



UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA, CIRUGÍA Y ANATOMÍA
VETERINARIA**

**VALORACIÓN MEDIANTE IMÁGENES DIGITALES
DEL SEMEN DESCONGELADO DE VERRACO.**

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

FERNANDO TEJERINA AMPUDIA

León, Diciembre de 2007

A mi familia y Judith

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera llegado a buen puerto sin la colaboración de un gran conjunto de personas e instituciones. Desde aquí, mi más profundo agradecimiento y reconocimiento a todos aquellos que de una manera desinteresada habéis estado a mi lado; y en especial:

A mis directores, Juan Carlos Domínguez y Beatriz Alegre, por proporcionarme la posibilidad de realizar el doctorado bajo su dirección, poniendo a mi disposición cuantos recursos materiales necesitase e integrándome en un grupo de investigación con unos valores humanos incomparables.

A la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León por la concesión de la Beca de Formación de Personal Investigador, que durante 4 años, me ha permitido realizar esta Tesis Doctoral.

A Raúl González, al que le debo más de la mitad de este trabajo, por haberme enseñado a “manejarme” en un laboratorio andrológico, por mostrarse siempre dispuesto a responder a cualquiera de mis dudas y a ayudar en cualquier circunstancia, por compartir los momentos más exasperantes de la realización de este trabajo transmitiéndome su inquebrantable espíritu de superación; pero por encima de todo por ofrecerme una amistad verdadera y desinteresada.

A Manuel Castejón, por su generosidad al dedicar infinitud de su tiempo a la realización de un excepcional trabajo de diseño de los métodos estadísticos empleados en esta Tesis, mostrándose siempre dispuesto en todo momento a contestar mis dudas y aconsejándome como solo un amigo sabe hacerlo.

A Carles Soler por acogerme en el Departamento de Biología Funcional y Antropología Física de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia, proporcionándome las nociones necesarias para la realización del diseño de la presente Tesis Doctoral; sus consejos me han permitido disponer de una base sólida sobre la que desarrollar el resto del trabajo.

A Sergio Bernal y Sonia Cárdenas (y al pequeño Santiago) por su compañerismo, simpatía y amistad, que les ha llevado en multitud de ocasiones a renunciar a sus tareas y tiempo libre por ayudarme en el desarrollo de mi trabajo.

Al resto de becarios, que han sido más que simples compañeros de trabajo, con los que he coincidido en este periodo: Javier Campos, Jose Carlos García, Alvaro Ferreras, Cristian Córdoba, Judith Tejero,...

A Maite Carbajo y sus becarios Jenny y Adelino por compartir su experiencia en la preparación de medios de capacitación, y además a estos últimos por los momentos vividos mientras fuimos compañeros de despacho.

A toda la Unidad de Reproducción y Obstetricia de la Universidad de León, por los años de formación y trabajo que he pasado en ella, destacando los constantes ánimos y simpatía que siempre me han mostrado todos sus integrantes, en especial con aquellos con los que he tenido un mayor contacto como Lina, Merce, Patri....

A Jesús Peláez por resolver cuantas dudas le planteaba y permitirme acceder a la bibliografía que tanto trabajo le costo reunir.

A Enrique Alegre por facilitarme una información clara y sencilla de la mecánica de funcionamiento del análisis por imagen digital y por su constante colaboración en todos aquellos proyectos en los que hemos trabajado juntos. Así como a sus becarios, Hernando y Luz Karime, por compartir conmigo su equipo siempre que lo necesitaba.

A Centrotec S.A., y a todo el personal, becarios y alumnos en prácticas con los que he tenido el placer de coincidir, bien durante la realización de los experimentos o posteriormente durante el periodo en el que estuve trabajando en el centro; a todos ellos muchas gracias por facilitarme mi labor.

A Paulino de Paz por ayudarme desinteresadamente en la búsqueda de la información referente a las características de los fluorocromos.

A Jose Félix Pérez, por involucrarme en nuevos e interesantes proyectos prestandome toda su ayuda y buen hacer.

A Proiser R+D, y en especial a Francisco Blasco por darme las soluciones para superar todos los problemas que me he ido encontrando con el sistema de análisis, sin las cuales no hubiese podido completar este trabajo; y a María Sancho por dotarme de la formación necesaria para la realización de las tinciones espermáticas.

A los Capitanes Liñán y Gaudó y al Teniente Coronel Berruezo, así como al resto del personal militar de la remonta de Santander por haberme instruido en el área de la reproducción equina, mostrándose siempre atentos a responder cualquiera de mis dudas.

A Heriberto Rodríguez por permitirme participar durante 4 meses de la experiencia y buen hacer de un grupo de investigación excelente, a la par que he contado siempre con su apoyo y ayuda; así como a toda la División (personal docente, técnicos y personal de servicios) de Reproducción de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas; ya que los frutos allí cosechados no hubiesen sido posibles sin su colaboración y profesionalidad.

A Fernando, Marta, Yoseph, Seri, Jatesada, Aran, Antonio, Nin, Yaohong, Ann-Sofi y al resto de compañeros becarios, o ya doctores, con los que tuve el gusto de coincidir durante mis estancias en Uppsala, porque nunca olvidare los buenos momentos pasados con vosotros y que hicieron que me olvidase de la morriña de estar lejos de mi país.

A Biophos por confiar en mi trabajo para el desarrollo de sus productos, y en especial a Hans Stoehr por prestar siempre interés a mis observaciones y valorar mis esfuerzos y dedicación.

A mis Amigos, ya que este trabajo me ha obligado, en muchas ocasiones, a “olvidarme” de ellos, pero a pesar de esto me han mostrado su apoyo incondicional, siendo su ánimo indispensable para alcanzar el objetivo final.

A toda mi familia, pero muy especialmente a mis padres, por la entrega y generosidad que han mostrado en la educación y cuidado de sus hijos; ayudándome en todos mis retos y haciéndose cargo de muchas de mis obligaciones y tareas sin ni siquiera yo pedirselo. No cabe duda que esta Tesis es fruto del espíritu de trabajo y honradez que ellos siempre han inculcado en mí, y que más allá del mundo académico me acompaña en todas las acciones de mi vida.

A mis hermanos, por saberme hacer reír cuando más complicados eran los problemas a los que me enfrentaba, y a mis abuelos que siempre se desvelaron por mí, y no me cabe duda que ahora estarán tremendamente orgullosos del trabajo que he realizado.

Por último mi más emocionado agradecimiento a Judith, porque siempre has sabido estar a mi lado, animándome en los momentos de desazón y aportándome la calma y tranquilidad sin los que hubiese abandonado este proyecto hace tiempo. Has sido la responsable con tu carácter luchador, perseverante y tenaz, de insuflarme la suficiente energía para sobreponerme al desanimo, consiguiendo que confiará en mis capacidades; a la par que me has transmitido tu alegría y amor por la vida. Sin lugar a dudas el mayor triunfo de esta Tesis ha sido encontrarte a ti.

ÍNDICES

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1 EL APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO.....	9
2.1.1 El testículo.....	9
2.1.2 El epidídimo.....	10
2.1.3 Glándulas anejas.....	11
2.1.3.1 Vesículas seminales.....	11
2.1.3.2 Glándula prostática.....	12
2.1.3.3 Glándulas bulbouretrales.....	12
2.2 EL ESPERMATOZOIDE.....	13
2.2.1 La espermatogénesis.....	13
2.2.1.1 Fase proliferativa.....	14
2.2.1.2 Meiosis.....	14
2.2.1.3 Espermioogénesis o espermatohistogénesis.....	15
2.2.2. Morfología espermática.....	15
2.2.2.1. Cabeza espermática.....	15
2.2.2.2. El flagelo del espermatozoide.....	17
2.2.2.3 La membrana citoplasmática.....	19
2.3 CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN PORCINO.....	21
2.3.1 Introducción histórica.....	21
2.3.1.1 Historia general de la criopreservación.....	21
2.3.1.1.1 <i>Pasado, presente y futuro en la especie porcina</i>	22
2.3.2 Efectos de la congelación y descongelación sobre el espermatozoide.....	25
2.3.2.1 Efectos deletéreos de los agentes crioprotectores.....	26
2.3.2.2 Efecto del enfriamiento, congelación y descongelación.....	26
2.3.2.2.1 <i>Efectos de los cambios de temperatura</i>	26
2.3.2.2.2 <i>Efecto de la formación-disolución de hielo</i>	29

2.3.3 Repercusiones de la crioconservación sobre la funcionalidad y la estructura espermática.....	33
2.3.3.1 Alteraciones en las membranas celulares.....	33
2.3.3.2 Modificaciones del medio interno.....	35
2.3.3.3 Efectos sobre el citoesqueleto.....	36
2.3.3.4 Efectos sobre la movilidad.....	37
2.3.3.5 Efectos sobre el núcleo.....	38
2.4 TÉCNICAS DE ANÁLISIS SEMINAL.....	39
2.4.1 Introducción.....	39
2.4.2 Técnicas de análisis seminal.....	41
2.4.2.1 Valoración macroscópica del eyaculado.....	41
2.4.2.2 Medida de la concentración espermática.....	41
2.3.2.3 Evaluación de la motilidad espermática.....	43
2.4.2.4 Morfología espermática.....	44
2.4.2.5 Análisis de la membrana citoplasmática.....	45
2.4.2.6 Evaluación de la integridad del acrosoma.....	50
2.4.2.7 Evaluación de la función mitocondrial.....	53
2.4.2.8 Evaluación del status de capacitación.....	54
2.3.2.9 Evaluación de la integridad del ADN.....	56
2.4.2.10 Evaluación de la capacidad fecundante.....	57
2.4.2.11 Otras pruebas para la valoración <i>in vitro</i> de la calidad seminal.....	60
2.5. ANÁLISIS SEMINAL MEDIANTE TECNOLOGÍA DE IMÁGENES DIGITALES.....	63
2.5.1 Introducción histórica.....	63
2.5.1.1 Antecedentes y nacimiento de los sistemas de análisis seminal mediante imágenes digitales.....	64
2.5.1.2 Desarrollo de los sistemas CASA.....	66
2.5.1.3 Situación actual.....	68
2.5.2 El sistema CASA.....	70
2.5.2.1 Componentes y funcionamiento.....	70
2.5.2.2 Parámetros medidos por los sistemas CASA.....	74
2.5.2.2.1 Parámetros cinéticos.....	74
2.5.2.2.2 Parámetros morfométricos.....	78

2.5.3 Fuentes de variación en los resultados de los sistemas CASA.....	80
2.5.3.1 Fuentes de variación en el análisis cinético.....	81
2.5.3.1.1 Fuentes de variación originadas por los equipos de captura y análisis.....	81
2.5.3.1.2 Factores de variación derivados de las condiciones del análisis.....	85
2.5.3.2 Fuentes de variación en las medidas morfométricas realizadas por sistemas ASMA.....	88
2.5.3.2.1 Fuentes de variación originadas por los equipos de captura y análisis.....	88
2.5.3.2.2 Factores de variación derivados de las condiciones del análisis.....	89
2.5.4 Utilización actual de los sistemas computerizados de análisis seminal.....	91
2.5.4.1 Uso de la tecnología de análisis de imagen digital en el campo de la toxicología-farmacología....	91
2.5.4.2 Uso de los sistemas CASA en la evaluación del material seminal tras la aplicación de procesos tecnológicos.....	92
2.5.4.3 Empleo de los sistemas CASA en la predicción de la fertilidad.....	93
2.5.4.4 Utilización de los sistemas CASA para la determinación de la concentración espermática.....	96
2.5.4.5 Uso de los sistemas CASA en la determinación de subpoblaciones espermáticas.....	97
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	101
3.1 PRODUCTOS Y SOLUCIONES.....	103
3.2 ANIMALES EMPLEADOS.....	106
3.3 RECOLECCIÓN Y VALORACIÓN RUTINARIA SEMINAL.....	107
3.4 PROCESO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN.....	109
3.5 METODOLOGÍA GENERAL DEL ANÁLISIS DE LA MOTILIDAD DE ESPERMATOZOIDES DE VERRACO MEDIANTE EL SISTEMA <i>INTEGRATED SEMEN ANALYSIS SYSTEM</i> (ISAS®).....	111
3.5.1 Preparación de la muestra.....	111
3.5.2 Equipo óptico, de captura y sistema CASA empleados.....	112
3.6 METODOLOGÍA GENERAL DEL ANÁLISIS DE LA MORFOMETRÍA DE LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE DE VERRACO MEDIANTE EL EQUIPO <i>INTEGRATED SEMEN ANALYSIS SYSTEM</i> ® (ISAS®).....	115
3.6.1 Preparación de la muestra.....	115
3.6.2 Equipo óptico, de captura y sistema CASA empleados.....	116
3.7 VALORACIÓN DE LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA.....	117
3.8 VALORACIÓN DE LA VITALIDAD ESPERMÁTICA.....	118
3.9 CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DESCONGELADOS.....	119

3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	122
3.11 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	123
3.11.1 Experimento 1. Evaluación de los patrones cinéticos descritos por los espermatozoides de verraco durante el proceso de criopreservación.....	123
3.11.1.1. Identificación de las subpoblaciones cinéticas.....	124
3.11.1.2. Análisis estadístico aplicado a los parámetros cinéticos individualmente.....	127
3.11.2 Experimento 2. Comparación de la distribución de las subpoblaciones cinéticas, el porcentaje de movilidad, la vitalidad y la integridad acrosómica de espermatozoides descongelados, diluidos en BTS o MR-A [®] THAW.....	128
3.11.2.1. Análisis estadístico.....	128
3.11.3 Experimento 3. Evaluación de la morfometría de la cabeza espermática de verraco durante el proceso de criopreservación.....	129
3.11.3.1. Análisis estadístico.....	130
3.11.4 Experimento 4. Determinación de la congelabilidad de un eyaculado a partir de los resultados de los análisis convencional y computerizado por imágenes digitales.....	131
3.11.5 Experimento 5. Caracterización cinética del semen de verraco sometido a condiciones de capacitación tras la descongelación.....	132
3.11.5.1. Análisis estadístico.....	133
4. RESULTADOS.....	135
4.1. ANÁLISIS SEMINAL CONVENCIONAL.....	137
4.2. ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS ESPERMÁTICOS CONVENCIONALES DURANTE EL PROCESO DE CRIOCONSERVACIÓN.....	138
4.2.1 Evolución de la vitalidad y la integridad acrosómica durante el proceso de criopreservación.....	138
4.2.2 Evolución del porcentaje de movilidad espermática durante el proceso de criopreservación.....	141
4.3 EXPERIMENTO 1. EVALUACIÓN DE LOS PATRONES CINÉTICOS DESCRITOS POR LOS ESPERMATOZOIDEOS DE VERRACO DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACION.....	144
4.3.1 Determinación de las subpoblaciones cinéticas presentes en un eyaculado.....	144
4.3.2 Evolución de las subpoblaciones espermáticas durante la congelación-descongelación.....	147
4.3.3 Evolución de los parámetros cinéticos individuales durante la congelación-descongelación.....	155

4.3.4 Correlaciones de los parámetros cinéticos y la distribución subpoblacional con la motilidad, la vitalidad y la integridad acrosómica.....	158
4.4 EXPERIMENTO 2. COMPARACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES CINÉTICAS, EL PORCENTAJE DE MOVILIDAD, LA VITALIDAD Y LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA DE ESPERMATOZOIDES DESCONGELADOS, DILUIDOS EN BTS O MRA THAW®.....	160
4.4.1 Análisis cinético.....	160
4.4.2 Vitalidad e integridad acrosómica.....	163
4.5 EXPERIMENTO 3: EVALUACIÓN DE LA MORFOMETRÍA DE LA CABEZA ESPERMÁTICA DE VERRACO DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN.....	165
4.5.1 Determinación de las subpoblaciones morfométricas presentes en un eyaculado.....	165
4.5.2 Evolución de los parámetros morfométricos individuales durante la congelación-descongelación.....	166
4.5.3 Correlaciones de los parámetros morfométricos con la vitalidad, la integridad acrosómica y la motilidad.....	173
4.6 EXPERIMENTO 4: DETERMINACIÓN DE LA CONGELABILIDAD DE UN EYACULADO A PARTIR DE LOS RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS CONVENCIONAL Y COMPUTERIZADO POR IMÁGENES DIGITALES.....	175
4.6.1 Correlación de los parámetros individuales con la congelabilidad.....	175
4.6.2 Modelos de regresión lineal.....	177
4.7 EXPERIMENTO 5: CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DEL SEMEN DE VERRACO SOMETIDO A CONDICIONES DE CAPACITACIÓN TRAS LA DESCONGELACIÓN.....	179
4.7.1 Evolución del porcentaje de movilidad durante la incubación.....	179
4.7.2 Estudio de la distribución subpoblacional cinética durante el proceso de incubación en un medio capacitante tras la descongelación de espermatozoides de porcino.....	180
4.7.3 Estudio de los parámetros cinéticos de los espermatozoides de porcino durante la incubación en un medio capacitante tras la descongelación.....	183
5. DISCUSIÓN.....	187
5.1 EVOLUCIÓN DE LA VITALIDAD, INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y MOTILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES DE VERRACO DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN.....	189
5.2 EXPERIMENTO 1: EVALUACIÓN DE LOS PATRONES CINÉTICOS DESCRITOS POR LOS ESPERMATOZOIDES DE VERRACO DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACION.....	196

5.3 EXPERIMENTO 2: COMPARACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES CINÉTICAS, EL PORCENTAJE DE MOVILIDAD, LA VITALIDAD Y LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA DE ESPERMATOZOIDES DESCONGELADOS, DILUIDOS EN BTS O MRA® THAW.....	204
5.4 EXPERIMENTO 3: EVALUACIÓN DE LA MORFOMETRÍA DE LA CABEZA ESPERMÁTICA DE VERRACO DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN.....	206
5.5 EXPERIMENTO 4: DETERMINACIÓN DE LA CONGELABILIDAD DE UN EYACULADO A PARTIR DE LOS RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS CONVENCIONAL Y COMPUTERIZADO POR IMÁGENES DIGITALES.....	210
5.6 EXPERIMENTO 5: CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DEL SEMEN DE VERRACO SOMETIDO A CONDICIONES DE CAPACITACIÓN TRAS LA DESCONGELACIÓN.....	214
6. CONCLUSIONES.....	217
7. CONCLUSIONS.....	221
8. RESUMEN.....	225
9. SUMMARY.....	231
10. BIBLIOGRAFÍA.....	237
11. ANEXOS.....	277

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Sustancias fluorescentes empleadas en el análisis seminal.....	61
Tabla 2. Parámetros cinéticos medidos por los sistemas CASA.....	79
Tabla 3. Reactivos empleados en la realización de las soluciones y medios.....	103
Tabla 4. Diluyente de refrigeración.....	104
Tabla 5. Diluyente de congelación.....	104
Tabla 6. Solución de glutaraldehído al 2%.....	105
Tabla 7. Solución stock de PNA-FITC.....	105
Tabla 8. Solución stock de Ioduro de Propidio.....	105
Tabla 9. Solución stock de Carboxifluoresceína.....	105
Tabla 10. Solución Formolada.....	105
Tabla 11. Medio completo de Tyrode (MCT).....	106
Tabla 12. Machos empleados en el trabajo experimental.....	107
Tabla 13. Número de espermatozoides analizados en cada tiempo.....	124
Tabla 14. Número de espermatozoides analizados en cada uno de los diluyentes.....	128
Tabla 15. Grupos de eyaculados sometidos al proceso de capacitación.....	133
Tabla 16. Número de espermatozoides analizados en cada tiempo y grupo.....	133
Tabla 17. Resultados medios del análisis seminal convencional a tiempo 0.....	137
Tabla 18. Vitalidad espermática e integridad acrosómica en cada punto de toma de muestras.....	138
Tabla 19. Vitalidad espermática e integridad acrosómica de cada raza durante el proceso de criopreservación.....	140
Tabla 20. Vitalidad espermática e integridad acrosómica de cada macho durante el proceso de criopreservación.....	140
Tabla 21. Porcentaje de movilidad espermática, analizada en presencia/ausencia de cafeína en cada uno de los puntos de toma de muestra.....	141
Tabla 22. Porcentaje de espermatozoides móviles de cada una de las razas analizadas, en presencia/ausencia de cafeína y en cada uno de los tiempos considerados.....	143
Tabla 23. Evolución del porcentaje de movilidad de cada uno de los individuos.....	143
Tabla 24. Índices de correlación entre la determinación del porcentaje de movilidad en presencia- ausencia de cafeína.....	144
Tabla 25. Índices de correlación entre la determinación del porcentaje de movilidad espermática en ausencia de cafeína y los valores de integridad acrosómica y vitalidad.....	144
Tabla 26. Índices de correlación entre la determinación del porcentaje de movilidad espermática en presencia de cafeína y los valores de integridad acrosómica y vitalidad.....	144
Tabla 27. Valores promedio de los parámetros cinéticos de cada subpoblación.....	145

Tabla 28. Evolución de las subpoblaciones espermáticas durante el proceso de criopreservación en muestras sin cafeína añadida.....	147
Tabla 29. Evolución de las subpoblaciones espermáticas durante el proceso de criopreservación en muestras con cafeína añadida.....	148
Tabla 30. Comparación del tamaño subpoblacional entre las muestras analizadas en presencia de cafeína con respecto a las que no fue añadida dicha sustancia.....	149
Tabla 31. Comparación del tamaño subpoblacional entre las dos razas empleadas en las muestras analizadas sin cafeína.....	151
Tabla 32. Comparación del tamaño subpoblacional entre las dos razas empleadas en las muestras analizadas con cafeína.....	152
Tabla 33. Evolución de la distribución de las subpoblaciones espermáticas en el macho E955 durante el proceso de criopreservación.....	153
Tabla 34. Evolución de la distribución de las subpoblaciones espermáticas en el macho G2552 durante el proceso de criopreservación.....	153
Tabla 35. Evolución de la distribución de las subpoblaciones espermáticas en el macho G5223 durante el proceso de criopreservación.....	153
Tabla 36. Evolución de la distribución de las subpoblaciones espermáticas en el macho G6328 durante el proceso de criopreservación.....	154
Tabla 37. Evolución de la distribución de las subpoblaciones espermáticas en el macho T475 durante el proceso de criopreservación.....	154
Tabla 38. Evolución de la distribución de las subpoblaciones espermáticas en el macho L69 durante el proceso de criopreservación.....	154
Tabla 39. Evolución de la distribución de las subpoblaciones espermáticas en el macho L437 durante el proceso de criopreservación.....	154
Tabla 40. Evolución de la distribución de las subpoblaciones espermáticas en el macho R3846 durante el proceso de criopreservación.....	155
Tabla 41. Evolución de la distribución de las subpoblaciones espermáticas en el macho R4052 durante el proceso de criopreservación.....	155
Tabla 42. Evolución de la distribución de las subpoblaciones espermáticas en el macho R5487 durante el proceso de criopreservación.....	155
Tabla 43. Medias de los parámetros cinéticos en ausencia de cafeína durante el proceso de criopreservación.....	156
Tabla 44. Medias de los parámetros cinéticos en presencia de cafeína, durante el proceso de criopreservación.....	156
Tabla 45. Comparación de los resultados de los parámetros cinéticos analizados en ausencia vs. presencia de cafeína a lo largo del proceso de criopreservación.....	157
Tabla 46. Correlaciones entre el tamaño de cada subpoblación en cada tiempo con los valores de la vitalidad, la integridad acrosómica (Int. Acrosómica), el porcentaje de espermatozoides móviles determinado en ausencia de cafeína (% Motilidad) y el porcentaje de espermatozoides móviles determinados en presencia de cafeína (% Motilidad + Caf.).....	158

Tabla 47. Correlaciones significativas ($p < 0,05$) entre los parámetros cinéticos determinados en ausencia de cafeína en cada tiempo, con: los valores de la vitalidad, la integridad acrosómica (Int. Acrosómica), el porcentaje de espermatozoides móviles determinado en ausencia de cafeína (% Motilidad) y el porcentaje de espermatozoides móviles determinados en presencia de cafeína (% Motilidad + Caf.).....	159
Tabla 48. Correlaciones significativas ($p < 0,05$) entre los parámetros cinéticos determinados en presencia de cafeína en cada tiempo, con: los valores de la vitalidad, la integridad acrosómica (Int. Acrosómica), el porcentaje de espermatozoides móviles determinado en ausencia de cafeína (% Motilidad) y el porcentaje de espermatozoides móviles determinados en presencia de cafeína (% Motilidad + Caf.).....	159
Tabla 49. Distribución, en cada una de las subpoblaciones descritas, de los espermatozoides descongelados analizados en BTS y MRA Thaw [®] en ausencia/presencia de cafeína.....	160
Tabla 50. Parámetros cinéticos determinados en cada uno de los diluyentes de descongelación considerados en presencia/ausencia de cafeína.....	162
Tabla 51. Porcentaje de espermatozoides móviles en cada uno de los diluyentes de descongelación considerados con/sin cafeína.....	163
Tabla 52. Vitalidad espermática e integridad acrosómica en los dos diluyentes de descongelación considerados.....	164
Tabla 53. Evolución de los parámetros morfométricos durante el proceso de criopreservación.....	166
Tabla 54. Comparación de los resultados de los parámetros morfométricos entre las dos razas consideradas.....	170
Tabla 55. Parámetros morfométricos de la cabeza espermática del macho E955 durante el proceso de criopreservación.....	171
Tabla 56. Parámetros morfométricos de la cabeza espermática del macho G2552 durante el proceso de criopreservación.....	171
Tabla 57. Parámetros morfométricos de la cabeza espermática del macho G5223 durante el proceso de criopreservación.....	171
Tabla 58. Parámetros morfométricos de la cabeza espermática del macho G6328 durante el proceso de criopreservación.....	171
Tabla 59. Parámetros morfométricos de la cabeza espermática del macho T475 durante el proceso de criopreservación.....	172
Tabla 60. Parámetros morfométricos de la cabeza espermática del macho L69 durante el proceso de criopreservación.....	172
Tabla 61. Parámetros morfométricos de la cabeza espermática del macho L437 durante el proceso de criopreservación.....	172
Tabla 62. Parámetros morfométricos de la cabeza espermática del macho R3846 durante el proceso de criopreservación.....	172
Tabla 63. Parámetros morfométricos de la cabeza espermática del macho R4052 durante el proceso de criopreservación.....	173
Tabla 64. Parámetros morfométricos de la cabeza espermática del macho R5487 durante el proceso de criopreservación.....	173

Tabla 65. Índices de correlación entre los parámetros cinéticos, en cada tiempo, con: los valores de la vitalidad, la integridad acrosómica (Int. Acrosómica), el porcentaje de espermatozoides móviles determinado en ausencia de cafeína (% Motilidad) y el porcentaje de espermatozoides móviles determinados en presencia de cafeína (% Motilidad + Caf.).....	174
Tabla 66. Índices de correlación entre la congelabilidad y el porcentaje de movilidad medido de forma subjetiva y el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales.....	175
Tabla 67. Índices de correlación entre la congelabilidad y el porcentaje de movilidad medida con el sistema CASA.....	175
Tabla 68. Índices de correlación entre la congelabilidad y el porcentaje de vitalidad y el porcentaje de acrosomas íntegros.....	175
Tabla 69. Correlaciones con la congelabilidad del tamaño de cada subpoblación.....	176
Tabla 70. Correlaciones con la congelabilidad de los parámetros cinéticos.....	176
Tabla 71. Correlaciones entre los parámetros morfométricos y el % de vitalidad tras la descongelación.....	177
Tabla 72. Porcentaje de movilidad en cada uno de los grupos durante el proceso de capacitación.....	179
Tabla 73. Comparación de la distribución subpoblacional entre grupos.....	181
Tabla 74. Parámetros cinéticos en el grupo de buenos congeladores.....	183
Tabla 75. Parámetros cinéticos en el grupo de congeladores medios.....	183
Tabla 76. Parámetros cinéticos en el grupo de malos congeladores.....	184
Tabla 77. Resultados de la VCL ($\mu\text{m/s}$) en los tres grupos de eyaculados considerados.....	184
Tabla 78. Resultados de la VSL ($\mu\text{m/s}$) en los tres grupos de eyaculados considerados.....	184
Tabla 79. Resultados de la VAP ($\mu\text{m/s}$) en los tres grupos de eyaculados considerados.....	184
Tabla 80. Resultados del LIN (%) en los tres grupos de eyaculados considerados.....	184
Tabla 81. Resultados del STR (%) en los tres grupos de eyaculados considerados.....	185
Tabla 82. Resultados del WOB (%) en los tres grupos de eyaculados considerados.....	185
Tabla 83. Resultados de la ALH (μm) en los tres grupos de eyaculados considerados.....	185
Tabla 84. Resultados de la BCF (Hz) en los tres grupos de eyaculados considerados.....	185

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Vista sagital del aparato reproductor del cerdo.....	13
Figura 2. Partes de un espermatozoide.....	17
Figura 3. Vista dorsal (A) y corte sagital (B) de la cabeza espermática.....	17
Figura 4. Mecanismo de acción de diversas sustancias fluorescentes empleadas en la valoración de la integridad de la membrana citoplasmática.....	48
Figura 5. Mecanismo de acción de diferentes sustancias empleadas en la evaluación de la integridad acrosomal.....	53
Figura 6. Representación de la célula y su radio de búsqueda (A), y el trazado de su trayectoria en la siguiente imagen.....	73
Figura 7. Reconstrucción de las trayectorias cuando dos espermatozoides comparten la misma zona de probabilidad.....	73
Figura 8. Métodos de cálculo de la VAP.....	76
Figura 9. Efecto de la frecuencia de captura en el trazado de la trayectoria.....	83
Figura 10. Imagen obtenida con una cámara de captura discontinua (Pulnix PE2015).....	84
Figura 11. Imagen obtenida con una cámara de captura continua (Basler A312-F).....	84
Figura 12. Imagen del recorrido de un espermatozoide analizada por el programa ISAS®.....	114
Figura 13. Aspecto de la cabeza espermática en el momento de su captura.....	117
Figura 14. Imagen procesada, con la cabeza y cola segmentadas y las medidas morfométricas básicas.....	117
Figura 15. Diagrama de flujo de las operaciones realizadas hasta la congelación del semen.....	120
Figura 16. Diagrama de flujo de las operaciones realizadas tras las descongelación del material seminal.....	121
Figura 17. Porcentaje de vitalidad espermática durante el proceso de congelación (0Horas, 4Horas, 6Horas) y tras la descongelación (DC).....	139
Figura 18. Porcentaje de integridad acrosómica durante el proceso de congelación (0Horas, 4Horas, 6Horas) y tras la descongelación (DC).....	139
Figura 19. Vitalidad espermática e integridad acrosómica en cada uno de los machos, analizadas tras la descongelación.....	141
Figura 20. Evolución del porcentaje de movilidad durante el proceso de criopreservación en muestras con/sin cafeína.....	142
Figura 21. Árbol jerárquico aglomerativo.....	145
Figura 22. Altura de los nodos de unión en el árbol jerárquico aglomerativo.....	146
Figura 23. Distribución de densidades de los datos tras su proyección.....	146
Figura 24. Distribución de las tres subpoblaciones durante el proceso de criopreservación, determinadas en las muestras sin cafeína añadida.....	148

Figura 25. Distribución de las tres subpoblaciones durante el proceso de congelación-descongelación, determinadas en las muestras con cafeína añadida.....	149
Figura 26. Comparación del tamaño de la SP ₁ en muestras con/sin cafeína a lo largo del proceso de criopreservación.....	150
Figura 27. Comparación del tamaño de la SP ₂ en muestras con/sin cafeína a lo largo del proceso de criopreservación.....	150
Figura 28. Comparación del tamaño de la SP ₃ en muestras con/sin cafeína a lo largo del proceso de congelación-descongelación.....	151
Figura 29. Porcentaje de espermatozoides pertenecientes a la SP ₁ en cada uno de los diluyentes con/sin cafeína.....	161
Figura 30. Porcentaje de espermatozoides pertenecientes a la SP ₂ en cada uno de los diluyentes con/sin cafeína.....	161
Figura 31. Porcentaje de espermatozoides pertenecientes a la SP ₃ en cada uno de los diluyentes con/sin cafeína.....	162
Figura 32. Porcentaje de espermatozoides móviles en cada uno de los diluyentes de descongelación con/sin cafeína.....	163
Figura 33. Porcentaje de vitalidad espermática en cada diluyente de descongelación.....	164
Figura 34. Porcentaje de integridad acrosómica en cada diluyente de descongelación.....	164
Figura 35. Distribución de los datos morfométricos tras su proyección.....	166
Figura 36. Evolución de la longitud de la cabeza espermática durante el proceso de criopreservación.....	167
Figura 37. Evolución de la anchura de la cabeza espermática durante el proceso de criopreservación.....	167
Figura 38. Evolución del área de la cabeza espermática durante el proceso de criopreservación.....	167
Figura 39. Evolución del perímetro de la cabeza espermática durante el proceso de criopreservación.....	168
Figura 40. Evolución de la elipticidad de la cabeza espermática durante el proceso de criopreservación.....	168
Figura 41. Evolución de la rugosidad de la cabeza espermática durante el proceso de criopreservación.....	168
Figura 42. Evolución de la elongación de la cabeza espermática durante el proceso de criopreservación.....	169
Figura 43. Evolución de la regularidad de la cabeza espermática durante el proceso de criopreservación.....	169
Figura 44. Porcentaje de movilidad en cada uno de los grupos durante el proceso de capacitación.....	180
Figura 45. Evolución de las subpoblaciones espermáticas durante el periodo de incubación en el grupo de buenos congeladores.....	181
Figura 46. Evolución de las subpoblaciones espermáticas durante el periodo de incubación en el grupo de congeladores medios.....	182

Figura 47. Evolución de las subpoblaciones espermáticas durante el periodo de incubación en el grupo de malos congeladores..... 182

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A	Área de la cabeza del espermatozoide.
ACRO	Integridad acrosómica.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AI	Índice de angularidad.
ALH	Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide.
AMP _C	Adenosín monofosfato cíclico.
ANOVA	Análisis de la varianza.
ASMA	Análisis automático de la morfometría espermática.
ATP	3'-5' Adenosín trifosfato.
AV	Velocidad angular media.
BCF	Frecuencia de batido.
BSA	Albúmina sérica bovina.
BTS	Solución "Beltsville" de descongelación.
Caf.	Cafeína.
CASA	Análisis computerizado de semen.
CCD	<i>Charge couple device</i> .
CECOS	<i>Centre d'étude et conservation du sperme humain</i> .
CON	Congelabilidad.
ConA	Agglutinina de <i>Concavalina ensiformis</i> .
CS	Cantidad suficiente.
CTC	Clortetraciclina.
DABCO	1,4-diazababiciclo [2,2,2] octano.
DMSO	Dimetil sulfóxido.
DNC	Dance.
DNM	Dance medio.
EEUU	Estados Unidos de Norteamérica.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
ELI	Elipticidad de la cabeza espermática.
ELISA	Ensayo inmunoenzimático.
ELO	Elongación de la cabeza espermática.

ESHRE	<i>“European society for human reproduction and embriology”</i> .
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
FIV	Fecundación <i>in vitro</i> .
FN	Porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales.
H_Y	Amplitud del armónico.
HBS	Armónico básico de la oscilación de la cabeza espermática.
HEPES	[N-(2-hidroxietyl) 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.
HOST	Test de endósmosis.
IA	Inseminación artificial.
ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides.
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina.
JC-1	5,5,6,6' - Tetracloro- 1,1',3,3'ioduro tetraetil bencimidazolil carbozianina
JPL	<i>Jet propulsion laboratory</i> .
L	Longitud de la cabeza espermática.
LIN	Índice de linealidad.
MADAbs	Desplazamiento angular medio absoluto.
MADAlg	Desplazamiento angular medio algebraico.
MAE	Membrana acrosomal externa.
MAI	Membrana acrosomal interna.
MCT	Medio completo de Tyrode.
MOTCAF	Porcentaje de espermatozoides móviles medidos mediante el equipo CASA en presencia de cafeína.
MOTSIN	Porcentaje de espermatozoides móviles medidos mediante el equipo CASA en ausencia de cafeína.
MOTSUBJ	Porcentaje de espermatozoides móviles medidos subjetivamente
NASA	<i>National aeronautics and space administration</i> .
NRR	<i>Non Return Rate</i> .
NTSC	<i>National television standards comitee</i> .
OMS	Organización mundial de la salud.

ORT	Test de resistencia osmótica.
P	Perímetro de la cabeza del espermatozoide.
p	Probabilidad.
PAL	<i>Phase alternating line.</i>
PATN	<i>Patern analysis system.</i>
PBS	Solución amortiguadora de sales de fosfato.
PCA	Análisis de componentes principales.
PKA	Proteín kinasa a.
PNA	Aglutinina de <i>Arachis hipogea.</i>
PSA	Aglutinina de <i>Pisum sativum.</i>
r	Coefficiente de correlación.
r ²	Coefficiente de regresión.
RA	Reacción acrosómica.
REG	Regularidad de la cabeza espermática.
ROS	Especies reactivas del oxígeno.
RPE	Ficoeritrina.
RUG	Rugosidad de la cabeza espermática.
SCD	Test de dispersión de la cromatina.
SCSA	<i>Sperm chromatin structure assay.</i>
SOD	Superóxido dismutasa.
SP ₁	Subpoblación 1.
SP ₂	Subpoblación 2.
SP ₃	Subpoblación 3.
SPMI	Proteína inhibidor de la motilidad en el plasma seminal.
STR	Índice de rectitud.
TRITC	Isocianato de tetrametil rodamina.
TUNEL	<i>Terminal dUDP nick end labeling.</i>
UEA	Aglutinina de <i>Ulex europaeus.</i>
UPGMA	<i>Unweighted pair groups median average.</i>
VAP	Velocidad media del espermatozoide.
VCL	Velocidad circular del espermatozoide.
VIT	Vitalidad espermática
VSL	Velocidad rectilínea del espermatozoide.
W	Anchura de la cabeza del espermatozoide.

WGA	Aglutinina de <i>Triticus vulgaris</i> .
WOB	Índice de oscilación.
WPGMC	<i>Weighted pair-group method using centroids.</i>
ZP	Zona pelúcida.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Dentro de la ganadería española, el sector más importante es el porcino, con una contribución a la producción final ganadera, durante el año 2006, de alrededor de 4.600 millones de euros (33% del total). Dentro de la Unión Europea somos el segundo país productor tras Alemania, siendo uno de los pocos sectores que presentan un balance positivo en el mercado exterior (MAPA, 2006). Podemos considerar a este sector como estratégico dentro de la economía española, y dada su importancia, cualquier medida que suponga un afianzamiento o incremento de la producción del mismo tendrá un interés relevante; sin duda, dentro de esas medidas la investigación de nuevas técnicas que mejoren la eficacia productiva (como puede ser la criopreservación seminal), juegan un papel relevante.

La producción porcina es mayoritariamente intensiva, basándose su éxito en 5 pilares básicos: manejo, alimentación, genética, sanidad y reproducción; dentro de éste último se ha de destacar que más del 80 % de las hembras reproductoras fueron inseminadas con semen fresco/refrigerado (Gadea, 2004), obviando el uso de semen congelado al contrario que el sector de vacuno de leche, donde aporta ventajas inigualables. La preferencia por las dosis frescas/refrigeradas refleja los escasos rendimientos reproductivos que el semen criopreservado aporta en la especie porcina [50 % de partos y una prolificidad aproximada de 7 lechones por camada (Johnson *et al.*, 2000)], lo que anula el resto de beneficios del empleo de este tipo de almacenamiento.

A pesar de que en la producción intensiva ha quedado descartado su uso por el momento, el empleo de material seminal criopreservado ha encontrado su aplicación para la producción en pureza en las granjas de selección (Almlid y Hofmo, 1996). La investigación en la campo de la congelación de semen de verraco no se ha detenido, y no solo para mejorar los resultados en los núcleos genéticos, sino también buscando hacer viable su uso en la producción intensiva de carne de cerdo. Muchos han sido los avances realizados en los últimos 20 años, tanto en la técnica de congelación (Peláez, 2003) como a la hora de aplicar las dosis seminales (Roca *et al.*, 2000), lo que ha supuesto una mejora de los resultados de fertilidad y prolificidad (Thilmant, 1997; Eriksson y Rodríguez-Martínez, 1999; Bolarín *et al.*, 2006), acercándose a los del semen fresco/refrigerado.

Dentro de la mejora de los resultados de la aplicación del semen criopreservado en la especie porcina, además de un adecuado procedimiento de congelación y aplicación, Reed (1985), sugiere la necesidad de desarrollar y/o mejorar las técnicas de análisis seminal tras la congelación. Tradicionalmente esta valoración se realiza determinando la integridad del plasmalema y del acrosoma, parámetros para cuya medida se han desarrollado técnicas

novedosas en los últimos años (Rodríguez-Martínez, 2003b; Peña, 2003b; 2005a). El tercer parámetro, ampliamente utilizado en la valoración postdescongelación ha sido la motilidad espermática, pero no ha sido hasta la aparición de los sistemas CASA (*Computer Assisted semen analysis*), cuando esta determinación alcanzó un carácter objetivo y comparable (Verstegen *et al.*, 2002; Soler *et al.*, 2006). Además de estas ventajas, ya de por sí indispensables para cualquier técnica de análisis seminal (Rodríguez-Martínez, 2003b), aportan otras no menos despreciables; así la posibilidad de medir distintos parámetros cinéticos de forma individualizada en cada espermatozoide, nos proporciona (además de datos imposibles de ser medidos por nuestros sentidos) la posibilidad de clasificar las células espermáticas en grupos diferenciados por sus características cinéticas, representando más fielmente la verdadera estructura poblacional del eyaculado (Abaigar *et al.*, 1999; Quintero-Moreno, 2003a; Soler *et al.*, 2006).

A parte de la aparición de los sistemas CASA, los avances en las tecnologías de análisis y reconocimiento de imágenes han permitido el desarrollo de equipos de análisis morfométrico mediante imágenes digitales [también conocidos por su acrónimo ASMA (*Automated Sperm Morphometric Analysis*)], aportando de forma práctica datos que han servido para profundizar, entre otros campos, en el conocimiento de los efectos de la crioconservación sobre las células espermáticas de verraco (Thurston *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2005b), permitiendo realizar, al igual que para la motilidad, un análisis subpoblacional de los espermatozoides constituyentes de un eyaculado.

Dado que la principal fuente de variabilidad en la respuesta a la congelación esta causada por el individuo (Roca *et al.*, 2006), ya en 1985 Reed afirma que uno de los puntos a la hora de mejorar la técnica es la correcta elección de los machos de los que se va a recolectar el semen a criopreservar. La aparición de los sistemas CASA, junto con otras nuevas tecnologías, ha abierto nuevos caminos en la capacidad de estimación de la potencial congelabilidad seminal de un individuo, permitiendo una correcta selección de los mismos, lo que conlleva aparejado un ahorro tanto de tiempo como de dinero.

Basándonos en lo expuesto con anterioridad, nuestro trabajo se enmarca en la continuación de la línea de investigación abierta en el área de Reproducción y Obstetricia de la Facultad de Veterinaria de León, sobre la crioconservación de semen de verraco, viendo aumentadas nuestras capacidades al disponer de las excelentes instalaciones proporcionadas por el centro de inseminación artificial porcina, participado por la Universidad de León, Centrotec S.A.

Los objetivos específicos de este trabajo de tesis doctoral fueron:

- Estudiar los patrones cinéticos de los espermatozoides de verraco durante el proceso de criopreservación, y tras él en diferentes diluyentes, prestando especial atención a la distribución subpoblacional de los mismos.
- Describir los patrones cinéticos de los espermatozoides criopreservados y posteriormente incubados en un medio capacitante, como modelo de los posibles fenómenos que pueden sufrir en el aparato reproductor de la hembra; y evaluando la respuesta al proceso en función de la aptitud para la congelación del semen.
- Analizar los cambios morfométricos que sufre la célula espermática de porcino durante y tras el proceso de crioconservación, prestando especial atención a la distribución subpoblacional de las mismas.
- Determinar la utilidad de los valores derivados de los sistemas de análisis seminal computerizado, tratados de forma individual y combinada (para definir subpoblaciones espermáticas), en la estimación de la congelabilidad de un eyaculado.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 EL APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO

2.1.1 El testículo

El testículo de los mamíferos es el órgano encargado de realizar dos funciones imprescindibles en los procesos reproductivos: la síntesis y secreción de hormonas (estereoidogénesis) y la producción de espermatozoides (espermatogénesis), que una vez hayan alcanzado la madurez, sean capaces de fecundar a ovocitos, dando lugar a nuevos individuos. Cada una de estas dos funciones se produce en compartimentos anatómicos distintos pero interrelacionados entre si; la producción hormonal tiene lugar, mayoritariamente, en el seno del tejido conjuntivo intersticial (glándula diastemática), mientras que la espermatogénesis tiene lugar en el interior de los túbulos seminíferos.

El tejido conjuntivo intersticial: está situado entre los túbulos seminíferos, estando compuesto por macrófagos, linfocitos, tejido conjuntivo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y diferentes tipos celulares entre los que se encuentran las células de Leydig; estas, presentan forma poliédrica y se agrupan en pequeños acúmulos, siendo las encargadas de la producción y secreción de sustancias tanto de naturaleza esteroide como no esteroide; aunque destacan, fundamentalmente, la testosterona y la 5- α -dihidrotestosterona, hormonas que son necesarias para la diferenciación sexual, la producción de gametos y el mantenimiento de la homeostasis endocrina del macho.

