13,42 <sup>b</sup>	5,19	50,50 <sup>a</sup>	8,28	65,78 <sup>ab</sup>	9,50	55,56 <sup>abc</sup>	8,93	66,46 <sup>b</sup>	11,63	47,64 <sup>ab</sup>	11,03
R5487	6,82 <sup>ab</sup>	3,00	42,36 <sup>a</sup>	9,52	50,90 <sup>ab</sup>	17,12	57,72 <sup>bc</sup>	10,72	41,92 <sup>ab</sup>	9,02	39,86 <sup>a</sup>	16,57	
SP3	G2552	31,48 <sup>ab</sup>	6,50	15,20 <sup>ab</sup>	9,40	10,56 <sup>a</sup>	10,83	16,40 <sup>a</sup>	9,55	8,50 <sup>a</sup>	5,57	19,74 <sup>a</sup>	12,55
	G5223	36,58 <sup>ab</sup>	8,28	11,84 <sup>ab</sup>	9,65	2,16 <sup>a</sup>	3,08	10,96 <sup>a</sup>	10,86	6,28 <sup>a</sup>	5,54	8,84 <sup>a</sup>	5,59
	G6328	27,68 <sup>a</sup>	9,87	28,18 <sup>b</sup>	11,49	11,84 <sup>a</sup>	5,86	12,52 <sup>a</sup>	5,49	10,94 <sup>a</sup>	3,38	10,78 <sup>a</sup>	5,75
	T475	34,62 <sup>ab</sup>	8,01	5,18 <sup>a</sup>	8,01	7,52 <sup>a</sup>	7,00	6,68 <sup>a</sup>	3,67	9,24 <sup>a</sup>	5,47	13,66 <sup>a</sup>	4,41
	L437	33,28 <sup>ab</sup>	4,76	18,86 <sup>ab</sup>	17,68	3,56 <sup>a</sup>	5,78	4,90 <sup>a</sup>	4,53	2,78 <sup>a</sup>	3,84	10,64 <sup>a</sup>	7,79
	R3846	43,58 <sup>b</sup>	5,24	9,32 <sup>ab</sup>	8,83	9,00 <sup>a</sup>	1,94	7,54 <sup>a</sup>	1,41	12,04 <sup>a</sup>	7,41	12,08 <sup>a</sup>	6,50
	R4052	26,02 <sup>a</sup>	7,72	8,70 <sup>ab</sup>	4,38	6,14 <sup>a</sup>	5,98	10,28 <sup>a</sup>	4,65	3,70 <sup>a</sup>	2,35	12,40 <sup>a</sup>	6,86
R5487	38,14 <sup>ab</sup>	8,02	50,58 <sup>ab</sup>	6,10	18,76 <sup>a</sup>	20,73	48,28 <sup>a</sup>	18,59	42,22 <sup>a</sup>	16,32	51,20 <sup>a</sup>	12,25	

**Tabla 9.30:** Valores medios de las tres subpoblaciones para cada verruco, en presencia de cafeína, en el T0 y durante la prueba de la termorresistencia. Distintos superíndices revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre verrucos.