Dentro de los productos de naturaleza no esteroide producidos por las células de Leydig se encuentran el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), participando estos compuestos en la interacción célula-célula, en el interior del testículo (Skinner, 1991; Hedger y Meinhardt, 2003).

Los túbulos seminíferos: su epitelio esta constituido por dos tipos celulares, las células de Sertoli y las células de la línea germinal.

Células de Sertoli. Son células grandes, con abundante retículo endoplásmico liso; de su porción axial cilíndrica irradia un sistema complejo de delgadas prolongaciones laterales que rodean a las células germinales que ocupan los intersticios que existen entre ellas. Están implicadas en la nutrición, en el aislamiento de la circulación general y en el apoyo estructural a las células germinales para favorecer su proliferación, desarrollo y diferenciación. Además, favorecen el movimiento de las células germinales dentro del túbulo seminífero y la liberación de los espermatozoides hacia la luz del túbulo.

Células germinales. Este tipo celular se multiplica en el epitelio germinal, presentando procesos de división celular, así como de diferenciación en espermatozoides. Las células se encuentran ordenadas en una serie de asociaciones o estados bien definidos. La secuencia de estos estados se denomina ciclo del epitelio seminífero, cada ciclo tiene una duración de 8,6 días en el verraco, requiriéndose 4 ciclos para el desarrollo de la espermatogénesis, cuya duración total es de 34 días (Swierstra, 1968). Las células germinales difieren en algunos aspectos del resto de las células generales del organismo, pues son las únicas con capacidad meiótica, su diferenciación es temprana en el embrión y están conectadas entre sí mediante puentes intercelulares, de manera que se pueden crear grupos celulares que se encuentran en la misma fase de desarrollo.

2.1.2 El epidídimo

El epidídimo es un conducto contorneado, presentando en el verraco una longitud de 54 m, los espermatozoides acceden a él a través de los conductos eferentes; produciéndose en su interior un proceso de maduración y almacenamiento (Hafez, 2002), siendo necesarios estos procesos para que el espermatozoide adquiera la capacidad de fecundar de forma natural a un ovocito (Harper, 1993). En el epidídimo se reconocen tres regiones anatómicas: cabeza, cuerpo y cola. Estructuralmente está integrado (de fuera a dentro) por una capa serosa, una doble capa muscular lisa (longitudinal y circular) y una capa epitelial de revestimiento, detectándose tejido conectivo laxo entre las distintas capas, siendo el epitelio del epidídimo pseudoestratificado con grandes células columnares (Hafez, 2002).

El fluido en la luz de epidídimo es hiperosmótico con respecto al suero sanguíneo, decreciendo la osmolaridad desde la región de la cabeza a la cola. Se desconocen los mecanismos que permiten mantener esta hiperosmolaridad, aunque se ha observado que la glicerilfosforilcolina y la carnitina son responsables del 30% de la osmolaridad. Otros componentes del fluido epididimario son las cefalinas y los fosfatos (Harper, 1993; Cooper, 1998).

En el fluido epididimario son secretadas diversas proteínas a lo largo de su longitud. El tipo de proteínas que se secretan varía en función de la especie y de la región del epidídimo. Estas proteínas son las responsables de los cambios en la membrana y en los patrones de movimiento de los espermatozoides; siendo, además, las encargadas de: actuar como moléculas transportadoras de compuestos liposolubles, participar en la remodelación y protección de la membrana del espermatozoide, aumentar los sitios de unión que permitan la adhesión de nuevos componentes, inducir el movimiento progresivo del espermatozoide, evitar la aglutinación de las células espermáticas inmaduras y aumentar su capacidad

fecundante tanto *in vitro* como *in vivo* (Cooper, 1998). Toda esta actividad secretora es dependiente de la testosterona y de la 5- α -dihidrotestosterona.

El recorrido de los espermatozoides a través del epidídimo del verraco tiene una duración de 10 días, durante este tiempo completan el proceso de maduración y finalmente se almacenan en la cola del epidídimo. En el momento de la eyaculación acceden por el conducto deferente a la región pélvica de la uretra donde confluyen las secreciones procedentes de las glándulas anejas (Swierstra, 1968; Hafez, 2002).

2.1.3 Glándulas anejas

2.1.3.1 Vesículas seminales

También denominadas como glándulas seminales, se encuentran localizadas dorsalmente a la uretra y próximas a su nacimiento, son dos glándulas pares, compuestas, tubulares o tubuloalveolares; su conducto de secreción y el conducto deferente comparten un conducto eyaculatorio común que se abre en la uretra (Hafez, 2002).

Las vesículas seminales secretan un líquido blanco gelatinoso o amarillento, siendo el componente mayoritario del semen de verraco, aumentando su volumen en el plasma seminal hacia el final de la eyaculación (Rodríguez-Martínez, 2003a). La secreción es rica en fructosa, monosacárido que sirve de fuente de energía para los espermatozoides eyaculados, sobre todo en condiciones anaeróbicas, y está estrechamente relacionada con la motilidad inicial de los espermatozoides. Esta secreción también se caracteriza por un elevado contenido en ergotioneína e inositol, así como de diversos aminoácidos, glicerilfosforilcolina, ácido cítrico, ligandos de zinc e inhibidores de la acrosina (Wrobel y Dellmann, 1993; Hafez, 2002; Strzezek, 2002).

Las vesículas seminales proporcionan la mayoría de las proteínas (80-90%) que constituyen el plasma seminal de verraco (Strzezek, 2002). Las proteínas secretadas por la vesícula seminal cumplen diversas funciones, entre las que destacan: cubrir y proteger la superficie de los espermatozoides y aumentar su motilidad (Moore y Hibbit, 1977; Strzezek, 2002). Aunque parezca contradictorio con lo explicado anteriormente, también se ha conseguido purificar, en la secreción de estas glándulas, la denominada “proteína inhibidor de la motilidad en el plasma seminal” (SPMI, en su acrónimo en ingles), localizándose también en el epitelio de las vesículas seminales y cuya función es inhibir la motilidad de los espermatozoides (Iwamoto *et al.*, 1995).

Por esta conjunción de funciones podemos considerar que las vesículas seminales desempeñan un papel fundamental en el proceso reproductivo y su eliminación, a nivel experimental, ocasiona tanto alteraciones en la membrana plasmática, como un incremento en la sensibilidad al choque frío de los espermatozoides (Strzezek, 2002).

2.1.3.2 Glándula prostática

La glándula prostática está integrada por un número variable de glándulas tubuloalveolares individuales derivadas del epitelio de la uretra pélvica. Posee dos porciones, una externa, en forma de placa (*corpus prostaticae*), y otra interna (*par disseminata prostaticae*) o diseminada (bien desarrollada), que rodea a la uretra pelviana (Wrobel y Dellmann, 1993).

La secreción de la próstata contiene ácido cítrico, fosfatasa ácida y fibrinolisisina. De entre estos componentes, es el ácido cítrico el que refleja la actividad secretora de la próstata, además es el encargado de activar la fosfatasa ácida y del mantenimiento del equilibrio osmótico, junto con los iones de sodio y potasio, favoreciendo la motilidad de los espermatozoides. Otras funciones que se le atribuyen a la secreción prostática, dado su carácter alcalino, son: neutralizar el plasma seminal que se acidifica por la acumulación del dióxido de carbono metabólico y lactato, iniciar los movimientos activos de los espermatozoides y neutralizar la secreción vaginal ácida.

Por último la próstata es la responsable de la secreción de zinc, que en el plasma seminal se encuentra en forma de iones libres y unidos a proteínas; su importancia destaca por contribuir a estabilizar la membrana plasmática y la cromatina nuclear. Además, los niveles de zinc, se han relacionado con el contenido proteico del plasma seminal, el consumo de oxígeno de los espermatozoides y su motilidad. Es tal su relevancia que se ha constatado que bajos niveles de zinc en el plasma seminal se asocian con una disminución de la calidad del semen (Sáiz y Marigorta, 2003).

2.1.3.3 Glándulas bulbouretrales

Son glándulas pares, se localizan dorsalmente a la uretra, en la porción posterior a la ocupada por la glándula prostática, y están rodeadas por el músculo isquiglandular.

La secreción de estas glándulas representa entre el 15-30% del eyaculado, es de naturaleza mucosa, aspecto gelatinoso y rica en ácido siálico. La principal función que se le

atribuye a esta fracción gelatinosa es la de facilitar la oclusión del cérvix una vez finalizada la eyaculación, para evitar el reflujo del material seminal hacia la cavidad vaginal (Hafez, 2002).

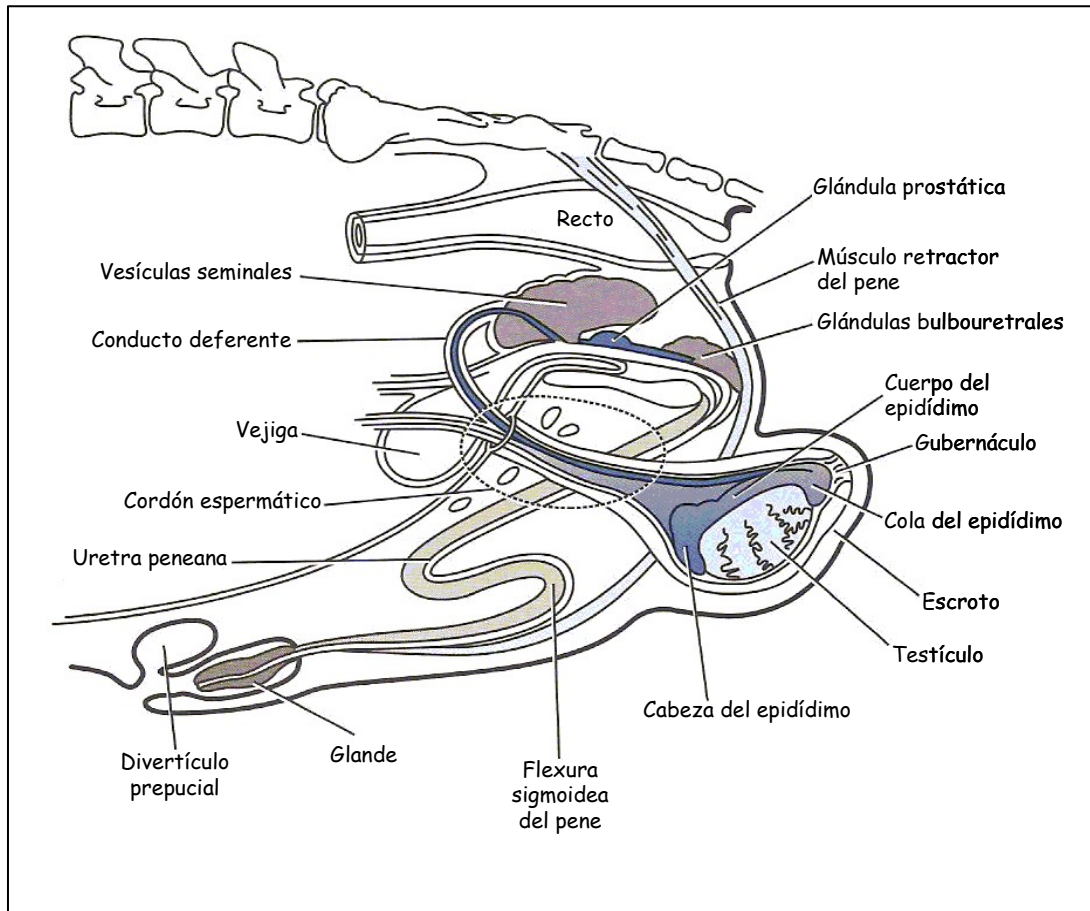


Figura 1. Vista sagital del aparato reproductor del cerdo (tomado de Senger, 2005).

2.2 EL ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide es una célula altamente especializada, incapaz de dividirse y resultado final de la gametogénesis en el macho. Es una célula haploide y portadora de la información genética paterna.

2.2.1 La espermatogénesis

Dentro de la espermatogénesis se agrupan una serie de fenómenos mediante los cuales las espermatogonias, provenientes de las células germinales denominadas gonocitos primordiales, se transforman en espermatozoides, constando dicho proceso de tres fases:

2.2.1.1 Fase proliferativa

Durante esta fase las espermatogonias, células diplóides derivadas directamente de las células germinales primordiales del embrión, entran en mitosis siguiendo el dictado cíclico de las células de Sertoli, de acuerdo a mecanismos locales de regulación; mediante este fenómeno se originan generaciones sucesivas de espermatogonias cada vez más diferenciadas. Ahora bien, en cada periodo proliferativo, una de las espermatogonias permanece sin diferenciarse, con lo que se asegura un modelo de células tronco, por lo que el proceso resulta de carácter ilimitado.

2.2.1.2 Meiosis

La meiosis es un proceso diferenciado de división celular, en el que a partir de una célula diplóide se originan cuatro células haplóides, lo que se consigue combinando dos divisiones celulares completas con una sola replicación del ADN.

Los espermatocitos primarios son las células que sufren la primera división meiótica o meiosis reduccional. En la primera etapa de la profase se produce la replicación del ADN, de modo, que en este punto, los espermatocitos primarios son células tetraplóides; durante la profase se produce la formación de quiasmas entre los cromosomas duplicados, produciéndose el intercambio de material genético, de manera que cada célula resultante del proceso poseerá un genotipo diferente, redundando en un incremento de la variabilidad genética. A continuación se inicia la siguiente fase, la metafase, en la que se produce la disolución de la membrana nuclear y los pares de cromosomas se alinean en el ecuador y son fijados por el huso acromático. En la siguiente fase, la anafase, a diferencia de la mitosis no se produce la duplicación y división de los centrómeros, por lo que sólo la mitad del número original de cromosomas emigra hacia cada polo celular. Por último, en la telofase, los cromosomas se desenrollan y comienza a formarse una nueva membrana celular, para dividirse a continuación el citoplasma, quedando las células hijas unidas por puentes intercelulares. Las células resultantes de esta primera división meiótica se denominan espermatocitos secundarios, y tienen un número haploide de cromosomas, pero su contenido de ADN es diplóide, al estar cada cromosoma constituido por dos cromátidas.

En la segunda división meiótica, o meiosis ecuacional, se van a obtener dos espermátidas a partir de cada espermatocito secundario, cada una de estas espermátidas contiene un número de cromosomas y un contenido de ADN haploide. Esta segunda división

meiótica es un proceso similar a la mitosis con la diferencia de que el núcleo sólo contiene un número haploide de cromosomas.

2.2.1.3 Espermiogénesis o espermatohistogénesis

La espermiogénesis es un proceso de transformación y maduración de las espermátidas en espermatozoides, sin que se produzca división celular alguna. Entre los cambios de mayor relevancia, podemos destacar: la formación del acrosoma, el desarrollo del flagelo, la transformación del núcleo, la reorganización de los orgánulos y del citoplasma y la liberación de los espermatozoides desde el epitelio tubular al lumen (espermiación). El resultado final de todos estos procesos es la aparición de una célula (espermatozoide) altamente diferenciada y una serie de restos del citoplasma conocidos como cuerpos residuales que serán absorbidos por las células de Sertoli vecinas.

Aunque morfológicamente el espermatozoide en los túbulos seminíferos es parecido al presente en el eyaculado, carece de movimiento progresivo y no están preparados para sufrir el proceso que les permitirá fusionarse espontáneamente con el ovocito; para que pueda alcanzar esta capacidad es necesario que sufra una serie de procesos a su paso por el epidídimo, como: aumento de la condensación de la cromatina, adquisición de patrones de movimiento progresivos, cambios en la composición de la membrana plasmática y transformaciones morfológicas y estructurales.

2.2.2. Morfología espermática

Morfológicamente podemos dividir al espermatozoide en dos componentes principales: la cabeza y el flagelo o cola.

2.2.2.1. Cabeza espermática

Las cabezas de los espermatozoides de mamíferos presentan formas y tamaños muy variados; siendo la de cerdo ovoide, con una longitud de 8,4-9,4 μm y una anchura de 4,2-5,5 μm (las dimensiones varían en función del método de medida utilizado) (Cummings y Woodwall, 1985; Tejerina *et al.*, 2005).

Además de las variaciones interespecíficas en el tamaño/forma de la cabeza, existen especies, como: el hombre, el perro o la alpaca, que se presenta un gran pleiomorfismo en las cabezas de los espermatozoides presentes dentro de un mismo eyaculado (Buendía *et al.*, 2002), mientras que en otras, como en el cerdo, existe una gran uniformidad en su forma.

En la cabeza se distinguen: el núcleo, el acrosoma, una pequeña cantidad de estructuras citoesqueléticas y un reducido citoplasma.

El núcleo contiene un número haploide de cromosomas y nucleoproteínas, principalmente protaminas, las cuales son relativamente pequeñas (27-65 aminoácidos) y ricas en arginina y cisteína. La cromatina nuclear está tan altamente condensada que es imposible la transcripción del ADN, y ocupa un volumen significativamente menor que en las células somáticas. Este empaquetamiento parece ser necesario para proteger al material genético de un posible daño, tanto durante el almacenamiento en el tracto reproductor masculino como en el tránsito por el aparato reproductor de la hembra (Evenson *et al.*, 2002). Los procesos de condensación y descondensación de la cromatina espermática constituyen unos de los eventos de mayor importancia de la fisiología reproductiva; una condensación deficiente del material genético podría propiciar lesiones en el ADN, al encontrarse expuesto a agentes físicos y químicos, mientras que una hipercondensación de la cromatina podría dar lugar a un retraso en la formación del pronúcleo masculino después de la penetración en el ovocito, produciendo un retraso en la recombinación de ambos pronúcleos y la consiguiente muerte embrionaria precoz (Pasteur *et al.*, 1991; Hingst *et al.*, 1995). El análisis del estado de la integridad de la cromatina espermática ha cobrado en los últimos años una gran relevancia, siendo estudiado en la mayoría de especies con interés productivo para el hombre como parámetro predictor de la fertilidad de un eyaculado (Rodríguez-Martínez, 2003b).

El acrosoma es una vesícula intracelular, membranosa y aplanada que cubre la parte anterior del núcleo. Este orgánulo se forma durante la espermatogénesis (espermatohistogénesis) a partir del complejo de Golgi de las espermátidas. En el acrosoma distinguimos la membrana acrosomal interna y la membrana acrosomal externa (próxima a la cara interna de la membrana plasmática). Durante el proceso de reacción acrosómica, la membrana acrosomal y la membrana plasmática se fusionan liberando al exterior el contenido acrosomal. Dicho contenido está constituido mayoritariamente por enzimas hidrolíticas, siendo desde el punto de vista funcional, las principales la acrosina y la hialuronidasa, (necesarias para denudar las capas que rodean al ovocito).

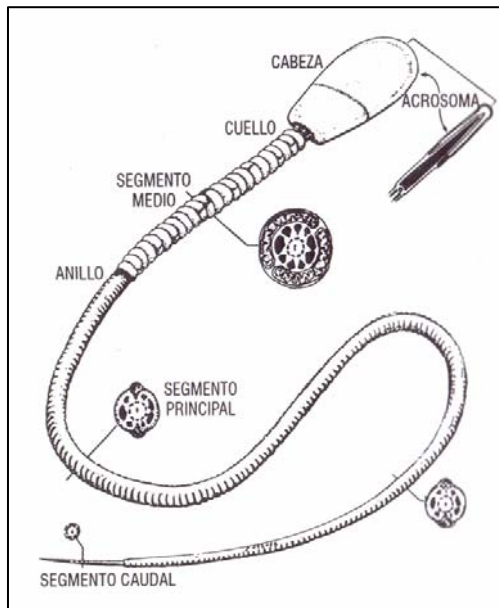


Figura 2. Partes de un espermatozoide (Hafez 2000).

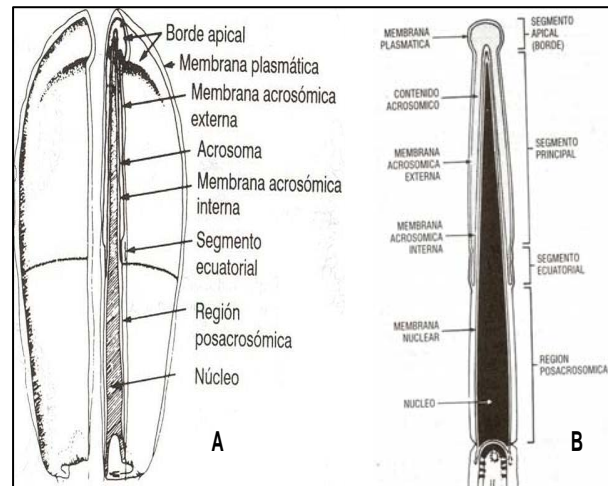


Figura 3. Vista dorsal (A) y corte sagital (B) de la cabeza espermática (Hafez 2000).

La acrosina es una proteasa que está presente en el acrosoma en forma de proacrosina, la cual es convertida a su forma activa durante la reacción acrosómica. Esta proteína se diferencia de las enzimas similares de otros tejidos en el peso molecular y en el sustrato, indicando que se trata de una isoenzima específica del espermatozoide. Por su parte, la hialuronidasa es una glicosidasa y parece ser una enzima específica del espermatozoide ya que es diferente de la forma común de la hialuronidasa lisosomal de las células somáticas.

2.2.2.2. El flagelo del espermatozoide

Esta estructura está dividida en cuatro regiones distintas: el cuello, la pieza intermedia y los segmentos principal y terminal.

El cuello, también denominado pieza conectiva, se trata de una pequeña franja encargada de conectar la cabeza con la cola del espermatozoide. Los componentes principales del cuello son: el capítulo, las columnas estriadas, la placa basal y el anillo posterior. Estas estructuras están alineadas con el centriolo, estructura desde la que se originan las fibras y microtúbulos de la cola y sirve como centro organizativo en la formación del axonema y las columnas estriadas. Sin embargo, la presencia del centriolo no es necesaria para la iniciación o propagación del movimiento ondulatorio de la cola (Lindemann y Gibbons, 1975; Lindemann y Kanous, 1989).

La pieza intermedia se sitúa a continuación del cuello, conteniendo debajo de la membrana plasmática mitocondrias dispuestas helicoidalmente y envolviendo al axonema. La hélice mitocondrial esta adherida a un complejo filamentoso subyacente llamado retículo submitocondrial; los filamentos de esta red se conectan entre si lateralmente y se fusionan con el *annulus*, en el punto de unión entre la pieza intermedia y la pieza principal. Dentro de la pieza intermedia y extendiéndose hasta el segmento principal de la cola se encuentran las fibras densas externas, se sitúan rodeando al complejo del axonema en número de 9 en la pieza intermedia y 7 en el segmento principal de la cola. Están compuestas por proteínas tipo queratina ricas en cisteína que presenta grupos sulfhidrilo (-SH) lo que da lugar a la formación de numerosos puentes disulfuro (-S-S-) (Cooper, 1986). Por último, la pieza terminal es la porción final del flagelo, no presentando su estructura ni vaina fibrosa ni fibras densas.

Recorriendo la parte central de toda la cola del espermatozoide y extremadamente asociado a las fibras densas se encuentra el axonema, siguiendo la típica estructura de “9+2”, denominada así al estar compuesto por una pareja de microtúbulos centrales (denominados C1 y C2) rodeados por nueve pares (dobletes) de microtúbulos periféricos, estando conectados los microtúbulos C1 y C2 a cada microtúbulo periférico A mediante unas estructuras denominadas radios. Cada doblete esta constituido por un microtúbulo A completo unido a un microtúbulo B incompleto. De cada microtúbulo A parten dos brazos de dineína (interno/externo) hacia el microtúbulo B del siguiente doblete, la dineína tiene la particularidad de que presenta actividad ATPasa, es decir, es la encargada de hidrolizar ATP liberando la energía que será utilizada para el movimiento de la cola. Los microtúbulos están compuestos por proteínas estructurales denominadas α y β Tubulina, que se unen formando un dímero que se dispone helicoidalmente.

El citoesqueleto de los espermatozoides de los mamíferos esta constituido por un cilindro hueco, estando este formado por dos columnas longitudinales unidas por anillos circulares, compuestos por filamentos que se orientan circularmente presentando un fuerte empaquetamiento; esta estructura se denomina vaina fibrosa y recorre toda la pieza intermedia, disminuyendo el grosor de los anillos según se aproximan al extremo de la cola y terminando abruptamente en la parte final.

La presencia de elementos semirrígidos en la pieza intermedia y el segmento principal (vainas fibrosas y fibras densas) va otorgar direccionalidad y flexibilidad al movimiento flagelar (Gagnon, 1995), generando que la cola presente un movimiento rotacional y elíptico, el cual transmite a la cabeza del espermatozoide a través del cuello. Este movimiento rotacional subsidiario de la cabeza, es lo que otorga en última instancia progresividad al espermatozoide (Mortimer, 2000).

Desde el punto de vista molecular el proceso que desencadena el movimiento se inicia con la fosforilación de los brazos de dineína, hidrolizando ATP y liberando energía. La energía liberada permite que los brazos de dineína interactúen con el microtúbulo B del par de microtúbulos adyacente generando el deslizamiento de un par de microtúbulos sobre el otro. Debido a que el axonema está anclado en la base de la cabeza del espermatozoide esta fuerza deslizante se transforma en un movimiento ondulante en la cola. La desfosforilación de la dineína por la calcineurina, una fosfatasa dependiente de calmodulina, permite la liberación del microtúbulo al que se había unido, de manera que el axonema vuelve a su posición de partida y comienza de nuevo a doblarse en dirección contraria. Debido a que la dineína sólo produce la fuerza en una única dirección, la producción de un movimiento ondulatorio requiere que la fosforilación/desfosforilación y por tanto la activación y la inactivación de la dineína se desencadene de forma asincrónica a lo largo de todo el axonema (Turner, 2003)

Como hemos mencionado, el axonema necesita ATP para poder activarse y provocar el movimiento de la cola del espermatozoide, los estudios existentes revelan que no sólo es necesario el aporte proveniente de la respiración mitocondrial (Turner, 2006), sino que también parecen estar involucrados mecanismos no oxidativos a partir de glucosa (Westhoff *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2001).

En la regulación de la motilidad espermática están involucradas (aunque sin conocerse en toda su extensión), la vía intracelular del AMPc/PKA y la fosforilación de proteínas, así como los iones HCO_3^- y Ca^{2+} (Aparicio, 2006).

2.2.2.3 La membrana citoplasmática

Mención a parte hemos de realizar de la membrana citoplasmática, estructura de gran dinamismo y crucial importancia, tanto en los procesos biológicos como para las tecnologías de conservación y manejo seminal.

La membrana citoplasmática se encuentra dividida en regiones perfectamente delimitadas, que difieren tanto en composición como en función; así, en la cabeza nos encontramos una región acrosomal, subdividida a su vez en 3 segmentos (marginal, principal y ecuatorial); y una región subacrosomal. En la membrana citoplasmática del flagelo se puede diferenciar un dominio que cubre la hélice mitocondrial y otro que se extiende desde la pieza intermedia hasta el extremo de la cola, estando separados estos dos dominios por el *annulus*.

La estructura general de la membrana esta constituida por tres capas distintas: una bicapa de lípidos, una interfase fosfolípidos-agua y un glicocalix.

Los principales lípidos en la membrana son los fosfolípidos y el colesterol. Entre los fosfolípidos destacan la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, la esfingomiélin, la cardiolipina y pequeñas cantidades de fosfatidilserina y fosfatidilinositol (Nolan y Hammerstedt, 1997). La fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina se encuentran en la capa interna, mientras que la fosfatidilcolina y la esfingomiélin se encuentran en la capa externa (Poulos y White, 1973)

La proporción fosfolípidos/colesterol es un indicador de la fluidez de la membrana, su relación molar no es constante entre especies, siendo para espermatozoides de verraco 0,20 (Green *et al.*, 2001a), para espermatozoides de caballo 0,36 (Green *et al.*, 2001a) y para espermatozoides de toro 0,40 (Parks *et al.*, 1987). El colesterol, junto con las proteínas integrales, actúa como estabilizador de la membrana. La concentración de colesterol varía en las diferentes regiones de la membrana plasmática, siendo en la región del acrosoma donde se presenta en mayor proporción (López y de Souza, 1991).

La membrana plasmática del espermatozoide presenta una mayor proporción de proteínas que las membranas de las células somáticas, suponiendo hasta el 50% de la composición de la misma. Su presencia permite la realización de múltiples funciones, al actuar como: canales de paso de sustancias, enzimas, receptores o proteínas transportadoras. La disposición de las proteínas en la membrana puede ser: desde aquellas que se encuentran integradas en la misma (bien atravesándola completamente o bien inmersas), a las que se encuentran adheridas a la misma de forma covalente o no, siendo su anclaje las proteínas integrales (Dostalova *et al.*, 1994; Dobrinsky *et al.*, 1997).

La capa más externa de la membrana es un glicocálix formado por oligosacáridos que se unen covalentemente a las proteínas y lípidos de membrana. Una de las funciones del glicocalix es proteger al espermatozoide de agentes físicos o químicos que pudieran dañarle, pero también puede intervenir en la interacción del espermatozoide con otras células (Hammerstedt *et al.*, 1990).

2.3 CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN PORCINO

2.3.1 Introducción histórica

2.3.1.1 Historia general de la crioconservación

Podemos considerar la crioconservación de espermatozoides como una técnica novedosa si la comparamos con el procedimiento al que va íntimamente ligada, la inseminación artificial (IA); mientras que de este último, las primeras experiencias son realizadas por Lazaro Spallanzani en el siglo XVIII, debemos de esperar a 1949, para que C. Polge, A. Smith y A. Parkes realizasen la primera congelación de espermatozoides viables, al descubrir de forma casual los efectos crioprotectores del glicerol (Polge, 1985), este hito marca el nacimiento de la técnica y supuso una verdadera revolución en la conservación del material seminal, al permitir mantener la capacidad fecundante durante largos periodos de tiempo, abriendo nuevos horizontes para la aplicación de la IA en las especies de interés ganadero y para el hombre.

Con las potenciales ventajas que la nueva técnica aportaba, las experiencias de congelación de semen se extienden y suceden durante toda la década de los 50. Así, la primera congelación de semen de caballo se produjo en 1950 (Watson, 1990). El primer nacimiento de una cría obtenida a partir de semen congelado se produjo en 1951 en la especie bovina (Curry, 2000).

Las primeras congelaciones de semen de verraco y morueco se demoraron hasta 1956 (Watson, 1990), mientras que el éxito reproductivo en la aplicación de semen descongelado no se constató hasta 1970 en el ganado porcino (Polge *et al.*, 1970).

El uso de semen criopreservado de forma rutinaria en los sistemas de producción, prácticamente solo ha tenido éxito en la especie bovina, siendo su utilización considerada como imprescindible en los programas de IA (Polge *et al.*, 1970, Iritani, 1980, Curry, 2000). El gran desarrollo en la especie bovina no deja de reflejar la gran importancia que se dio desde un primer momento en este sector a la posibilidad de la crioconservación del material seminal, surgiendo rápidamente una fuerte demanda por parte de los ganaderos al conseguirse desde el inicio de su aplicación resultados comparables a los obtenidos en la monta natural. Esta situación espoleó un mayor esfuerzo investigador en esta especie quedando el perfeccionamiento de la técnica de criopreservación en las otras especies de renta mas relegado.

Aunque sin interés comercial obvio, la congelación de semen se ha llevado a cabo en numerosas especies de diferentes clases animales (mamíferos, aves, peces y reptiles) (Watson, 1990), orientada en la mayoría de los casos a la conservación de los recursos genéticos de animales en peligro de extinción (Holt y Pickard, 1999; Delgado, 2000; Yoshida, 2000).

2.3.1.1.1 Pasado, presente y futuro en la especie porcina

Como ya indicamos anteriormente las primeras experiencias de crioconservación con espermatozoides porcinos se atribuyen a Polge en 1956, pero no fue hasta 1970 cuando el mismo investigador y su grupo constataron con total credibilidad el nacimiento de una camada de lechones a partir de semen congelado de verraco (Polge *et al.*, 1970), no obstante solo consiguieron resultados similares a los obtenidos con la utilización de semen fresco cuando depositaban el material seminal en el oviducto; mientras que si la deposición se realiza en el extremo de los cuernos uterinos, o se realiza la inseminación por vía cervical no consiguieron reproducir la gestación; atribuyendo estos resultados a la destrucción leucocitaria que se produciría en el útero al hallarse dañada la membrana de los espermatozoides a causa del proceso de crioconservación.

Las primeras camadas conseguidas utilizando semen descongelado por vía cervical nacieron en 1971, fruto del trabajo de tres grupos de investigación diferentes (Crabo y Einarsson, 1971; Graham *et al.*, 1971; Pursel y Johnson, 1971) [Citados todos en Johnson, 1985].

Gracias a estos primeros éxitos se produjo un incremento del interés en la criopresevación de semen porcino, fruto del cual surgen una variada gama de procedimientos de congelación, descongelación e inseminación.

En 1975, Pursel y Johnson, introdujeron importantes modificaciones en los procedimientos de congelación y descongelación existentes, mejorando sensiblemente no solo la calidad y la capacidad fecundante del semen, si no también que simplifican los procesos, tanto en el momento de la congelación como en el de la descongelación, facilitando el trabajo en los centros de IA y en las granjas donde se utilizaba semen descongelado (Johnson, 1985). En ese mismo año (1975), el grupo de investigadores encabezado por Westendorf, dan a conocer su protocolo para la congelación de semen de verraco, presentando como novedades el envasado del semen en pajuelas y la congelación del mismo sobre vapores de nitrógeno líquido. Otros dos protocolos distintos; estos utilizando, al igual que Pursel y Johnson, la congelación en pastillas sobre la superficie de nieve carbónica, aparecieron en 1976 (Paquignon y Courot) y en 1977 (Larsson *et al.*).

De estos 4 procedimientos, anteriormente citados, básicamente solo han sido utilizados intensamente a nivel comercial los protocolos de Pursel y Johnson y de Westendorf *et al.* (Johnson, 1985).

De 1985 a esta parte se ha desarrollado un gran trabajo experimental [ver, por ejemplo, Hammitt y Martin (1989); Fiser y Fairful (1990); Bwanga *et al.* (1991); Berger y Fischerleitner (1992); Fiser *et al.* (1993); Eriksson y Rodríguez-Martínez (2000a;b); Saravia *et al.* (2005)] para establecer las condiciones óptimas de congelación y descongelación y hacer más práctico el uso de semen, pero siempre tomando como base los dos protocolos anteriormente citados.

En el momento actual el uso de semen congelado para su aplicación mediante IA en la producción porcina es prácticamente anecdótico, más aún si lo comparamos con el número de IA realizadas con semen fresco/refrigerado, que se encuentra en franca expansión, llegando a superar en algunos países, como en el nuestro, el 80% de hembras reproductoras (Gadea, 2004).

Según datos de Wagner y Thibier en 2000, en un estudio descriptivo del panorama existente en 1998, no dejaban lugar a dudas de la escasa repercusión del uso de semen descongelado, ya que solo se produjeron 15900 dosis, frente a los 65 millones de dosis de semen fresco producidas, atestiguando, así mismo, una disminución en la producción de dosis de semen criopreservado según los datos anteriores (1996) de Almlid y Hofmo, que indican la producción en ese año fue de 21800 dosis.

Igualmente Wagner y Thibier, centran el 60% de la producción de semen congelado en EEUU, siendo su principal destino la exportación, situación que permanece constante desde hace varios años según reportan otros autores (Reed, 1985; Almlid y Hofmo, 1996).

El principal factor limitante en el uso del semen congelado no deja de ser otro que el inferior rendimiento productivo en comparación con el fresco/refrigerado. Así, mientras que con la utilización de semen descongelado en condiciones de campo se barajan unos resultados de fertilidad en torno al 50% de partos y una prolificidad aproximada de 7 lechones por camada (Johnson *et al.*, 2000); con semen refrigerado en condiciones de manejo similares se obtienen un 83% de partos, y 10-11 lechones por camada (Johnson, 1998). Hemos de tener en cuenta, que si en un principio la refrigeración del semen nos permitía mantener la capacidad fecundante durante 3-4 días con diluyentes de corto periodo de conservación; con los diluyentes más recientemente desarrollados podemos aumentar ese periodo de conservación hasta 6-7 días (Dube *et al.*, 2004; Vyt *et al.*, 2004a), permitiendo crear redes nacionales de distribución de semen de verraco; a lo que también ha contribuido la innegable mejora de las infraestructuras. Con todo ello los ganaderos tienen a su disposición una herramienta que les

permite obtener, si no semejantes, resultados muy próximos a los obtenidos por la monta natural.

Además de este factor crucial, Reed recoge en 1985 otros, que a día de hoy, pueden seguir siendo tan válidos como entonces para explicar la escasa utilización del semen criopreservado a nivel comercial, estos son: elevado coste del procedimiento, variación en la congelabilidad de los espermatozoides en función del verraco y momento de la inseminación excesivamente crítico. Sin embargo, podemos considerar que otros factores limitantes descritos también por Reed, se han superando en parte, como es la necesidad de un número excesivo de espermatozoides por dosis (Bolarín *et al.*, 2006), o la ausencia de test laboratoriales fiables que evalúen con precisión la calidad del semen criopreservado, toda vez que en los últimos 20 años se han desarrollado nuevas técnicas de análisis de los espermatozoides descongelados que nos permiten tener un conocimiento más amplio de su estado morfofuncional (Rodríguez-Martínez, 2003b; Peña *et al.*, 2003b, 2005a).

Actualmente, el uso mayoritario que se da a la crioconservación seminal en el campo de la porcicultura es la producción en pureza en las granjas de selección, uso muy ligado a la posterior exportación de las dosis, con la intención de instaurar en los países receptores nuevas líneas selectas de abuelos/as (Almlid y Hofmo, 1996). Podemos considerar ésta la verdadera aplicación futura de la técnica, ya que según Carbonell y Navarro (1990), no incrementaría excesivamente los costes de producción de la granja; aunque sería necesario alcanzar unos objetivos previos, como: mejorar la fertilidad del semen de los verracos o disminuir la variabilidad de los verracos en la respuesta a la congelación.

Otras actividades más minoritarias que se le ha dado a la crioconservación en la especie porcina, han sido: su uso en la investigación y la creación de bancos de recursos genéticos de determinadas razas, líneas genéticas o individuos muy valiosos.

En cuanto a los últimos avances realizados para mejorar la aplicación de la técnica, hemos de destacar la introducción de un catéter especial que permite la deposición en profundidad del cuello uterino del material seminal (Roca *et al.*, 2000; Vázquez *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2001), lo que permite a la par que se incrementan los resultados de fertilidad (76-80%) y prolificidad (9,3-9,5 lechones por camada), reducir el número de espermatozoides necesarios para llevar a cabo la inseminación y por tanto aumentar el número de dosis producidas; así en el estudio realizado con inseminación profunda llevado a cabo por Bolarín *et al.* (2006) utilizando hembras con ovulación espontánea y dosis de 1000 millones de espermatozoides descongelados, obtuvo destacables resultados tanto en fertilidad (70%) como en prolificidad (9 lechones nacidos vivos). Otra estrategia desarrollada durante los últimos años y asociada a la anterior, es intentar sincronizar el momento de la ovulación de una forma más eficaz para hacer coincidir en el tiempo la estancia de los espermatozoides descongelados (de reducida vitalidad) con el ovocito en el oviducto (Abad *et al.*, 2006).

En los últimos años, se le ha dado una importancia creciente a los fenómenos relacionados con las especies reactivas de oxígeno (ROS “*reactive oxygen species*”), como causantes de parte de las alteraciones estructurales y funcionales que sufre el espermatozoide de cerdo durante los procesos de congelación y descongelación, de forma que la adición de enzimas o sustancias antioxidantes pueden en cierta medida proteger de sus acciones deletéreas; Breininger *et al.* (2005) consiguieron implementar los resultados de motilidad, integridad de membrana acrosómica y viabilidad espermática mediante la adición de α -tocoferol al diluyente de congelación; mientras que la adición de superóxido dismutasa y catalasa no sólo mejoró los parámetros de calidad seminal, sino que también se consiguieron mejores resultados en las pruebas de fecundación *in vitro* (Roca *et al.*, 2005)

No obstante, a parte de estos avances y siguiendo un esquema comercial de inseminación artificial Thilmant (1997), y Eriksson y Rodríguez-Martínez (1999, 2000c), han comunicado la obtención de unos rendimientos reproductivos excelentes para el semen congelado (fertilidad: 70-80%; prolificidad 10,1-10,7 lechones/camada), aunque la repercusión de estos acontecimientos está aún por determinar.

2.3.2 Efectos de la congelación y descongelación sobre el espermatozoide

La tecnología de criopreservación del espermatozoide incluye seis etapas importantes:

1. Dilución del material seminal.
2. Enfriamiento de la suspensión espermática.
3. Adición del agente crioprotector y envasado.
4. Congelación.
5. Almacenamiento en envase criogénico.
6. Descongelación y utilización.

El diseño de cada una de estas fases debe ir enfocado a producir el menor daño posible sobre las estructuras y el metabolismo del espermatozoide, siendo de especial importancia la función y arquitectura de la membrana plasmática. La inadecuada adaptación a las etapas citadas anteriormente, así como los cambios que va a sufrir la célula durante tan delicado proceso, van a ser responsables de daños o agresiones, esto va a suponer que el espermatozoide pierda capacidad para llevar a cabo sus funciones con normalidad (Watson, 1995; Gao *et al.*, 1997). No obstante, se considera que la adición del agente crioprotector

(Watson, 2001), y las etapas de enfriamiento, congelación y descongelación (Watson, 1990), son las principales fuentes de daño sobre las células en el conjunto del proceso.

2.3.2.1 Efectos deletéreos de los agentes crioprotectores

Los efectos deletéreos que se producen durante esta fase son debidos a la acción tóxica y al estrés osmótico que ejercen sobre los espermatozoides (Watson, 2001).

El crioprotector más comúnmente utilizado en la congelación de espermatozoides de mamíferos (salvo algunas excepciones), es el glicerol (Watson, 1990, 1995; Holt, 2000b); recomendándose la utilización de este compuesto a concentraciones de 1-2 M, sin embargo, numerosos estudios experimentales han revelado que por encima de 0,5 M, ejerce un efecto deletéreo. Su efecto, parece ser mediado más por su toxicidad que por el posible estrés osmótico al que somete a la célula (Watson, 1995). La tolerancia al glicerol, no obstante, varía extremadamente entre las especies. En el toro, el morueco y el caballo, por ejemplo, se utilizan concentraciones comprendidas entre el 4 y el 9% (Watson, 1990), pero para el espermatozoide de los marsupiales es necesario emplear cerca de un 20% (Holt, 2000b), y con el de otros, como el verraco (Watson, 1990, 1995; Holt, 2000b) o el ratón (Holt, 2000b), no es recomendable incluir más de un 3%, o un 1,75%, respectivamente. El estrés osmótico se produce a consecuencia de la penetración del crioprotector en la célula, lo que depende del grado de permeabilidad de la membrana a dicha sustancia (Watson, 1995); esto no sería válido para las sustancias crioprotectoras catalogadas como “no penetrantes”. La severidad de este efecto osmótico, parece estar relacionada con la temperatura a la que se añade el glicerol. En ciertas ocasiones, para reducir el daño del mismo, se recomienda la adición del glicerol en etapas sucesivas (fase de glicerización, como se denominaba antiguamente) (Watson, 1995).

2.3.2.2 Efecto del enfriamiento, congelación y descongelación

2.3.2.2.1 Efectos de los cambios de temperatura

En la fase inicial de enfriamiento, previa a la congelación, la temperatura de la suspensión espermática se reduce desde valores fisiológicos hasta otros ligeramente por encima de los 0 °C. Este cambio térmico va a poner de manifiesto la extrema sensibilidad de los espermatozoides, sobre todo, a los descensos bruscos de temperatura, más conocidos como “shock por frío” (Parks, 1997); por otra parte, los daños son también debidos a la

temperatura final alcanzada, lo que podemos denominar como “daño por enfriamiento extremo” (“*chilling injury*” en la literatura anglosajona) (Watson, 1990, 1995). Así, el espermatozoide manifiesta pérdida de la integridad de membrana y de las funciones celulares al ser enfriado rápidamente en el rango de 20 a 0 °C, aunque por lo general, el daño resulta más severo entre 12 y 2 °C (Watson, 1995). Estas alteraciones pueden minimizarse si se utilizan velocidades de enfriamiento muy lentas (< 10 °C/min) hasta cerca de los 4 °C (Parks, 1997). No obstante, este enfriamiento lento también generara lesiones, aunque mucho menos severas y extensas (Watson, 1990).

La sensibilidad al fenómeno descrito anteriormente varía entre las especies. El espermatozoide de las aves parece no verse demasiado afectado, mientras que la célula espermática de los mamíferos resulta más sensible, siendo los ungulados quienes manifiestan mayor susceptibilidad (Watson, 1995). De este modo, podemos describir un gradiente de tolerancia, en el que el espermatozoide del hombre, altamente resistente, se situaría en uno de sus extremos, seguido, en orden creciente de sensibilidad, por los espermatozoides del perro y el gato, menos resistentes, los del toro, morueco y caballo, altamente susceptibles, y finalmente, el del verraco, extremadamente sensible (Parks, 1997). Estas variaciones de susceptibilidad han sido atribuidas a diferencias en la composición lipídica de la membrana plasmática (De Leeuw *et al.*, 1990; Parks y Linch, 1992; White, 1993), pues dos características intrínsecas a la misma, la abundancia relativa de colesterol, y la proporción de ácidos grasos insaturados, determinan la facilidad con la que en ésta aparecen fenómenos de transición y separación lateral de fases (Alberts *et al.*, 1989), que son, en definitiva, a quienes se ha atribuido en último término los daños por el enfriamiento en la célula espermática (Drobnis y *et al.*, 1993).

Tales fenómenos de transición y separación lateral de fases, resultan del comportamiento termotrópico que exhiben los sistemas de membrana que contienen lípidos con ácidos grasos (Parks, 1997). En virtud del mismo se produce, en situaciones de enfriamiento, una gelificación del plasmalema (habitualmente dinámico y fluido), por efecto del “empaquetamiento” de las cadenas de ácidos grasos de fosfolípidos y glicolípidos como consecuencia de la reducción de algunos de sus movimientos moleculares por el descenso de la temperatura. Existirán varias temperaturas críticas para la aparición de transiciones de fase en la membrana, que se conocen como “puntos de transición de fase”, y conforme se vayan alcanzando, las moléculas afectadas se agruparán y empaquetarán, apareciendo un “parche” de congelación sobre la estructura de bicapa lipídica fluida. Los fosfolípidos con mayores puntos de fusión (puntos de transición de fase más altos) van quedando “secuestrados” en dominios de fase viscosa, rodeados enteramente por fosfolípidos aún en fase líquida, con lo que la membrana experimenta así un fenómeno de separación lateral de fases (Alberts *et al.*, 1989). Estos sucesos repercuten enormemente en la estructura y funcionalidad de la membrana, produciéndose, por ejemplo, un aumento de la permeabilidad a los cationes y al

agua; la segregación de las proteínas integrales de membrana, por quedar excluidas de los dominios de la fase viscosa, altera la interacción lípido-proteína que se necesita para la correcta conformación y función de aquélla; la disminución de la actividad de las enzimas adosadas a la membrana, y también de la difusibilidad de las proteínas por la bicapa, afectan a los procesos basados en este sistema de transporte (Parks, 1997). Así pues, si bien el fenómeno podría revertir con el calentamiento de la célula, es posible que las consecuencias aparecidas mientras estuvo instaurado no sean reversibles afectando entonces, de manera importante, a la viabilidad celular (De Leeuw *et al.*, 1990).

Durante la fase de enfriamiento hasta 5 °C, se han detectado en los espermatozoides, mediante microscopía de fluorescencia con clortetraciclina (CTC), la presencia de patrones de tinción similares al de aquellos espermatozoides incubados en medios de capacitación (Maxwell y Johnson, 1997a); las alteraciones que sufre el espermatozoide que le llevan a mostrar dichos patrones se denominan: cambios similares a la capacitación o “criocapitación” (*capacitation-like changes*, en literatura anglosajona); siendo uno de los procesos responsables de las alteraciones morfofuncionales que sufren las células espermáticas, este proceso ha sido descrito en los espermatozoide de un gran número de especies: cerdo (Watson, 1996; Maxwell y Johnson, 1997a), ratón (Fuller y Whittingham, 1996), toro (Cormier *et al.*, 1997), morueco (Gillan *et al.*, 1997) y garañón (Schembre *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2006).

La capacitación fisiológica engloba una serie de cambios que afectan al espermatozoide bajo unas condiciones específicas creadas en el interior del aparato reproductor de la hembra, y que van a repercutir tanto en la estructura del plasmalema (desorden lipídico), en la motilidad (hiperactivación) y en la composición del medio interno (alteración en la concentración de AMP_C, e iones tales como HCO₃⁻, Na⁺, K⁺ y Ca²⁺). Estas modificaciones van a poner al espermatozoide en disposición de poder unirse al ovocito y culminar la fecundación. Todo este proceso parece estar mediado por cambios en los niveles de HCO₃⁻, Ca²⁺ y de las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Matás *et al.*, 2006) a nivel intracelular lo que desencadenaría la acción de diversas proteínas-quinasas.

En el caso de la criocapitación, Green y Watson (2001b), propusieron la siguiente secuencia de acontecimientos para explicar su aparición: el enfriamiento del medio en el que se encuentran los espermatozoides produce la desestructuración de la membrana, afectando a los procesos de transporte selectivo de sustancias de la misma, alterando su permeabilidad y provocando un incremento de la concentración intracelular de Ca²⁺. La acumulación de Ca²⁺ en el medio interno produce la activación de las proteínas-quinasas responsables de desencadenar la cascada de procesos similares a la capacitación.

Tanto en la capacitación fisiológica, como en la criocapacitación, el resultado final va a ser la desestabilización de la membrana plasmática y la reacción acrosómica (Green y Watson, 2001b).

Tras la capacitación el espermatozoide va a sufrir una drástica reducción de su vida útil, y en el caso de los espermatozoides criocapacitados una disminución manifiesta de su fertilidad al sufrir dicho cambio fuera del aparato reproductor de la hembra (Green y Watson, 2001b; Kaneto *et al.*, 2002), este fenómeno se agrava en aquellas especies (como el cerdo o el caballo) en los que la hembra presenta celos de larga duración.

Aunque el resultado final sea similar, incluso los patrones de tinción con CTC, estamos ante dos procesos muy diferentes, lo cual se respalda, al no compartir vías de regulación por proteínas-kinasas similares (Bravo *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2006).

2.3.2.2.2 Efecto de la formación-disolución de hielo

En 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 a su disolución, las cuales dependen de las velocidades de enfriamiento y calentamiento, respectivamente (Watson, 1995).

Efecto de 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:

- 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. Tanto la célula como el medio extracelular 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.

- Cuando la temperatura se sitúa entre -5 y -15 °C se forman espontáneamente los primeros cristales de hielo en el medio extracelular. El interior de la célula, no obstante, permanece aún en estado de superenfriamiento, al evitar la membrana plasmática que los cristales extracelulares de hielo penetren en el citoplasma a través de sus poros acuosos, impidiendo así que éstos crezcan en el espacio intracelular. La cristalización parcial extracelular reduce la cantidad de agua disponible para solubilizar los solutos, la concentración de éstos aumenta, y el agua intracelular, no congelada, fluirá hacia el exterior

para equilibrar las presiones osmóticas a uno y otro lado del plasmalema. En consecuencia, la célula comienza a experimentar un proceso de deshidratación.

Los acontecimientos posteriores dependen de la rapidez con que las células son congeladas, pues el grado de permeabilidad de la membrana plasmática al agua es función de la temperatura, por tanto 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 en función de que el ritmo de enfriamiento sea lento o rápido.

Con un ritmo de enfriamiento lento, se tardará en alcanzar la temperatura en la que la membrana se hace impermeable al agua. La célula, por tanto, 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. 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, al no fluir esta con rapidez como para que se alcance el equilibrio osmótico en el tiempo disponible, existirá un “exceso” de hidratación en la célula que mantiene el estado de superenfriamiento, el cual conduce eventualmente a la formación de hielo intracelular como solución final para alcanzar el equilibrio osmótico.

Influencia de la velocidad de enfriamiento: con descensos rápidos de temperatura el fenómeno físico más sobresaliente es la formación de cristales de hielo en el espacio intracelular, y este hecho, provoca la muerte de la célula, o la aparición de lesiones severas (Mazur, 1985; De Leeuw *et al.*, 1990). No obstante, las consecuencias del fenómeno dependen del tamaño de los cristales que se formen, y ello a su vez del ritmo de enfriamiento utilizado: rápido, que conduce a la formación de cristales voluminosos, o muy rápido, con el que se forman cristales de pequeño tamaño (microcristales), quienes, por lo general, no se consideran dañinos (De Leeuw *et al.*, 1990b). Por el contrario, el proceso de deshidratación que acompaña a la congelación lenta se asocia potencialmente con la supervivencia celular (Watson, 1995). Sin embargo, velocidades extremadamente lentas también provocan alteraciones importantes en la célula, y proporcionan bajos índices de supervivencia (Mazur, 1985). Como posteriormente se ha demostrado en la práctica, hay una velocidad de enfriamiento considerada como óptima, por encima o por debajo de la cual menos células sobreviven al proceso (Mazur, 1985).

Para explicar los motivos que subyacen bajo este comportamiento, Mazur (1965) propuso 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”, 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.). A velocidades de enfriamiento por encima de la óptima, por su parte, no hay suficiente tiempo para que el agua salga de la célula, conduciendo a una situación de superenfriamiento, y aumentando 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 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, la mayoría de los tipos celulares no sobreviven a la congelación en ausencia de algún 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 va a depender del tipo celular; y dentro de los espermatozoides, de la especie de procedencia, oscilando la velocidad óptima de enfriamiento entre 10 y 80 °C/min (Watson, 1995), siendo, por ejemplo, de 30-50 °C/min para el del verraco, 50-60 °C/min para el del morueco, y 26-52 °C/min para el del toro (Woelders, 1997).

Las diferencias entre tipos celulares sugieren, ante todo, que características intrínsecas a la célula influyen en el trazado de las curvas. Dichas características celulares son factores que afectan a la facilidad con que el agua puede salir de la célula, si bien el grado en que ésta se pierde es función del diferencial de presión osmótica a ambos lados de la membrana; viene definido, también, 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”, así 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, 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 podido calcular 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). El valor predictivo de estos modelos, no obstante, 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, por ejemplo, a la organización de la membrana plasmática del espermatozoide en dominios, afectando por tanto al cálculo de la conductividad hidráulica y la energía de activación, cuyos valores podrían variar entre dominios; y 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 que las diferencias se deban a que para esta célula existen otros mecanismos dañinos en juego, que posiblemente sean de naturaleza osmótica.

Efecto de la desaparición del hielo: durante la fase de descongelación, también se producen efectos letales en la célula, con lo que la efectividad de una congelación bien llevada a la práctica puede quedar anulada si no se realiza adecuadamente la descongelación. Se considera, así, que el verdadero desafío al que se enfrenta la célula en el proceso de criopreservación lo constituye una franja de temperaturas de -15 a -60 °C, la cual afecta negativamente a su integridad, y por la que deben pasar en dos ocasiones, una vez durante el enfriamiento y otra durante la descongelación (Mazur, 1985). La supervivencia al proceso requiere, pues, afrontar con éxito una etapa de congelación y otra de descongelación.

Se han propuesto dos mecanismos dañinos para el proceso de descongelación, asociados a dos situaciones particulares. 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 tienden a agruparse y a formar cristales de mayor tamaño, con las consiguientes consecuencias letales (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 rápidamente ante la imposibilidad de que el crioprotector abandone la célula lo suficientemente rápido como para mantener el equilibrio osmótico, con el consiguiente hinchamiento por efecto de la entrada de agua (Watson, 1990). La velocidad de descongelación óptima, por tanto, depende de la pauta de enfriamiento seguida, pero debe representar una situación intermedia entre los dos extremos anteriores, con la que se minimicen los daños que se causen 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. Holt *et al.* (1992), por ejemplo, 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. Se ha propuesto, entonces, 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, 1994a).

2.3.3 Repercusiones de la crioconservación sobre la funcionalidad y la estructura espermática

2.3.3.1 Alteraciones en las membranas celulares

La primera causa de daño celular que infiere el proceso de criopreservación es la alteración de la membrana plasmática (Parks y Graham, 1992). De hecho, el plasmalema es la estructura espermática que resulta más severamente dañada (Parks, 1997). Aunque la membrana acrosómica externa y las membranas de la mitocondria, no obstante, también se ven afectadas (Watson, 1995).

Los efectos concretos del proceso de criopreservación sobre las membranas celulares consisten en la alteración de la estructura y modificación de la composición lipídica y organización molecular. Éstos, a su vez, provocan pérdida de enzimas intracelulares y trastornos en el balance iónico. De este modo, las lesiones aparecidas en la membrana plasmática, el acrosoma y las mitocondrias producen como efectos inmediatos pérdida de la permeabilidad selectiva del plasmalema, trastornos en el metabolismo aerobio (respiración celular) y la glucólisis anaerobia. El incremento de permeabilidad en la membrana ocasiona abundantes pérdidas de moléculas (ATP, ácidos nucleicos, enzimas) e iones intracelulares (magnesio, potasio), y disminuye la capacidad para regular la entrada de iones de calcio y sodio, que se acumulan en el espacio intracelular. El trastorno de las rutas metabólicas aerobia y anaerobia limita las posibilidades de generar nuevas moléculas de ATP, comprometiendo,

consecuentemente, todas aquellas funciones celulares dependientes de energía, entre ellas la motilidad (De Leeuw *et al.*, 1990; Bwanga, 1991; White, 1993).

Las alteraciones en la permeabilidad de la membrana conllevan la pérdida de componentes intracelulares, entre ellos las enzimas responsables de la metabolización de las ROS (Álvarez y Storey, 1992; Lasso *et al.*, 1994), como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa; a esta pérdida hay que sumar la disminución de otros compuestos antioxidantes (α -tocoferol, ácido ascórbico, taurina, hipotaurina, etc) en el medio extracelular tras la dilución y/o centrifugación previa a la congelación en la mayoría de protocolos de criopreservación (Brouwers *et al.*, 2005).

El incremento de las ROS se ha puesto de manifiesto en el proceso de la crioconservación de semen de hombre (Wang *et al.*, 1997), toro (Chatterjee y Gagnon, 2001) o cerdo (Cerolini *et al.*, 2001, Maldjian *et al.*, 2005), siendo esta última especie mucho más sensible a su acción deletérea, al presentar un alto contenido en ácidos grasos insaturados en los lípidos de membrana y una pobre capacidad antioxidante (Breininger *et al.*, 2005).

A nivel del plasmalema, 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, reduciéndose ambos constituyentes (Alvarez y Storey., 1992, Cerolini *et al.*, 2001, Maldjan *et al.*, 2005), así como una alteración funcional de la membrana celular, al producirse una pérdida de fluidez de la misma (Sanocka y Kurpisz, 2004).

Desde el punto de vista estructural los estudios realizados por Watson y Plummer (1985) con semen de verraco, demostraron que el proceso de criopreservación produce la rotura del plasmalema, y la pérdida de sustancia en la matriz acrosomal con desprendimiento de la membrana acrosómica externa. En cuanto a la membrana mitocondrial, el grado de alteración que ésta experimenta es variable, pudiendo sufrir modificaciones severas en su organización interna, con fuga de contenido incluida, o por el contrario, permanecer inalterada. Todas estas lesiones tendrían un carácter progresivo, y la magnitud de los daños será directamente proporcional a la intensidad del estrés térmico padecido, así como al grado de susceptibilidad de cada estructura, mostrándose la membrana plasmática de la pieza intermedia, en cierta manera, más resistente. Este panorama presentado es de difícil extrapolación a otras especies, como ya citamos con anterioridad, la susceptibilidad a la congelación varía según la especie, de ahí que también lo haga el cuadro lesional detectado.

Por último, los recientes estudios realizados con Merocianina, han puesto de manifiesto el “desorden lipídico” que se produce en la membrana durante el proceso de crioconservación; dichos desordenes tienen su explicación en la movilización de la

fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, desde su localización interna en la la membrana hacia el exterior como consecuencia del proceso de criocapacitación (Thomas *et al.*, 2006).

2.3.3.2 Modificaciones del medio interno

Podemos distinguir dos fenomenos sobresalientes en cuanto a las modificaciones del medio interno: la pérdida de enzimas intracelulares y los trastornos del balance iónico.

En cuanto al primero de ellos, se han verificado pérdidas de las enzimas lactato deshidrogenasa, glutamato oxaloacético transaminasa, glucosa fosfato isomerasa, fostatasa alcalina, superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa en varias especies de mamíferos domésticos (Watson y Plummer, 1985; Bwanga, 1991; Alvarez y Storey, 1992; Lasso *et al.*, 1994; Upreti *et al.*, 1996). Las pérdidas se constatan en una o varias fases del proceso, que pueden ser diferentes para cada especie y enzima en cuestión. En cualquier caso, repercuten sensiblemente en el metabolismo de los carbohidratos, ocasionando un descenso importante de los niveles de actividad glucolítica y respiratoria (Watson y Plummer, 1985).

La pérdida de las enzimas responsables de la metabolización de las ROS va a producir un incremento de los niveles de las mismos (Wang *et al.*, 1997; Cerolini *et al.*, 2001; Chatterjee y Gagnon, 2001; Maldjian *et al.*, 2005), habiendo sido identificados estos compuestos como responsables de las siguientes alteraciones: peroxidación lipídica de los componentes de las membranas celulares, alteraciones del citoesqueleto, inhibición de la unión ovocito-espermatozoide y lesiones en el axonema asociadas con perdida de la motilidad espermática (citadas por Breininger *et al.*, 2005).

En cuanto al trastorno del balance iónico, se han citado perturbaciones en el equilibrio de las concentraciones de sodio, zinc y calcio, que se acumulan en el espacio intracelular, y de las de potasio y magnesio, que salen masivamente de la célula (Watson y Plummer, 1985). El acúmulo intracelular de iones de calcio es muy significativo en el verraco (White, 1993; Bailey y Buhr, 1995), si bien, sujeto a grandes diferencias entre individuos (Watson y Plummer, 1985), pero no parece que existan notables diferencias entre los espermatozoides del verraco, el morueco y el toro en lo que al grado de alteración del equilibrio de los restantes iones se refiere (Watson y Plummer, 1985).

Para el caso concreto del calcio, el incremento de su concentración intracelular puede deberse a la alteración de la actividad de la bomba que la regula (White, 1993), ya que las proteínas de membrana que funcionan como bomba de iones disminuyen su actividad con el descenso de la temperatura (Watson y Plummer, 1985). Pero también, la segregación de proteínas, por efecto de las separaciones laterales de fase interferirá con los mecanismos de

transporte de este elemento (Watson y Plummer, 1985). El enfriamiento, no obstante, afecta de distinto modo en cada especie a la capacidad reguladora que la célula ejerce sobre dicho componente (Bailey y Buhr, 1995), y el incremento intracelular resultante, entonces, puede estar relacionado con el grado de sensibilidad a la hipotermia (Watson y Plummer, 1985). Finalmente, se ha sugerido que la pérdida de continuidad y vesiculación de la membrana, que se observan en la región anterior de la cabeza espermática, puede ser consecuencia del acúmulo intracelular de calcio, teniendo en cuenta el papel que desempeña este ión en la reacción acrosómica (Parks, 1997).

2.3.3.3 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 muchas de las proteínas del citoesqueleto exhiben un comportamiento de despolimerización y repolimerización dependiente de la temperatura (Watson, 1995), lo que podría tener importantes consecuencias para aquella en caso de que el enfriamiento afecte a algunas de estas proteínas. El glicerol, además, altera la polimerización y despolimerización de los microtúbulos, y ello podría repercutir sobre la membrana plasmática indirectamente. Los cambios en la estructura de los microtúbulos del citoesqueleto, por ejemplo, pueden alterar la interacción que mantienen con las proteínas de la membrana, y afectar así al mecanismo de transducción de señales, o desorganizar los característicos “dominios” (Parks y Graham, 1992).

Por otro lado, los rápidos cambios del volumen celular tendrían también repercusiones importantes sobre el sostén esquelético de las membranas plasmática y acrosomal, aunque poco se conoce al respecto (Watson, 1995). Interesa saber, no obstante, que en la alteración estructural de la membrana plasmática de la región acrosómica influyen las dimensiones de la cabeza espermática, pues así lo sugiere el hecho de que en el espermatozoide de las especies más vulnerables ésta sea alargada y plana, distinta de la más pequeña y convexa de las especies resistentes. El componente citoesquelético estabilizador parece no estar presente 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, en los que esta región ocupa, generalmente, una mayor superficie (Watson y Plummer, 1985).

2.3.3.4 Efectos sobre la movilidad

La pérdida de movilidad que se observa en espermatozoides criopreservados podría ser consecuencia, tanto de los cambios ocurridos en el transporte activo y en la permeabilidad del plasmalema, como en la alteración de la disponibilidad energética. Es posible, también, que se deban a daños en los componentes del axonema (Watson, 1995) por la formación y disolución de hielo.

Podemos relacionar igualmente la reducción de movilidad en los espermatozoides criopreservados con el fenómeno de peroxidación lipídica que se produce en la membrana, como describimos anteriormente. Dicho fenómeno se produce de una manera más intensa a nivel de la pieza intermedia (Brouwers *et al.*, 2005), por lo que es de suponer que interferirá en la producción de energía vía respiración oxidativa de las mitocondrias situadas a este nivel, así se han correlacionado los daños morfológicos de la pieza intermedia, y el descenso de la movilidad en la población espermática (Karow, 1997). En consonancia con lo anteriormente expuesto, existe una alta correlación entre la formación de ROS y el descenso de movilidad posdescongelación y este mismo fenómeno y la pérdida de la superóxido dismutasa (SOD) (Alvarez y Storey, 1992; Brouwers *et al.*, 2005). La acción de las ROS no solo se circunscribe a un efecto deletéreo sobre la producción energética 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.

Los cambios que se producen en la movilidad del espermatozoide, no solo son de tipo cuantitativo, sino que también existen modificaciones cualitativas en el patrón de movimiento espermático durante el proceso de crioconservación; en la etapa en las que se elimina el plasma seminal del eyaculado y en la posterior de adición del diluyente de refrigeración se produce un incremento de los espermatozoides con una elevada VCL, ALH y reducida LIN (Cremades *et al.*, 2005), similares características presentan los espermatozoides hiperactivados a consecuencia de la capacitación previa a la fecundación (Schmidt y Kamp, 2004). Las alteraciones en los parámetros de movilidad, vienen a reflejar el proceso similar a la capacitación que sufre el espermatozoide, debido tanto a la posible pérdida de factores decapacitantes con la eliminación del plasma seminal en la centrifugación (Mortimer *et al.*, 1998), como los cambios en la membrana plásmica similares a la capacitación descritos por Maxwell y Johnson (1997b); y Green y Watson (2001b). 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 culpables de la drástica caída de la movilidad espermática

2.3.3.5 Efectos sobre el núcleo

En el espermatozoide del hombre se ha comprobado que el estado de condensación de la cromatina nuclear se altera por efecto de la congelación-descongelación (se dice que se supercondensa) [revisado por Royère *et al.* (1991)]. Se ha constatado, además, que en ovocitos fecundados *in vitro* con espermatozoides criopreservados se produce un retraso considerable en la aparición de los pronúcleos, respecto de los que son fecundados con espermatozoides de eyaculados frescos, sugiriendo así una relación causa-efecto entre aquél y este fenómeno, que tendría consecuencias importantes sobre la capacidad fecundante del espermatozoide, y quizás también sobre las primeras etapas del desarrollo embrionario (Royère *et al.*, 1991). Estas alteraciones nucleares se producen desde la misma etapa de dilución, acentuándose después en la fase de congelación, y podrían estar producidas por movimientos de iones de zinc, o alteraciones del equilibrio de los puentes disulfuro o de los grupos tiol, afectando a la relación entre el ADN y las proteínas nucleares (Royère *et al.*, 1991).

Un estado similar de supercondensación de la cromatina nuclear se ha constatado también en espermatozoides criopreservados de verraco (Hamamah *et al.*, 1990), y algunos estudios avalan su relación con la capacidad fecundante y/o el desarrollo embrionario. También, Martín-Rillo *et al.* (1999) asocian los trastornos del desarrollo embrionario a alteraciones en la organización de la cromatina nuclear, pues encuentran una mayor proporción de embriones en estadios menos avanzados del desarrollo, y también de embriones degenerados, en cerdas que habían sido inseminadas con semen descongelado, en comparación con otras, que lo fueron con semen refrigerado, en el que las evidencias de modificación del estado de condensación de la cromatina eran menores. Estas modificaciones, no obstante, no mermaban la capacidad fecundante del espermatozoide.

En cuanto a la integridad de la doble hélice de ADN del núcleo de los espermatozoides porcinos, un reciente estudio de Fraser y Strzezek (2007), ha descrito un incremento de la fragmentación de la misma tras el proceso de congelación-descongelación; dicho incremento de la fragmentación era independiente tanto del método, como del medio de congelación utilizado. En el mismo estudio se puso de manifiesto la acción protectora que ejerce tanto el plasma seminal como las sustancias crioprotectoras a la hora de reducir la fragmentación del material genético. Las causas de este daño no parecen claras, durante mucho tiempo se ha especulado con la participación de las ROS como desencadenante del mismo, pero van der Schans *et al.* (2000) demostraron con la utilización de un test de ELISA, que mide el daño oxidativo en la doble hélice del ADN de espermatozoides de toro que este no se incrementaba tras el proceso de criopreservación.

2.4 TÉCNICAS DE ANÁLISIS SEMINAL

2.4.1 Introducción

El fin último del análisis *in vitro* de la calidad seminal de un eyaculado es la predicción de su fertilidad, no obstante, aún en la actualidad, podemos considerar esta aseveración como una utopía (Rodríguez-Martínez, 2003b; González Urdiales *et al.*, 2006). La manifiesta incapacidad de las técnicas de análisis en el establecimiento de una correcta predicción de la fertilidad, es en su mayor parte debida a que el proceso reproductivo es un acto de extrema complejidad, en el que el resultado final del mismo no solo es dependiente de los parámetros de calidad seminal, sino que se va a ver mediado por los condicionantes de la hembra, la interacción macho-hembra y la injerencia humana en el proceso (Amann, 1989; Colebrander *et al.*, 2003,).

Además del objetivo primario anteriormente descrito, las pruebas de análisis seminal, se emplean, cada día con más asiduidad, en la determinación de las repercusiones sobre la célula espermática de los procesos tecnológicos a las que las sometemos (como puede ser la crioconservación); evaluando la idoneidad de las mismas para su uso en las practicas de inseminación artificial tras estos procesos.

De forma tradicional el análisis de la capacidad como reproductor de un macho destinado a la cría se estima a partir de la conjunción de los datos obtenidos, de (según Colebrander *et al.*, 1992; Gonzalez Urdiales *et al.*, 2006):

- El análisis clínico del aparato reproductor.
- La evaluación de la libido y capacidad copulatoria.
- Los datos de los índices de preñez de montas o inseminaciones pasadas.
- Los resultados del análisis de los parámetros de calidad seminal.

Este esquema nos permite comprobar el correcto funcionamiento del aparato reproductor del macho, y descartar los casos claros de infertilidad y subfertilidad (Graham 2001; Rodríguez-Martínez, 2003b; 2006). No obstante, presenta una serie de desventajas que le impiden alcanzar el objetivo final de una correcta predicción de la fertilidad. Así, la estimación de los ratios de preñez/parto pasados requiere de un elevado número de montas y/o inseminaciones para evitar distorsiones por factores extrínsecos, como la edad y el estado reproductivo de las hembras empleadas; o por el manejo al que hemos sometido, tanto a las hembras como a los machos (van Buiten *et al.*, 1998; Morris y Allen, 2002; Rodríguez-

Martínez, 2006). Esta valoración es costosa tanto desde el punto de vista económico, como en el tiempo empleado (Rodríguez-Martínez, 2003b; Guillan *et al.*, 2005). Finalmente, los datos obtenidos son retrospectivos, lo que dificulta la realización de predicciones con exactitud para la situación futura (Colebrander *et al.*, 2003).

Las pruebas *in vitro* tradicionales, analizan diversos aspectos físicos del eyaculado (color, volumen, concentración), así como la motilidad y la morfología espermática, siendo estos dos últimos parámetros los que van a determinar la idoneidad de un eyaculado para ser usado en las técnicas de inseminación artificial; su correlación con la fertilidad es muy variable en función del estudio que tomemos en cuenta, así para la motilidad se describen correlaciones entre $r = 0,15$ y $r = 0,83$, mientras que para la morfología oscilan entre $r = 0,06$ y $r = 0,86$ (datos recogidos en Rodríguez-Martínez, 2003b). En cualquier caso, no nos van a asegurar una predicción correcta de la fertilidad y podemos llegar a la siguiente conclusión citada por Colebrander *et al.* (2003): “si los resultados del espermiograma son malos, los resultados de fertilidad lo serán igualmente; pero unos buenos resultados en estas pruebas no nos aseguran unos buenos resultados de fertilidad”.

La explicación de esta manifiesta incapacidad predictiva, se basa en la multifactorialidad anteriormente descrita, que se puede aplicar también a nivel de la célula espermática, necesitando ésta de diversos atributos para llevar a cabo correctamente su función.

Según Graham (1996), las cualidades que deben de poseer los espermatozoides de un eyaculado fecundante, son:

- 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.

Por tanto, con el análisis clásico estamos analizando solo una parte de la compleja función espermática (Amann y Hammerstedt, 1993; Quintero-Moreno, 2003). Para solventar este importante obstáculo, en los últimos años se han desarrollado multitud de pruebas que evalúan cada uno de los atributos del espermatozoide, permitiendo combinar sus resultados para obtener una mejor estimación de la fertilidad (Rodríguez-Martínez, 2003b). Es especialmente reseñable la contribución que ha supuesto el análisis por citometría de flujo, al

permitirnos analizar diferentes parámetros de forma simultánea (Graham, 2001; Rodríguez-Martínez 2003b; Colebrander *et al*, 2003; Guillan *et al.*, 2005); así como las pruebas 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 pelucida (ZP), conteo de espermatozoides accesorios, penetración de ovocitos, etc] (Rodríguez-Martínez, 2006). No obstante estas pruebas quedan, en la mayoría de las ocasiones, restringidas al ámbito de la investigación, al requerir de personal especializado; y ser costosas y lentas, por lo que los resultados obtenidos son retrospectivos. Para Rodríguez-Martínez (2003b), la prueba de análisis seminal ideal quedaría definida por los siguientes criterios técnicos: objetividad, repetibilidad y exactitud; a nivel práctico nos permitimos añadir, que deberían de tratarse de test sencillos, baratos y rápidos.

Como conclusión y previamente a la descripción de las técnicas disponibles, podemos aseverar que actualmente, más que predecir, sólo podemos llegar a estimar la fertilidad de un eyaculado, utilizando conjuntamente los datos de varias pruebas que analicen distintos aspectos morfofuncionales de los espermatozoides (Rodríguez-Martínez, 2003b).

2.4.2 Técnicas de análisis seminal

2.4.2.1 Valoración macroscópica del eyaculado

Es la primera evaluación tras la recolección, en ella a parte de la determinación del volumen, evaluamos el aspecto y el color del material recogido. La observación de colores distinto al blanco nítido, nos indica, o bien patologías en el aparato reproductor del macho, si la coloración detectada es roja (hemorragias) o marronacea (infecciones piógenas); o bien contaminación con orina durante la extracción, si la coloración es amarillenta (Martin-Rillo *et al.*, 1996b).

2.4.2.2 Medida de la concentración espermática

Esta evaluación es uno de los hitos más importantes en la contrastación seminal, tanto desde el punto de vista reproductivo como desde el comercial, ya que nos va a permitir calcular el número potencial de dosis que se pueden producir a partir de cada eyaculado. Como ponen de manifiesto un gran número de autores (citados en Rodríguez-Martínez, 2006), existe una fuerte correlación entre el número de espermatozoides viables presentes en

la dosis inseminante y la fertilidad obtenida, estableciéndose una curva dosis-respuesta, en la que la fertilidad se incrementa con el número de espermatozoides viables en la dosis hasta alcanzar un *plateau*, que no se supera por mucho que los incrementemos. Es necesario, por tanto, asegurar ese número de células para conseguir la máxima fertilidad y rentabilizar mejor el trabajo en un centro de inseminación artificial, para lo que deberemos de contar con un método de cálculo de la concentración lo más exacto posible, que nos permita realizar el mayor número de dosis sin que disminuya ese valor óptimo (Gonzalez Urdiales *et al.*, 2006).

Disponemos de diversos procedimientos para llevar a cabo esta medida, siendo los más frecuentemente utilizados los hematocitómetros, colorímetros y espectrofotómetros (Hafez, 2000; Gonzalez Urdiales *et al.*, 2006), y en menor medida los contadores electrónicos de partículas, los citómetros de flujo y los sistemas basados en el análisis de imagen (Woelders, 1990; Hafez, 2000; Gonzalez-Urdiales *et al.*, 2006).

Los hematocitómetros, presentan cámaras de recuento en su superficie, donde se encuentra grabada una cuadrícula, el área de cada una de sus divisiones es un valor conocido, así como el volumen que encierra; conociendo también la dilución a la que hemos sometido a la muestra, es muy sencillo calcular la concentración de la misma a partir del número de espermatozoides que hayamos contado con un microscopio óptico. Ejemplos de este sistema, son las cámaras *Neubauer improved*, *Bürker* o *Makler*. Se trata de un método muy popular por su sencillez, requiriendo únicamente la supresión del movimiento espermático por una solución fijadora. El principal inconveniente de estas técnicas, a parte del elevado tiempo empleado, es la escasa repetibilidad entre duplicados, encontrándose coeficientes de variación de hasta el 12%, mucho mayores que los del espectrofotómetro (2,9%) y la citometría de flujo (2,3%) (Paulenz y Hofmo, 1996). Sin embargo es la técnica usada como referencia para comparar los resultados de las otras descritas a continuación.

Los espectrofotómetros y colorímetros nos permiten medir, en porcentaje, la cantidad de luz que es capaz de atravesar (transmitancia) o que queda retenida (absorbancia), al incidir un haz de luz sobre una muestra situada en una cubeta transparente. La densidad óptica obtenida se ha de contrastar con una recta patrón, realizada previamente con diluciones de semen de concentración conocida. Los resultados presenta una alta correlación con el recuento directo en cámara (Gonzalez Urdiales *et al.*, 2006; Tejerina *et al.*, 2006a), y una mayor repetibilidad que este, siendo también un método más rápido y práctico. No obstante, también presenta algún factor negativo, ya que, tanto la aglutinación espermática, como el uso de diluyentes turbios (por ejemplo los que tienen una base láctea) pueden interferir en la medición.

Tanto el uso de citómetros de flujo, como de contadores celulares electrónicos, es anecdótica y limitada al ámbito de la investigación, a pesar de presentar sus mediciones una correlación significativamente alta con las de las cámaras de recuento celular.

En cuanto a los sistemas basados en la tecnología de análisis de imagen, nos encontramos, por una parte los sistemas CASA (*Computer-Assisted semen analysis*) tradicionales, presentando sus resultados una baja correlación con los obtenidos por los hematocitómetros, constatándose diferencias significativas entre ambos métodos en diversos estudios (Chan y *et al.*, 1990; Iguer-Ouada y Verstegen 2001; Tejerina *et al.*, 2006a). Por otra parte, un sistema recientemente introducido (Nucleocounter[®]) combina la tecnología de análisis de imagen con una tinción fluorescente, no presentando diferencias significativas con los recuentos de las cámaras (Tejerina *et al.*, 2006a).

2.3.2.3 Evaluación de la motilidad espermática

Ha sido el parámetro más comúnmente utilizado para definir la viabilidad espermática y por ende la calidad e idoneidad de un eyaculado para ser usado en el proceso reproductivo. Existen grandes discrepancias entre los diferentes autores a la hora de determinar su relación con la fertilidad, así lo atestigua el amplio rango de correlaciones descritas, que va desde $r = 0,15$ a $r = 0,83$ (Rodríguez-Martínez, 2003b); estos valores se acotan e incrementan si la determinación de la motilidad se realiza mediante un sistema CASA y los resultados obtenidos se combinan estadísticamente tanto entre sí como con otros parámetros de calidad seminal (Farrell *et al.*, 1998), esto es debido a que estos sistemas aportan la objetividad y repetibilidad de la que carece la valoración visual con microscopía óptica. No obstante, los sistemas CASA serán ampliamente descritos en las siguientes secciones.

De forma subjetiva 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, a continuación, se observa al microscopio óptico bajo un objetivo de 40 aumentos. La valoración de este parámetro es subjetiva y se expresa 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. Ésta es una valoración que requiere de una elevada concentración espermática para que las ondas y remolinos se hagan visibles, siendo empleada a nivel práctico en el análisis de semen de rumiantes (Hafez, 2000).

La evaluación de la motilidad individual requiere diluir previamente el semen, para a continuación, depositarlo entre un porta y un cubreobjetos atemperados. La observación bajo microscopía óptica se realizará con objetivos de 100 o 200 aumentos, y valoraremos de forma subjetiva tanto el porcentaje de espermatozoides móviles, el porcentaje de espermatozoides

con movimiento progresivo y la calidad del movimiento espermático en base a una escala arbitraria de 0 (espermatozoides inmóviles) a 5 (espermatozoides con movimiento progresivo muy rápido) (González Urdiales *et al.*, 2006).

La motilidad espermática es extremadamente sensible tanto a cambios en la temperatura, al efecto de la dilución, al tiempo de análisis, al diluyente empleado o la profundidad de la gota (Hafez 2000), debemos por tanto ser especialmente rigurosos y realizar este análisis en las condiciones óptimas y estandarizadas.

2.4.2.4 Morfología espermática

Junto con la valoración de la motilidad, el estudio de la morfología espermática es la otra prueba determinante de la calidad de un eyaculado; permitiendo además detectar alteraciones en la espermiogénesis y en la maduración epididimaria, lo cual, puede resultar muy útil a la hora de eliminar reproductores con baja calidad seminal, cuando estas anomalías indiquen patologías genitales mayores. Al igual que en la valoración subjetiva de la motilidad, la correlación de los resultados obtenidos en la valoración morfológica del semen con la fertilidad varía ampliamente en función del estudio que tomemos en cuenta, describiéndose valores entre $r = 0,06$ a $r = 0,86$ (Rodríguez-Martínez, 2003b).

El espermatozoide morfológicamente normal responde a lo representado en la Figura 2.

Los espermatozoides morfológicamente anormales, presentan malformaciones de distintos tipos, así Gonzalez Urdiales *et al.* (2006) las clasifican en:

- 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, se suelen manifestar o bien por alteraciones a nivel de la cola (colas enrolladas o en “látigo”) 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, variaciones de pH, composición del diluyente o por variación de la presión osmótica).

Aparte de las lesiones anteriores, la presencia de gotas citoplasmáticas, es una alteración frecuente en los espermatozoides de mamíferos; se tratan de residuos de la espermatogénesis que aparecen en la zona de conexión entre la cabeza y la pieza intermedia (gota citoplasmática proximal) y que van deslizándose hacia el anillo de Jensen (zona de unión de la pieza intermedia con la sección principal de la cola), denominándose entonces gotas citoplasmáticas distales, donde se acaban desprendiendo. Es importante hacer una diferenciación en el análisis entre gotas proximales y distales por su distinta correlación con la fertilidad, se ha determinado que eyaculados con más de un 5% de gotas citoplasmáticas proximales producen un descenso de la fertilidad, y en cambio, no se ha obtenido una correlación directa entre el porcentaje de gotas citoplasmáticas distales y ese mismo parámetro.

Tenemos a nuestra disposición diversos métodos para realizar el análisis de la morfología espermática. El más sencillo es el uso de tinciones de extensiones espermáticas y su posterior observación en un microscopio óptico, para lo que disponemos de un amplio abanico de opciones. Podemos elegir entre tinciones simples como el azul de metileno, el rosa de bengala, o la hematoxilina, 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; en cambio las tinciones dobles (Giemsa, William, Papanicolau) lo que buscan es visualizar partes específicas del espermatozoide (García-Artiga *et al.*, 1994). Podemos realizar un análisis morfométrico a partir de ambas tinciones, mediante el uso de sistemas computerizados conocidos por su acrónimo en inglés como ASMA (*automated semen morphology analysis*), aunque por el costo del equipamiento y su lentitud su uso queda restringido a los trabajos de investigación (Casey *et al.*, 1996; Tejerina *et al.*, 2005; García-Herreros *et al.*, 2006).

Tanto el uso de microscopia de contraste de fase, como de contraste diferencial de interferencia, previa fijación de la muestra, nos permiten igualmente realizar el análisis morfológico de los espermatozoides.

Por último, también es posible realizar un análisis ultraestructural utilizando el microscopio electrónico de barrido o transmisión, aunque su uso es puramente experimental (Bonet *et al.*, 2006).

2.4.2.5 Análisis de la membrana citoplasmática

La membrana citoplasmática recubre en su totalidad al espermatozoide, constituyendo la frontera de separación con el medio externo, y desarrollando una gran variedad de

funciones fisiológicas encaminadas a mantener las condiciones óptimas del medio interno, sin las cuales, el espermatozoide perdería su vitalidad. Así, es la encargada del transporte de sustancias y el mantenimiento del gradiente de iones y solutos a su través (Gonzalez Urdiales *et al.*, 2006; Silva y Gadella, 2006), siendo la artífice de la internalización de la glucosa y fructosa del medio externo (Angulo *et al.*, 1998), necesarias para la obtención de energía en forma de ATP. Además de estos procesos, su relevancia es máxima en el momento culminante del proceso reproductivo, al ser la responsable de interaccionar, primero, con las células del aparato reproductor de la hembra, y finalmente con el ovocito en el momento de la fecundación (Rodríguez-Martínez, 2001; 2005). La alteración, tanto funcional como estructural de la membrana, supone la incapacidad de mantener las concentraciones intracelulares de iones, solutos, enzimas y coenzimas dentro de rangos fisiológicos, así como el cese de la producción de la energía necesaria para el movimiento espermático, desencadenando todas estas alteraciones la muerte celular, de ahí que las pruebas que valoran el estado de integridad del plasmalema se denominan también de “**vitalidad celular**”.

Como citamos en el capítulo 2.2, la membrana citoplasmática es una de las estructuras más seriamente afectadas por el proceso de congelación-descongelación, siendo su análisis ineludible cuando llevamos a cabo estos procedimientos, ya sea con una finalidad investigadora o comercial; esta afirmación se verifica al comprobar como en la práctica totalidad de trabajos que analizan los atributos del semen descongelado se le da una importancia preponderante al estudio del estado del plasmalema (Januskauskas *et al.*, 1999; Neild *et al.*, 2003, Peña *et al.*, 2003b; 2005a; Nagy *et al.*, 2003, 2004; Peláez *et al.*, 2006; de Graaf *et al.*, 2006, etc).

Al ser un aspecto tan sumamente importante se ha desarrollado una amplia panoplia de pruebas para estudiar su estado. Podemos realizar una evaluación morfológica utilizando óptica de contraste diferencial de interferencia o Nomarski, así como microscopía electrónica (de barrido o de transmisión), si bien estas técnicas aportan información parcial y/o son tediosas y de alto costo. Además, aun cuando proveen de información detallada de los daños inflingidos a la membrana plasmática, estos resultados no siempre están correlacionados con la fertilidad, a menos que el daño descrito sea muy importante (Rodríguez-Martínez, 2005).

Tampoco parece muy útil la determinación del ATP y ciertas enzimas celulares como índices de daño celular, al producirse la rotura de la membrana y aumentar su presencia en el medio extracelular; debido a que los resultados en gran medida dependen de las condiciones experimentales utilizadas (Woelders, 1990), y el tipo de información que proporcionan no puede diferenciar qué células están dañadas y cuáles no (Watson, 1990).

Las técnicas tintoriales son las más ampliamente utilizadas en la valoración de la membrana citoplasmática, tanto las convencionales, como las fluorescentes. Las tinciones convencionales (también denominadas “tinciones de vivos/muertos”) se basan en el principio

de que los espermatozoides con la membrana plasmática intacta (vivos) presentan mecanismos de permeabilidad selectiva que impiden la entrada del colorante, mientras que en aquellos donde existe ruptura del plasmalema, y no existan estos mecanismos, el colorante penetrará y la célula se tiñe (Watson, 1990). Ejemplos de estas tinciones, son: la eosina/nigrosina, azul tripán, verde rápido/eosina, eosina/azul de anilina o el amarillo de naftol/eritrosina (García-Artiga *et al.*, 1994; Rodríguez-Martínez, 2005). No obstante, el uso de esta metodología acarrea una serie de complicaciones: la aparición de espermatozoides parcialmente teñidos, lo que dificulta la interpretación de su *status* (Watson, 1990); aunque para Bamba (1988) esto indica un estado inicial de alteración que desencadenará, con el paso del tiempo, una pérdida total de la permeabilidad selectiva, pudiendo, por tanto, considerar a estos espermatozoides como muertos. En el caso de analizar semen criopreservado, el glicerol puede aumentar la permeabilidad de la membrana de los espermatozoides no dañados, incrementándose la población de espermatozoides con la membrana dañada artificialmente (Mixner y Saroff, 1954, citados por Peláez, 2003); por último la eosina (una de las tinciones más empleadas) se usa a concentraciones citotóxicas pudiendo, igualmente, subestimar artificialmente la proporción de espermatozoides vivos (Woelders, 1990).

Con la aparición de fluorocromos capaces de determinar con mayor objetividad el estado de integridad de la membrana, las tinciones clásicas se han desechado como técnica de elección para valorar este parámetro; así se han desarrollado una gran variedad de protocolos basados en la utilización de tinciones fluorescentes (ver tabla 1). Estas sustancias se clasifican en dos grupos principales en función de su mecanismo de acción, así las tinciones de membrana impermeable (como el yoduro de propidio, Hoechst 33258, homodimero de etidio, YoPro-1), actúan de forma similar a las tinciones convencionales, penetrando en la célula sólo cuando ésta está dañada y uniéndose específicamente al ADN (Rodríguez-Martínez, 2005; Silva y Gadella, 2006); por otra parte las tinciones de membrana permeable [como el diacetato de fluoresceína y sus derivados (ver Gillan *et al.*, 2005)] atraviesan la membrana citoplasmática, para una vez dentro del espermatozoide ser desacetiladas por esterasas intracelulares, no pudiendo posteriormente retornar al medio extracelular, de esta manera se acumulan en el interior del citoplasma (Graham, 2001; Gillan *et al.*, 2005; Silva y Gadella, 2006); dentro del mismo grupo se encuentra el SYBR-14, en este caso el mecanismo de acción es distinto, penetrando en la célula, sólo, si están activas las bombas de iones de la membrana, y uniéndose al ADN (Garner *et al.*, 1994). Esta particularidad, permite que generalmente la identificación de las poblaciones de espermatozoides vivos y muertos, se realice utilizando combinaciones de dos fluorocromos que presentan capacidades opuestas para atravesar el plasmalema, así como con otros compuestos fluorescentes que evalúan el estado del acrosoma (Garner *et al.*, 1986; Garner y Johnson, 1995; Januskauskas y Rodríguez-Martínez, 1995; Januskauskas *et al.*, 1999; Juonala *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2000; Nagy *et al.*, 2003; etc).

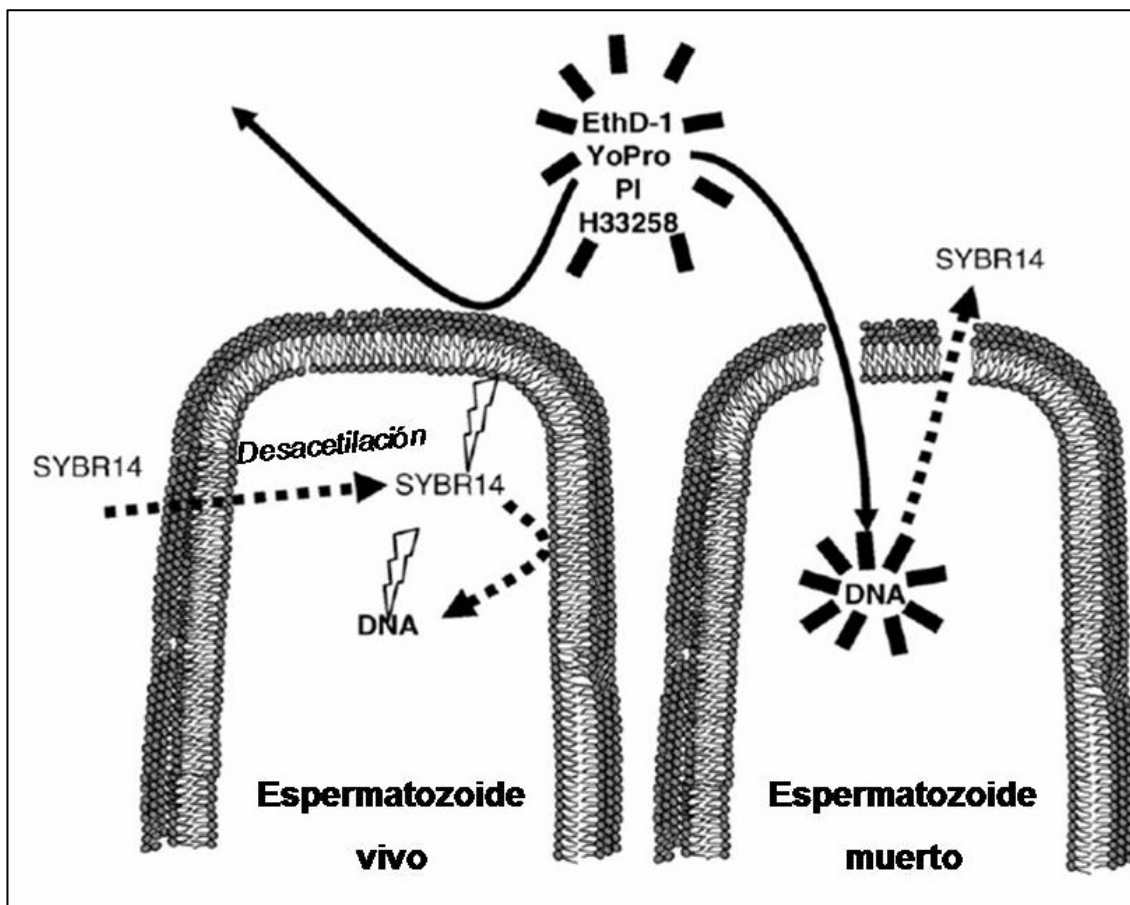


Figura 4. Mecanismo de acción de diversas sustancias fluorescentes empleadas en la valoración de la integridad de la membrana citoplasmática; tanto de membrana impermeable como el homodímero de etidio (EthD-1), el YoPro-1, el yoduro de propidio (PI) y el Hoechst H33258; como de membrana permeable (SYBR14) (Silva y Gadella, 2006).

El recuento de los espermatozoides que componen cada una de las subpoblaciones puede realizarse mediante observación en un microscopio epifluorescente con los filtros adecuados para cada uno de los fluorocromos empleados (Althouse y Hopkins, 1995), si bien un problema inherente a este método es que se debe de evaluar un número elevado de células para obtener pequeños errores estándar, lo que supone invertir un tiempo considerable en el análisis; de ahí que la introducción de la citometría de flujo para realizar el conteo en las técnicas de tinción con sustancias fluorescentes haya supuesto un gran avance, permitiéndonos realizar el análisis de decenas de miles de espermatozoides de forma rápida y evaluando diversos parámetros de forma simultánea (Silva y Gadella, 2005; Guillan *et al.*, 2005; Peña y Rodríguez, 2006), aumentando las correlaciones de sus resultados con la fertilidad, tanto *in vitro* (Maxwell *et al.*, 1998) como *in vivo* (Ericsson *et al.*, 1993; Januskauskas *et al.*, 2001).

Mediante el uso de fluorocromos, no solo podremos determinar el estado de integridad de la membrana, sino también la organización interna de ésta. El Annexin-V es una proteína de unión a la fosfatidilserina dependiente de calcio, se conjuga con isotiocianato de fluoresceína (FITC), permitiendo reconocer las células con fosfatidilserina expuesta en la parte exterior de la membrana (Silva y Gadella, 2006); de manera similar el compuesto RO-09-0198, se une a la fosfatidiletanolamina (Gadella *et al.*, 2002); ambos fosfolípidos se exteriorizan en el momento inicial de las lesiones de membrana y durante los procesos de capacitación y criocapacitación, permitiéndonos detectar de forma relativamente temprana las lesiones en el plasmalema en espermatozoides de toro (Januskauskas *et al.*, 2003) o verraco (Peña *et al.*, 2003b, 2005a). Su correlación con la fertilidad se ha cifrado en los estudios disponibles hasta la actualidad (Anzar *et al.*, 2002 y Januskauskas *et al.*, 2003) en $r = 0,30-0,56$.

Un último aspecto a evaluar de la membrana plásmatica, es la funcionalidad de la misma; las pruebas que se utilizarán para analizarla se basan en el principio de que una célula espermática inmersa en una solución hipoosmótica captará agua en un intento de restablecer el equilibrio entre las presiones osmóticas a ambos lados del plasmalema, este principio se cumplirá si dicha estructura se encuentra íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente (Quintero-Moreno, 2003a).

Dos técnicas distintas usan la capacidad del espermatozoide para reaccionar ante medios hipoosmóticos:

-Test de endósmosis (*hypoosmotic swelling test*, HOST), evalúa el hinchamiento y enrollamiento que se produce en el flagelo de las células con una membrana íntegra, a consecuencia de la entrada y acumulación de agua a ese nivel; mientras que los espermatozoides con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentarán cambios en la forma de su flagelo (Pérez-Llano *et al.*, 1999). Ésta prueba ha sido utilizada en el análisis de espermatozoides de diversas especies como el hombre, perro, caballo y cerdo, tratándose de un método sencillo en el que se incuba la muestra seminal durante 30 a 60 minutos en un medio con una presión osmótica, comprendida, entre 50 y 150 mOsm/kg (la fisiológica es 300 mOsm/Kg) a 37°C; aunque en relación al periodo de incubación, se ha diseñado una variante corta del test que lo reduce a 5 minutos por lo que se podría adaptar a las valoraciones rutinarias de un centro de inseminación comercial (Pérez-Llano *et al.*, 2001). Cuando se comparan los resultados de esta prueba y los obtenidos en la evaluación estructural del plasmalema, estos se encuentran correlacionados, pero no son coincidentes (Jeyendran *et al.*, 1984; Rodríguez-Gil *et al.*, 1994; Vázquez *et al.*, 1997; Pratap *et al.*, 2000). Para Jeyendran *et al.* (1984), esto se explica, considerando que estas dos pruebas evalúan aspectos distintos, pudiendo ocurrir que una membrana íntegra estructuralmente sea incapaz de responder a un estrés hipoosmótico, lo que revela en definitiva la pérdida de su actividad

funcional; en el mismo trabajo se describe una correlación elevada ($r = 0,90$) con el test de penetración en ovocitos de hámster con semen humano, para la misma especie, el HOST parece ser un buen método predictivo tanto de la capacidad fecundante “*in vitro*” como “*in vivo*” (Check *et al.*, 1989; Zaneveld y Jeyendran, 1990; Verheyen *et al.*, 1997).

-Test de resistencia osmótica (*Osmotic resistance test*, ORT), como en el caso anterior al espermatozoide se le somete a un shock hipoosmótico, para en esta ocasión evaluar las lesiones estructurales evidentes tras la incubación que se producen a nivel del acrosoma (Schilling *et al.*, 1984 y 1986; Gil *et al.*, 2000), de forma que aquellos que hayan sido capaces de resistir la agresión osmótica sin alteraciones acrosomales serán considerados como funcionales (Pérez-Llano *et al.*, 1998). Tanto la capacidad fecundante (Schilling *et al.*, 1986) como la habilidad para la conservación de un eyaculado (Schilling *et al.*, 1984, 1986, Schilling y Vengust, 1985) han sido estimadas con esta prueba. Como para el HOST, se ha desarrollado un variante con un periodo de incubación de solo 5 minutos que facilita su uso en los centros de inseminación artificial comerciales (Pérez-Llano *et al.*, 1998)

2.4.2.6 Evaluación de la integridad del acrosoma

La integridad estructural del acrosoma es un requisito indispensable para que el espermatozoide sea capaz de unirse de forma efectiva al ovocito y se lleve a cabo la fecundación (Yanagimachi, 1994); la pérdida de dicha integridad previamente al paso por el aparato reproductor femenino o en una fase temprana de tránsito por él, supondrá una irremediable pérdida de la capacidad fecundante del espermatozoide (Woelders, 1990; Silva y Gadella, 2006). Pero tan importante como esta premisa, es que la célula espermática tenga la capacidad de sufrir la reacción acrosómica cuando se encuentre en las proximidades del ovocito, permitiendo la penetración en su zona pelúcida (Colebrander 2003). Por tanto el estudio de la integridad acrosomal lo podemos enfocar desde dos perspectivas diferentes:

1. Teniendo en cuenta el porcentaje de espermatozoides que presentan algún daño en la vesícula acrosómica y que por tanto, verán drásticamente reducida su vida útil, quedando incapacitados para la fecundación, siendo éste un procedimiento frecuentemente utilizado tras la congelación-descongelación del semen con la finalidad de evaluar los daños sobre el acrosoma.

2. Evaluando la capacidad de reacción acrosómica (RA) ante estímulos externos. Esta aproximación parece mucho más informativa (Colenbrander *et al.*, 2003), describiendo correlaciones significativas ($r = 0,60$) entre el grado de inducibilidad de la RA y la fertilidad de las muestras (Rodríguez-Martínez, 2005). Como agentes inductores de la RA

in vitro se han utilizado ZP homólogas (Berger *et al.*, 1989), ZP solubilizada (Mattioli *et al.*, 1996), proteínas de la ZP (Harkema *et al.*, 1998), ionóforos de calcio (como el Hoechst A23187), etc (Rodríguez-Martínez, 2003b; 2005).

Disponemos de un amplio abanico de pruebas para detectar el daño a nivel acrosomal; en primer lugar son válidas las técnicas descritas con anterioridad para la realización de la valoración morfológica de las células espermáticas, como la observación al microscopio electrónico (Yanagimachi, 1984), la microscopía de contraste de fases (Pursel y Johnson, 1974; Woelders, 1990) y la microscopía de contraste diferencial de interferencia (Aalseth y Saacke, 1986; Peláez, 2003); no obstante, no se tratan de los métodos más indicados, más aún, si como en el caso de las dos últimas, trabajamos con especies en las que el acrosoma no alcanza grandes dimensiones.

Para aquellas especies en las que la microscopía se muestra insuficiente, las pruebas de elección son las técnicas tintoriales. Las más sencillas han sido desarrollados para ser utilizadas en condiciones de campo o en investigación elemental, por lo que emplean colorantes convencionales que destacan la estructura acrosómica, como: el verde rápido FCF y eosina B (Wells y Awa, 1970); giemsa (Watson, 1975); eosina y nigrosina (Bamba, 1988); amarillo naftol S y eritrosina B (Steinholt *et al.*, 1991); Spermac[®] (Paulenz *et al.*, 2000); Coomassie azul G-250 (Larson y Miller, 1999), etc. Se han descrito protocolos de tinción doble o triple encaminados al análisis conjunto de la vitalidad y la integridad acrosómica, proporcionando una información más detallada del estado de la célula espermática, pero siendo de más difícil aplicación por su complejidad; ejemplos son: la combinación de eosina-nigrosina y giemsa (Ramesha *et al.*, 2000); tripán azul, rojo neutro y giemsa (Kovacs y Foote, 1992); tripán azul, marrón Bismarck y rojo Bengala (Vázquez *et al.*, 1992).

Paralelamente a lo sucedido en el análisis de integridad de la membrana plasmática, las tinciones convencionales se han ido desechando como técnica de referencia en favor del uso de tinciones fluorescentes, más prácticas y precisas, especialmente si se utilizan en conjunción con la citometría de flujo.

Las sustancias encargadas de realizar el marcaje fluorescente (ver tabla 1) son principalmente lectinas vegetales combinadas con un fluorocromo. En un principio fue utilizada la aglutinina de *Pisum sativum* (PSA) en la evaluación de la integridad acrosomal (Graham, 2001), gracias a su capacidad de unirse a residuos de α -manosa y α -galactosa de la matriz acrosomal (Farlin *et al.*, 1992; Flesch *et al.*, 1998; Guillan *et al.*, 2005), de manera que la aparición de la tinción solo es posible cuando la membrana acrosómica no se encuentre íntegra (Topfer-Petersen *et al.*, 1984; Cross *et al.*, 1986; Graham, 2001). La aglutinina de *Arachis hypogaea* (PNA), es una lectina proveniente de la planta del cacahuete que se une específicamente con residuos de β -galactosa asociados a la membrana acrosomal externa de los espermatozoides (Mortimer *et al.*, 1987; Cheng *et al.*, 1998; Flesch *et al.*, 1998; Szasz *et*

al., 2000); sobre la PSA presenta la ventaja de tener menos lugares de unión no específicos en otras áreas del espermatozoide (Graham, 2001) y al igual que ésta sólo se detectará fluorescencia si se encuentra dañada la estructura acrosómica.

Aunque las dos lectinas anteriormente descritas son las utilizadas con más asiduidad, también se han empleado otras aglutininas conjugadas con FITC para el estudio de la integridad acrosomal como la aglutinina de *Concanavalia ensiformis* (ConA, específica de residuos de D-manosa y D-glucosa), la aglutinina de *Triticum vulgare* (WGA, específica para ácido siálico y residuos de N-acetilglucosamina) y la aglutinina de *Ulex europaeus* (UEA, específica para L-fucosa) (Gillan *et al.*, 2005).

Se usa con frecuencia el FITC (isotiocianato de fluoresceína) como fluorocromo conjugado, aunque también se han descrito combinaciones de PNA-TRITC (isocianato de tetrametil rodamina), PNA-RPE (ficoeritrina) (Silva y Gadella, 2006); independientemente del fluorocromo empleado, esta técnica se puede usar en conjunción con la citometría de flujo (Graham, 2001; Gillan *et al.*, 2005; Silva y Gadella, 2006).

Como en el caso de las tinciones convencionales, la asociación entre un marcador fluorescente de integridad de membrana y una lectina indicadora de integridad acrosomal es una práctica común, permitiéndonos evaluar de forma conjunta estos dos parámetros espermáticos (Peláez, 2003; Graham, 2001).

Dado el carácter ácido del interior del acrosoma, (pH=5), las tinciones desarrolladas específicamente para poner de manifiesto los lisosomas, como el Lysotracker Green TM, pueden ser empleadas con éxito en el estudio acrosomal (Thomas *et al.*, 1997; 1998).

Por último, también tenemos a nuestra disposición técnicas de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos mono o policlonales, conjugados con colorantes fluorescentes; siendo específicos de proteínas de la membrana acrosomal (como la CD46) o de la matriz acrosómica (Gonzalez Urdiales *et al.*, 2006).

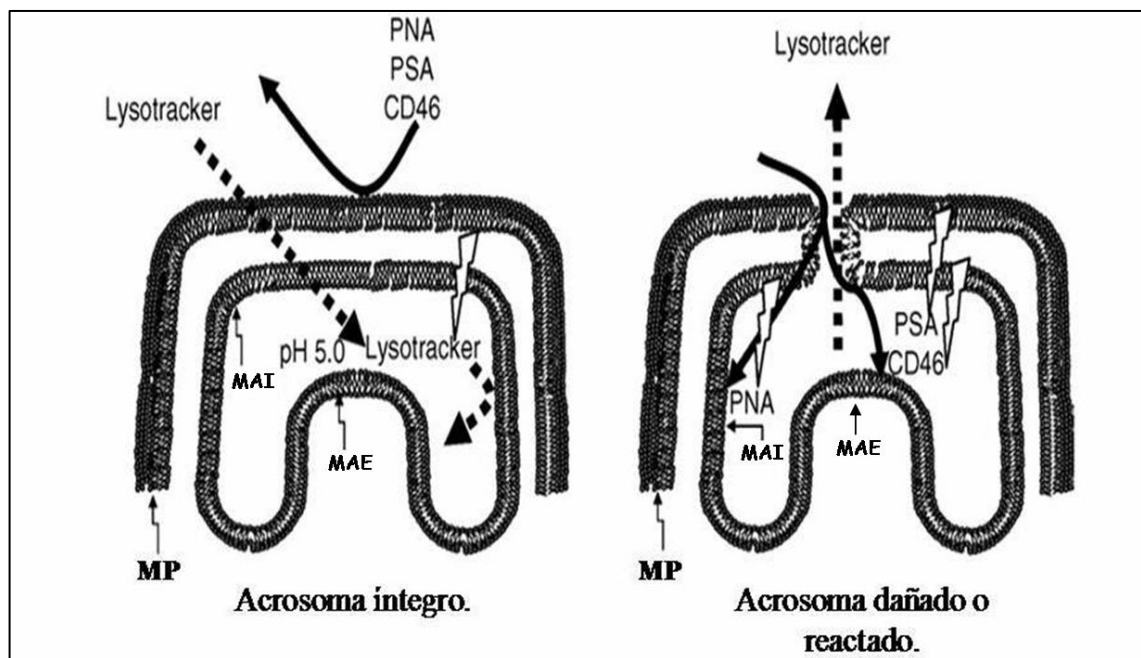


Figura 5. Mecanismo de acción de diferentes sustancias empleadas en la evaluación de la integridad acrosomal, como el PNA, el PSA, anticuerpos (CD46) y el Lysotracker; así como sus lugares de unión: Membrana Acrosomal Externa (MAE) y Membrana Acrosomal Interna (MAI) (Silva y Gadella, 2006).

2.4.2.7 Evaluación de la función mitocondrial

El estudio de la funcionalidad mitocondrial sirve como estimador de la capacidad mótil del espermatozoide (Colebrander *et al.*, 2003; Silva y Gadella, 2006), al ser este orgánulo el responsable de la síntesis del ATP que el espermatozoide necesita para su desplazamiento (Marín *et al.*, 2003).

Para la tinción de la vaina mitocondrial tenemos a nuestra disposición diversos fluorocromos, tratándose de sustancias catiónicas y lipofílicas por lo que difunden de forma pasiva a través de la membrana plasmática y se acumulan en la matriz mitocondrial, la cual presenta carga negativa (Pinart *et al.*, 2006).

En el estudio de este orgánulo se ha empleado la Rodamina (Evenson *et al.*, 1982; Graham *et al.*, 1990; Fraser *et al.*, 2002), sustancia que se acumula en el interior de la matriz mitocondrial produciendo una fluorescencia verde si la mitocondria desarrolla el proceso de respiración de forma activa, pero no nos indicará la intensidad del mismo (Graham, 2001; Gillan *et al.*, 2005). Este no es el caso del 5,5,6,6'-tetracloro- 1,1',3,3' ioduro tetraetilbezimidazolilcarbocianina (JC-1), sustancia que atraviesa de forma selectiva las membranas mitocondriales en su forma monomérica; si el potencial de membrana es bajo la

mantiene y emite fluorescencia verde, sin embargo si el potencial de membrana es alto se agrega y emite fluorescencia roja (Garner *et al.*, 1999; Gravance *et al.*, 2000).

También tenemos a nuestra disposición las tinciones comerciales específicas para mitocondrias MitoTracker[®] (ver Silva y Gadella, 2006); una de ellas, el MitoTracker[®] Green FM, es utilizado por Pinart *et al.* (2006) como parte de un protocolo de tinción que combina el estudio por citometría de flujo de la vitalidad espermática, la integridad acrosómica y la funcionalidad mitocondrial del espermatozoide de cerdo.

2.4.2.8 Evaluación del status de capacitación

Para poder llevar a cabo la fecundación el espermatozoide eyaculado debe sufrir una serie de transformaciones necesarias para alcanzar la capacidad de unirse a la ZP del ovocito de forma efectiva (Harkema *et al.*, 1998); este proceso se denomina capacitación y comprende una serie de fenómenos, como:

- La modificación de la arquitectura de la membrana espermática, mediante la promoción de desórdenes lipídicos (Williamson *et al.*, 1983; Cheng *et al.*, 1998; Gadella y Harrison 2000; 2002; Gadella *et al.*, 2001; Rathi *et al.*, 2001).
- La exposición de una serie de receptores en la membrana, que posteriormente interactuarán específicamente con otros existentes en el ovocito (Yanagimachi, 1994).
- Las modificaciones en las concentraciones intracelulares de HCO_3^- , Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Matás *et al.*, 2006).
- Aumento de la síntesis de AMP_C (Matás *et al.*, 2006).
- La adquisición de un patrón de movimiento hiperactivado caracterizado por amplios batidos flagelares y escasa progresividad (Yanagimachi, 1970; Mortimer, 1997).

Todos estos cambios desembocan en la producción de la RA, indispensable para la unión al ovocito, pero deletérea si no se produce en las proximidades del mismo, al acortar drásticamente la vida útil del espermatozoide (Watson, 1995).

Como hicimos referencia, durante el proceso de congelación-descongelación se van a visualizar en el espermatozoide una serie de cambios similares a los que se producen en las células capacitadas, reduciéndose drásticamente su longevidad; así se han encontrado una correlación significativa ($r = 0,48$) entre la proporción de espermatozoides no capacitados tras

el proceso de crioconservación y la fertilidad de ese material seminal (Thundathil *et al.*, 1999)

Podemos realizar dos aproximaciones distintas al análisis del estado de capacitación. La determinación del número de espermatozoides que han sufrido una capacitación prematura, nos identificará esas células espermáticas como no útiles, al ver disminuida su vida útil; o bien, el uso de agentes capacitantes nos indicará la proporción de células capaces de sufrir este proceso, indispensable para el éxito reproductivo (Colebrander *et al.*, 2003).

Las técnicas utilizadas en la determinación del estado de capacitación se basan en la identificación de las alteraciones asociadas al mismo; así la técnica más ampliamente aplicada se basa en el uso del antibiótico clortetraciclina (CTC), este se liga con el Ca^{2+} , y el complejo formado se une a zonas hidrófobas, como la membrana, produciéndose un aumento de la fluorescencia de la CTC (Gillan *et al.*, 2005). En función del estado del espermatozoide se distinguen tres patrones tintoriales; F: fluorescencia uniforme en toda la cabeza: espermatozoide no capacitado con acrosoma intacto; B: fluorescencia disminuida en la parte posterior de la cabeza: espermatozoide capacitado con el acrosoma íntegro; AR: fluorescencia disminuida en la zona apical de la cabeza: espermatozoide que ha sufrido la reacción acrosómica (Saling y Storey, 1979; Ward y Storey, 1984; Colebrander *et al.*, 2003; Gillan *et al.*, 2005; Silva y Gadella, 2006). La técnica de la CTC puede ser empleada conjuntamente con el análisis mediante citometría de flujo (Maxwell y Johnson, 1997a).

Sin embargo, la tinción de CTC solo nos indicará cambios tardíos en el proceso de capacitación (Rathi *et al.*, 2001; Rodríguez-Martínez, 2003b; 2006), habiéndose sido superada en los últimos años por tinciones que ponen de manifiesto mas prematuramente los cambios asociados con este proceso, como la Merocianina 540, sustancia marcadora de la fluidez de membrana (Harrison *et al.*, 1996; Colebrander *et al.*, 2003), que aumenta su fluorescencia cuando se incrementan los desordenes lipídicos (Gadella y Harrison, 2002), identificando antes que la CTC los procesos de capacitación y crioapacitación (Müller *et al.*, 1999; Harrison y Gadella, 2005).

También basados en la detección de la pérdida de simetría de la membrana, se han utilizado recientemente los análogos de fosfolípidos marcados (como el C6NBD-fosfolípido) para investigar los desordenes que se producen en el plasmalema (Gillan *et al.*, 2005).

Tanto el Annexin-V como el Ro-09-0198 se pueden utilizar para detectar alteraciones en las membranas específicas de procesos de capacitación. La utilización de sistemas CASA, nos permite identificar las características cinéticas de los espermatozoides hiperactivados, lo que se utiliza como criterio de capacitación (Cummins, 1995; Cremades *et al.*, 2005; García-Herreros *et al.*, 2005).

Otras técnicas disponibles resumizadas por Matás *et al.* (2006), son:

- Medición del contenido de Ca^{2+} intracelular con el fluorocromo Fura 2.
- Medición del incremento de Ca^{2+} intracelular mediante citometría de flujo con los fluorocromos Fluo-3 e Ioduro de propidio.
- Medición de la modificación de los grupos sulfhídrido de las proteínas presentes en la membrana plasmática mediante 5-IAF y Ioduro de propidio.
- Medición de la generación de ROS mediante citometría con el fluorocromo H2DCFDA.

2.3.2.9 Evaluación de la integridad del ADN

El mantenimiento de la integridad del ADN es uno de los condicionantes necesarios para que el proceso reproductivo tenga éxito; ya que, aunque un espermatozoide con aberraciones en el material genético sea perfectamente capaz de fecundar un ovocito, el embrión resultante sufrirá un proceso de apoptosis, cuando se encuentre en estado de 4 a 8 células (Bordignon y Smith, 1999; Graham, 2001; Fatehi *et al.*, 2006). Así, la determinación del estado del ADN se configura como un parámetro independiente en el estudio de la calidad seminal y un potencial instrumento en la predicción de la fertilidad (Evenson, 2002).

Las técnicas empleadas en su estudio se basan en la detección de roturas en la cadena de ADN del núcleo del espermatozoide mediante el uso de enzimas o tratamientos de lisis inducida por calor o por ácidos y la posterior tinción de los espermatozoides tratados (García *et al.*, 2006).

Para llevar a cabo esta determinación podemos recurrir a la utilización de un gel simple de electroforesis (COMET-assay), el ADN que se encuentre íntegro no migrará de su posición inicial; mientras que si presenta roturas, se desplazará trazando un rastro que se aprecia mediante microscopía de fluorescencia (Fraser y Strzezek, 2004; Silva y Gadella, 2006; Jiang *et al.*, 2007).

La técnica más comúnmente utilizada es la *sperm chromatin structure assay* (SCSA), descrita por Evenson *et al.* (1980); se basa en las propiedades metacromáticas del naranja de acridina, el cual, tras un proceso de desnaturalización en medio ácido del material genético, si se une a una cadena doble de ADN emite un fluorescencia verde; siendo naranja si la cadena a la que se ha unido es simple (Silva y Gadella, 2006; Graham, 2001). Esta técnica ha sido

utilizada profusamente, obteniéndose correlaciones significativas con la fertilidad tanto en toro ($r=0,94$ [Ballachey *et al.*, 1988]) como en verraco ($r \leq 0,93$ [Evenson *et al.*, 1994]).

Así mismo se ha empleado la técnica TUNEL (Silva y Gadella, 2006; García *et al.*, 2006), en la que utilizando nucleótidos marcados, que se unirán a las zonas que presentan cadena sencilla, identificándolas como dañadas; los resultados obtenidos se han correlacionado con la fertilidad (Benchaib *et al.*, 2003).

En la actualidad disponemos de otra opción para detectar la presencia de núcleos con ADN fragmentado, denominada *sperm chromatin dispersion* (SCD), basada en la producción de un halo periférico de dispersión del material genético (identificado mediante la tinción de Wrigh o fluorescente) en aquellos espermatozoides que lo contengan fragmentado tras un tratamiento de lisis; definiéndose un índice de fragmentación del ADN (García *et al.*, 2006). Esta técnica fue inicialmente desarrollado para semen humano (Fernández *et al.*, 2003) y ha sido empleada en la evaluación de semen de toro (García-Macías *et al.*, 2007) y verraco (Enciso *et al.*, 2006); siendo un método más rápido y sencillo que los anteriormente descritos, pudiendo ser utilizado en un laboratorio de análisis convencional (García *et al.*, 2006).

2.4.2.10 Evaluación de la capacidad fecundante

Las técnicas expuestas hasta el momento son válidas en el análisis de parámetros espermáticos individuales, aunque como quedó constatado, el proceso reproductivo es multifactorial, no pudiendo uno solo de estos test asignarnos una predicción eficaz de la fertilidad por si solo. Por tanto, cuanto mayor sea el número de parámetros testados, mayor consistencia tienen los resultados obtenidos (Amann y Hammstedt, 1993). Así, se han desarrollado una serie de pruebas que pretenden reproducir *in vitro* las condiciones que el espermatozoide va a sufrir *in vivo*, evaluando si es capaz de llevar a cabo procesos celulares específicos y complicados, como la unión a explantos tubáricos, la capacitación, la unión a la zona pelúcida, la RA, la fecundación *in vitro* y la inducción del desarrollo embrionario. Las técnicas empleadas en la determinación tanto del estado del acrosoma como del estado de capacitación han sido descritas previamente. Las pruebas que describimos a continuación son aquellas que imitan, en parte, las condiciones que se producen en el aparato reproductor de la hembra:

-Test de unión espermática a explantos tubáricos. Estudios *in vitro* han demostrado que la unión de los espermatozoides con las células epiteliales oviductales prolonga la vida de los mismos (Lefebvre y Suárez, 1996), presumiblemente por que los mantiene no capacitados (Fazeli *et al.*, 1999). Así se especula, que las células espermáticas unidas al epitelio oviductal

son la única reserva de espermatozoides potencialmente fértiles. Basándose en lo anterior, parece acertado suponer que la realización de un cocultivo de células espermáticas con explantos de oviducto y cuantificando la unión entre ambas en condiciones controladas, se podría predecir la fertilidad de las mismas (Rodríguez-Martínez, 2005). No obstante, las correlaciones descritas con la fertilidad son solo marginales (Ellington *et al.*, 2000; Waberski *et al.*, 2006), lo cual podría ser debido al desconocimiento que aún tenemos de como el reservorio esta modulado, y pudiendo haber caído en una excesiva simplificación de los hechos que realmente ocurren *in vivo* (Rodríguez-Martínez, 2005).

-Test de unión del espermatozoide a la zona pelúcida. La unión del espermatozoide a la zona pelúcida es una etapa temprana y crítica del proceso de la fecundación del ovocito, necesitando para que se desarrolle que el espermatozoide haya sufrido previamente el proceso de capacitación y la RA (Rodríguez-Martínez, 2006). Este análisis lo podemos realizar tanto con ovocitos íntegros, aunque esta alternativa requerirá de un número elevado de los mismos, para evitar las fuentes de variación atribuibles a los distintos estados de madurez en que se encuentren (Zhang *et al.*, 1995); o bien mediante el uso del test de hemizona, en el que se usa sólo la ZP de ovocitos desnudos (Franken *et al.*, 1993; Fazeli *et al.*, 1995; 1997), lo que también nos permite biseccionar dicha hemizona y comparar el número de espermatozoides unidos de la muestra a analizar y aquellos de una muestra de semen de fertilidad conocida que usemos como control (Cummins, 1995). En el desarrollo de este test se pueden emplear ZP de ovocitos de la misma especie del material seminal a analizar (test homólogos), o bien de otras especies distintas (test heterólogos) (Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000; Colenbrander *et al.*, 2003). Los resultados de esta prueba los podemos interpretar desde dos puntos de vista, por una parte presentando el número total de espermatozoides unidos a la zona pelúcida (Zhang *et al.*, 1998), mientras que la segunda alternativa consiste en calcular un índice que relacione los espermatozoides unidos a la zona pelúcida de la muestra a analizar, y los de una muestra de semen control de fertilidad conocida (Fazeli *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998).

Tanto para el verraco (Lynham y Harrison, 1998), como para el toro (Zhang *et al.*, 1998) y para el caballo (Colebrander *et al.*, 2003); se han descrito buenas correlaciones entre los resultados del test de unión a la zona pelúcida y la posterior fertilidad en campo.

-Recuento de espermatozoides accesorios. Se trata de aquellos espermatozoides, que tras la fecundación del ovocito, han quedado atrapados en la zona pelúcida debido al bloqueo que instaura el ovocito para evitar la poliespermia. Éstas células espermáticas han demostrado tener capacidad para penetrar el ovocito, debiendo ser consideradas potencialmente fértiles tanto *in vivo* como *in vitro* (Rodríguez-Martínez, 2006). Tanto para el verraco (Weitze *et al.*, 1990), como para el toro (Saacke *et al.*, 2000) el recuento de

espermatozoides accesorios se les ha atribuido cierta capacidad de predicción de los resultados de fertilidad.

-Penetración *in vitro*. Siguiendo el incremento en la complejidad de las condiciones a las que sometemos a los espermatozoides, el siguiente paso va a consistir en la evaluación de la capacidad de penetración de las células espermáticas en el ovocito. Así, los test de penetración *in vitro* se considerarán positivos cuando detectamos al espermatozoide o al pronúcleo masculino en el interior del ooplasma (Rodríguez-Martínez, 2006). Los test de penetración ovocitaria se practican utilizando ovocitos homólogos o heterólogos, pudiendo estar tanto desnudos (sin zona pelúcida), o intactos inmaduros, siendo esta última alternativa aparentemente mejor por ser considerada no fisiológica la penetración de ovocitos desnudos (Peláez, 2003). Tradicionalmente, los ovocitos heterólogos se han obtenido del hamster desde que Yanagimachi *et al.* (1976) los encontraran útiles para evaluar la capacidad fecundante del espermatozoide del hombre, si bien, cabe la posibilidad de recurrir a ovocitos de animales filogenéticamente relacionados con el individuo del que procede el esperma (Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000).

Esta prueba, como consta en la bibliografía (Wheeler y Seidel, 1987; Martínez *et al.*, 1993; Tatemoto *et al.*, 1994; Henault y Killian, 1995; Matás *et al.*, 1996; Hay *et al.*, 1997; Gadea *et al.*, 1998; Brahmkshtri *et al.*, 1999; etc), ha sido ampliamente utilizado en multitud de especies, tanto en la evaluación de la capacidad fecundante de un individuo, como en el estudio de las repercusiones que ha tenido un tratamiento tecnológico particular sobre la capacidad de penetración ovocitaria (Peláez, 2003), habiéndose publicado correlaciones significativas entre los resultados de estos test y la fertilidad *in vivo* en el cerdo (Ivanova y Mallova, 1993; Gadea, 2005) y en el toro (Henault y Killian, 1995).

-Pruebas de fecundación *in vitro* (FIV). Es el método que más verazmente reproduce todos los fenómenos que se van a desarrollar en el aparato reproductor de la hembra y cuyo resultado final es la formación de un nuevo individuo, no restringiéndose solamente a la comprobación de la unión entre espermatozoide y ovocito, si no que en él se evalúan los primeros estadios de desarrollo embrionario hasta la formación de la mórula y/o los blastocistos (Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000); habiéndose descrito, que ese desarrollo se ve en parte condicionado por la muestra seminal utilizada (Shamsuddin y Larsson, 1993). Este procedimiento ha sido empleado ampliamente en un gran número de especies, y como es obvio, las pruebas son realizadas con ovocitos homólogos intactos, madurados *in vivo* o *in vitro* (Rodríguez-Martínez, 1999). En los estudios realizados se han encontrado correlaciones significativas entre los resultados de fertilidad de la FIV y los de fertilidad *in vivo* en estudios retrospectivos (revisado por Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000 y Selles *et al.*, 2003) pero también en estudios prospectivos (Zhang *et al.*, 1999)

No obstante, los resultados de esta técnica dependen en gran medida de las condiciones experimentales, siendo complicado establecer comparaciones entre resultados obtenidos por dos laboratorios diferentes (Rodríguez-Martínez, 2006); así mismo, es cuestionado también si el ratio espermatozoides-ovocito reproduce las condiciones *in vivo*, lo que conllevaría, que los resultados perdiesen su significado biológico (Hunter y Rodríguez-Martínez, 2002).

2.4.2.11 Otras pruebas para la valoración *in vitro* de la calidad seminal

Aunque nuestro objetivo no es detallar pormenorizadamente todas los test utilizados en la evaluación *in vitro* de un eyaculado, podemos describir junto a las anteriores, por su importancia fisiológica y/o correlación con la fertilidad en campo las siguientes técnicas:

-Técnicas de filtración y separación de espermatozoides. Dentro de las primeras se utilizan matrices compuestas por Sephadex y lana de vidrio (ver Bussalleu *et al.*, 2006); para el semen de garañón, se han encontrado correlaciones altamente significativas ($r = 0,64-0,93$) entre el porcentaje de espermatozoides que pasan a través del filtro y la fertilidad (Samper *et al.*, 1991).

Dentro del segundo grupo de técnicas, la más representativa es el *Swim-up*. En este caso se han descrito correlaciones entre el porcentaje de espermatozoides recuperados tras el tratamiento y con movimiento lineal y la fertilidad, $r = 0,43-0,63$ (Zhang *et al.*, 1998).

-Grado de exposición de los receptores espermáticos para la progesterona. La presencia de estos receptores es necesaria para que el espermatozoide sufra la capacitación, e intervienen en la posterior unión con la ZP (Colebrander *et al.*, 2003), así, Rathi *et al.*, 2000, pusieron de manifiesto, en semen equino, la alta correlación existente ($r = 0,73-0,84$) entre el porcentaje de espermatozoides que presentan receptores para la progesterona en su plasmalema después de la incubación en medios capacitantes y la fertilidad.

-Análisis de los componentes del plasma seminal. Gracias a la utilización de diferentes marcadores bioquímicos, podemos evaluar en el plasma seminal la funcionalidad del epidídimo y de las diferentes glándulas sexuales accesorias. Siendo también de vital importancia la acción del plasma seminal sobre la fisiología espermática, incrementando la motilidad, la estabilidad de membrana y la capacidad para resistir la decondensación prematura de la cromatina (Rodríguez-Martínez, 2005), características todas ellas ligadas con la capacidad fecundante del espermatozoide.

Tabla 1. Sustancias fluorescentes empleadas en el análisis seminal.

SUSTANCIA	CARACTERÍSTICAS	λ DE ABSORCION/ EMISION
Hoechst 33258	Tinción de membrana impermeable, atraviesa el plasmalema cuando este 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 este 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 esterasas 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 esterasas se acumula en el citoplasma.	488/575
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 conjuga: FITC: 488/515 TRITC: 568/590 RPE:488/620
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
WGA	Aglutinina marcadora de daño acrosómico proveniente de la planta del trigo, se une a residuos de N-acetilglucosaminil y ácido siálico.	Conjugada con: FITC: 488/515

SUSTANCIA	CARACTERÍSTICAS	λ DE ABSORCION/ EMISION
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	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, 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 ₁₁ BODIPY	Marcador de daño por acción de ROS. Análogo de los ácidos grasos insaturados, cambia sus propiedades fluorescente 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 haya desnaturalizado.	488/525 -630

2.5. ANÁLISIS SEMINAL MEDIANTE TECNOLOGÍA DE IMÁGENES DIGITALES

2.5.1 Introducción histórica

A pesar de los grandes avances tecnológicos que hemos recogido en el epígrafe anterior, la evaluación del material seminal en los centros de I.A. o las clínicas andrológicas humanas se sigue realizando, en su mayoría, de una forma subjetiva, empleando “simples” microscopios y siguiendo una metodología no muy alejada conceptualmente de la usada en la primera observación de la célula espermática llevada a cabo por Anton Van Leeuwenhoek en el lejano 1687 (Amann y Katz, 2004).

La valoración manual supone asumir fuertes variaciones en los resultados cuando una misma muestra es valorada varias veces por el mismo técnico o por distintos técnicos o laboratorios, tanto en el análisis de la movilidad (Amann, 1989; Dunphy *et al.*, 1989; Neuwinger *et al.*, 1990c; Woelders, 1990; Davis y Katz, 1993; Verstegen *et al.*, 2002; Cooper *et al.*, 2002; Soler *et al.*, 2006), como en el de la morfología (Amann, 1981; Barker *et al.*, 1987; Davis *et al.*, 1995; Ombelet *et al.*, 1997; Cooper *et al.*, 1999).

Los resultados aportados por estas técnicas subjetivas impiden tanto su comparación, como la repetibilidad del análisis. Una desventaja añadida, es que solo permiten realizar una caracterización de la población espermática en su conjunto mediante valores medios de las características evaluadas; alejándose este planteamiento de la naturaleza real de la composición del material espermático, al encontrarse este estructurado en subpoblaciones celulares con características diferenciadas entre sí (Abaigar *et al.*, 1999; Quintero-Moreno *et al.*, 2003a; Soler *et al.*, 2006).

Con esta descripción previa, es fácil observar, como las técnicas tradicionales subjetivas incumplen las 3 características (objetividad, repetibilidad y exactitud) que debería de poseer la técnica de análisis seminal ideal según Rodríguez-Martínez (2003b).

Esta situación ha planteado que multitud de investigadores hayan propugnado la necesidad de una estandarización en los métodos de medida que nos permitan solventar los graves problemas que acarrea la evaluación subjetiva del material seminal (Chang *et al.*, 1983; Davis y Katz, 1993; Ombelet *et al.*, 1995; Cooper *et al.*, 1999; 2002; Verstegen *et al.*, 2002).

2.5.1.1 Antecedentes y nacimiento de los sistemas de análisis seminal mediante imágenes digitales

Los estudios que abogaban por la introducción de nuevas técnicas que subsanasen la subjetividad de la evaluación manual no son relativamente recientes; esta corriente de pensamiento nació en la década de los años 40 del pasado siglo, cuando diferentes grupos investigadores de universidades norteamericanas reconocieron la necesidad de obtener datos objetivos del porcentaje de espermatozoides móviles y su velocidad, asentando la base teórica, que 40 años después, daría lugar al nacimiento de los sistemas comúnmente conocidos como CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*). Estos científicos perseguían conseguir resultados mediante un método estandarizado, útiles tanto en la docencia, como a la hora de comparar trabajos científicos; no siendo en un primer momento prioritaria su aplicación en la clínica andrológica (Amann y Katz, 2004).

Una vez reconocidas las carencias del análisis tradicional, el desarrollo de nuevos sistemas para su sustitución se vio beneficiado por el ingente desarrollo en el campo de la electrónica que se produjo en las décadas siguientes, lo que propició la aparición de diversas soluciones metodológicas para la determinación de la movilidad:

-Turbidimetría: Este procedimiento mide el ratio de migración de los espermatozoides disueltos en un medio artificial, en función de los cambios de densidad óptica producidos por el desplazamiento de las células espermáticas en el interior del recipiente que las contiene [van Duijn y Rikmenspoel, 1960 (citado por Amann y Katz (2004); Sokoloski *et al.*, 1977; Atherton *et al.*, 1979; Levin *et al.*, 1980)].

Este método fue la base para el desarrollo del instrumento Sperm Quality Analyser[®] (Unitec Medical Systems Inc, CA, EEUU), ampliamente utilizado tanto en la especie humana como en las de interés zootécnico (Hoflack *et al.*, 2005).

-Velocimetría Laser-Doppler: Se basa en el principio de que la incisión de una haz láser monocromático sobre una dispersión espermática, ésta, lo dispersará, generando, de acuerdo al efecto Doppler, un espectro de frecuencias que dependen de los parámetros cinéticos de las células espermáticas (Dubois *et al.*, 1974; Jouannet *et al.*, 1977). Aunque, tanto esta técnica, como la turbidimetría no aportan información de las características del movimiento de los espermatozoides individuales y la medición del porcentaje de motilidad se realiza de forma indirecta (Mortimer, 1997; Amann y Katz, 2004; Versteegen *et al.*, 2002).

-Fotomicrografía de tiempo-exposición: Ésta técnica fue la primera que permitió reconstruir la trayectoria espermática de forma individual; introducida por Lord Rothschild y Swam en 1949 (citado por Amann y Katz, 2004), se basa en la realización de una sola fotografía, con un tiempo de exposición prolongado (generalmente 1 segundo), en un microscopio de campo oscuro. Con este procedimiento se conseguía que el recorrido realizado por cada espermatozoide quedase trazado en blanco sobre el fondo oscuro del negativo. Posteriormente, este procedimiento fue utilizado en el análisis de la motilidad en eyaculados humanos (Janick y McLeod, 1970; Overstreet *et al.*, 1979) o de diversas especies animales, como el caso del toro (Elliot *et al.*, 1973). A pesar de su antigüedad, esta técnica fue constantemente mejorada hasta los años 80 (Mortimer, 1997), en que se vio desplazada por los sistemas CASA.

-Fotomicrografía de exposición múltiple: Es una técnica con características similares a la anterior, en este caso se utiliza un microscopio con luz estroboscópica, realizándose 6 microfotografías en 1 segundo, con lo que dispondremos de 6 puntos del recorrido realizado por el espermatozoide que nos permitirán reconstruir la trayectoria del mismo, bien de forma manual o semiautomática (Makler *et al.*, 1980; 1984).

-Microcinematografía. Como su nombre indica, en este procedimiento se graba el movimiento espermático en una película cinematográfica, para a continuación, trazar el recorrido de los espermatozoides en función de la posición de una determinada parte de los mismo en cada uno de los fotogramas (Mortimer, 1997). Esta técnica permitió describir con detalle el movimiento espermático, definiendo a partir de las observaciones realizadas los parámetros que actualmente calculan los sistemas computerizados de análisis de la cinética espermática (David *et al.*, 1981; Serres *et al.*, 1984; Freund y Oliveira, 1987).

-Videocinematografía: En un intento de solventar las carencias de la microcinematografía (alto coste y elevado tiempo de procesado), se recurrió a la realización de las grabaciones en cinta de video, lo que permitió el desarrollo de sistemas semiautomáticos de análisis (Mortimer, 1997).

En cuanto al análisis morfológico, nada se pudo hacer hasta la aparición de las técnicas de análisis de imagen digital y clasificación automática de formas. Anteriormente a la aparición de éstas, el cálculo de las medidas morfométricas se realizaba con microscopios calibrados de proyección (Cummins y Woodall, 1985) y más recientemente realizando medidas directamente sobre las fotografías de microscopios electrónicos (Jagoe *et al.*, 1986). Ambos métodos son a todas luces incompatibles con el trabajo práctico en una clínica andrológica o un centro de inseminación artificial, al ser extremadamente lentos y tediosos.

Como otros muchos avances tecnológicos en los últimos 40 años del siglo pasado, el nacimiento de los sistemas CASA fue fruto del importante esfuerzo investigador que se

realizó en la denominada “carrera espacial”; así la NASA (*National Aeronautics and Space Administration*) requería un sistema capaz de seguir y mostrar los parámetros cinéticos de los cohetes tras su lanzamiento, el desarrollo de este sistema se llevo a cabo en el JPL (*Jet Propulsion Laboratory*) en base a técnicas de análisis digital de imágenes. Cuando el mismo sistema fue utilizado a nivel microscópico por Jecht y Russo en 1973 (citados por Amann y Katz, 2004) con espermatozoides humanos, se hizo patente que el equipo tenía capacidad de segmentar y seguir los espermatozoides, calculando los parámetros que se habían definido previamente en el seguimiento de los cohetes, aunque ningún uso práctico se le dió a este descubrimiento.

En 1975 Katz y Dott desarrollan lo que podría considerarse el primer y arcaico sistema CASA, en el que se realiza una medición global de la movilidad, teniendo que esperar hasta 1979 a que Amann y Hammerstedt desarrollen el primer equipo capaz de identificar las trayectorias individuales, calcular el porcentaje de espermatozoides móviles y su velocidad. Este proyecto fue fruto de la colaboración del grupo de los investigadores señalados con los centros de inseminación de ganado vacuno del estado norteamericano de Pennsylvania, quienes buscaban un protocolo estándar para el análisis seminal en sus instalaciones; convirtiéndose, también, en la primera aplicación en la andrología veterinaria.

Sin embargo, no es hasta 1985, gracias al gran desarrollo de los microprocesadores y las tarjetas digitalizadoras, cuando aparece el primer sistema para el análisis cinético espermático con una arquitectura similar a los actuales (Katz *et al.*).

El primer sistema computerizado de análisis morfométrico se remonta a 1982 (Schmassmann *et al.*) como en el caso de los primeros sistemas para el análisis de la motilidad, su mecanismo de funcionamiento difería bastante del de los actuales equipos, al utilizar tabletas digitalizadoras para transferir los datos morfométricos al programa encargado de su análisis.

2.5.1.2 Desarrollo de los sistemas CASA

Con la aparición de esta nueva tecnología, el sueño de conseguir datos libres de posibles fuentes de variación de forma práctica parecía cumplido, lo que propició la aparición de los primeros sistemas comerciales. El pionero fue el Expert Vision[®] derivado del trabajo de Katz *et al.* (1985) y comercializado por Motion Analyzers Corporation, fue el originario de la familia de modelos conocidos como CellTrack[®]. Este equipo fue seguido por el CellSoft[®] (CRYO resources Ltd.), a diferencia de su antecesor fue diseñado desde un principio para el análisis cinético espermático. 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[®] de Hamilton-Thorne Research, 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 iluminación próxima al infrarrojo y óptica de campo oscuro (Amann y Katz, 2004). Fue el primer equipo comercializado bajo la denominación que luego englobaría a todos los sistemas computerizados de análisis seminal: CASA.

La comercialización y uso de sistemas diseñados para el análisis morfométrico se retrasó hasta principios de los años 90 (Soler *et al.*, 2006), influenciada, sin duda, por el menor interés a nivel práctico que suscitaba dicha aplicación. Los primeros programas fueron desarrollados por las mismas compañías que habían lanzado los sistemas CASA; así Motion Analyzers Corporation diseñó el CellForm-Human[®] y CRYO Resources Ltd. el CellSoft Morphologyzer[®]. En un intento de diferenciarles de los equipos que analizaban la movilidad se les dio el nombre genérico de ASMA (*Automated Sperm Morphometric Analysis*) aunque ambos tienen una base tecnológica común.

Con la comercialización de los primeros equipos CASA parecía que los objetivos inicialmente planteados 40 años atrás habían sido alcanzados, siendo la obtención de resultados libres de variación posible, y quizás la obtención de un método con una excelente correlación con la fertilidad; estas expectativas levantaron tal entusiasmo en la comunidad andrológica mundial que el contrapunto era puesto por los técnicos de laboratorio, que veían peligrar sus trabajos al creerse prescindibles (Mortimer, 2000). Pero los hechos demostraron todo lo contrario, pronto se observó que los resultados de la nueva técnica están fuertemente condicionados por diversas fuentes de variación (Vantman *et al.*, 1988), propiciando que las medidas fueran inexactas (Mortimer y Mortimer, 1988). De forma simultánea, se observó que la comparación de resultados entre sistemas distintos resultaba, cuando menos, problemática (Gill *et al.*, 1988; Amann, 1988). Seguía sin ser posible, por tanto, la realización de estudios comparativos entre resultados obtenidos por distintos técnicos y/o laboratorios, al estar estos influenciados por las condiciones en que se realizaban los análisis; esto supuso una fuerte decepción que repercutió en el retraso del desarrollo de la técnica (Mortimer, 2000), pero no su desaparición al valorarse como más relevantes los aspectos positivos que aportaba, como la eliminación de la subjetividad del observador, que los negativos que la lastraban; así las fuentes de error remanentes, eran en su mayoría de tipo técnico, solucionables con una correcta validación y estandarización de los sistemas y las condiciones de medida, y un adecuado entrenamiento de los técnicos encargados de su manejo.

Tras sendas reuniones en el seno de la *American Society of Andrology* en Houston, Texas y la federación francesa CECOS (*Centre d'Etude et de Conservation du Sperme Humain*) en Montpellier; el primer aspecto sobre el que se alcanzó el consenso, fue la terminología de los parámetros cinéticos medidos por los sistemas CASA (Mortimer, 1990).

Estos derivaban de los estudios de cartografía manual de las décadas pasadas, recibiendo en muchas ocasiones, un mismo parámetro, distinto nombre en función del grupo investigador que realizase el trabajo.

Durante la década de los años 90 se realizó un extenso trabajo de identificación de las fuentes de variación que afectaban a los resultados de los sistemas automáticos de análisis por imagen digital, para una vez definidas éstas describir las condiciones óptimas que minimicen dichas fuentes de error en la valoración tanto de los parámetros cinéticos (Neuwinger *et al.*, 1990c; Anzar *et al.*, 1991; Weltzels *et al.*, 1993; Holt *et al.*, 1994b; Kraemer *et al.*, 1998; etc.), como de los parámetros morfométricos (Davis *et al.*, 1992; Ball y Mohamed, 1995; Gravance *et al.*, 1995; 1997; Sancho *et al.*, 1998). Muchas de las conclusiones de los trabajos realizados durante esta época fueron utilizadas para la confección, en tres reuniones internacionales, de las recomendaciones de uso general para los sistemas CASA (Mortimer *et al.*, 1995; Fraser *et al.*, 1997; ESHRE *Andrology Special Interest Group*, 1998).

El esfuerzo realizado en la validación de estos equipos, repercutió en un importante incremento de su utilización en los trabajos de investigación, al convertirse realmente, en sistemas capaces de ofrecernos datos comparables, y en su mayoría libre de errores. Este incremento se ve atestiguado en el sumario realizado por Verstegen *et al.* (2002), en el que recogen las publicaciones que hacían uso (tanto para el análisis cinético como morfométrico) de los sistemas CASA entre 1986-2000 indexadas en la base de datos MedLine[®]. Otro aspecto destacable de este sumario era el incremento del porcentaje de trabajos que se realizaban con dichas técnicas en las especies de animales domésticos, lo que pone de manifiesto la creciente implantación de los equipos CASA en la investigación andrológica veterinaria, a pesar del alto coste de los equipos.

2.5.1.3 Situación actual

Podemos considerar, que tras los trabajos realizados en pos de la validación y el control de calidad en los sistemas computerizados de valoración seminal, que un equipo bien calibrado y configurado nos aportará una información precisa y correcta (Amann y Katz, 2004); convirtiendo al análisis por imágenes digitales en una técnica madura, ampliamente utilizada en la investigación, la clínica y los centros de inseminación artificial, cuando se requiere de un método que subsane la subjetividad de la valoración tradicional y nos aporte datos comparables, libres de fuentes de error; aunque en el caso concreto del análisis morfométrico con sistemas computerizados ha quedado restringido al ámbito científico, siendo notoriamente menor el número de trabajos aparecidos en esta área en comparación con los realizados en el análisis de movilidad. La causa de esta desigualdad parece ser que aún se

trata de un método tedioso, siendo necesario una automatización que reduzca el tiempo empleado en cada análisis.

Su utilización es generalizada en los trabajos en los que se estudia la movilidad espermática, llegando al caso más notorio de su aplicación, que han sido los estudios toxicológicos y farmacológicos sobre la cinética espermática, estudios, que desde 1992, se realizan por consenso con sistemas CASA (Schraeder *et al.*, 1992). Para Amann y Katz (2004), ha sido en las clínicas andrológicas donde estos equipos han tenido un mayor éxito, cuantificando el número de equipos existentes a nivel mundial en 1200 y haciendo notar que se trata de una técnica en franca expansión. En el caso concreto de EEUU, su uso se ve beneficiado por una normativa federal que impone la obligatoriedad de disponer en cada centro andrológico de un sistema de referencia objetivo para el análisis de la movilidad, no existiendo, prácticamente, ninguna alternativa a los sistema CASA. Por tanto, se han constituido más como un elemento de estandarización que una herramienta útil en la predicción de la fertilidad, más aun al perder peso la movilidad en el análisis andrológico al aparecer técnicas como la ICSI (*Intracytoplasmatic sperm injection*) o la FIV. Los mismos autores ponen de manifiesto la reciente introducción de los equipos de análisis computerizado por imagen digital en los centros de inseminación artificial de bovino, equino y porcino.

Podemos considerar que la situación en el resto de los países desarrollados no dista mucho de lo expuesto para el caso concreto de EEUU, con la salvedad de que no hay ningún tipo de norma que obligue a su uso; aunque como demuestra un reciente estudio de mercado (2006) realizado por la empresa Biophos GmbH (empresa diseñadora del sistema Qualisperm[®]) parece ser que esta regulación no es necesaria para que la tecnología CASA tenga una amplia difusión, estimando que el número de nuevos equipos necesarios anualmente entre los años 2006 a 2010, para satisfacer las necesidades del mercado es de entre 200 a 400 máquinas para las clínicas humanas, motivada tal necesidad por el incremento del número de personas con acceso a atención andrológica. En el sector veterinario cifran entre 80-120 los equipos necesarios para los centros de inseminación artificial bovinos y otros tantos para los centros de IA porcinos.

Al calor de este renovado interés, han surgido en los últimos 15 años nuevos equipos, entre los más importantes se encuentran: el Hobson Sperm Tracker[®] (Hobson Tracking Systems), el SM-CMA[®] System (Stroemberg-Mika Cell Motion Analysis[®], revolucionario al ser el primer equipo capaz de identificar al espermatozoide por la presencia de la cola) de Ströemberg-Mika, el Integrated Semen Analysis System[®] (PROISER R+D), el Qualisperm[®] (Biophos GmbH), el SpermVision[®] (Minitüb GmbH), el CEROS[®] de Hamilton-Thorne y los derivados del sistema IVOS[®] de este fabricante diseñados específicamente para el análisis de semen de caballo, de verraco y para el análisis toxicológico. La investigación sobre los sistemas existentes ha llevado al desarrollo de nuevas aplicaciones, así en el equipo IVOS[®] de

Hamilton-Thorne se ha desarrollado un software en el que la identificación de los espermatozoides se lleva a cabo mediante una tinción fluorescente, lo que permite distinguirlos de los residuos que podrían confundirse con células espermáticas (Zinaman *et al.*, 1996); también se han introducido en el análisis por imagen digital lectinas marcadas con tinciones no fluorescentes para analizar el daño acrosómico (Chan *et al.*, 2002). Por último, se han desarrollado aplicaciones encaminadas al análisis de las imágenes de fragmentación del ADN tras el tratamiento con el protocolo Sperm Chromatin Dispersion; así como módulos específicos para el análisis de tinciones fluorescentes en el sistema ISAS[®] (Soler *et al.*, 2006).

Además de la aparición de estas nuevas aplicaciones, se debe hacer notar, el esfuerzo en la búsqueda de las condiciones apropiadas para obtener la máxima calidad en el proceso de medida (Krause y Viethen, 1999; Coetzee *et al.*, 1999; Boone *et al.*, 2000); lamentable estos esfuerzos han quedado restringidos a la andrología humana, no habiéndose llegado a ningún tipo de acuerdo global para el análisis mediante sistemas CASA en cada una de las especies de animales domésticos, por lo que solo nos queda extrapolar las conclusiones de los trabajos en la especie humana, con la problemática que ello puede suponer (Verstegen *et al.*, 2002).

Los sistemas CASA nos han permitido describir de una manera más precisa los patrones de movilidad y la morfometría espermática, con lo que se han confirmado viejas teorías, como la distribución poblacional de los espermatozoides dentro de un eyaculado (Abaigar *et al.*, 1999; Thurston *et al.*, 2001), situación imposible de confirmar ante la imposibilidad de medir las características individuales de cada célula espermática. Estas nuevas teorías ya han tenido su repercusión al comprobarse que su distribución esta correlacionada con procesos tan importantes como la crioconservación (Martínez-Pastor *et al.*, 2005; Cremades *et al.*, 2005) o con la fertilidad (Quintero-Moreno *et al.*, 2003a).

2.5.2 El sistema CASA

2.5.2.1 Componentes y funcionamiento

Todos los sistemas CASA (tanto los diseñados para el análisis morfométrico, como los encargados de la evaluación cinética de los espermatozoides) imitan en cierto modo el funcionamiento de nuestro sentido visual. En el hombre disponemos de un órgano encargado de la captura de imágenes, el ojo, y otro distinto para el análisis de los mismos, el cerebro; en un sistema CASA la cámara de video (y la tarjeta digitalizadora, en caso de que sea necesaria) realizarían una función similar al globo ocular y el software instalado en una computadora imitaría las funciones del encéfalo, extrayendo la información de la imagen recibida.

En este esquema general habría que añadir los elementos tradicionalmente utilizados en el análisis manual de las células espermáticas; estos serían un microscopio o equipo similar con un sistema de contraste de fases y pletina atemperada para la valoración cinética; mientras que para el análisis morfométrico solo es necesario un microscopio de campo claro.

Desde un punto de vista técnico, es la valoración cinética, la que presenta una mayor dificultad; en ella la cámara de video captura una serie consecutiva de imágenes (o *frames*) del movimiento espermático a través, generalmente, de un tercer ojo del microscopio.

Tradicionalmente se han utilizado cámaras de captura discontinua. La frecuencia de *frames* capturados, variaba en función de que el fabricante siguiese uno de los 2 estándares aplicados a tal parámetro, lo cual dependía del país en el que se encontrase; así se podía utilizar el PAL (*Phase Alternating Line*) el cual proporciona 25 frames/segundo; o bien el NTSC (*National Television Standards Comitee*) que proporciona 30 frames/segundo. El apelativo de “discontinua” hace referencia a que la totalidad del *frame* no es capturado por estas cámaras en el mismo instante, produciéndose por separado la grabación de las líneas pares de la imagen de las impares, para posteriormente ensamblarlas en una imagen única (Mortimer, 2000).

En la actualidad podemos seleccionar la frecuencia de captura (en un rango dependiente del equipo con el que trabajemos) y disponemos en el mercado de cámaras digitales de captura continua, capaces de realizar la grabación de cada frame en un solo tiempo y llevar a cabo la digitalización por si mismas, sin necesidad de tarjeta digitalizadora (Tejerina *et al.*, 2006b).

Tanto las cámaras de captura continua, como las de captura discontinua, poseen un CCD (*Charge Coupled Device*), que consiste en una matriz de elementos semiconductores sensibles a luz. En el CCD se realiza un doble proceso de digitalización.

La imagen óptica incidente es, en primer lugar, muestreada espacialmente obteniéndose una imagen compuesta por tantos píxeles como elementos fotosensibles tenga esta matriz. Al número de elementos en cada dimensión, por unidad de distancia, se le llama resolución de la imagen. Mediante una circuitería electrónica que se encuentra en el interior de la cámara se produce posteriormente la digitalización de la intensidad de la luz incidente sobre cada elemento fotosensible. Cuando un fotón incide en uno de estos elementos fotosensibles es absorbido, creando una carga y generando una señal eléctrica que serán proporcionales a la cantidad de luz incidente sobre dicho elemento. Esta señal eléctrica se cuantifica y se convierte en un valor dentro de una escala. Típicamente, el valor asignado estará comprendido entre 0 y 255. Si la imagen final va a ser una imagen en color real, en cada elemento de la matriz, se realiza el mismo proceso para cada uno de los tres colores básicos, rojo, verde y azul. Si la imagen es en escala de grises, la imagen resultante estará

formada por tantos píxeles como elementos tenga la matriz, y cada píxel tendrá un valor de intensidad comprendido entre 0 (negro) y 255 (blanco).

Este proceso se realiza independientemente de que la señal de salida de la cámara sea analógica o digital. Si la cámara es digital -su señal de salida es digital- la imagen entregada por la cámara será el resultado de esta digitalización. La cámara podrá conectarse al ordenador mediante algún estándar de conexión, como puede ser el USB o el Firewire, y se podrá trabajar sin más con la imagen digital. Si la cámara es analógica, en su interior se convertirá esta señal digital en una señal analógica que cumpla con los estándares analógicos del mercado. En estos casos, si se quiere trabajar con imágenes digitales procedentes de este tipo de cámaras, será necesario digitalizarlas nuevamente mediante una tarjeta digitalizadora o *frame grabber* que se encuentre en un ordenador.

En cuanto se ha digitalizado la imagen ésta pasa a ser una matriz numérica sobre la que se pueden aplicar diferentes operaciones que permiten realizar el procesamiento digital de la imagen. Dependiendo del objetivo buscado las operaciones pueden ser geométricas (operaciones como rotaciones, traslaciones o cambios de escala), aritméticas (adición, sustracción de imágenes), diversas operaciones de punto que actúan sobre el valor de cada píxel y permiten, por ejemplo, mejorar el contraste de la imagen, etc. Mediante un conjunto de estas operaciones se puede mejorar el aspecto de la imagen, preprocesamiento, y posteriormente, con otro tipo de operaciones, segmentar la imagen con lo que se conocería que píxeles se corresponden, por ejemplo, con la cabeza de un espermatozoide. Otras operaciones realizadas sobre esta nueva matriz nos permitirán medir su área, su eje mayor, etc., u obtener complejos descriptores de su forma, como pueden ser los proporcionados por descriptores basados en los momentos de Hu, Zernike, Legendre, etc.

Una vez formada la imagen digital el primer paso que ha de realizar el programa de análisis es identificar que píxeles, del total de los capturados, corresponden a los espermatozoides (generalmente la cabeza), siendo esta una función característica de cada sistema (Mortimer, 1997) conocida como segmentación; estableciéndose por lo general unos umbrales de tamaño (superior e inferior) que excluyan con la mayor eficacia posible las partículas no espermáticas; aunque también es posible utilizar, como ya citamos, tinciones fluorescentes en el sistema IVOS[®] de Hamilton-Thorne (Zinaman *et al.*, 1996) o la presencia de la cola (Neuwinger *et al.*, 1990a) en el SM-CMA[®].

Una vez eliminadas las partículas no espermáticas, los “objetos” presentes, identificados como espermatozoides, son reducidos a un solo punto (centroide), constituyendo el referente de cada célula espermática en las siguientes imágenes; esta operación es realizada en el sistema IVOS[®] identificando el centroide como el punto más luminoso de la cabeza espermática (Yeung *et al.*, 1992), mientras que los equipos CellTrack[®] y CellSoft[®] toman el centro del grupo de píxeles identificados como cabeza (Mortimer, 1997). Esta aproximación

trae como consecuencia la imposibilidad de comparar los resultados de los sistemas CASA con los obtenidos en los estudios anteriores de cartografía manual, al usar esta técnica como punto de referencia la unión entre la cabeza y la cola (ver por ejemplo Suárez *et al.*, 1983), por tanto se obtienen resultados diferentes al utilizar metodologías distintas (Chan *et al.*, 1990).

En el siguiente paso, el sistema localiza las coordenadas del centroide en los sucesivos *frames*, reconstruyendo la trayectoria descrita de dicho punto de referencia y calculando los parámetros cinéticos derivados de su desplazamiento.

Este planteamiento en principio sencillo, se complica al existir en una misma secuencia decenas de espermatozoides, con sus respectivos centroides moviéndose simultáneamente, por tanto, para conseguir un trazado acorde a la realidad y evitar las confusiones en la reconstrucción de los recorridos, debemos de definir un área circular en torno a la última posición conocida del centroide, en el que mayor probabilidad tengamos de encontrarle en la imagen siguiente.

El radio de dicha área de probabilidad es dependiente de la máxima velocidad de desplazamiento de los espermatozoides, y se calcula según la siguiente fórmula (Mortimer *et al.*, 1997):

$$\frac{\text{Máxima velocidad de desplazamiento espermático}}{\text{Frecuencia de adquisición de imágenes}}$$

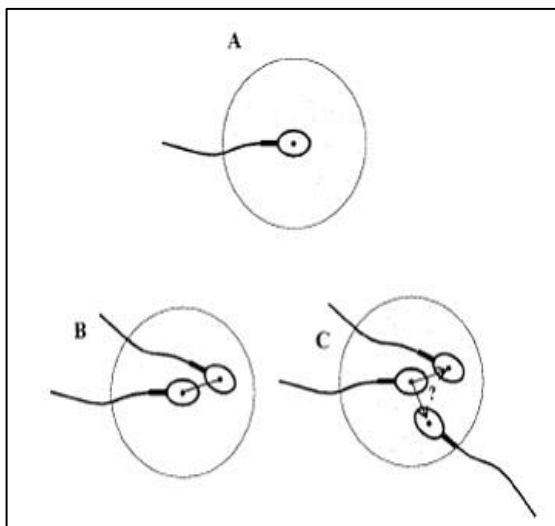


Figura 6. Representación de la célula y su radio de búsqueda (A), y el trazado de su trayectoria en la siguiente imagen (B); la posible confusión sucede cuando un segundo espermatozoide irrumpe en la zona de probabilidad del primero (C) (Mortimer, 2000).

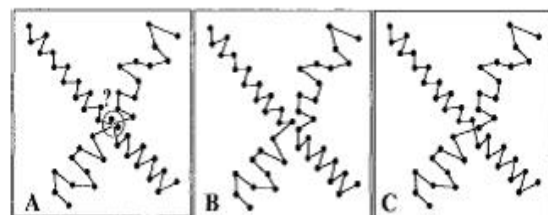


Figura 7. Reconstrucción de las trayectorias cuando dos espermatozoides comparten la misma zona de probabilidad (A), pudiendo originar una reconstrucción errónea de las mismas (B), o, si el software lo permite un correcto trazado (C) (Mortimer, 2000).

Dicho valor debe de estar contenido dentro de los parámetros de configuración iniciales del equipo y adaptado a cada especie concreta.

Una vez reconstruida la trayectoria, ésta es procesada matemáticamente obteniéndose unos resultados numéricos precisos (Krause, 1995).

Para la determinación morfométrica, el programa segmenta el espermatozoide del fondo y delimita, al menos, la separación entre la cabeza y la cola; una vez identificadas las células espermáticas, y por una simple relación de escala, se procede al cálculo de las medidas morfométricas de la cabeza en función de los píxeles que la componen. Si la tinción lo permite y el software ha sido diseñado para tal fin, se puede realizar también la determinación de las dimensiones de la pieza intermedia y el acrosoma (Soler *et al.*, 2006).

2.5.2.2 Parámetros medidos por los sistemas CASA

2.5.2.2.1 Parámetros cinéticos

Para Drobnis *et al.* (1988) los parámetros cinéticos calculados por un sistema CASA, son: “aspectos geométricos de la movilidad, dependientes del tiempo, que se diferencian mediante cálculos de masa y fuerza”; se trata pues de indicadores que nos aportan información de la velocidad del movimiento del espermatozoide, así como de la frecuencia, los cambios de dirección y la amplitud de la trayectoria descrita por la cabeza espermática (David *et al.*, 1981; Serres *et al.*, 1984).

No obstante, es paradójico que el punto de referencia (centroide) se encuentre en la cabeza del espermatozoide y no en el flagelo del mismo, verdadero órgano efector de la función mótil. Esta situación, pone de manifiesto la incapacidad técnica de los actuales sistemas CASA, de realizar un seguimiento efectivo de los puntos que componen el flagelo, debido a la elevada frecuencia de batido en el mismo; hemos de pensar que para un análisis correcto de esta estructura, que bate a 80 Hz en el caso de la especie humana, necesitaríamos cámaras con un frecuencia de captura de 200 Hz. Por tanto, la solución adoptada ha sido realizar una medida indirecta de la funcionalidad mótil de la célula espermática tomando como referencia la cabeza (Mortimer, 1997).

No obstante, esto no siempre fue así, en los estudios realizados usando técnicas de cartografía manual, se realizaba el análisis del movimiento flagelar, cuantificándose los siguientes parámetros (recogidos por Mortimer, 1997):

- Longitud de la onda de batido flagelar.
- Velocidad de propagación de la onda flagelar.
- Frecuencia del batido flagelar.
- Amplitud del batido flagelar.
- Radio de curvatura flagelar.
- Radio de curvatura.
- Angulo de inflexión flagelar.
- Eficacia de batida.
- Eficacia cinética.
- Velocidad angular de la onda flagelar.

Sin embargo, en la actualidad, los sistemas computerizados de análisis de la movilidad calculan, al menos, los siguientes 8 parámetros cinéticos básicos derivados del movimiento del centroide de la cabeza espermática:

-Velocidad Curvilínea (VCL): Velocidad, en $\mu\text{m/s}$, del espermatozoide en su trayectoria curvilínea, siendo esta la proyección bidimensional de la trayectoria tridimensional real del mismo (Mortimer, 1997). Nos indica la distancia cubierta por la cabeza de la célula espermática en el tiempo de observación. Es siempre mayor o igual (este último supuesto solo se verificará en el caso de que la trayectoria real del espermatozoide sea un línea completamente recta) que las otras dos velocidades.

-Velocidad Rectilínea (VSL): Velocidad, en $\mu\text{m/s}$, del espermatozoide en su trayectoria rectilínea, siendo esta la resultante de unir el primer y último punto de la trayectoria curvilínea durante el periodo de observación. Indica la ganancia neta de espacio por parte del espermatozoide, siendo, dentro de los 3 parámetros cinéticos el que presenta el valor más bajo (Mortimer, 1997).

-Velocidad media (VAP): Velocidad, en $\mu\text{m/s}$, del espermatozoide en su trayectoria media durante el periodo de observación; siendo la trayectoria media un indicativo de la dirección media de desplazamiento de la célula espermática, sus puntos se obtienen a partir del valor promedio de las coordenadas de los puntos de la trayectoria circular adyacente mediante un proceso matemático denominado “*smoothing*”, si bien es posible realizar el

trazado manual o geoméricamente (Mortimer, 1997). Hemos de tener en cuenta que cada equipo comercial puede usar distintos métodos algebraicos para llevar a cabo el proceso de “smoothing” (Mortimer, 1997), suponiendo un obstáculo en la comparación de resultados obtenidos por equipos de fabricantes distintos (Mortimer y Swam, 1999a; b).

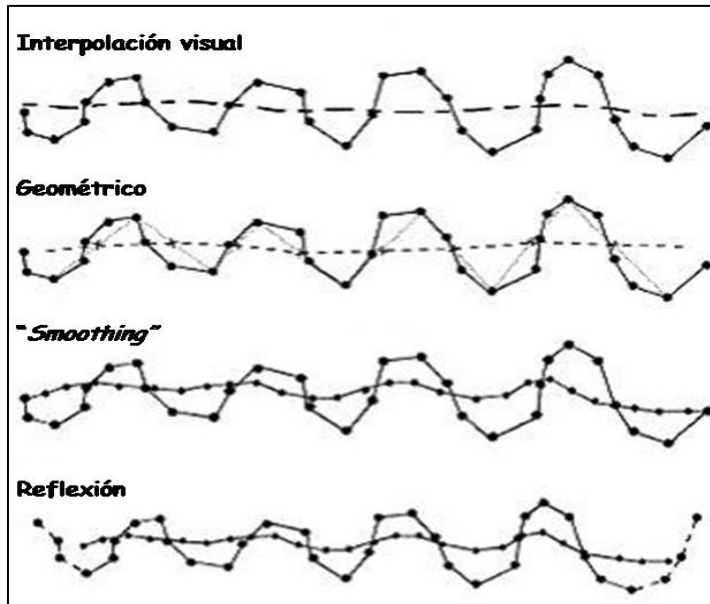


Figura 8. Métodos de cálculo de la VAP (Mortimer, 1997).

-**Índice de Linealidad (LIN)**: Es la relación porcentual entre la VSL y la VCL $[(VSL/VCL)*100]$; indica cuan próxima es la trayectoria circular del espermatozoide a una línea recta. Los recorridos circulares presentan un bajo LIN, ya que la trayectoria circular será mucho mayor que el espacio neto ganado; mientras que con trayectorias curvilíneas, con una relativamente baja amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y una dirección de movimiento próxima a una línea recta, el LIN es elevado (Mortimer, 1997).

-**Índice de Rectitud (STR)**: Es la relación porcentual entre la VSL y la VAP $[(VSL/VAP)*100]$; nos indica cuan próxima es la trayectoria media a una línea recta. Como en el índice anterior presenta valores bajos en trayectorias curvilíneas alejadas de una línea recta (aunque mayores que el LIN); mientras que serán altos cuando los puntos de la trayectoria media estén separados y presenten una baja ALH (Mortimer, 1997).

-**Índice de Oscilación (WOB)**: Es la relación porcentual entre la VAP y el VCL $[(VAP/VCL)*100]$; indica el grado de oscilación de la trayectoria real de la cabeza espermática respecto de la trayectoria media (Blanco, 1998); presenta valores bajos cuando la ALH es elevada, y altos cuando la trayectoria descrita por el espermatozoide es circular y la VCL y la VAP presentan valores similares.

-Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH): Se define como el desplazamiento en μm , efectuado por la cabeza espermática en su trayectoria curvilínea de uno a otro lado de la trayectoria media (Quintero-Moreno, 2003a). Es usada como una aproximación para describir el batido flagelar, no tratándose de una amplitud *sensu stricto*, al no medirse la distancia entre el pico de la onda y el punto de inflexión de la curva (Mortimer, 2000). Para realizar el cálculo de la misma, es necesario el trazado previo de la trayectoria media del espermatozoide, para a continuación calcular la distancia entre cada punto de la misma con la real, dicha distancia es definida en literatura anglosajona como “*riser*” (Boyers *et al.*, 1989), siendo la ALH en cada punto el doble del *riser*. En una trayectoria regular la distancia es perpendicular a cada punto de seguimiento de la trayectoria media; esto no se verifica si el recorrido del espermatozoide es muy irregular (como ocurre con los espermatozoides hiperactivados) haciendo que los resultados obtenidos para este parámetro tengan menor exactitud (Mortimer, 1997).

Los resultados de ALH se expresan de dos posibles maneras, en función del sistema CASA que estemos utilizando:

- ALH media: es el promedio del conjunto de valores de ALH calculados en todos los puntos de su trayectoria.
- ALH máxima: Es el máximo valor de ALH en la trayectoria considerada.

-Frecuencia de batido (BCF): Es el número de veces que la cabeza del espermatozoide cruza la dirección de movimiento; siendo indicativo de la frecuencia de batido del flagelo. La BCF se expresa en Hz y se calcula contando el número de veces que la trayectoria curvilínea cruza la trayectoria media por segundo. La BCF es útil en la valoración de fuertes cambios en los patrones del movimiento del flagelo (Mortimer, 1997).

Además de los anteriores parámetros existen otros derivados de ellos recogidos en la tabla 2, siendo usados con menor asiduidad (Blanco, 1998; Quintero-Moreno, 2003a; b).

Por último, Mortimer y Swam (1999a; b) desarrollaron una nueva serie de parámetros derivados de los básicos, a excepción de la VAP y la ALH, con la intención de hacer más fácil la comparación de resultados entre sistemas distintos, y más adecuados para la valoración de espermatozoides hiperactivados.

2.5.2.2.2 Parámetros morfométricos

La totalidad de los programas morfométricos realizan la medición de los siguientes parámetros de la cabeza espermática:

Longitud (L): Medida, en μm , del eje mayor de la cabeza del espermatozoide.

Anchura (W): Medida, en μm , del eje menor de la cabeza del espermatozoide.

Perímetro (P): Longitud, en μm , de la frontera externa entre la zona identificada como cabeza y el fondo.

Área (A): Suma, en μm^2 , de las áreas del grupo de píxeles que el software ha identificado como cabeza.

En algunos sistemas ASMA, como en el Sperm Class Analyzer[®], o el Integrated Semen Analysis System[®], realizan el cálculo de 4 parámetros adicionales, indicativos de la forma del espermatozoide:

- Elipticidad: L/W .
- Rugosidad: $4\pi A/P^2$.
- Elongación: $(L-W)/(L+W)$.
- Regularidad: $(\pi LW/4A)$.

Con el sistema ISAS[®], es posible realizar el estudio morfométrico de la pieza intermedia (Hidalgo *et al.*, 2005), midiendo los siguientes parámetros:

- Anchura de la pieza intermedia (μm).
- Área de la pieza intermedia (μm^2).
- Distancia, en μm , entre el eje mayor de la cabeza y la inserción de la pieza intermedia.
- Ángulo de divergencia de la pieza intermedia con respecto al eje mayor de la cabeza.

Los sistemas de análisis morfométrico, han mostrado su validez en el análisis del núcleo del espermatozoide definiéndose nuevos parámetros para caracterizar dicha estructura (ver Ramos *et al.*, 2002) en la especie bovina. También en el análisis tradicional de la morfometría con sistemas ASMA, se han desarrollado nuevos parámetros basados en la distinta distribución de grises dentro de la cabeza espermática, en este caso, de la especie humana (Garret y Baker, 1995).

Tabla 2. Parámetros cinéticos medidos por los sistemas CASA.

PARÁMETRO	Unidad	DEFINICIÓN
Velocidad curvilínea (VCL)	$\mu\text{m/s}$	Velocidad media de la cabeza espermática a lo largo de su trayectoria real.
Velocidad rectilínea (VSL)	$\mu\text{m/s}$	Velocidad media de la cabeza espermática a lo largo de la línea recta que une la primera y última posición de la trayectoria curvilínea.
Velocidad media (VAP)	$\mu\text{m/s}$	Velocidad promedio de la cabeza del espermatozoide en su trayectoria media.
Índice de linealidad (LIN)	%	Linealidad de la trayectoria curvilínea $(\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100$
Índice de rectitud (STR)	%	Rectitud de la trayectoria media $(\text{VSL}/\text{VAP}) \times 100$
Índice de oscilación (WOB)	%	Grado de oscilación de la trayectoria real de la cabeza espermática respecto a la trayectoria media $(\text{VAP}/\text{VCL}) \times 100$
Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALHmed)	μm	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 del espermatozoide (ALHMax)	μm	Máximo desplazamiento efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media.
Dance (DNC)	μm	$\text{VCL} \times \text{ALH}$
Dance medio (DNM) o índice de hiperactividad	μm	ALHmed/LIN
Índice de angularidad (AI)	%	Valor porcentual de los ángulos menores formados por los segmentos que definen la trayectoria curvilínea.
Velocidad angular media (AV)	$\mu\text{m/s}$	$(\text{VCL} \times \text{AI}) \times 100$
Desplazamiento angular medio absoluto (MADAbs)	°	Ángulo que toma la dirección de un segmento de la trayectoria y el siguiente en valor absoluto.
Desplazamiento angular medio algebraico (MADAAlg)	°	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)	μm	Menor valor de la amplitud de la trayectoria curvilínea respecto a la trayectoria media.
Mayor oscilación armónica de la cabeza del espermatozoide (HHI)	μm	Mayor valor de la amplitud de la trayectoria curvilínea respecto a la trayectoria media.
Oscilación media de la cabeza del espermatozoide (HME)	μm	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.

2.5.3 Fuentes de variación en los resultados de los sistemas CASA

Como indicamos en el epígrafe 2.4, el inicio de la aplicación de los sistemas de análisis seminal por imagen digital, no estuvo exento de problemas. La demostración de que sus resultados no mejoraban sustancialmente la eficacia de la predicción de la fertilidad de la muestra considerada, supuso la pérdida de las expectativas que se habían levantado entorno a ellos como la panacea para el análisis andrológico; hecho que no deja de ser lógico al valorar dos parámetros (movilidad/morfometría) que solo proveen de una parte de la información que explica el complejo proceso reproductivo (Amann y Hammerstedt, 1993; Quintero-Moreno, 2003a). La necesidad de que el personal encargado de la operación de estos equipos, estuviese previamente formado y exhaustivamente entrenado en su manejo, supuso otra traba a salvar en la aplicación de esta tecnología (ESHRE, 1998). A lo anterior, en el ámbito concreto de la andrología veterinaria, hemos de sumar el elevado coste de los equipos, condicionante que ha ralentizado su aplicación en el análisis seminal de las especies domésticas (Verstegen *et al.*, 2002; Amann y Katz, 2004).

No obstante, el mayor inconveniente descrito en la utilización de los sistemas CASA, es, que tanto el modelo de equipo comercial utilizado, como las condiciones de medida y preparación de la muestra, van a condicionar los resultados del análisis. Por lo tanto se anula la principal ventaja de estos sistemas, la recogida de datos morfométricos/cinéticos de forma precisa, impidiendo la comparación de resultados.

El esfuerzo realizado en el estudio y corrección de los factores de variación ha sido notable, consiguiendo el desarrollo de protocolos de estandarización de los procesos de análisis para cada sistema y para la mayoría de especies animales de interés; estos protocolos junto con férreas medidas de control de calidad han permitido validar los sistemas de análisis mediante imágenes digitales para la valoración precisa de las características espermáticas (Fraser *et al.*, 1997; ESHRE, 1998; Verstegen *et al.*, 2002; Amann y Katz, 2004).

Es por tanto indispensable el estudio de las fuentes de variación que pueden afectar a los resultados de la valoración morfométrica y cinética, obtenidos mediante sistema computerizados de análisis seminal.

2.5.3.1 Fuentes de variación en el análisis cinético

2.5.3.1.1 Fuentes de variación originadas por los equipos de captura y análisis de imágenes

-Diseño del software: Los sistemas CASA para el análisis cinético presentes en el mercado difieren en: el método de identificación de los espermatozoides, la zona del mismo usada como referente para el trazado de las trayectorias, los parámetros de configuración y los algoritmos empleados en los cálculos de sus características de movimiento (Mortimer, 1997), en especial en aquellas que requieren un proceso de “*smoothing*”, como la VAP y la ALH, para su determinación (Holt *et al.*, 1994b; Mortimer y Swan, 1999a; b). A consecuencia de estas diferencias los resultados obtenidos, al analizar una misma muestra por distintos equipos, presentan diferencias entre sí (Mortimer y Mortimer, 1988; Davis *et al.*, 1992b; Davis y Katz, 1992; 1993; Holt *et al.*, 1994b), lo que impide la comparación de resultados en trabajos realizados por laboratorios que empleen sistemas distintos.

-Parámetros de configuración:

-Umbral de identificación de espermatozoides: La correcta distinción entre espermatozoides y residuos es un paso particularmente relevante, es perentoria la correcta elección de los umbrales de tamaño superior e inferior, entre los cuales, toda partícula encontrada se considerará como una célula espermática. De lo contrario, la identificación de restos celulares (inmóviles) incrementa artificialmente el número de células espermáticas analizadas, y produce una disminución del porcentaje de espermatozoides móviles (Vantman *et al.*, 1988). También es posible que las partículas no espermáticas sean reconocidas como espermatozoides móviles, en muestras con una elevada concentración, debido a las colisiones que confieran movimiento a las partículas, incrementando artificialmente el porcentaje de espermatozoides móviles (Mortimer *et al.*, 1995).

Además del recurso de la elección de unos umbrales eficientes, podemos implementar el proceso de identificación mediante métodos tales como el *swim-up*, que nos permiten reducir el número de partículas presentes en la muestra (Chan *et al.*, 1989).

-Radio de búsqueda: La incorrecta elección del valor de este parámetro de configuración acarrea la exclusión del análisis de las trayectorias de las células espermáticas con una velocidad de desplazamiento alta, si el radio de búsqueda es pequeño (menos de 12 μm para el semen de oveja y cerdo); por el contrario si el radio de búsqueda es excesivamente alto (por encima de 16 μm para el cerdo y 17 para el morueco) se generarán errores en los resultados finales al producirse con frecuencia cruces de trayectorias (Holt y Palomo, 1996;

Holt *et al.*, 1996). En el caso concreto del análisis de los espermatozoides de verraco con el sistema Hobson Sperm Tracker[®], Holt *et al.* (1996), definen que el valor óptimo para el radio de búsqueda es de 13 μm ; dichos autores encuentran una correlación positiva entre la ALH y el radio de búsqueda, mientras que esa correlación es negativa para la BCF. Blanco (1998), determina que para el sistema SCA[®] el valor óptimo de este parámetro para el análisis de semen de verraco es de 11 μm , constatándose que este varía en función del equipo empleado.

-Número de puntos de la trayectoria analizados: Este valor se corresponde con el número de imágenes capturadas en la secuencia y tiene una repercusión directa en la determinación de: la VCL, LIN y ALH (Mack *et al.*, 1988; Vantman *et al.*, 1988). Las modificaciones en estos parámetros están condicionadas por la concentración de la muestra analizada, si ésta es la alta la VCL disminuye progresivamente al incrementarse el número de puntos utilizados. A bajas concentraciones el parámetro más afectado es el LIN, ya que en este caso, a medida que disminuye el número de puntos la trayectoria describirá movimientos cada vez más rectilíneos (Vantman *et al.*, 1998).

Para una misma concentración, el uso de diferente número de puntos va a originar resultados distintos en el porcentaje de movilidad y en los valores de los parámetros cinéticos. Es aconsejable, para obtener un análisis lo más representativo posible, usar 20 o más puntos en la reconstrucción de la trayectoria (Mack *et al.*, 1988; Yeung y Niechlag, 1993). No obstante, el uso de valores altos origina que los espermatozoides que presenten un movimiento muy rápido no permanezcan dentro del campo de captura durante todo el tiempo necesario para completar la secuencia, originando trayectorias incompletas y produciendo una disminución artificial en el porcentaje de espermatozoides móviles (Davis y Katz, 1992).

-Frecuencia de captura: Está íntimamente relacionada con el parámetro anterior, el uso de distinto número de imágenes recopiladas por segundo, cambia sustancialmente la forma de la trayectoria reconstruida (notese las diferencias en la figura 9). A mayor frecuencia de captura, más informativo será el trazado del recorrido del espermatozoide (Mortimer, 2000), afectándose todos los parámetros cinéticos, que describe a excepción, obviamente, de la VSL (Mortimer y Mortimer., 1988; Mortimer y Swan, 1999a); según se incrementa la frecuencia de captura, a la par aumentan los valores de la VCL, VAP, STR y BCF; mientras que el LIN, WOB y ALH disminuyen.

La mayoría de sistemas CASA para el análisis cinético utilizan frecuencias de captura entre 25-30 Hz, aunque para el caso del análisis de espermatozoides capacitados o la medida de la ALH se deben usar frecuencias mayores (Mortimer y Mortimer, 1988; Sherins, 1991); incluso la ESHRE (1988) recomienda el uso de 50 Hz para el análisis rutinario del semen humano, si bien es un valor, que por motivos técnicos, no todos los equipos pueden alcanzar.

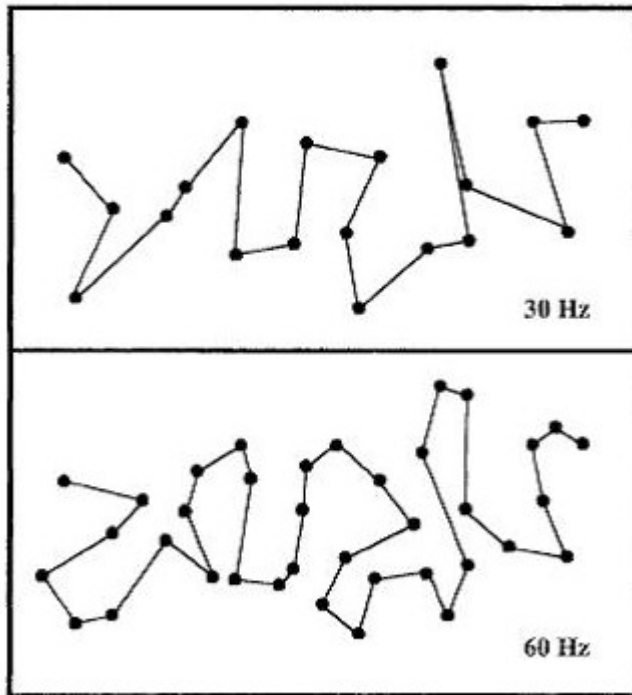


Figura 9. Efecto de la frecuencia de captura en el trazado de la trayectoria. A mayor frecuencia, mayor detalle del camino recorrido por el espermatozoide, lo que afecta al cálculo de los parámetros cinéticos (Mortimer, 2000).

-Derivadas del equipo óptico y de captura:

-Óptica: La obtención de un correcto contraste entre las células espermáticas y el fondo es indispensable para una eficaz segmentación y consecuentemente un correcto análisis. Necesitamos de una iluminación adecuada y constante, así como el uso, en todos los análisis, de la misma magnificación [100x es la recomendada para la evaluación de la movilidad por la ESHRE (1998)], siendo estas condiciones imprescindibles para la obtención de resultados fiables y repetibles.

Un gran número de sistemas esta equipado con ópticas de contraste de fase positivo, mediante el cual los espermatozoides aparecerán oscuros sobre un fondo claro; no obstante, la rotación de la cabeza puede alterar su tamaño y luminosidad y un enfoque agudo producir un halo que interfiere en el reconocimiento exacto de la posición de la misma (Yeung y Nieschlag, 1993), siendo muchas veces necesario desenfocar ligeramente las preparaciones para conseguir mejores resultados. La solución a estos problemas lo aportan las ópticas de contraste de fase negativo, al proporcionarnos una imagen de la cabeza espermática más definida, al aparecer en este caso brillante sobre un fondo oscuro, eliminando la aparición del halo ante un enfoque preciso. En una comparativa entre ambos tipos de ópticas (Yeung y Nieschlag, 1993) se observaron resultados divergentes, siendo el contraste de fase negativo el que presentaba una reconstrucción más fiable de las trayectorias de los espermatozoides, por tanto, este es el más recomendado para el análisis mediante sistemas computerizados de los patrones de motilidad espermática.

- Cámara de captura: Como citamos en el epígrafe 2.4, tenemos a nuestra disposición cámaras de captura continua y discontinua, existiendo fuertes diferencias en los resultados aportados por ambos tipos. En el caso de las cámaras de captura discontinuas la trayectoria representada es menos fiel a la realmente recorrida por el espermatozoide, debido a la aparición de cabezas espermáticas “fantasma”; fenómeno que se produce al no coincidir en el entrelazado la imagen contenida en las líneas pares con la contenida en las impares, por una elevada velocidad de desplazamiento espermático. En un estudio realizado por Tejerina *et al.* (2006b), a partir de una misma muestra, se pudo observar como existen diferencias significativas para todos los parámetros cinéticos (a excepción del LIN) entre los resultados aportados por una cámara de captura continua y una discontinua; siendo mayores los resultados de VCL, VSL, VAP, WOB y ALH cuando la grabación se realizaba con una cámara de captura discontinua, mientras que para el mismo dispositivo eran inferiores los resultados de BCF y STR.

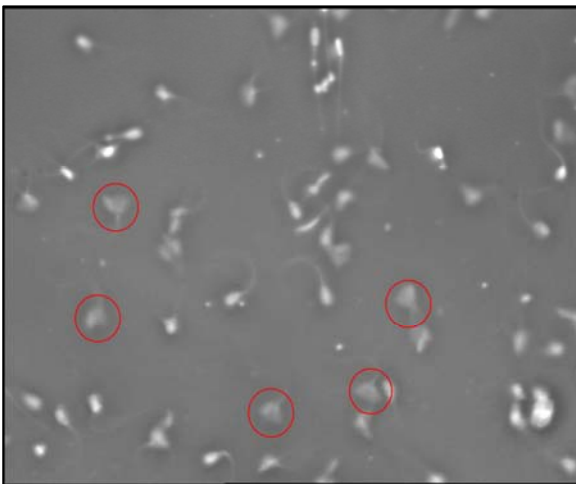


Figura 10. Imagen obtenida con una cámara de captura discontinua (Pulnix PE2015). Se pueden apreciar la aparición de cabezas “fantasmas” dentro de los círculos rojos.

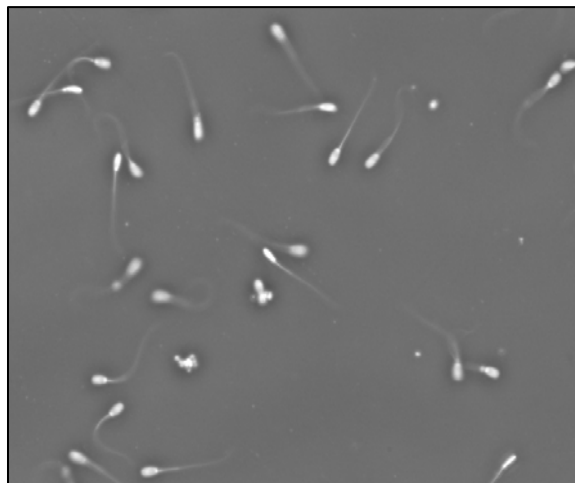


Figura 11. Imagen obtenida con una cámara de captura continua (Basler A312-F).

2.5.3.1.2 Factores de variación derivados de las condiciones del análisis.

-Temperatura: Es desde hace tiempo conocida su transcendencia para el análisis subjetivo de la movilidad, habiéndose demostrado, igualmente, que los resultados de los parámetros cinéticos están fuertemente condicionados por ella, sufriendo fuertes incrementos según aumenta la temperatura hasta llegar a valores corporales, como describen Iguer-Ouada y Verstegen (2001) para los espermatozoides caninos, o en el caso del semen humano, donde el incremento afecta especialmente al porcentaje de células móviles (Davis y Katz, 1993), y a la velocidad y el LIN (Sherins, 1991). Así la temperatura recomendada por el grupo ESHRE (1998), es la temperatura corporal de la especie de origen del semen analizado (en el caso del cerdo 39° C).

-Concentración de la muestra: La forma en que la concentración de la muestra afecta a la motilidad de los espermatozoides presentes en ella, ha sido descrita en diferentes estudios (Vantman *et al.*, 1988; Wetzels *et al.*, 1993; Spiropoulos, 2001; Verstegen *et al.*, 2002), como uno de los parámetros que más condiciona los resultados de las características cinéticas espermáticas. Para Pedigo *et al.* (1989), el uso de concentraciones elevadas está inversamente correlacionado con la variabilidad de los resultados. Este efecto, en principio beneficioso para la precisión de los datos obtenidos, se ve contrarrestado por la significativa influencia que ejercen las altas concentraciones en los resultados cinéticos. Existe una correlación positiva entre la concentración de la muestra y el porcentaje de motilidad individual de la misma, fruto de la cual se produce una sobreestimación artificial de dicho parámetro, que será más acusada cuando el valor real de dicho porcentaje sea medio o bajo (Wetzels *et al.*, 1993). Esto es debido a las colisiones de las células espermáticas entre sí, que aumentarán su probabilidad según aumente la concentración, provocando la adquisición de movimiento por parte de las células inmóviles que han sufrido una colisión. Wetzels *et al.* (1993) describen una disminución de la VCL con el incremento de la concentración, fenómeno que tiene dos posibles explicaciones:

-La pérdida de datos de las células más rápidas al presentar estas trayectorias incompletas por las colisiones que han sufrido y quedar excluidas del análisis.

-Los espermatozoides inmóviles que adquieren motilidad lo hacen con bajos valores de la VCL, disminuyendo la media de este parámetro cinético.

La VSL responde de forma similar a la anterior (Vantman *et al.*, 1988).

La pérdida de los datos de los espermatozoides más rápidos y el incremento en el número de colisiones, hace que las trayectorias sean más sinuosas, produciéndose una disminución del LIN y un incremento de la ALH (Vantman *et al.*, 1988; Weltzels *et al.*, 1993).

A partir de todas las apreciaciones anteriores, se ha llegado a la conclusión que el rango óptimo de concentraciones para el análisis cinético con sistemas computerizados, se encuentra entre 25 y 50 millones de espermatozoides por mililitro, siendo el utilizado en la práctica totalidad de trabajos.

-Diluyentes: Los parámetros cinéticos se ven condicionados por las características y composición de los medios en los se diluyen los espermatozoides (Farrell *et al.*, 1996; Rijsselaere *et al.*, 2003). Por lo tanto, sólo se pueden comparar los resultados de dos muestras si ambas están diluidas en el mismo medio.

-Cámara de recuento: La cámara utilizada puede producir errores sistemáticos en los análisis mediante los sistemas CASA, influyendo sobre los patrones cinéticos de las células espermáticas (Sherins, 1991; David y Katz, 1993). La elección de la cámara a utilizar es básica para la realización de una correcta medición.

La utilización de portas-cubres o hematocitómetros debería quedar descartada, al producirse una distribución de los espermatozoides en varias capas en el volumen delimitado por la cámara, estando solamente una correctamente identificada, además se producen movimientos de los células espermáticas entre las distintas capas, lo que dificulta el seguimiento de las mismas (Verstegen *et al.*, 2002). En la mayoría de los laboratorios se ha venido utilizando una cámara de solo 10 μm de profundidad, la Makler (Blanco, 1998), que limita la distribución de los espermatozoides a un única capa; el uso de este tipo de cámaras requiere un especial cuidado para evitar el sobrellenado (se suelen cargar con un volumen de 4-5 μL), que produce alteraciones en los resultados de la concentración y el porcentaje de motilidad (Mack *et al.*, 1989; Yanagida *et al.*, 1990). En la actualidad disponemos de otros modelos como: la Microcell[®] de Conception Technologies, de 12 y 20 μm de profundidad (Verstegen *et al.*, 2002), la Cell-vu[®] de 20 μm de Millennium Sciences, Inc (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001) y la cámara Leja[®] de 20 μm de Leja Products (Douglas-Hamilton *et al.*, 2005).

Se han constatado diferencias tanto entre cámaras de distinta profundidad (Le Lannou *et al.*, 1992), como en cámaras con la misma profundidad y de distinto fabricante (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001), por lo que las diferencias no solo son debidas a la profundidad, sino que interviene, también, algún factor inhibitorio de la motilidad, probablemente por incompatibilidades del material de la cámara con el metabolismo espermático (Verstegen *et al.*, 2002). Las recomendaciones, tanto del ESHRE (1998), como de otros autores (Verstegen

et al., 2002) apuntan a la necesidad de utilizar cámaras de recuento entre 10 y 20 μm de profundidad.

-Número de espermatozoides analizados. El número de células espermáticas necesarias para caracterizar el total de la población, ha sido siempre uno de los planteamientos más discutidos en la práctica andrológica. La mayoría de laboratorios realizan el análisis cinético sobre 100 o 200 espermatozoides elegidos al azar en varios campos, obteniendo coeficientes de variación entorno al 10%, usando concentraciones de 50 millones de espermatozoides por mililitro; aunque para el caso del semen humano puede ser habitual trabajar a concentraciones en torno a los 10 millones, en casos de oligospermia se incrementan los coeficientes de variación hasta el 50% (Blanco, 1998), por lo que para capturar un número adecuado de espermatozoides debemos analizar varios replicados de la misma muestra. Ante esta situación, no es de extrañar que la ESHRE (1998) recomiende para el semen humano el análisis de al menos 200 espermatozoides.

La situación es bien diferente en el análisis de semen de las especies domésticas; Holt *et al.* (1996), consideran que para la determinación del número óptimo de espermatozoides es imprescindible tener en cuenta el propósito para el que los datos son recogidos. Si lo que se requiere determinar son las medias de los valores, referido a teorías estadísticas de muestreo, el número mínimo depende de los límites de tolerancia y de la desviación standard de las medias. Para semen de verraco, trabajando con el sistema Hobson Sperm Tracker[®], establecen que la media de los valores de VAP no cambian significativamente analizando más de 25 espermatozoides, aunque los límites de confianza del 95% no se logran hasta que se analiza un mayor número de células. Si se requieren análisis más detallados de la población espermática, estos autores, recomiendan la evaluación de 60 o más células para que los resultados sean representativos. Estos argumentos sin embargo, no tienen aplicación si la técnica de medida introduce, por sí misma, error en el método de muestreo.

-Variabilidad intra-técnico: A pesar de que los sistemas CASA nacieron con el fin de evitar la subjetividad en el análisis provocada por la valoración visual directa, los resultados obtenidos siguen sufriendo variaciones en función del técnico que realice el análisis. Así, en un estudio de Holt *et al.* (1994b), en el que una misma muestra era analizada por varios técnicos (con diverso grado de experiencia) en 5 modelos diferentes de sistemas CASA, se pudo constatar, que para todos los parámetros evaluados la variabilidad interna del modelo, fue mayor que entre modelos, indicando que las diferencias en manejo de la muestra y la experiencia del técnico fueron fuentes de variación más significativas que los sistemas CASA por sí mismos. Esta apreciación se repitió en el estudio llevado a cabo por Farrell *et al.* (1995), al evaluar dos sistemas CASA idénticos. A consecuencia de estos resultados, la especialización y el entrenamiento del personal dedicado al manejo de estos equipos son unos de los aspectos que más importancia acaparan en los trabajos que describen la correcta

utilización de la nueva tecnología (ESHRE, 1998; Krause y Viethen, 1999; Verstegen *et al.*, 2002).

2.5.3.2 Fuentes de variación en las medidas morfométricas realizadas por sistemas ASMA

2.5.3.2.1 Fuentes de variación originadas por los equipos de captura y análisis

-Derivadas del software de análisis: Los algoritmos empleados para la segmentación de la cabeza espermática y su posterior medida son diferentes entre sistemas CASA comerciales distintos. Coetzee *et al.* (2001), describen diferencias significativas en los resultados obtenidos con los sistemas IVOS[®] de Hamilton-Thorne y el Mika Medical Sperm Analyser[®] de Ströemberg-Mika, del análisis de la misma muestra de semen humano teñido con Diff-Quick[®] y Papanicolau, por lo que la comparación de resultados entre estos dos sistemas se hace inviable. Incluso dentro del mismo equipo se observan diferencias en los resultados dependiendo del modo de funcionamiento (automático, semiautomático o manual) (Goulart *et al.*, 2003).

-Fuentes de variación derivadas del sistema de captura:

-Intensidad de la fuente de iluminación: Es un parámetro determinante en el contraste entre el espermatozoide y el fondo de la imagen, por tanto influye de forma decidida en la segmentación de la cabeza y en el consecuente cálculo de los parámetros morfométricos; sería por tanto deseable utilizar la misma en todas las medidas para que esta no influya en los resultados finales (Sancho *et al.*, 1998; Verstegen *et al.*, 2002).

-Magnificación: Es obvio que la magnificación empleada juega un papel condicionante de los resultados finales, consiguiéndose el mejor grado de detalle y exactitud con el mayor aumento disponible. El problema de tal planteamiento es que cuanto mayor sea la magnificación con la que estemos trabajando, menor será el número de células por campo, por tanto, será necesario analizar un mayor número de campos y se prolongará el tiempo de la captura (Gravance *et al.*, 1997). Para aunar ambos propósitos (mantener la exactitud y hacer el método más práctico) cabe la posibilidad de comparar los resultados obtenidos con los distintos objetivos, pudiendo emplear el de menor aumento cuando no haya diferencias significativas en los resultados de los parámetros morfométricos, entre este y el de mayor magnificación. Estos estudios no se pueden generalizar, debiendo de ser específicos de cada

sistema, especie y tinción. Para el caso del sistema SCA[®], se ha testado la magnificación en el análisis del espermatozoide porcino, comprobándose la existencia de diferencias significativas entre los resultados de los objetivos de 400 y 1000 aumentos, por lo que en este caso solo será válida la mayor magnificación para realizar la captura (Tejerina *et al.*, 2005); en el sistema CellMorf[®] el análisis del espermatozoide de morueco se podría realizar a 400 aumentos (Gravance *et al.*, 1998a), mientras que para el equipo CellForm[®] sería válido el objetivo de 200 para una correcta captura de células espermáticas de caprino (Gravance *et al.*, 1995). No obstante, en estos dos últimos estudios, el objetivo de máximo aumento que servía como modelo para la comparación era el de 60 aumentos, y no el de 100 como sería deseable.

2.5.3.2.2 Factores de variación derivados de las condiciones del análisis

-Agente fijador: En función del agente fijador que añadamos a la muestra seminal, previamente a la extensión en el portaobjetos, se van a modificar las dimensiones de la cabeza espermática, lo que conlleva la obtención de resultados diferentes, y por tanto la imposibilidad de compararlos cuando utilizamos agentes distintos. En un ensayo con semen ovino se pudo constatar como el uso de diferentes sustancias fijadoras (Glutaraldehído, metanol, etanol y un mezcla de sustancias denominada SUZA), era la causante de la aparición de diferencias significativas en los datos finales; siendo los agentes que menos variabilidad originaban (por tanto los más idóneos para el análisis morfométricos) el glutaraldehído y el SUZA (Sancho *et al.*, 1998).

-Tinción: Es el factor determinante a la hora de conseguir un adecuado contraste entre la cabeza espermática y el fondo de la imagen, por tanto está directamente implicada en la segmentación de la imagen y en el posterior cálculo de los parámetros morfométricos. El primer condicionante a la hora de elegir la sustancia colorante es que las tinciones son especie-dependientes (Gravance *et al.*, 1995; 1997); y en segundo lugar, de todas aquellas sustancias aptas para una especie en concreto, deberemos elegir aquellas que mejor se adapten a los algoritmos de segmentación del programa ASMA utilizado.

En andrología humana se han utilizado infinidad de tinciones, la WHO (1998) recomienda la técnica de Papanicolau (al igual que para la valoración subjetiva), aunque su utilización no es muy común en los trabajos de investigación. Han sido utilizadas de forma esporádica la hematoxilina (Davis *et al.*, 1992) y la tinción de Shorr (Wang *et al.*, 1991) con el equipo Morphologyzer II[®] (Cryorresources) y la tinción de Feulgen (Moruzzi *et al.*, 1988) en una versión adaptada del software Leitz TAS-plus[®] (E. Leitz, Rockleigh, NY). Más utilizados en la tinción de espermatozoides humanos son los kits comerciales como el Hemacolor[®] (Pérez-Sánchez *et al.*, 1994; Goulart *et al.*, 2003) o el Diff-Quick[®] (Coetzee *et*

al., 1999), siendo precisamente esta última combinación de tinciones, la descrita en distintos estudios comparativos como el más idóneo tanto para el análisis convencional (Harrison *et al.*, 1989), como para el morfométrico computerizado (Coetzee *et al.*, 2001b).

En las especies de interés ganadero los colorantes empleados han sido muy diversos; para el análisis morfométrico del espermatozoide equino con el equipo Hamilton-Thorne[®] se ha utilizado la hematoxilina (Casey *et al.*, 1997), siendo también la tinción que menos errores de digitalización producirá cuando se trabaja con el equipo SCA[®] en esta especie (Hidalgo *et al.*, 2005). En el semen de toro se han empleado agentes colorantes tan exóticos como el azul de toluidina (Beletti *et al.*, 2005), o asociaciones tan convencionales como la Hematoxilina con Rosa de Bengala, mostrándose superior a la Hematoxilina en solitario cuando las extensiones eran analizadas con el sistema CellMorf[®] (Gravance *et al.*, 1996), a la misma conclusión se llegó, en este caso, analizando espermatozoides de morueco (Gravance *et al.*, 1998a). Sin embargo Sancho *et al.* (1998), prefieren emplear el kit comercial Hemacolor[®] en la valoración morfométrica en la especie ovina. Para el caso del caprino, la tinción óptima para trabajar con el sistema Cell-Form[®] es la Hematoxilina (Gravance *et al.*, 1995), mientras que para el SCA[®] es el Diff-Quick[®] (Hidalgo *et al.*, 2005), situación que se repitió al analizar espermatozoides de ciervo empleando el mismo equipo (Soler *et al.*, 2005). Por último, los estudios referentes a la evaluación morfométrica de semen de cerdo son escasos, existiendo un solo estudio comparativo de tinciones para el sistema ISAS[®], en el que se recomienda la utilización de la Hematoxilina como agente que menores errores de digitalización produce durante la captura (García-Herreros *et al.*, 2006), no obstante en esta evaluación no se incluía el kit Diff-Quick[®], que ha demostrado que puede ser utilizado en las células espermáticas de los eyaculados de verraco (Tejerina *et al.*, 2005). En esta misma especie, también se ha aplicado la tinción modificada de Farelly (Hirai *et al.*, 2001) en análisis realizados con el sistema Mika Medical Sperm Analyser[®] y la combinación de Hematoxilina de Meyer y Eosina Y en solución alcohólica, en un estudio descriptivo de las subpoblaciones morfológicas existentes en un eyaculado, llevado a cabo por Thurston *et al.* (2001) con el equipo Hobson Sperm Tracker[®].

-Número de espermatozoides analizados: Como en el caso de la motilidad, la elección del número idóneo de células a analizar para caracterizar morfológica o morfométricamente una población espermática, no tiene una respuesta sencilla (Kuster *et al.*, 2004), más aún en este caso, ya que un número excesivo de espermatozoides a capturar por muestra puede suponer un prologado tiempo de análisis (Gravance *et al.*, 1995). La WHO (1998) recomienda, al menos, capturar 200 células espermáticas; sin embargo en estudios llevados a cabo con diversas especies/equipos [ovino/CellMorf (Gravance *et al.*, 1995); caprino/CellMorf[®] (Gravance *et al.*, 1995); porcino/SCA[®] (Tejerina *et al.*, 2005); equino/SCA[®] (Hidalgo *et al.*, 2005)], se ha demostrado que no habría diferencias en los resultados de los parámetros morfométricos entre tamaños muestrales de 100 y 200

espermatozoides capturados; incluso utilizando el sistema ISAS[®] y la tinción hematoxilina, en semen de verraco, se podría reducir el número de células capturadas a solo 50, sin existir diferencias significativas con los resultados de tamaños muestrales mayores (García-Herreros *et al.*, 2006).

2.5.4 Utilización actual de los sistemas computerizados de análisis seminal

El estudio de las fuentes de variación anteriormente descritas, ha desembocado en el diseño de protocolos estandarizados de medida, que junto con el adecuado entrenamiento del personal y los avances técnicos aplicados en los últimos años, han conseguido anular, en unas ocasiones, o disminuir, en otras, los errores cometidos en el proceso de medida por los sistemas computerizados de análisis seminal. Sin ninguna duda un sistema bien calibrado y manejado correctamente nos proporciona una información precisa y exacta. Las ventajas que nos aportan estos equipos en cuanto a: objetividad, repetibilidad, valoración de características imposibles de captar por nuestros sentidos, obtención de datos individualizados de cada célula y facilidad en el tratamiento de los resultados obtenidos, hacen que a día de hoy, sean utilizados con asiduidad tanto en clínicas andrológicas, como más ampliamente en estudios epidemiológicos/toxicológicos, en la caracterización cinética y morfométrica tras procesos tecnológicos o fisiológicos, en la predicción de la fertilidad y en el estudio de las subpoblaciones espermáticas

2.5.4.1 Uso de la tecnología de análisis de imagen digital en el campo de la toxicología-farmacología

Si en un campo ha sido revolucionaria la aparición de los sistemas CASA, este ha sido el de la toxicología y la epidemiología reproductiva, no dejando de ser un reflejo de la necesidad de que los estudios llevados a cabo tuviesen un cariz objetivo y comparable.

El interés por parte de los investigadores nació en 1987, cuando Working y Hurt validaron el sistema CellSoft[®] para el análisis del semen de rata, animal modelo por excelencia en la investigación toxicológica. Dos años más tarde Toth *et al.* evalúan el efecto de distintos fármacos, administrados a los roedores, sobre los patrones cinéticos de sus espermatozoides.

Gracias a las bondades y ventajas que aportaban los sistemas de análisis computerizado seminal, se alcanzó el consenso de utilizar dichos equipos en la valoración

cinética/morfométrica seminal en estudios de toxicología y epidemiología seminal humana (Scharaeder *et al.*, 1992); habiéndose diseñado, incluso, modelos especiales para tal disciplina como el TOX IVOS[®] de Hamilton-Thorne (Slott *et al.* 1993).

La aplicación ha sido todo un éxito, habiendo sido evaluados los efectos de diferentes riesgos laborales sobre el material seminal de los trabajadores expuestos a ellos, como puede ser la exposición a metales pesados (Hjollund *et al.*, 1998), al fenvalerato (Tan *et al.*, 2002) o a las altas temperaturas (Figa-Talamanca *et al.*, 1992). También otras fuentes de sustancias tóxicas, como el tabaco, han sido evaluadas en los fumadores como disruptores de la movilidad espermática (Rubes *et al.*, 1998). Los efectos alterantes sobre la cinética del espermatozoide de sustancias tales, como: ptalatos (Duty *et al.* 2004), el alcohol (Donnelly *et al.*, 1999) o los herbicidas (Betancourt *et al.*, 2006), han sido analizadas añadiéndolas directamente sobre la muestra espermática. El último de estos estudios, a diferencia de los anteriores que se realizaron con espermatozoides humanos, fue realizado tomando como modelo las células espermáticas porcinas.

La valoración de las acciones deletéreas de sustancias tóxicas o riesgos ambientales sobre la morfometría de la cabeza del espermatozoide, también ha sido evaluada, tanto mediante el empleo de animales de experimentación (Davis *et al.*, 1994; Tablado *et al.*, 1998), como sobre el material seminal de una muestra de personas que habitualmente consumen sustancias con un potencial tóxico (alcohol, cafeína y tabaco) (Vine *et al.*, 1997).

2.5.4.2 Uso de los sistemas CASA en la evaluación del material seminal tras la aplicación de procesos tecnológicos

Con una metodología idéntica a la utilizada en los estudios toxicológicos de evaluación directa de los efectos de distintas sustancias sobre la movilidad espermática, pero con unos objetivos más enfocados a la descripción de las variaciones en los patrones de movimiento de los espermatozoides y su posible aplicación tecnológica, se han utilizado los sistemas de análisis por imagen digital para el estudio de los efectos de compuestos tales como los ROS (Shang *et al.*, 2003), demostrando su efecto deletéreo; también ha sido contrastado el efecto de una elevada concentración de leucocitos y la bacteria *Escherichia Colli* en el semen humano (Diemer *et al.*, 2003), así como las consecuencias de la presencia del virus del papiloma humano sobre la cinética espermática (Lai *et al.*, 1997).

En otros estudios, se ha llevado a cabo la valoración de la adición de sustancias con un posible efecto beneficioso sobre el material seminal, como: la plasmina en eyaculados de toro (Taitzoglou *et al.*, 2004), la angiotensina II en espermatozoides de equino (Ball *et al.*, 2003), y

el 2-Hidroxipropil-Beta-Ciclodextrina (Zeng y Terada, 2001) o la PGF_{2α} (Maes *et al.*, 2003), sobre las características móviles del semen de verraco.

También han contribuido de forma decidida al estudio de las consecuencias de distintos tratamientos tecnológicos sobre la movilidad seminal, como la centrifugación (Brinsko *et al.*, 2000) o la conservación de semen refrigerado (Vyt *et al.*, 2004a; de Ambrogi *et al.*, 2006). Dentro de este apartado, han sido los efectos de la criopreservación, tanto sobre la movilidad como sobre la morfometría de los espermatozoides, los más ampliamente estudiados, convirtiéndose la técnica de análisis por imagen digital en una herramienta realmente imprescindible para el análisis del efecto de los procesos de congelación-descongelación (Amann y Katz, 2004). Si bien, en la práctica totalidad de especies de interés para el hombre se han llevado a cabo estudios sobre la acción de los procesos de crioconservación, hay que hacer notar que es en la especie porcina (junto con la humana), donde un mayor esfuerzo investigador se ha desarrollado en el estudio de las consecuencias de esos procesos sobre la cinética (Eriksson y Rodríguez-Martínez, 2000; Thurston *et al.*, 2003; Cremades *et al.*, 2005; Saravia *et al.*, 2005) y la morfometría espermática (Thurston *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2005b).

Los sistemas CASA nos han permitido caracterizar, de forma objetiva, procesos fisiológicos como la maduración espermática en el epidídimo, tanto cinética (Soler *et al.*, 1994) como morfométricamente (Soler *et al.*, 2000); o el proceso de hiperactivación, habiendo sido descrito los patrones de movilidad de los espermatozoides que sufrían dicho fenómeno en las especies domesticas, como en el cerdo (Schmidt y Kamp, 2004; García-Herreros *et al.*, 2005); y por supuesto, en el hombre (Mortimer, 1997).

2.5.4.3 Empleo de los sistemas CASA en la predicción de la fertilidad

Durante los primeros años de aplicación de esta nueva tecnología, surgieron fuertes esperanzas de que con ella se conseguirían mejorar las predicciones de los resultados de fertilidad (Mortimer, 2000), no obstante, aunque en casos concretos, si se ha observado una mejoría en los índices de correlación descritos (Rodríguez-Martínez, 2003b); debemos recordar la incapacidad de un solo parámetro (aunque este sea medido de forma objetiva) para predecir los resultados de un proceso tan complejo.

Son numerosos los estudios (citados por Blanco, 1998) realizados en la especie humana encontrándose, en muchos de ellos, la existencia de correlaciones significativas entre los parámetros cinéticos con la penetración del mucus cervical, la fecundación *in vivo* y la

fecundación *in vitro*; siendo mucho menos frecuentes los trabajos que indican la falta de dichas correlaciones (Grunert *et al.*, 1989; Hinting *et al.*, 1990).

Una situación similar es aplicable a las especies de interés zootécnico, si bien, el número de estudios realizados para ellas es sensiblemente menor (Blanco, 1998).

De forma genérica, no parece claro que las características de la motilidad espermática puedan tener un valor muy elevado como predictores de la fertilidad (Aitken *et al.*, 1985; Amann, 1989). Aunque los valores de VCL, VSL y VAP han demostrado ser, en conjunto, mayores en las muestras de semen humano que producían la fecundación de más del 50 % de los ovocitos disponibles en una prueba de FIV (Donnelly *et al.*, 1998); dentro de estos tres parámetros, parece ser la VCL la que tiene una mayor importancia en la estimación de fertilidad (Holt *et al.*, 1984; 1985; Liu *et al.*, 1991; Marshburn *et al.*, 1992; De Geyter *et al.*, 1998; Shibahara *et al.*, 2004).

Los citados Donnelly *et al.* (1998), describieron como el valor de la ALH es más bajo en las muestras menos fértiles, datos similares fueron obtenidos por Liu *et al.*, (1991) y Sukcharoen *et al.*, (1996), aunque no existía correlación directa con la fertilidad.

La BCF parece no presentar diferencias entre los eyaculados de alta/baja fertilidad (Donnelly *et al.*, 1998), mientras que para el LIN y el STR, Sukcharoen *et al.* (1995 y 1996) afirman que están correlacionadas negativamente con la fertilidad tras el proceso de fecundación *in vitro*.

Por otra parte en un estudio con hombres sin ningún tipo de problema andrológico, fue el porcentaje de espermatozoides móviles el único en presentar una correlación significativa con la fertilidad de sus respectivas parejas (Larsen *et al.*, 2000).

La determinación de los espermatozoides hiperactivados en una muestra seminal, sometida a un proceso de FIV, mediante estos sistemas computerizados, se constituye también como una herramienta útil en la estimación de los resultados de la fertilidad subsiguiente, debido a la gran importancia fisiológica de este hecho (Verstegen *et al.*, 2002).

Si bien, los trabajos en los que se analizan los parámetros cinéticos individualmente pueden ser interesantes, parece más informativo desarrollar estrategias en las que combinemos mediante modelos de regresión los valores de varios de ellos y de esta manera contar con una descripción más amplia de las características de motilidad espermática. Siguiendo este planteamiento Farrell *et al.* (1998), encontraron un sorprendentemente alto índice de regresión ($r^2 = 0,98$) entre los resultados de fertilidad medidos mediante el índice de no retorno al celo a los 59 días y un modelo de regresión formado por los parámetros: ALH, BCF, LIN, VAP y VSL; siendo el mayor índice de correlación encontrado en un parámetro individual, concretamente la ALH de los espermatozoides progresivos, igual a 0,68.

La posibilidad de hacer un estudio detallado de la composición de las subpoblaciones dentro de un eyaculado, ha permitido correlacionar la distribución de las mismas con los resultados de fertilidad, obteniéndose resultados positivos para el semen de caballo (Quintero-Moreno *et al.*, 2003b).

Los trabajos en que se estudian las correlaciones de las características de movilidad de los espermatozoides porcinos con las posterior fertilidad, son escasos y los resultados no demasiado alentadores; Blanco (1998) no encuentra ninguna correlación entre las variables cinéticas medidas y la fertilidad en granja; Holt *et al.* (1997), constatan como el cambio sufrido por los parámetros cinéticos y el valor final de estos, tras dos horas de incubación a 39° C, en ambos casos realizando un modelo de regresión múltiple, eran los mejores indicadores de la fertilidad obtenida en granja en comparación con otras pruebas, como el número de espermatozoides que presentaban reacción acrosómica de forma natural o que la sufrían tras ser convenientemente inducidos, aunque las correlaciones descritas eran más bien bajas. Finalmente Hirai *et al.* (2001), observan, entre dos grupos de verracos diferenciados entre si por presentar las cerdas inseminadas un índice de no retorno al cielo (NRR) superior/inferior al 86%, como no existían diferencias significativas entre el porcentaje de espermatozoides móviles de los verracos de ambos grupos; sin embargo los machos con un más alto NRR el porcentaje de espermatozoides con una VAP era significativamente mayor. Cuando la comparativa hacía referencia al tamaño de camada, eran los verracos con un porcentaje significativamente mayor de espermatozoides motiles los que presentaban un porcentaje mayor de lechones nacidos vivos.

El análisis morfológico seminal ha demostrado, en diversos estudios (ver Verstegen *et al.*, 2002), ser un parámetro correlacionado con la fertilidad, sin embargo, los estudios de correlación entre la morfometría y los resultados reproductivos son escasos. En un estudio retrospectivo, llevado a cabo en espermatozoides humanos, Aziz *et al.* (1998), constatan como en las parejas que tenían éxito reproductivo, las cabezas espermáticas del padre presentan un área significativamente más pequeña (y con una menor dispersión) y una elongación mayor, que las de aquellos hombres que no habían podido concebir.

En la especie porcina Hirai *et al.* (2001), describen como las cabezas espermáticas de los individuos más fértiles presentan un área significativamente menor, pero a diferencia de lo observado en la especie humana, son menos alargadas y más anchas. Los mismos autores observan, en contraposición, que los machos más prolíficos presentan un área cefálica significativamente mayor, mientras que la dimensión del eje longitudinal era significativamente más largo que la de aquellos machos que presentan camadas cortas.

Los espermatozoides de caballos con mejores resultados reproductivos, a similitud de los casos anteriores, presentan un área, así como una longitud y perímetro, significativamente mayores que los de aquellos sementales catalogados como subfértiles (Casey *et al.*, 1997).

2.5.4.4 Utilización de los sistemas CASA para la determinación de la concentración espermática

Una de las posibilidades de uso de los sistemas computerizados de análisis seminal, que no hemos mencionado hasta el momento, es la determinación de la concentración de una muestra espermática. Esta medida, conceptualmente es muy sencilla, ya que conocemos tanto el volumen de los campos donde hemos realizado el análisis como el número de espermatozoides contados. Sin embargo, lo que se debería haber constituido en un gran avance en la evaluación seminal, la valoración por un mismo sistema de la concentración y la motilidad (en todos sus aspectos), no se ha llevado a la práctica debido al gran número de estudios que demuestran la existencia de importantes diferencias entre los resultados obtenidos por los sistemas CASA y los procedimientos tradicionalmente usados como referencia (hematocitómetros fundamentalmente) en la medida de la concentración (Mortimer y Mortimer., 1988; Neuwinger *et al.*, 1990b; Chan *et al.*, 1990; Davis *et al.*, 1992; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001; Spiropoulos, 2001; Vyt *et al.*, 2004).

Diversas explicaciones se han propuesto para las inexactitudes en la medida de la concentración por estos sistemas:

- La identificación de desechos celulares como espermatozoides (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001; Verstegen *et al.*, 2002).
- El relativamente bajo número de espermatozoides analizados por el sistema CASA (Verstegen *et al.*, 2002).
- El efecto de la movilidad espermática sobre la medida de la concentración (Coetzee y Menkveld, 2001).
- La distribución no homogénea de los espermatozoides dentro de la cámara de recuento (Johnson *et al.*, 1996 a; b; Mahmoud *et al.*, 1997; Seaman *et al.*, 1996).

Los trabajos de investigación encaminados a solventar la incapacidad de los sistemas CASA en la determinación de la concentración han continuado, así en 2005 Douglas-Hamilton *et al.*, describen como en la cámara de recuento Leja se producía una distribución no homogénea de las células espermáticas, debido a un hecho físico que acontece cuando un fluido se desplaza por capilaridad, conocido como el “efecto Segre-Silberberg”, además estos autores desarrollan una fórmula de ajuste para corregir las desviaciones que se producían por dicho efecto. No obstante, estas fórmulas serán solo de aplicación en la cámara Leja[®], siendo necesario calcularlas para cada cámara de recuento empleada.

La tecnología de análisis por imagen digital ha sido aplicada con más éxito a otros sistemas para la determinación de la concentración; en el caso del sistema Nucleocounter[®] (Chemometec, Dinamarca) tras realizar una tinción con yoduro de propidio de una muestra espermática, esta es transferida a una cámara de recuento, donde tras una iluminación con luz de λ apropiada, se toma una imagen vía CCD, contándose en dicha imagen el número de puntos fluorescentes existentes, asimilando que cada punto se corresponde con un espermatozoide. Los resultados de este sistema de medida no han presentado diferencias con los obtenidos por un hematocitómetro o por espectofotometría (Tejerina *et al.*, 2006a).

2.5.4.5 Uso de los sistemas CASA en la determinación de subpoblaciones espermáticas

La existencia, dentro de un eyaculado, de espermatozoides con características distintas en base a parámetros bioquímicos (Calamera *et al.*, 2003) o test funcionales (Petrunina y Topfer-Petersen, 2000; Pérez-Llano *et al.*, 2003) es un hecho bien conocido; pero hasta hace relativamente poco tiempo, aunque se intuía, era muy difícil confirmar la misma estructuración en función de características cinéticas o morfométricas, debido a que solo se disponían de métodos de valoración cuyo resultado era un valor global que definía a toda la población sin prestar atención a los atributos individuales de cada célula. El planteamiento tradicional asume, por tanto, que la población espermática está homogéneamente distribuida; esto implicará una pérdida considerable de información relevante, ya que quizás sólo una parte de esa población sea realmente fecundante. Por lo tanto, si esta población predominante no es demasiado grande, sus características se verán totalmente enmascaradas por el conjunto de las células, si los resultados son tratados de una forma global dentro del eyaculado. Quizás, esta situación explique fenómenos como la poca validez que tiene el estudio de la motilidad global de un eyaculado en algunas especies como el cerdo; considerando que los resultados de motilidad entendidos globalmente tienen muy poca fuerza estadística como parámetros a considerar en un análisis seminal clásico (Rigau *et al.*, 1996).

Las incorrecciones de la teoría clásica comenzaron a ponerse al descubierto con los primeros estudios de cartografía manual, al desvelarse por parte de Van Djuin y Rikmenspoel (1960) (citados en Amann y Katz, 2004) que los parámetros cinéticos no seguían una distribución normal; pero no fue hasta la llegada de los sistemas CASA cuando se pudo realizar de forma eficaz la descripción de esta realidad, al comprobarse con sencillez la medición de los parámetros cinéticos y morfométricos de forma individualizada sobre cada espermatozoide. Una vez conocidos estos, es relativamente fácil clasificar mediante funciones

estadísticas adecuadas a las células en subpoblaciones, surgiendo la posibilidad de estudiar la distribución de las mismas tras procesos tecnológicos o correlacionarlas con la fertilidad.

Fruto de este nuevo planteamiento han aparecido diversos estudios que definen subpoblaciones dentro de cada eyaculado en función de los parámetros cinéticos, en especies tan diversas como el hombre (Davis *et al.*, 1991; 1995), el mono (Holt *et al.*, 1996), el caballo (Quintero-Moreno, 2003b), la gacela (Abaigar *et al.*, 1999, 2001), el burro (Miro *et al.*, 2005), el ciervo (Martínez-Pastor *et al.*, 2005a; b; 2006), aunque ha habido una en la que la profusión de trabajos a destacado por encima de las demás: el cerdo (Abaigar *et al.*, 1999; Thurston *et al.*, 2001; Quintero-Moreno *et al.*, 2004; Cremades *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2005; 2006). Estos estudios han puesto de manifiesto, en primer lugar, la existencia de esa estructura subpoblacional, y en segundo lugar, la relación entre su distribución y los procesos de almacenamiento y congelación que sufre el semen, y los cambios estacionales a los que se ve sometido el macho.

Los estudios relativos a subpoblaciones morfométricas son más escasos, habiéndose comprobado su existencia en los eyaculados de perro (Núñez-Martínez *et al.*, 2006) y en el verraco (Peña *et al.*, 2005b); en esta misma especie Thurston *et al.*, (2001) describieron la existencia de subpoblaciones espermáticas definidas a partir de la aplicación, a las imágenes de las cabezas de los espermatozoides, de descriptores de Fourier, aunque en este caso, más que por sus morfometría, las subpoblaciones fueron definidas por las características morfológicas.

Si importante es disponer de datos individualizados de cada célula, de igual relevancia es diseñar un procedimiento estadístico que nos permita obtener la mayor información de esos datos a la hora de estructurar las subpoblaciones espermáticas. Los métodos utilizados han sido muy diversos, variando en función de los autores de los trabajos:

-Davis *et al.* (1995) usan un procedimiento multipaso combinando el método de las K-medias y el análisis discriminante multivariable.

-Holt *et al.* (1996) utilizan una clasificación no jerárquica (basada en el método de las K-medias) y a continuación dos clasificaciones jerárquicas utilizando los algoritmos UPGMA (*unweighted pair groups median average*) y WPGMC (*weighted pair-group method using centroids*).

-Abaigar *et al.* (1999; 2001) y Cremades *et al.* (2005), realizan el análisis estadístico mediante el software PATN (Pattern Analysis Package), realizando en primer lugar una clasificación no jerárquica usando algoritmos no paramétricos, a continuación ejecutan una clasificación jerárquica mediante el algoritmo UPGMA, sometiendo a los grupos resultantes a una nueva clasificación jerárquica mediante el módulo FUSE. Los grupos definidos son examinados mediante un análisis de componentes principales (PCA) para reducir el número

de variables que definen cada grupo de observación a un número pequeño de vectores. Finalmente se aplica el procedimiento de correlación de ejes principales, siendo este un programa de regresión lineal múltiple encargado de comprobar como los grupos resultantes del PCA se distribuyen espacialmente en comparación con los grupos iniciales.

-Quintero-Moreno *et al.* (2003a; b; 2004; 2007), han seguido métodos más simples, eligiendo las variables más representativas por medio de agrupamiento jerárquico, para a continuación realizar un agrupamiento no jerárquico mediante el método de las K-medias.

-Núñez-Martínez *et al.* (2006) y Peña *et al.* (2005b) a partir de los resultados obtenidos del sistema CASA realizan un PCA, obteniendo un número menor de variables informativas, con lo que simplifican el análisis, para a continuación realizar un agrupamiento por el método de las K-medias, seguido de un análisis de regresión encaminado a validar los grupos obtenidos en el análisis anterior.

- Por último Martínez-Pastor *et al.* (2005a; b; 2006) realizan, en primer lugar, un PCA, seguido de una clasificación no jerárquica, definiendo el centro de los grupos mediante el modelo de las K-medias, para a continuación realizar una clasificación jerárquica mediante el procedimiento UPGMA, que defina el número total de subpoblaciones.

Cada procedimiento utilizado tiene sus ventajas/desventajas, así el agrupamiento no jerárquico elimina los datos *outliers* (Martínez-Pastor *et al.*, 2005); mientras que del PCA se obtienen nuevas variables no correlacionadas que aportan importante información descriptiva válida para la interpretación de los resultados.

Resulta llamativo que en las distintas especies animales en las que se ha realizado la determinación del número de subpoblaciones, en función de sus parámetros cinéticos/morfométricos, independientemente del método estadístico empleado, y en la mayoría de los casos, el número de grupos definidos por eyaculado son 3 o 4, dicha homogeneidad resulta un hallazgo sorprendente, al trabajar con especies filogenéticamente bastante distantes (Quintero-Moreno *et al.*, 2004).

El origen de la formación de estas subpoblaciones es aún una fuente de discusión entre los diversos investigadores; aunque muchos de los estudios citados anteriormente especulan que el origen se podría encontrar en el proceso de la espermatogénesis, donde la existencia de espermátidas con distinto genotipo originará espermatozoides con distintas capacidades, una vez que estos hayan terminado su proceso de maduración (Peña *et al.*, 2005b; Núñez-Martínez *et al.*, 2006; Abaigar *et al.*, 1999; Thurston *et al.*, 2001).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 PRODUCTOS Y SOLUCIONES

Tabla 3. Reactivos empleados en la realización de las soluciones y medios.

PROVEEDOR	PRODUCTO	REFERENCIA CATÁLOGO
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steingeim, Alemania.	Carboxifluoresceína	C8166
	Yoduro de propidio	P4170
	Bicarbonato sódico	S 5761
	Cafeína	C-0750
	Glutaraldehido 25%	G6257
	Lactosa	L8783
	DABCO	D2522
	PNA	L7381
	Sulfato magnésico	M9397
	PBS	P4244
	DMSO	D5879
	HEPES	H3375
	Albúmina sérica bovina (BSA)	A7906
	Lactato sódico	L4263
	Piruvato sódico	P4562
	Cloruro potásico	P3911
Acofarma S.A., Tarrasa, España.	Glucosa anhidra	14732
	Glicerol	14691
Panreac Quimica S.A., Castellar del Vallès, España.	Citrato sódico	131655
	Xileno	211769
	Aceite de inmersión	251002
	DPX [®] (resina de montaje)	255254
Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania.	Dodecil-sulfato sódico	13560/0008

PROVEEDOR	PRODUCTO	REFERENCIA CATÁLOGO
Vorquímica S.A., Vigo, España.	Formaldehido	3F0351
Medion Diagnostics GmbH, Düdingen, Alemania.	Diff-Quik	130833
Merck KGaA, Darmstadt, Alemania.	Cloruro sódico	1.06404.0500
	Cloruro cálcico	1.02382.0500
	Hidrogeno fosfato de sodio	1.06346.0500

En las siguientes tablas se detallan las diferentes soluciones preparadas. El resto de datos de importancia, relativos al modelo y/o fabricante de los equipos y utensilios que fueron empleados en este trabajo se recogen en los epígrafes del 3.3 al 3.9.

Para el pesaje previo de los reactivos se empleó una balanza de precisión AB204-S (Mettler-Toledo, Nueva York, EEUU), mientras que para conseguir una correcta dilución de los mismos se utilizó un agitador magnético Basicmagmix (Lovango S.L., Barcelona, España). Todas las soluciones se prepararon con agua ultrapura Milli-Q proporcionada por un dispensador Milli-Q Synthesis A10 (Millipore Corporation, Bedford, EEUU).

Tabla 4. Diluyente de refrigeración.

Lactosa Monohidratada	11,0 % p/v
Yema de huevo	20,0 % v/v
Aqua Milli Q	C.S.

La solución una vez preparada se almacenó a 15 °C hasta el momento de su utilización.

Tabla 5. Diluyente de congelación.

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

La solución una vez preparada se almacenó a 5 °C hasta el momento de su utilización.

Tabla 6. Solución de glutaraldehído al 2%.

Preparar una solución inicial con:

Citrato sódico	1,0 % p/v
Glucosa anhidra	2,9 % p/v
Bicarbonato sódico	0,2 % p/v
Agua Milli Q	100 ml

De la solución anterior se toman 92 ml y se les adicionan:

Glutaraldehído al 25%	8 ml
-----------------------	------

La solución una vez preparada se almacenó a 4 °C hasta el momento de su utilización.

Tabla 7. Solución stock de PNA-FITC.

PNA-FITC	0,2 mg/ml
PBS	C.S.

La solución una vez preparada se alicuotó en fracciones de 1 ml que se almacenaron en tubos Eppendorf a una temperatura de -20 °C protegidos de la luz, hasta el momento de su utilización.

Tabla 8. Solución stock de Ioduro de Propidio.

Ioduro de Propidio	0,5 mg/ml
Suero Salino Fisiológico	C.S.

La solución una vez preparada se alicuotó en fracciones de 1 ml que se almacenaron en tubos Eppendorf a una temperatura de -20 °C protegidos de la luz, hasta el momento de su utilización.

Tabla 9 Solución stock de Carboxifluoresceína.

Carboxifluoresceína	0,46 mg/ml
DMSO	C.S

La solución una vez preparada se alicuotó en fracciones de 1 ml que se almacenaron en tubos Eppendorf a una temperatura de -20 °C protegidos de la luz, hasta el momento de su utilización.

Tabla 10. Solución Formolada.

Formaldehído	0,3% p/v
Suero salino fisiológico	C.S.

La solución una vez preparada se almacenó a 5 °C hasta su utilización.

Tabla 11. Medio completo de Tyrode (MCT).

Cloruro sódico	96,0 mM.
Cloruro potásico	4,7 mM.
Potasio magnésico	0,4 mM.
Hidrogeno fosfato de sodio	0,3 mM.
Glucosa	5,5 mM.
Piruvato sódico	1,0 mM.
Lactato sódico	21,6 mM.
Cloruro cálcico	0,5 mM.
Bicarbonato sódico	10,0 mM.
HEPES (pH 7,45)	20,0 mM.
BSA (Fracción V)	3,0 mg/ml.
Agua Milli Q	C.S.

La solución final fue filtrada utilizando filtros Millex[®] (Millipore Corporation, Bedford, EEUU) de 0,22 μm de tamaño de poro y fue almacenada a 5 °C hasta su utilización. La osmolaridad del medio fue de 310 mOsm/kg y el pH a 38 °C fue 7,45. Previamente a su empleo el medio fue equilibrado con un 5% de CO₂ a 39 °C.

3.2 ANIMALES EMPLEADOS

Este trabajo experimental fue desarrollado en las instalaciones del centro tecnológico de I.A. porcino CENTROTEC S.A., sito en la localidad leonesa de Campo de Villavidel. Dicha instalación cuenta con un plantel de 120 verracos en producción, de los cuales, seleccionamos una decena para la recolección de los eyaculados necesarios en la realización de nuestros experimentos. Los criterios para la elección de los machos fueron su edad (se desecharon los machos excesivamente viejos y los excesivamente jóvenes), de manera que los elegidos tenían, al comenzar la congelación seminal, una edad comprendida entre 12 y 30 meses; y un historial de espermigramas normal. De los 10 machos escogidos, 5 eran de raza Landrace y otros tantos de raza Large White. Se realizaron 5 procesos de criopreservación con cada uno de los individuos seleccionados (en total 50 congelaciones). Los verracos se encuentran alojados en corrales individuales de 2,5 m x 2,5 m (6,25 m²), en el interior de una nave con una temperatura controlada durante todo el año entre 18 y 22 °C y un fotoperiodo constante de 12 h de luz al día.

Los animales disponen de comederos individuales y fueron alimentados una vez al día con una ración de pienso C7 suministrado por la empresa UVESA, formulado especialmente para verracos. La cantidad media que recibía cada individuo era de 2,5 kg, ajustándose dicha

cantidad de acuerdo a la evolución de su índice corporal, fijado sistemáticamente cada 15 días. Los machos disponen de agua *ad libitum*, suministrada por bebederos de cazoleta.

El manejo de los verracos fue el típico en esta clase de explotaciones, siendo la frecuencia de extracción de tres saltos cada dos semanas.

Los eyaculados empleados en la realización de este trabajo fueron extraídos entre los meses de Septiembre de 2005 y Febrero de 2006. Nuestra intención fue realizar las 5 congelaciones de los eyaculados de un mismo macho en semanas consecutivas, no siendo posible en ciertas ocasiones por razones operativas y comerciales del centro. En la Tabla 12 se indican los machos a los que se realizaron las extracciones, así como su raza, su edad en el momento de la primera congelación y las fechas en las que estas se llevaron a cabo.

Tabla 12. Machos empleados en el trabajo experimental (LW: Large White, LD: Landrace).

Macho	Raza	Edad	Primera congelación	Segunda congelación	Tercera congelación	Cuarta congelación	Quinta congelación
E955	LW	30 meses	09/09/2005	14/09/2005	27/09/2005	14/10/2005	28/10/2005
G5223	LW	14 meses	11/11/2005	18/11/2005	30/11/2005	06/12/2005	13/12/2005
T475	LW	20 meses	02/12/2005	16/12/2005	22/12/2005	28/12/2005	03/01/2006
G2552	LW	21 meses	20/12/2005	04/01/2006	11/01/2006	18/01/2006	24/01/2006
G6328	LW	15 meses	11/01/2006	20/01/2006	25/01/2006	30/01/2006	08/02/2006
L69	LD	18 meses	14/09/2005	27/09/2005	07/10/2005	19/10/2005	28/10/2005
R5487	LD	12 meses	11/11/2005	18/11/2005	30/11/2005	16/12/2005	27/12/2005
R4052	LD	18 meses	02/12/2005	09/12/2005	13/12/2005	20/12/2005	27/12/2005
R3846	LD	19 meses	22/12/2005	28/12/2005	03/01/2006	10/01/2006	17/01/2006
L437	LD	20 meses	04/01/2006	10/01/2006	17/01/2006	24/01/2006	08/02/2006

3.3 RECOLECCIÓN Y VALORACIÓN RUTINARIA SEMINAL

La extracción seminal se realizó en un potro fijo (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania) mediante el método de la mano enguantada (Hancock y Hovell, 1959), previa limpieza de la zona prepucial externa con una solución de amonio cuaternario y vaciado de la cavidad prepucial. La fracción rica del eyaculado se recogió en una bolsa de plástico desechable (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania) de 3500 ml de capacidad, la cual dispone de un filtro encargado de retener la secreción gelatinosa de las glándulas bulbouretrales. Previamente a la extracción, en la bolsa de recogida, se vertieron 100 ml del diluyente MR-A[®] (Kubus S.A., Majadahonda, Madrid), esta bolsa estaba contenida en un termo (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania); y todo el conjunto se mantuvo atemperado en una estufa

Function Line (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Alemania), a 37 °C hasta el momento de su utilización.

Una vez finalizada la eyaculación, el filtro se desprendió de la bolsa de recogida y esta se trasladó al laboratorio, realizándose en él la valoración rutinaria seminal. En primer lugar se midió el volumen eyaculado, de manera indirecta, mediante pesaje de la bolsa en una balanza BL-6 (Sartorius AG, Goettingen, Alemania); cuyo dato, al igual que posteriormente la concentración, es procesado en el programa IDEE (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania), el cual tiene en cuenta el volumen inicial de diluyente añadido en la bolsa de recogida y el peso de dicha bolsa. A continuación la bolsa de recogida se mantuvo a 32,5 °C durante el periodo en el que se llevaron a cabo las demás pruebas de contrastación seminal; para lo cual se depositó en un contenedor plástico situado en el interior de un baño termostático Prescidig (J.P. Selecta S.A., Abrera, España). De cada eyaculado se recogieron 60 microlitros que fueron depositados en una cubeta plástica (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania) previamente cargada con 3 ml de diluyente MR-A, dicha cubeta fue introducida en un fotómetro SDM-5 (Minitüb, Tiefenbach, Alemania) para determinar la concentración espermática. A continuación, a partir de otra muestra de 60 microlitros del eyaculado diluida en 1 ml de diluyente en un tubo Eppendorf se realizaron las siguientes valoraciones:

- Porcentaje de movilidad y calidad de movimiento, de forma subjetiva, depositando mediante una pipeta Pasteur una gota entre un portaobjetos (76 mm x 26 mm) y un cubreobjetos (20 mm x 20 mm) (método de gota plana), previamente atemperados en una platina HT-200 (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania) calefactada a 39 °C. La observación se llevo a cabo en un microscopio Eclipse E-400 (Nikon, Tochigi, Japón) con un objetivo de contraste de fases positivo de 20X y un ocular de 10X. Así mismo, el microscopio disponía de una platina calefactada a 39 °C. El porcentaje de movilidad se expresó en múltiplos de 5, mientras que para la calidad de movimiento se utilizó la escala propuesta por Martín-Rillo *et al.* (1996), basada en la actividad de la función flagelar espermática, valorada de forma subjetiva:

- 0: espermatozoides inmóviles o muertos.
- 1: espermatozoides sin movimiento progresivo, girando sobre si mismos.
- 2: células espermáticas con movimientos anormales o eventualmente progresivos.
- 3: espermatozoides con movimiento progresivo lento y sinuoso.
- 4: espermatozoides con movimiento progresivo rápido.
- 5: espermatozoides con movimiento progresivo muy rápido.

• Recuento de morfoanomalías espermáticas: A la alícuota inicial se le añadieron 10 μ l de una solución de glutaraldehído al 2% (Tabla 6), una gota de esta muestra fijada se depositó entre portaobjetos y cubreobjetos mediante una pipeta Pasteur. La observación se realizó en un microscopio Eclipse E-400, mediante un objetivo de 400X utilizando un contraste de fases positivo. Se realizó el conteo de 100 espermatozoides, que fueron clasificados en las siguientes clases:

- Espermatozoides morfológicamente normales.
- Espermatozoides con gota citoplasmática proximal.
- Espermatozoides con gota citoplasmática distal.
- Espermatozoides con anomalías en la cola.
- Espermatozoides con anomalías en la cabeza.

3.4 PROCESO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN

Solo fueron aceptados para ser sometidos al proceso de crioconservación aquellos eyaculados que presentaban más de un 75% de espermatozoides móviles, pertenecían a los grupos 3, 4 y 5 de calidad de movimiento, tuvieran más de un 75% de formas normales y más de un 90% de acrosomas íntegros. La valoración de la integridad acrosómica, se llevo a cabo empleando una coloración fluorescente de PNA, tal como se describe en el apartado 3.7.

Se empleó la técnica de congelación descrita por Bwanga *et al.* (1990), basada en el protocolo de Westendorf *et al.* (1975), sobre la que Peláez (2003) realizó pequeñas modificaciones en las etapas iniciales del periodo de incubación. Así, una parte del material seminal, el volumen que contuviese 12000 x 10⁶ espermatozoides móviles, se diluyó (1:2) en un vaso de precipitados con MR-A[®] (teniendo en cuenta la dilución inicial producida en el momento de la recogida), previamente atemperado a 32,5 °C. La dilución se incubó a la temperatura ambiente del laboratorio (20-22 °C), durante 1 hora. Tras esta incubación, se transfirió a una sala climatizada a 15 °C, donde permaneció por espacio de 3 horas. Transcurrido este tiempo se repartió, a partes iguales, en tubos de centrifuga de 50 ml, que se mantuvieron atemperados a 15 °C en la misma estancia, hasta el momento de su utilización. La suspensión espermática contenida en dichos tubos se sometió a una centrifugación en un equipo Heraeus Megafuge 1.0 R (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Alemania), a 800 g durante 10 minutos y 15 °C. Finalizado el proceso, se descartó el sobrenadante y el *pellet* resultante fue diluido con el diluyente de refrigeración (Tabla 4). Éste, había sido preparado el mismo día y mantenido a 15 °C en una probeta hasta el momento de su adición. La dilución se

realizó en el mismo tubo de centrifuga, añadiendo el volumen suficiente de medio para alcanzar una concentración de 1.500×10^6 de espermatozoides/ml, a continuación se sometió a una homogenización en un agitador vortex (VWR international, Pennsylvania, EEUU), utilizando una intensidad suave de vibración. Una vez homogeneizada la suspensión, el tubo de plástico se introdujo en un vaso de precipitados con agua a 15 °C y este en una cámara frigorífica a 5 °C. De esta manera se consiguió evitar un fuerte contraste de temperaturas en los primeros momentos de la incubación a 5 °C.

La suspensión espermática permaneció dentro de la cámara por un espacio de 2 horas; tras este periodo de tiempo la diluimos de nuevo (2:1), en este caso, con el diluyente de congelación (Tabla 5). Este había sido preparado, igualmente, en el día y conservado a 5 °C. La concentración espermática final fue de 1000×10^6 de espermatozoides/ml, mientras que la concentración final de glicerol fue del 3% v/v. La solución, tras su homogenización, fue rápidamente envasada en minipajuelas de 0,25 ml (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania), mediante un equipo automático MPP 133 (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania), estando este situado dentro de la cámara frigorífica a 5 °C. Dichas pajuelas fueron previamente impresas con el número de identificación del macho, la fecha, la raza del verraco y el número de orden de la congelación mediante una impresora de pajuelas Easy Coder (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania).

Tras su llenado, las minipajuelas fueron inmediatamente trasladadas a la cámara de un biocongelador programable Ice Cube 1810 (Sy-Lab, Purkersdorf, Austria). Este, previamente se había puesto en funcionamiento para que alcanzase una temperatura inicial de 5 °C; a continuación se aplicó un programa trifásico de enfriamiento: 3 °C/min desde +5 °C hasta -6 °C, mantenimiento a -6 °C durante 1 minuto y bajada de temperatura a razón de 20 °C/min desde -6 °C hasta -100 °C. Una vez que se alcanzó esta temperatura, las pajuelas se introdujeron en un contenedor de almacenamiento de nitrógeno líquido a -196 °C.

Las pajuelas se conservaron durante al menos una semana, hasta proceder al análisis de las características seminales. Con el objetivo de reducir variaciones achacables a las distintas condiciones a las que pudieron estar sometidas durante el proceso de congelación, los análisis postdescongelación se realizaron sobre un *pool* del contenido de tres pajuelas de cada eyaculado criopreservado. Para llevar a cabo el proceso de descongelación las pajuelas se sumergieron en un baño termostático a 50 °C durante 12 segundos (Bwanga *et al.*, 1990). Una vez descongelado, el material seminal se transfirió a un tubo de centrifuga de 50 ml, donde se diluyó con el medio BTS [*Betsville Thawing Solution* (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania)] (Pursel y Johnson, 1975) a 32,5 °C o MR-A Thaw[®] (Kubus S.A., Majadahonda, España) a 20 °C; en este último caso siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante. En ambos diluyentes la concentración final de la suspensión espermática fue de 50×10^6 de espermatozoides/ml.

3.5 METODOLOGÍA GENERAL DEL ANÁLISIS DE LA MOTILIDAD DE ESPERMATOZOIDES DE VERRACO MEDIANTE EL SISTEMA “INTEGRATED SEMEN ANALYSIS SYSTEM” (ISAS[®])

3.5.1 Preparación de la muestra

Las muestras para el análisis de la motilidad mediante el sistema computerizado ISAS[®] (PROISER R+D, Paterna, España) fueron recogidas, tras una correcta homogeneización, del volumen total de semen sometido al proceso de congelación-descongelación, en 4 puntos críticos del mismo. Así, como en otros dos momentos del periodo de incubación en el medio de capacitación MCT tras la descongelación:

- Previamente a la incubación a temperatura ambiente (tiempo 0 horas).
- Anteriormente a la centrifugación, tras la conservación a 15 °C (tiempo 4 horas).
- Previamente a la adicción del glicerol y antes del proceso de envasado (tiempo 6 horas).
- Tras el proceso de descongelación y previa incubación durante 10 minutos a 32,5°C.
- A los 30 minutos de haber comenzado la incubación en el medio MCT.
- A los 60 minutos de haber comenzado la incubación en el medio MCT.

Los volúmenes recogidos variaron en función del punto de toma de muestra durante el proceso de congelación, dada la distinta concentración que presentaba en ellos el material seminal. Se tomó en cada caso el suficiente volumen, para una vez diluido en un tubo de centrifuga de 15 ml con el medio MR-A[®], se alcanzase una concentración final de 50×10^6 de espermatozoides/ml y un volumen final de 2 ml. De esta suspensión se tomaron 500 μ l que fueron diluidos en un volumen similar de MR-A[®], (concentración final de 25×10^6 de espermatozoides/ml) en un tubo Eppendorf; mientras que otros 500 μ l fueron diluidos con el mismo volumen de MR-A[®] enriquecido con una concentración de cafeína de 2 mM. Con esta operación se consiguió que la concentración espermática final fuese de 25×10^6 de espermatozoides/ml en ambas alícuotas, mientras que en la segunda se conseguía una concentración de cafeína de 1 mM. Utilizamos dicha sustancia debido a su capacidad para conseguir una mayor expresión de la capacidad motil de los espermatozoides en su presencia (Peláez, 2003) y también al postularse (Abaigar *et al.*, 1999), que con ella se consigue una mejor separación de las subpoblaciones definidas a partir de los parámetros cinéticos.

La muestra tomada posteriormente a la descongelación fue obtenida tras someter a este proceso a 3 pajuelas espermáticas (tomadas al azar) de cada uno de los eyaculados. Una vez descongeladas fueron diluidas en BTS o MR-A Thaw[®] en un tubo de centrifuga de 50 ml, hasta alcanzar una concentración de 50×10^6 de espermatozoides/ml. Dicho tubo, fue introducido en un baño termostático a 32,5 °C durante 10 minutos. Transcurrido este periodo de tiempo se tomaron 500 µl que fueron diluidos en un volumen similar de BTS o MR-A Thaw[®], atemperado a 32,5 °C (concentración final de 25×10^6 de espermatozoides/ml) dentro de un tubo Eppendorf. Otros 500 µl fueron diluidos con el mismo volumen de BTS o MR-A Thaw[®] (igualmente atemperado) enriquecido con una concentración de cafeína de 2 mM. De esta manera la concentración espermática fue de 25×10^6 de espermatozoides/ml, y se alcanzó una concentración final de cafeína de 1 mM en ambos diluyentes.

En el caso de las muestras que posteriormente fueron capacitadas siguieron un procedimiento similar a las descongeladas en el medio BTS sin cafeína añadida.

Todas las alícuotas analizadas en el proceso de congelación-descongelación fueron sometidas a una incubación previa a 39 °C durante 6 minutos, estando todo el material empleado en el análisis (cámara de recuento, puntas de pipetas y la platina del microscopio) atemperado a dicha temperatura (ESHRE, 1998).

Las muestras recogidas durante el proceso de capacitación fueron obtenidas a los 30 y a los 60 minutos de iniciado este. En ambos casos, del volumen total incubado se recogió una porción que fue diluida en un tubo Eppendorf hasta los 25×10^6 de espermatozoides/ml y alcanzar un volumen final de 1 ml. La dilución se realizó con el mismo medio MCT en el que se incubaron los espermatozoides, estando este a la misma temperatura (39 °C) y atmosfera (5% CO₂) que la suspensión espermática; tras lo cual se procedió al análisis directo en el sistema CASA.

Tras una correcta homogenización, de todas las muestras empleadas en esta fase experimental, se tomaron 4 µl que fueron depositados en una cámara de recuento Makler (Sefi Medical, Haifa, Israel) de 10 µm de profundidad, situada en una platina HT-200 calefactada a 39 °C, quedando así, preparada la muestra para su análisis.

3.5.2 Equipo óptico, de captura y sistema CASA empleados

Para la realización del análisis se empleó un microscopio Nikon Eclipse E-400, equipado con una óptica de contraste de fase negativo, utilizándose para la captura de las imágenes una magnificación de 200 aumentos.

En un tercer ojo del microscopio se acopló una cámara de captura discontinua PE2015 (Pulnix, Basingstoke, Reino Unido), con un CCD de 752x582 píxeles. Ésta, estaba conectada con una tarjeta digitalizadora Meteor-II (Matrox, London, Canada), situada en un ordenador personal clónico.

En dicho equipo informático se encuentra instalado el programa ISAS[®] (PROISER R+D, Paterna, España), en su versión 1.0.10. Los parámetros de configuración empleados para todas las muestras analizadas en nuestros experimentos, fueron:

- Número de imágenes analizadas: 25.
- Frecuencia de adquisición: 25 frames/segundo.
- Tiempo de captura: 1 segundo.
- Umbral mínimo/máximo del área de las partículas para ser identificadas como espermatozoides: 20/80 μm^2 .
- Radio de búsqueda: 11 μm .
- Número mínimo de imágenes en las que debe de aparecer un espermatozoide para que sea calculada su ALH: 7.

De cada una de las muestras se capturaron 4 campos situados en la zona pericentral de la cámara Makler. El número de espermatozoides por campo era de 30 a 40; situándose, por tanto, el número total de células analizadas entre 120 a 160 por muestra.

La posibilidad de almacenamiento de las secuencias permitió el análisis a posteriori de las mismas; previamente a la obtención de los resultados de los parámetros cinéticos se procedió a una revisión visual de las imágenes, eliminándose las partículas no espermáticas, los espermatozoides erróneamente identificados como móviles/inmóviles y aquellas trayectorias incompletas o incorrectamente trazadas tras un cruce. Durante el proceso de corrección se tuvieron en cuenta las células eliminadas y su condición a la hora de realizar el cálculo del porcentaje de espermatozoides móviles.

Los parámetros cinéticos medidos por el sistema fueron (para una descripción detallada de los mismos ver el epígrafe 2.5.2):

- VCL: Velocidad Circular.
- VAP: Velocidad Media.
- VSL: Velocidad Rectilínea.
- LIN: Índice de Linealidad.
- STR: Índice de Rectitud.
- WOB: Índice de Oscilación.
- ALH media: Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza.
- BCF: Frecuencia de batido.

Además, el sistema CASA determinó el porcentaje de movilidad espermático de cada una de las muestras analizadas.

Los valores de los parámetros fueron presentados en un fichero tipo Excel, que fue almacenado para su posterior procesado y análisis estadístico.

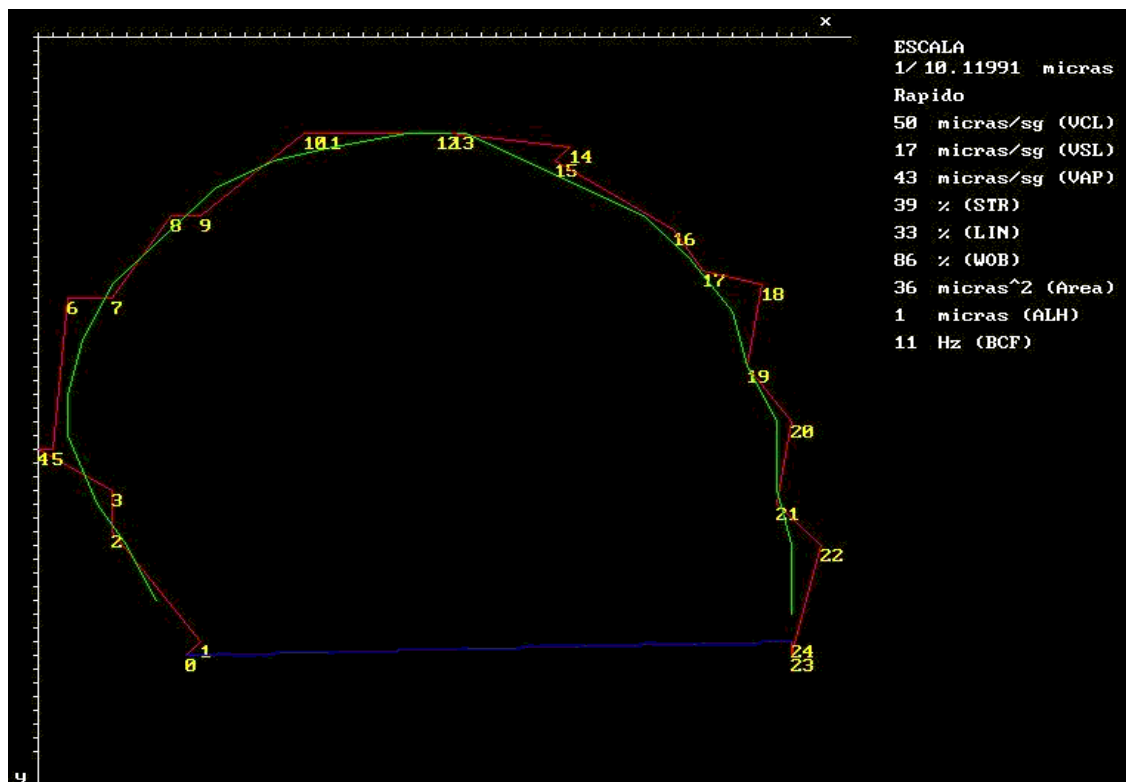


Figura 12. Imagen del recorrido de un espermatozoide analizada por el programa ISAS[®], las trayectorias se ha descompuesto en: la trayectoria curvilínea (roja), rectilínea (azul) y media (verde) y se ha realizado el cálculo de distintos parámetros cinéticos (parte superior izquierda de la pantalla).

3.6 METODOLOGÍA GENERAL DEL ANÁLISIS DE LA MORFOMETRÍA DE LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE DE VERRACO MEDIANTE EL EQUIPO *INTEGRATED SEMEN ANALYSIS SYSTEM*[®] (ISAS[®])

3.6.1 Preparación de la muestra

La recogida de las muestras para el análisis de la morfometría mediante el sistema computerizado ISAS[®] (Projectes y Serveis R+D, Paterna, España), se llevó a cabo en los mismos momentos descritos para el análisis cinético durante el proceso de criopreservación. Tras una correcta homogenización, se tomaron alícuotas del volumen total de semen sometido al proceso de congelación-descongelación, en 4 momentos críticos del mismo:

- Previamente a la incubación a temperatura ambiente (0 horas).
- Anteriormente a la centrifugación, tras la conservación a 15 °C (4 horas).
- Previamente a la adicción del glicerol y antes del proceso de envasado (6 horas).
- Tras el proceso de descongelación y posteriormente a una incubación a 32,5 °C durante 10 minutos.

En cada una de las tomas de muestras se recogió un volumen que contuviese 400×10^6 de espermatozoides/ml. Este se depositó en un tubo de centrifuga de 15 ml. Dicho tubo contenía en la toma de muestras de las 6 horas, 2 ml de MR-A[®].

Las muestras de material seminal descongelado se obtuvieron tomando 8 ml de la solución en BTS con una concentración de 50×10^6 de espermatozoides/ml. Dicha solución es la previamente preparada para llevar a cabo el análisis cinético; realizándose la toma de la muestra tras la incubación de 10 minutos a 32,5 °C.

Tanto durante, como después del proceso de criopreservación, las alícuotas recogidas se fijaron añadiendo en cada tubo 10 μ l de solución de glutaraldehído al 2% (Tabla 6). Una vez fijadas la muestras, se las sometió a una centrifugación a 600 g durante 6 minutos en una centrifuga Heraeus Megafuge 1.0 R. Con esta operación eliminamos, en la medida de lo posible, las partículas no espermáticas presentes en la muestra (Hidalgo *et al.*, 2005). Del material centrifugado se desechó el sobrenadante y se rediluyó el *pellet* resultante con MR-A[®] en las muestras tomadas en los tres primeros puntos de control, y con BTS en la muestra de espermatozoides descongelados. En ambos casos se alcanzó una concentración de 200×10^6

de espermatozoides/ml.

De esta nueva solución se tomó, previa homogenización, una alícuota de 8 μ l, que se depositó en un portaobjetos con banda mate y se extendió con un cubreobjetos, describiendo este un ángulo de 45 grados sobre el portaobjetos. Las extensiones se dejaron secar durante un mínimo 2 horas al aire; realizándose dos por cada alícuota preparada.

Las extensiones se tiñeron con el kit comercial Diff-Quick[®], para lo que se mantuvieron 7 minutos en la solución fijadora y 9 minutos en cada uno de los colorantes, estando todos ellos previamente atemperados a 39 °C. A continuación, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar al aire durante 2 horas.

Una vez secos, los portaobjetos se montaron con la resina DPX[®] diluida con xileno y se cubrieron con un cubreobjetos de 50x22 mm, dejando que la sustancia adhesiva fraguara durante un mínimo de 24 horas. Tras este tiempo, se retiraron los restos de la misma y se limpiaron las preparaciones con etanol, almacenándose hasta su análisis preservados de la luz en cajas preparadas a tal efecto.

3.6.2 Equipo óptico, de captura y sistema CASA empleados

Para la captura de las imágenes se utilizó un microscopio Eclipse E-400, empleándose una magnificación de 1000 aumentos (Tejerina *et al.*, 2005), siendo necesario, además, el uso de aceite de inmersión para hacer posible la observación. Las condiciones de iluminación se mantuvieron constantes durante el periodo en el que fueron capturadas las cabezas espermáticas. La cámara adosada al tercer ojo del microscopio fue en este caso un dispositivo de captura progresivo digital Basler A312-F (Basler AG, Ahrensburg, Alemania) con un CCD de 782x582 píxeles. Las imágenes fueron capturadas de forma manual con el módulo de morfometría del sistema ISAS[®], en su versión 1.0.16, empleándose la opción de análisis global de la cabeza.

Los datos fueron obtenidos a partir de 100 cabezas correctamente segmentadas y analizadas, realizándose este proceso con una eficacia del 74 % (para obtener 100 cabezas con las condiciones correctas, debíamos capturar como promedio 135), determinándose los siguientes parámetros de la cabeza (para una descripción detallada de los mismos ver epígrafe 2.5.):

- Longitud.
- Anchura.
- Perímetro.

- Área.
- Elipticidad.
- Rugosidad.
- Elongación.
- Regularidad.

Los valores de estos parámetros, en cada una de las muestras, fueron presentados de forma automática en un fichero tipo Excel, que fue almacenado para su posterior análisis estadístico.

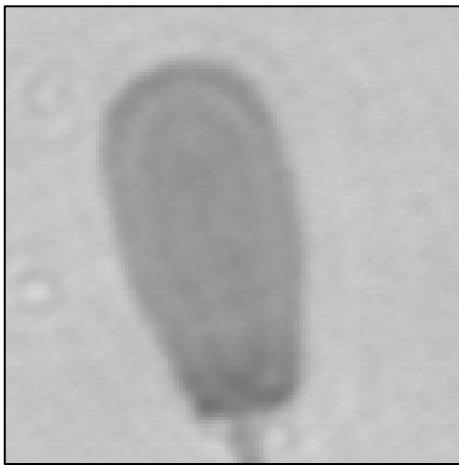


Figura 13. Aspecto de la cabeza espermática en el momento de su captura.

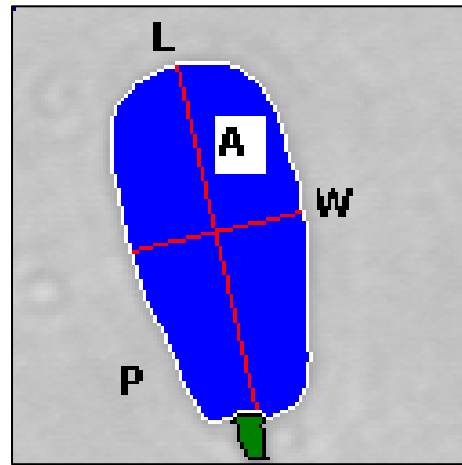


Figura 14. Imagen procesada, con la cabeza y cola segmentadas y las medidas morfométricas básicas: L, longitud de la cabeza; W, anchura de la cabeza; A, Área de la cabeza y P, perímetro de la cabeza espermática

3.7 VALORACIÓN DE LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA

El procedimiento llevado a cabo es una versión simplificada de la técnica descrita en el trabajo de Suzuki *et al.*, (2003). La toma de muestras para la realización de esta valoración se llevo a cabo en los mismos 4 puntos del proceso de congelación-descongelación descritos previamente para el análisis morfométrico. En las tomas de muestra durante el proceso de congelación se obtuvieron 500 μ l del mismo tubo Eppendorf del que se recogieron las alícuotas para el análisis de la motilidad (concentración de 50×10^6 de espermatozoides/ml).

Dicho volumen fue depositado en un recipiente de la misma clase y se le añadió 10 µl de la solución stock de PNA-FITC (Tabla 7). La preparación se incubó durante 8 minutos en un baño termostático a 37 °C, tras lo que se le adicionó 5 µl de una solución de formaldehído al 0,3% en suero salino fisiológico (Tabla 10). A continuación, se depositó una gota de la misma en un portaobjetos mediante una pipeta Pasteur, y sobre ésta, siguiendo el mismo procedimiento, una gota de solución de DABCO 0,22 M en glicerol:PBS (9:1). Se colocó un cubreobjetos sobre dicha preparación y se observó en un microscopio Eclipse E-600 (Nikon, Tochigi, Japón), a 1000 aumentos (empleando aceite de inmersión), utilizando iluminación epifluorescente junto con el filtro B-2A [filtro de excitación (paso de banda): 450-490 nm; filtro de cierre (paso largo): 520 nm].

Se analizaron dos gotas de cada muestra, evaluando en cada gota 100 espermatozoides que fueron clasificados, en función de que la tinción penetrase en la vesícula acrosómica (coloración verde en la porción apical de la cabeza), como espermatozoides con el acrosoma dañado. Por el contrario, si dicha coloración no aparecía se consideraba que la célula presentaba íntegro este orgánulo. El resultado se expresó como porcentaje de espermatozoides con el acrosoma íntegro.

Para la toma de muestras del semen descongelado se siguió el mismo protocolo que en el análisis cinético, recogiendo 500 µl de cada una de las soluciones preparadas a 50×10^6 de espermatozoides/ml con los diluyentes BTS y MR-A Thaw[®]. El resto del proceso de preparación y observación de esta tinción fluorescente fue similar al descrito para el análisis de las muestras recogidas previamente a la congelación.

3.8 VALORACIÓN DE LA VITALIDAD ESPERMÁTICA

El procedimiento llevado a cabo se basa en la técnica descrita en el trabajo de Harrison y Vickers (1990). La recogida de muestras siguió el mismo esquema descrito en el epígrafe dedicado a la valoración de la integridad acrosómica; en este caso al volumen de 500 µl contenido en el tubo Eppendorf se le añadieron 10 µl de la solución stock de Ioduro de Propidio (Tabla 8) y otros 10 µl de la de Carboxifluoresceína (Tabla 9), siendo posteriormente incubada a 37 °C durante 8 minutos en un baño termostático. Previamente a la valoración se fijó con 5 µl de solución formolada al 0,3% en suero salino fisiológico (Tabla 10). La observación microscópica se realizó en el mismo equipo utilizado para la evaluación de la vesícula acrosómica, salvo que en este caso se empleó una magnificación de 400 aumentos (por lo que no fue necesario el empleo de aceite de inmersión). Los filtros usados de forma alternativa en un mismo campo, fueron: el B-2A [filtro de excitación (paso de banda): 450-490 nm; filtro de cierre (paso largo): 515 nm] y el G-2A [filtro de excitación (paso de banda):

510-560 nm; filtro de cierre (paso largo): 590 nm]. A la gota de la muestra que se situó encima del portaobjetos se le añadió otra de DABCO. En total fueron analizadas 400 células por muestra, a partir de dos gotas distintas de la misma. Los espermatozoides fueron clasificados como “muertos”, si el Ioduro de Propidio había penetrado en su interior, al estar dañada su membrana (coloración roja); o “vivos” si la coloración que presentaban era verde al ser la carboxifluoresceína la que se encontraba en su interior por presentar el plasmalema íntegro. El resultado final se expresó como el porcentaje de células vivas presentes en la muestra.

3.9 CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DESCONGELADOS

A partir de los datos de la vitalidad espermática postdescongelación elegimos los eyaculados (ver epígrafe 3.11.5) sobre los que realizamos este proceso. En primer lugar, realizamos una nueva descongelación de 3 pajuelas de los mismos en BTS según lo descrito en el epígrafe 3.4. Una vez descongelados se incubaron 10 minutos en un baño termostático a 32,5 °C; tras lo cual, seguimos el procedimiento de capacitación descrito por García-Herreros *et al.* (2005) para semen porcino. De esta manera, sometimos a la suspensión espermática a una centrifugación a 800 g durante 10 minutos en el equipo Heraeus Megafuge 1.0 R. Tras este proceso desechamos el sobrenadante, y el *pellet* remanente fue diluido con el medio MCT (Tabla 11), previamente atemperado a 39 °C y equilibrado en una atmósfera con un 5% de CO₂, hasta una concentración de 100 x 10⁶ de espermatozoides/ml. A continuación, la suspensión espermática se introdujo en una estufa Heraeus Heracell (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Alemania) donde se incubó durante 1 hora a 39 °C [modificado respecto al trabajo de García-Herreros *et al.* (2005), al usar estos autores 38 °C para la incubación] y en una atmósfera con un 5% de CO₂.

En los diagramas de flujo representados en las Figuras 15 y 16, se recogen el conjunto de procesos al que fue sometido el material seminal, así como las pruebas realizadas con el objetivo de recoger los datos necesarios que nos permitiesen llevar a cabo el presente trabajo experimental.

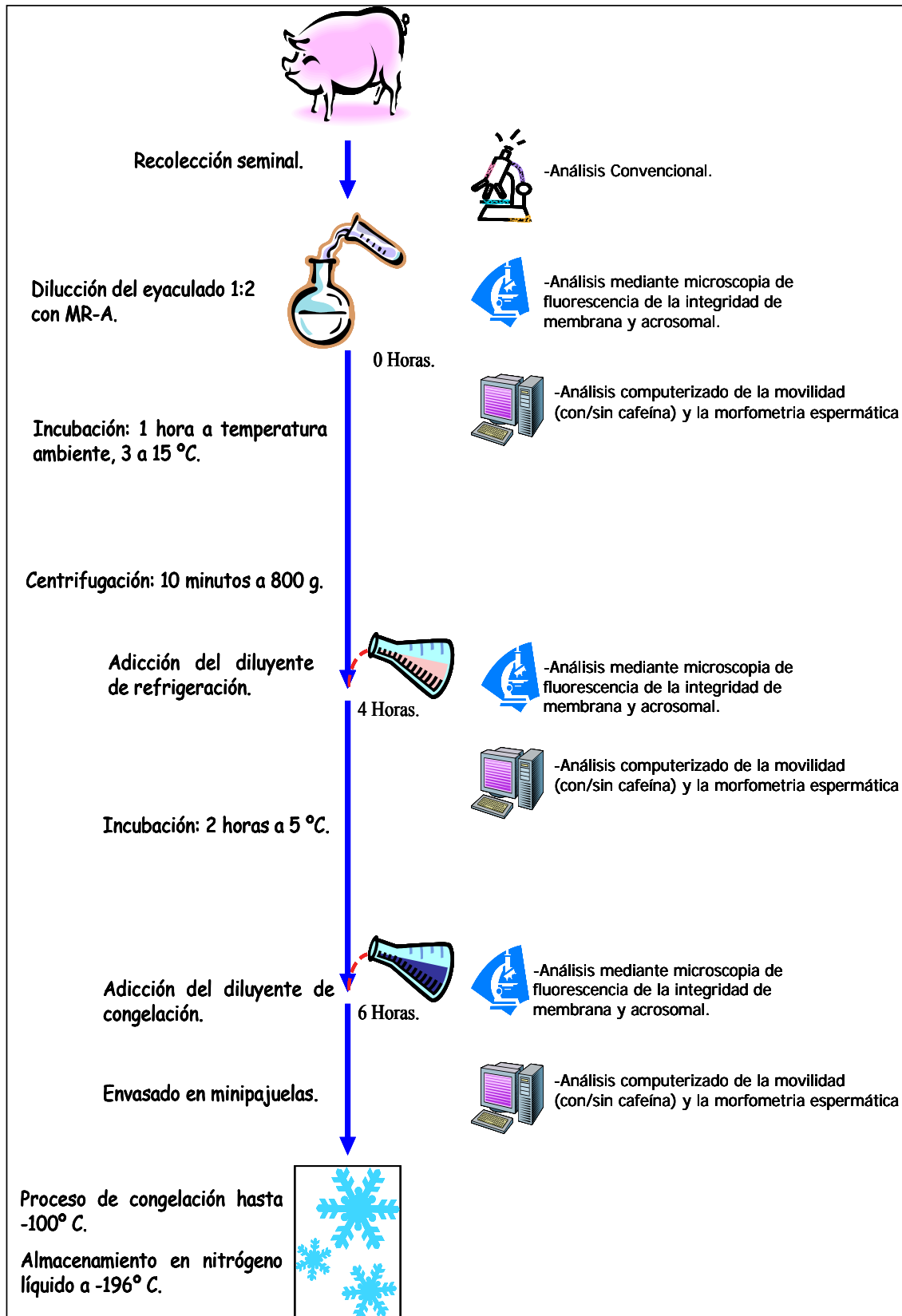


Figura 15. Diagrama de flujo de las operaciones realizadas hasta la congelación del semen.

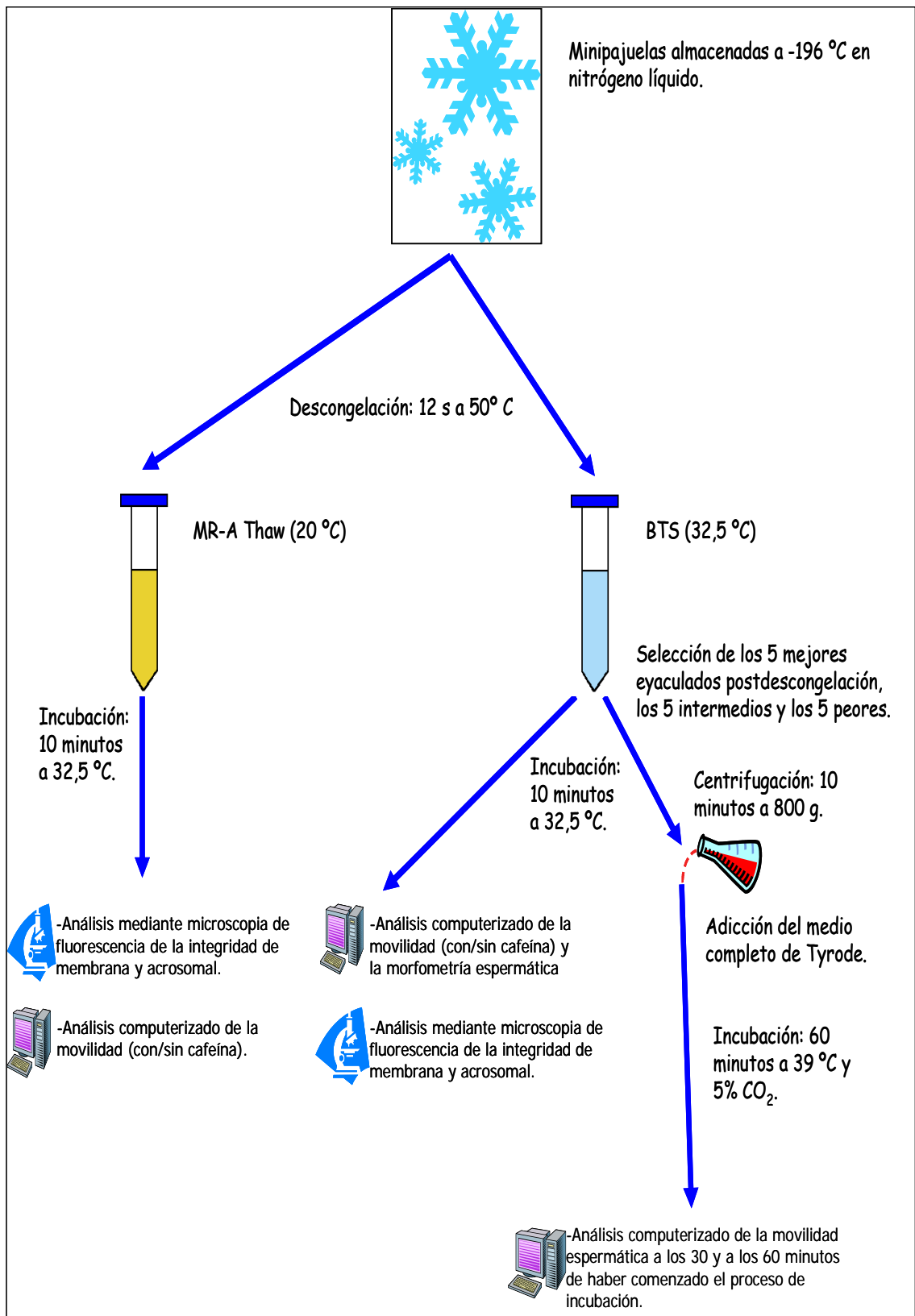


Figura 16. Diagrama de flujo de las operaciones realizadas tras las descongelación del semen.

3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el desarrollo del análisis estadístico de este trabajo experimental se han empleado dos programas distintos; así para la definición de los modelos de regresión y el análisis de las subpoblaciones espermáticas a partir de los resultados de los parámetros cinéticos, se empleó el entorno estadístico R [R: A language and environment for statistical computing (R: foundation for statistical computing. Viena, Austria)]. Hemos de resaltar, que al contrario que los programas tradicionales, en este, se encuentran los procedimientos estadísticos más innovadores y recientes, al tratarse de una aplicación de la comunidad científica dedicada al estudio en este campo. Presenta, además, la ventaja de poder ser descargado gratuitamente de Internet. El resto de pruebas y contrastes estadísticos fueron llevados a cabo empleando el programa SAS (Statistical Analysis Software, SAS Institute Inc, Cary, EEUU).

A excepción de los análisis realizados sobre los datos de la valoración rutinaria y los porcentajes de movilidad espermática, vitalidad espermática e integridad acrosomal, a lo largo del proceso de congelación-descongelación; la descripción de las técnicas empleadas se realiza de forma individual en cada experimento. Esto es debido a que las técnicas desarrolladas varían en función de la prueba que estemos describiendo y ser, en algunos casos, extremadamente complejas.

En todos los contrastes se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los grupos a comparar cuando el valor de p era inferior a 0,05. Previamente a la realización de comparaciones múltiples, se realizaron las pruebas de Levene y Shapiro-Wilk (o más raramente Kolmogorov-Smirnov) para evaluar si los conjuntos de datos cumplían las condiciones de homocedasticidad y normalidad respectivamente. De igual manera, ante comparaciones pareadas se realizó la prueba de Shapiro-Wilk con el objetivo de comprobar la normalidad exclusivamente.

Los parámetros del espermiograma rutinario que se ajustaron a una distribución normal fueron: volumen, concentración y porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales, por lo que se utilizó un T-test para comparar los resultados provenientes de las dos razas. Sin embargo, tanto el porcentaje de espermatozoides móviles determinado de forma subjetiva, como el obtenido empleando el sistema CASA no seguían una distribución normal, por lo que en la comparación de los resultados de los parámetros anteriores entre razas se empleó el test de Mann-Whitney.

Los resultados de los parámetros derivados del análisis seminal rutinario no siguieron una distribución normal, ni tampoco cumplían la premisa de homocedasticidad cuando los datos se estructuraron con el objetivo de realizar su comparación entre individuos. Por lo que para este caso, se aplicó el test no paramétrico de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis.

Los resultados del porcentaje de movilidad determinado tanto de forma computerizada como subjetiva tampoco cumplían la premisa de normalidad. Por tanto, en la comparación de los resultados de ambas medidas se empleó el test de Mann-Whitney. En la determinación de la correlación entre ambos métodos se empleó el índice de correlación de Spearman.

En el estudio de la evolución de los parámetros de vitalidad espermática e integridad de la vesícula acrosómica durante el proceso de crioconservación, se comprobó que en ninguno de los supuestos planteados se cumplían las condiciones de normalidad y homocedasticidad. Así, las comparaciones múltiples realizadas (entre los diferentes tiempos de toma de muestras de forma general, por raza e individuo y entre los diferentes machos en cada tiempo) se realizaron mediante el test de Kruskal-Wallis. En los casos en los que se compararon los grupos de datos de forma pareada (entre las dos razas analizadas y el análisis pareado de los tiempos de toma de muestra tanto de forma general, como por raza o individuo) se empleó el test de Mann-Whitney. Para determinar la correlación entre los valores de ambos parámetros en los distintos tiempos de toma de muestra, se empleó el índice de correlación de Spearman.

En el estudio de la evolución del porcentaje de movilidad (con/sin cafeína) durante el proceso de crioconservación, como en el caso anterior, no se cumplían las condiciones de homocedasticidad y normalidad en ninguno de los supuestos planteados. Las comparaciones múltiples realizadas (entre los diferentes tiempos de toma de muestras de forma general, por raza e individuo y entre los diferentes machos en cada tiempo), se llevaron a cabo mediante el test de Kruskal-Wallis. En los casos en los que comparásemos grupos de datos de forma pareada (entre las dos razas analizadas, en el análisis de muestras “con” *versus* “sin” cafeína y el análisis pareado de los tiempos de toma de muestra tanto de forma general, como por raza e individuo) se empleó el test de Mann-Whitney. Para determinar la correlación tanto entre valores de ambos parámetros, como con los resultados de vitalidad e integridad acrosómica, en los distintos tiempos de toma de muestra, se empleó el índice de correlación de Spearman.

3.11 DISEÑO EXPERIMENTAL

3.11.1 Experimento 1. Evaluación de los patrones cinéticos descritos por los espermatozoides de verraco durante el proceso de criopreservación

La movilidad es una de las características espermáticas que más se ve afectada durante los procesos de congelación-descongelación. En función de esta premisa, el objetivo de este experimento fue describir los cambios que sufren los patrones cinéticos espermáticos a lo

largo de estos procesos. Dicha descripción fue realizada de una manera objetiva gracias al empleo de un sistema CASA. Ante la certeza de la no homogeneidad del comportamiento cinético de los espermatozoides de un eyaculado (Abaigar *et al.*, 1999), fue necesario, para la consecución de nuestro objetivo principal, desarrollar una herramienta estadística que nos permitiera clasificar cada espermatozoide en su correspondiente población cinética. Esta operación es posible debido a la capacidad de los sistemas CASA de analizar individualmente cada célula espermática. Una vez definidas las subpoblaciones espermáticas, nuestra intención fue describir como éstas respondían a la criopreservación. Fueron también nuestros objetivos, analizar si la raza o el macho tenían algún tipo de efecto en la distribución de las mismas, así como el estudio de la correlación del tamaño de esas poblaciones con la vitalidad, la integridad acrosómica y el porcentaje de movilidad espermático. De manera secundaria evaluamos el comportamiento de los parámetros cinéticos individualmente.

Para su realización tomamos las muestras en los 4 puntos del proceso de congelación-descongelación anteriormente reseñados; tanto en ausencia como en presencia de cafeína. Debemos puntualizar que, tras la descongelación, en este experimento sólo se tuvieron en cuenta para el análisis las pajuelas descongeladas en BTS.

En total se analizaron los parámetros cinéticos de 50799 espermatozoides, distribuidos entre cada punto de toma de muestra como figura en la Tabla 13.

Tabla 13. Número de espermatozoides analizados en cada tiempo.

	Cafeina (1mM)	Sin Cafeina
Cero horas.	6634	6442
Cuatro horas.	6885	6100
Seis horas.	4454	4223
Postdescongelación	9679	6382

3.11.1.1. Identificación de las subpoblaciones cinéticas

Como indicamos, el primer paso a seguir es la definición de un procedimiento estadístico que permita el agrupamiento de las células a partir de sus características cinéticas individuales en subpoblaciones, siendo esta una de las principales motivaciones de este estudio.

Esa clasificación fue realizada a partir de los datos obtenidos de los espermatozoides no tratados con cafeína a tiempo cero, sirviendo como referencia para la posterior asignación de las distintas observaciones realizadas en los diferentes tiempos tanto en presencia/ausencia

de cafeína. De esta manera disponíamos de un modelo que nos permitió describir la evolución de esos grupos a lo largo del proceso de congelación.

Este proceso se extendió también a cada una de las congelaciones individuales permitiéndonos realizar, a continuación, las correspondientes comparaciones entre individuos y razas.

Como se ha comentado anteriormente (epígrafe 2.5), los trabajos precedentes confían para tal fin en multitud de métodos, y no siempre con acierto en atención al cumplimiento de las hipótesis que rigen la validez de los resultados obtenidos. El incumplimiento de tales hipótesis viene derivado frecuentemente de la asunción de un modelo para los datos que no se corresponde con la naturaleza del proceso generador de estos. Parece adecuado, en este contexto, confiar por tanto en técnicas de clasificación que no impongan restricciones fuertes acerca de la distribución de los datos. En este sentido, se procedió a aplicar el enfoque utilizado por Ciampi *et al.* (2007), utilizando para ello las funciones programadas por dichos autores bajo el entorno estadístico R.

El enfoque adoptado para realizar la clasificación no supervisada consta de las siguientes fases:

- *Preprocesado*: Se emplea el algoritmo *K-means* (MacQueen, 1967), a fin de reducir la cardinalidad del conjunto de datos y de este modo poder emprender la construcción de un árbol jerárquico aglomerativo en una etapa posterior. Se trata de una técnica de clasificación no supervisada de rápida ejecución y propiedades bien conocidas por la comunidad científica. En principio su uso aislado como técnica de clasificación principal viene limitada por la falta de afinidad equivariante de sus resultados. Sin embargo, en este caso se utiliza de forma auxiliar para facilitar la ejecución del algoritmo jerárquico aportando éste las características de afinidad equivariante necesarias. Durante la experimentación se comprobó que cuarenta constituía un número adecuado de *pre-clusters*. Como resultado de esta primera etapa se obtiene una clasificación previa de los datos, organizándose estos en cuarenta *pre-clusters* o, en términos de Ciampi *et al.*, “*bins*”.
- *Clasificación jerárquica aglomerativa (HAC)*: El segundo paso del enfoque adoptado utiliza los *bins* obtenidos en el paso previo empleándolos como átomos, a partir de los cuales se construye el árbol jerárquico aglomerativo. El uso en nuestra experimentación de árboles jerárquicos como técnicas de clasificación viene derivada de la utilidad que proporciona la representación completa de las relaciones de semejanza entre las posibles configuraciones. En nuestro caso particular, como ya citamos, los elementos de partida para construir el árbol son

los “bins”. Es necesario por tanto, definir la métrica utilizada para medir la semejanza de estos bins y las reglas de aglomeración utilizadas. Se podrá encontrar una descripción detallada de estos términos en la publicación de Ciampi *et al.* (2007). Baste aquí comentar, que la naturaleza de dicha métrica está basada en un índice de tasa de verosimilitud correspondiente a las distribuciones estadísticas que siguen las medias muestrales de dichos bins. La conformidad de los bins con las condiciones impuestas por el teorema de límite central basta para asumir un modelo estadístico normal para la distribución de estas medias muestrales, que no para las observaciones que representan.

Por tanto el enfoque adoptado, se caracteriza entonces, por no asumir a priori que los datos recogidos sigan modelo alguno.

Una vez realizada la clasificación no supervisada (análisis *cluster*) se utilizaron técnicas de análisis discriminante (clasificación supervisada) a fin de verificar la bondad de los resultados obtenidos en el análisis *cluster*. Por un lado, la comparación de la asignación de clases realizada por el análisis *cluster* y la predicción de clases realizada por el análisis discriminante lineal (LDA) o cuadrático (QDA) permitirá, utilizando por comodidad para ello el índice de Fowlkes-Mallows (Fowlkes y Mallows, 1983), valorar la medida en que los resultados del análisis *cluster* son reproducibles con fidelidad por el análisis discriminante. Por otro lado, el análisis discriminante lineal proporciona como resultado una proyección de los datos que resulta de especial utilidad en atención a los criterios utilizados para definir los hiperplanos de proyección: máxima compacidad de las clases presentes y máxima distancia entre diferentes clases. Dicha proyección resultará de especial utilidad en la interpretación visual de los resultados del análisis *cluster*.

Una vez llevado a cabo este proceso se determinó que el número idóneo de clases era de 3. Las características de estas tres subpoblaciones fueron tomadas como modelo para clasificar el resto de observaciones realizadas en los diferentes tiempos de recogida de muestras. De la misma forma se definió el tamaño de los grupos en cada una de las 50 congelaciones realizadas, permitiéndonos realizar las comparaciones descritas a continuación.

En la comparación del tamaño de una misma subpoblación (tanto en presencia como en ausencia de cafeína) a lo largo del proceso de congelación-descongelación se empleó el test de Kruskal-Wallis al no cumplir los datos la condición de homocedasticidad. Las comparaciones pareadas de tiempos se llevaron a cabo utilizando el T-test o el test de Mann-Whitney en función de que los datos siguiesen una distribución normal o no, respectivamente. En la comparación del tamaño de las tres subpoblaciones (tanto en presencia como en ausencia de cafeína) en cada uno de los tiempos, se empleó mayoritariamente el test de Kruskal-Wallis seguido del T-test y el test de Mann-Whitney. Si bien, al cumplir las condiciones de homocedasticidad y normalidad los datos de las pruebas realizadas a las 4

horas sin cafeína y tras la descongelación en presencia de esta sustancia fueron analizados mediante un ANOVA, seguido de una prueba de Tukey para expresar las diferencias entre subpoblaciones de forma pareada.

En cada punto de toma de muestras se analizó el efecto que ejercía la cafeína sobre la estructura subpoblacional, para lo que se compararon los tamaños de cada subpoblación en las dos condiciones, mediante el uso del T-test o el test de Mann-Whitney en función de que los datos siguiesen o no una distribución normal. De manera similar se actuó cuando se compararon los tamaños poblacionales de las dos razas empleadas en el estudio.

La comparación entre el tamaño de cada subpoblación en cada tiempo, en cada uno de los 10 machos utilizados, fue llevada a cabo mediante el test de Kruskal-Wallis, al no cumplir los datos las condiciones de homocedasticidad y normalidad.

Por último, el estudio de las correlaciones entre el tamaño de las tres subpoblaciones, en cada tiempo, con los correspondientes valores de vitalidad, integridad acrosómica y porcentaje de motilidad (en presencia/ausencia de cafeína), fueron expresadas mediante el índice de correlación de Spearman.

3.11.1.2. Análisis estadístico aplicado a los parámetros cinéticos individualmente

Paralelamente a lo comentado anteriormente, también se procedió al análisis de la evolución a lo largo de los distintos puntos de toma de muestras, de los parámetros cinéticos considerados individualmente. La comparación entre los 4 tiempos en los que se produjo la recogida de muestras (tanto en las muestras en las que se añadió cafeína, como en aquellas que no) se realizó mediante el test de Kruskal-Wallis, al no cumplir los datos la condición de homocedasticidad. Por su parte, en las comparaciones pareadas entre estos tiempos se utilizó, o bien un T-test o el test de Mann-Whitney, en función de que los datos cumplieren o no, respectivamente, la condición de normalidad. Los mismos planteamientos se emplearon cuando se evaluó la evolución de dichos parámetros en cada una de las razas e individuos. De igual manera, el contraste de los resultados entre individuos (en cada uno de los tiempos y en presencia/ausencia de cafeína) fueron llevados a cabo mediante el test de Kruskal-Wallis, al no cumplir los datos la condición de homocedasticidad.

En la comparación de los resultados de los parámetros cinéticos de las muestras con/sin cafeína, se empleó o bien un T-test o un test de Mann-Whitney en función de que los datos cumplieren o no (respectivamente) la premisa de normalidad. El mismo esquema se empleó cuando se realizó la comparación entre los resultados de las dos razas analizadas.

En el estudio de las correlaciones entre cada uno de los parámetros cinéticos con los resultados de las pruebas de vitalidad, integridad acrosómica y el porcentaje de movilidad espermática (medida tanto en presencia, como en ausencia de cafeína), se empleó el índice de correlación de Spearman.

3.11.2 Experimento 2. Comparación de la distribución de las subpoblaciones cinéticas, el porcentaje de movilidad, la vitalidad y la integridad acrosómica de espermatozoides descongelados, diluidos en BTS o MR-A[®] THAW

Tradicionalmente se ha empleado el diluyente BTS en la descongelación del material seminal criopreservado de verraco; ante la reciente aparición de un nuevo diluyente denominado MR-A Thaw[®], el objetivo de este experimento fue comparar como afectaba la distinta composición de estos medios a los patrones cinéticos de los espermatozoides descongelados de cerdo. Para lo cual, realizamos un análisis de subpoblaciones de los espermatozoides móviles, así como uno individualizado de cada parámetro cinético en cada uno de los diluyentes. Además de lo anteriormente expuesto, se compararon los resultados de vitalidad e integridad acrosómica postdescongelación en ambos diluyentes.

En la realización de esta prueba empleamos los 50 eyaculados previamente congelados, realizándose el análisis cinético, en cada uno de los diluyentes tanto en presencia (concentración final de 1mM) como en ausencia de cafeína. Se analizaron un total de 33012 células espermáticas, encontrándose su distribución por diluyente recogido en la Tabla 14.

Tabla 14. Número de espermatozoides analizados en cada uno de los diluyentes.

	Cafeína 1mM	Sin cafeína
BTS	9679	6382
MR-A Thaw [®]	8859	8092

3.11.2.1. Análisis estadístico

Utilizando como modelo las características de las clases definidas mediante el conjunto de operaciones descritas en el epígrafe 3.11.1.1, agrupamos las medidas cinéticas realizadas en los diluyentes postdescongelación en cada una de esas tres clases.

Una vez determinada la distribución poblacional, las comparaciones entre los diluyentes se llevaron a cabo mediante el test de Kruskal-Wallis, mientras que para las comparaciones de forma pareada se emplea el test de Mann-Whitney.

Como en anteriores experimentos, también se realizó un análisis de los parámetros cinéticos de manera individual. En el contraste de los resultados de estos parámetros entre los cuatro diluyentes preparados se empleó la prueba de Kruskal-Wallis al no cumplir los datos la premisa de homocedasticidad.

Los resultados de las pruebas de vitalidad e integridad acrosómica, sí siguieron una distribución normal por lo que la comparación entre los resultados de ambos diluyentes se realizó mediante un T-test.

3.11.3 Experimento 3. Evaluación de la morfometría de la cabeza espermática de verraco durante el proceso de criopreservación

Como describimos en la revisión bibliográfica el tamaño de la cabeza del espermatozoide se ve afectado por los procesos de congelación-descongelación, estando los cambios producidos relativamente poco estudiados, al tratarse el análisis de esta faceta de una labor tediosa. El surgimiento y desarrollo de los sistemas ASMA ha permitido agilizar el estudio de los parámetros morfométricos, haciendo posible el análisis efectivo de los cambios que sufre la cabeza del espermatozoide durante el proceso de crioconservación.

Al contrario que para el caso de la motilidad, no es un hecho claro la existencia de subpoblaciones espermáticas definidas a partir de las características morfométricas individuales. Los estudios realizados en este sentido sobre semen de cerdo son contradictorios, así Thurston *et al.* (2001) niegan tal posibilidad. Sin embargo Peña *et al.* (2005b), afirman lo contrario, y que por tanto, la clasificación puede ser llevada a cabo a partir de las medidas morfométricas de la cabeza espermática.

Los objetivos de nuestro experimento, al igual que en el experimento anterior, fueron, en primer lugar la definición de subpoblaciones espermáticas en función de los resultados de los parámetros morfométricos obtenidos. Esta posibilidad nos la brindan los sistemas ASMA al realizar el análisis de las cabezas espermáticas de forma individualizada. No obstante, como veremos más adelante llegamos a la conclusión de la inexistencia de tales clases morfométricas en los eyaculados de verraco. Por tanto, nuestro estudio se centró, a partir de ese momento, en el análisis de la evolución de los parámetros cinéticos de manera individualizada a lo largo del proceso de congelación-descongelación. Llevamos a cabo también, el análisis de la influencia de la raza y del individuo sobre los mismos y las

correlaciones con la vitalidad, la integridad acrosómica y el porcentaje de motilidad espermático en cada punto del proceso.

Se puso en práctica el mismo esquema de recogida de muestras, que el anteriormente descrito para el análisis cinético. Fueron analizados los parámetros morfométricos de 100 células espermáticas en cada uno de los 4 puntos de toma de muestra de cada una de las 50 congelaciones realizadas; por lo que en conjunto, se analizaron morfométricamente un total de 20.000 cabezas espermáticas.

3.11.3.1. Análisis estadístico

Empleamos la misma secuencia de operaciones descrita en el epígrafe 3.11.1.1 en la búsqueda de subpoblaciones definidas a partir de los resultados de los parámetros morfométricos. Dicha búsqueda fue infructuosa y el análisis continuó considerando esos parámetros individualmente.

La comparación de los resultados de cada parámetro entre los 4 tiempos en los que se produjo la recogida de muestras, fue realizada mediante el procedimiento ANOVA al cumplir los datos tanto las condiciones de homocedasticidad, como de normalidad. Por su parte las comparaciones pareadas entre estos tiempos se realizaron mediante la prueba de Tukey. Los mismos planteamientos se emplearon cuando se evaluó la evolución de dichos parámetros en cada una de las razas e individuos, así como en el contraste de los resultados entre individuos (en cada uno de los tiempos de recogida de muestras).

El contraste entre los resultados de los parámetros morfométricos provenientes de las dos razas analizadas se llevo a cabo mediante un T-test, al cumplir estos datos la condición de normalidad.

En el estudio de las correlaciones entre cada uno de los parámetros morfométricos con los resultados de las pruebas de vitalidad, integridad acrosómica y el porcentaje de movilidad espermática (medida tanto en presencia, como en ausencia de cafeína), se empleó el índice de correlación de Spearman, al no seguir los datos a comparar una distribución normal.

3.11.4 Experimento 4. Determinación de la congelabilidad de un eyaculado a partir de los resultados de los análisis convencional y computerizado por imágenes digitales

Dada la distinta respuesta a la congelación que presentan los machos de la especie porcina, y en vistas a una posible aplicación en el futuro de esta técnica desde un punto de vista comercial, es perentorio el desarrollo de pruebas que nos permitan a priori, seleccionar los machos buenos congeladores, o incluso los eyaculados más aptos para el proceso de crioconservación. De esta manera nos permitirán descartar aquellos individuos/eyaculados en los que el proceso provoque un daño irreparable en la calidad de su material seminal. Las nuevas técnicas de análisis computerizado pueden jugar un papel importante en la predicción de la congelabilidad de un eyaculado al aportarnos nueva información del mismo. De ahí, que en este experimento correlacionaremos (empleando los índices de correlación de Spearman y Pearson, en función del modelo que sigan los datos iniciales) los parámetros medidos (parámetros cinéticos y morfométricos individuales), o derivados (distribución subpoblacional cinética) de los sistemas CASA con el resultado de vitalidad postdescongelación. Decidimos elegir dicho parámetro al considerarlo como el índice más adecuado para medir la calidad del semen descongelado, al ser el que más drásticamente se ve afectado durante la congelación-descongelación. De igual manera y sirviéndonos como base comparativa, correlacionaremos los resultados de las medidas más “convencionales” (motilidad medida por el sistema CASA en presencia/ausencia de cafeína, vitalidad, integridad acrosómica, motilidad subjetiva y porcentaje de formas normales), con el porcentaje de vitalidad, como habíamos citado anteriormente.

No obstante, además de realizar las correlaciones de forma individual, parece más acertado combinar sus valores en un modelo predictivo. Este planteamiento se aproxima más al carácter multifactorial del proceso, siendo por tanto más acertado el pronóstico que hagamos cuanta más información dispongamos para confeccionarlos. En este aspecto los sistemas CASA nos aportan datos de aspectos hasta ahora desconocidos, como la distribución subpoblacional cinética, o poco estudiados, como los parámetros cinéticos y morfométricos individuales. Así en la segunda parte de este experimento, realizamos diversos modelos de regresión lineal, valorando cual aporta una mayor información sobre el resultado de la congelación, medido, como en el caso anterior, en función de la vitalidad postdescongelación. Para realizar dicha valoración se empleó un índice de correlación cuadrático ajustado, penalizado por el número de variables.

Los modelos de regresión diseñados fueron planteados a partir de las siguientes agrupaciones de parámetros (siempre medidas a tiempo 0):

- Modelo 1: A partir de las medidas de calidad seminal realizadas tradicionalmente en los centros de I.A.: porcentaje de motilidad determinada subjetivamente y porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales.
- Modelo 2: A partir de parámetros seminales de un espermiograma más avanzado que incluya: porcentaje de vitalidad, porcentaje de integridad acrosómica y porcentaje de motilidad medido por un sistema CASA en presencia/ausencia de cafeína.
- Modelo 3: Combinación de los datos de partida de los dos anteriores.
- Modelo 4: A partir de los 8 parámetros morfométricos.
- Modelo 5: A partir de los 8 parámetros cinéticos individuales, determinados en ausencia/presencia de cafeína.
- Modelo 6: A partir de la distribución subpoblacional, determinada tanto en presencia como en ausencia de cafeína.
- Modelo 7: Por agrupación de los datos de partida de los tres modelos anteriores, agrupando todos los parámetros medidos o derivados de un sistema CASA.
- Modelo 8: Combinando los parámetros medidos por el sistema CASA (Modelo 7) y los de partida del Modelo 3.

3.11.5 Experimento 5. Caracterización cinética del semen de verraco sometido a condiciones de capacitación tras la descongelación

La finalidad última del material seminal criopreservado debería de ser la inseminación; tras esta, las células espermáticas van a sufrir una serie de cambios englobados bajo el nombre de capacitación, entre los que se encuentran los que afectan a los patrones cinéticos de las mismas. Nuestra intención con este experimento fue reproducir *in vitro* las condiciones que desencadenan esos procesos con el objetivo de estudiar los efectos que tienen sobre las características de movimiento de los espermatozoides previamente criopreservados. Así se realizaron 3 tomas de muestras, la primera la llevada a cabo tras la descongelación, la segunda a los 30 minutos de incubación en condiciones de capacitación *in vitro* y la última a los 60 minutos en las mismas condiciones.

Al disponer de eyaculados en los que ya ha sido comprobada su calidad postdescongelación, fue también nuestra intención, comparar los efectos que tienen los fenómenos capacitantes sobre la cinética de las células espermáticas de eyaculados con distinta respuesta al proceso de congelación-descongelación. Así, la capacitación *in vitro* se llevó a cabo sobre 3 grupos de 5 eyaculados cada uno, clasificados como buenos, medios y malos congeladores en función de la vitalidad postdescongelación (5 mejores congelaciones, 5 intermedias y 5 peores). La composición de esos grupos esta recogida en la Tabla 15.

Tabla 15. Grupos de eyaculados sometidos al proceso de capacitación.

	Macho	Nº Congelación
Buenos congeladores	R4052	3 y 4
	R5487	1, 2 y 3
Congeladores medios	E955	3 y 4
	T475	1
	L69	2
	R3846	1
Malos congeladores	G2552	2, 3 y 5
	L437	1 y 4

En total se analizaron 2707 espermatozoides, distribuidos por grupos y tiempos según se especifica en la Tabla 16.

Tabla 16. Número de espermatozoides analizados por cada tiempo y grupo.

	Descongelado		
	30 minutos	60 minutos	
Buenos	872	300	187
Medios	628	124	90
Malos	436	45	25

3.11.5.1. Análisis estadístico

Utilizando como modelo las características de las clases definidas mediante el conjunto de operaciones descritas en el epígrafe 3.11.1.1, agrupamos las medidas realizadas en cada uno de los grupos en las tres subpoblaciones predeterminadas.

Al cumplir los resultados del tamaño poblacional tanto las condiciones de homocedasticidad, como de normalidad en cada uno de los grupos y tiempos; la comparación entre el tamaño de una misma población a lo largo del periodo de incubación fue llevado a cabo mediante el procedimiento ANOVA seguido del test de Tukey, para comparar dichos tiempos de forma pareada. Los mismos procedimientos se utilizan cuando se realiza la comparación de la distribución poblacional cinética entre los distintos grupos definidos en función a su congelabilidad.

En el análisis de los parámetros cinéticos de forma individual, las comparaciones entre los distintos grupos y tiempos fueron llevadas a cabo mediante el test de Kruskal-Wallis, al no cumplir los datos la premisa de homocedasticidad. Cuando los grupos o los tiempos de toma de muestra se compararon de forma pareada se empleó el T-test o el test de Mann-Whitney en función de que los grupos de datos, par a par, siguiesen o no (respectivamente) una distribución normal.

4. RESULTADOS

Los datos individualizados de cada congelación están recogidas en la sección Anexos.

4.1. ANÁLISIS SEMINAL CONVENCIONAL.

Los resultados del análisis seminal convencional, junto con el porcentaje de movilidad determinado por el sistema ISAS a tiempo 0, están recogidos en la Tabla 17. No hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) para los datos de estos parámetros entre las dos razas empleadas, a excepción de en el porcentaje de movilidad espermático determinado por el sistema CASA y el volumen eyaculado. Cuando se analizaron los datos de forma individual se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los machos empleados, para los resultados del volumen eyaculado, la concentración, el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y el porcentaje de movilidad determinado mediante el sistema CASA; mientras que estas diferencias no fueron observadas, en: el porcentaje de movilidad medido de forma subjetiva, y la calidad del movimiento espermático.

Tabla 17. Resultados medios del análisis seminal convencional a tiempo 0. Leyenda: Volumen (ml), Conc.: Concentración (10^6 spz/ml), % Mov. Subj.: porcentaje de movilidad subjetivo, Cal. Mov.: Calidad de movimiento, Mov. CASA: porcentaje de movilidad determinado automáticamente, FN: porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales.

Macho	Volumen.	Conc.	Mov. Subj.	Cal. Mov.	Mov. CASA	FN
E955	188,8±58,2	301,4±36,4	81,0±4,9	3,2±0,4	71,1±11,6	80,4±3,4
G2552	210,0±34,8	223,4±44,3	83,0±2,5	3,6±0,5	85,5±2,1	82,8±3,5
G5223	196,8±67,1	279,4±39,9	84,0±3,7	4,0±0,6	92,1±1,3	87,4±3,4
G6328	184,6±25,9	327,8±30,7	82,0±4,0	3,4±0,5	91,4±1,6	94,4±4,4
T475	142,6±24,9	260,2±31,7	81,0±3,7	4,0±0,6	93,4±0,9	90,6±2,7
Media Large White	184,6±47,6 ^a	278,4±35,6	82,2±1,2	3,6±0,3	86,7±8,3 ^a	87,1±5,1
L69	252,4±45,3	161,4±21,0	79,0±2,0	3,2±0,4	86,7±7,1	82,6±1,6
L437	220,4±32,6	189,40±39,7	82,0±2,5	3,6±0,5	93,7±2,8	85,6±3,2
R3846	248,4±32,9	297,6±327,6	82,0±2,5	4,4±0,5	91,7±4,4	86,2±2,9
R4052	233,2±64,0	327,2±58,5	80,0±0,0	3,4±0,5	92,1±3,3	85,4±3,7
R5487	145,6±15,9	296,8±50,0	83,0±4,0	3,6±0,5	90,9±4,1	85,2±4,4
Media Landrace	220,0±54,8 ^b	254,5±66,1	81,2±1,5	3,6±0,4	91,0±2,3 ^b	85,0±1,2
Global	202,3±53,9	266,5±68,0	81,7±3,6	3,6±0,4	88,9±8,2	86,1±5,2

a, b: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre razas.

Hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los resultados de la valoración de la movilidad espermática determinados de forma subjetiva y mediante el sistema CASA para las medias globales (81,7% vs. 88,9%, respectivamente); mientras que el coeficiente de correlación de Spearman entre ambas técnicas fue de $r = 0,26$ [no significativo ($p < 0,05$)].

4.2. ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS ESPERMÁTICOS CONVENCIONALES DURANTE EL PROCESO DE CRIOCONSERVACIÓN

4.2.1 Evolución de la vitalidad y la integridad acrosómica durante el proceso de criopreservación.

Las medias de estos dos parámetros de las 50 congelaciones realizadas se hayan recogidas en la Tabla 18 y en las Figuras 17 y 18; como se puede apreciar en ambas representaciones, se detectó un descenso significativo ($p < 0.05$) en los valores de estos dos parámetros entre cada uno de los cuatro puntos de la toma de muestra.

Tabla 18. Vitalidad espermática e integridad acrosómica en cada punto de toma de muestras.

	0 horas	4 horas	6 horas	Descongelado
% vitalidad	86,3±4,0 ^a	82,0±4,1 ^b	78,4±6,3 ^c	53,6±11,0 ^d
% integridad acrosómica	97,2±1,7 ^a	94,9±3,1 ^b	91,4±3,4 ^c	69,5±8,1 ^d

a, b, c, d: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos

No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los valores de estos dos parámetros entre las dos razas analizadas en ninguno de los puntos de control (Tabla 19). De manera que ambas razas se comportan de la misma forma que cuando se analizan los datos de forma conjunta.

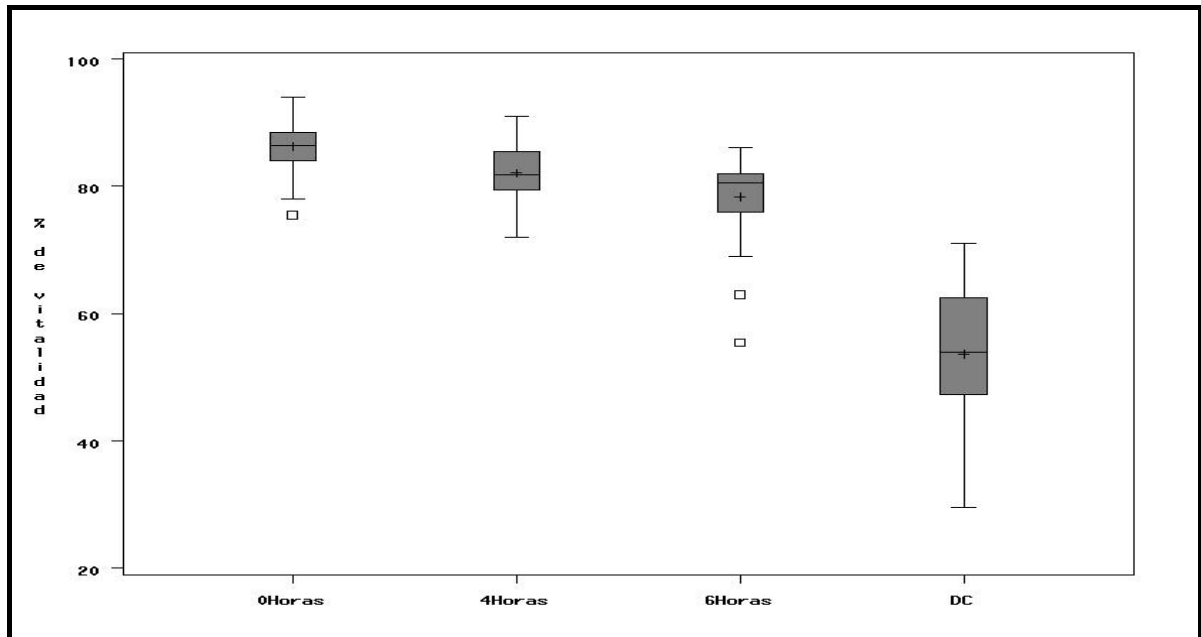


Figura 17. Porcentaje de vitalidad espermática durante el proceso de congelación (0Horas, 4Horas, 6Horas) y tras la descongelación (DC).

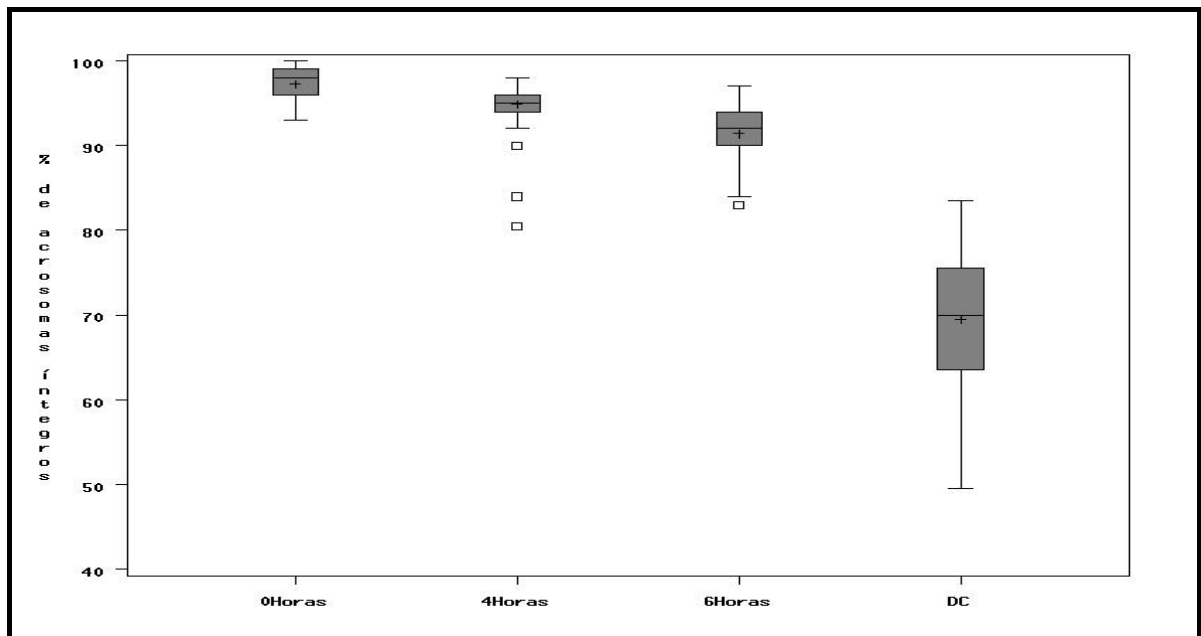


Figura 18. Porcentaje de integridad acrosómica durante el proceso de congelación (0Horas, 4Horas, 6Horas) y tras la descongelación (DC).

Tabla 19. Vitalidad espermática e integridad acrosómica de cada raza durante el proceso de criopreservación.

Tiempo	Parámetros	Large White	Landrace
0 horas	% vitalidad espermática	86,49±4,07	86,14±4,06
	% acrosomas íntegros	96,88±1,84	97,60±1,54
4 horas	% vitalidad espermática	82,26±4,31	81,83±4,05
	% acrosomas íntegros	94,88±2,93	94,86±3,37
6 horas	% vitalidad espermática	79,17±4,91	77,56±7,48
	% acrosomas íntegros	91,58±3,49	91,22±3,29
Descongelado	% vitalidad espermática	53,77±8,78	53,47±12,79
	% acrosomas íntegros	69,30±7,35	69,64±8,72

Si bien se encontraron algunas diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los machos para el parámetro de vitalidad a tiempo 0 y 6 horas; nos parece más interesante resaltar las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los individuos para los parámetros de viabilidad espermática e integridad acrosómica tras la descongelación (Figura 19). La evolución de estos parámetros en cada macho fue diferente, como se comprueba en la Tabla 20.

Tabla 20. Vitalidad espermática e integridad acrosómica de cada macho durante el proceso de criopreservación.

Macho	Parámetro	0 horas	4 horas	6 horas	Descongelado
E955	% vitalidad	85,6±6,4 ^a	81,7±4,8 ^a	74,8±7,5 ^b	51,2±5,3 ^c
	% integridad acrosómica	96,4±1,9 ^a	94,0±6,0 ^{ab}	89,2±5,5 ^b	73,1±3,8 ^c
G2552	% vitalidad	84,8±1,5 ^a	83,1±2,5 ^{ab}	80,7±1,6 ^b	41,7±5,5 ^c
	% integridad acrosómica	96,2±2,3 ^a	93,8±2,2 ^{ab}	91,3±1,8 ^b	56,8±4,5 ^c
G5223	% vitalidad	87,8±4,8 ^a	78,7±6,6 ^b	76,9±4,8 ^b	54,3±6,2 ^c
	% integridad acrosómica	98,8±0,6 ^a	96,0±2,1 ^b	92,0±4,1 ^c	69,6±3,3 ^d
G6328	% vitalidad	85,7±2,7 ^a	82,6±2,9 ^{ab}	80,8±2,2 ^b	62,2±4,7 ^c
	% integridad acrosómica	96,2±1,9 ^a	95,2±0,9 ^{ab}	93,3±2,2 ^b	75,2±2,1 ^c
T475	% vitalidad	88,7±3,5 ^a	85,2±1,6 ^{ab}	82,7±2,6 ^b	59,5±3,1 ^c
	% integridad acrosómica	96,8±1,2 ^a	95,4±1,0 ^a	92,2±2,5 ^b	71,8±2,8 ^c
L69	% vitalidad	85,0±4,3 ^a	78,5±4,8 ^b	67,5±8,5 ^c	45,7±4,4 ^d
	% integridad acrosómica	96,8±1,1 ^a	92,5±6,8 ^{ab}	87,7±4,3 ^b	63,8±3,3 ^c
L437	% vitalidad	83,5±2,6 ^a	80,5±3,4 ^{ab}	79,4±4,3 ^b	35,0±3,0 ^c
	% integridad acrosómica	97,0±1,7 ^a	95,0±2,5 ^a	91,0±2,4 ^b	61,4±5,1 ^c
R3846	% vitalidad	83,3±1,8 ^a	82,9±2,6 ^a	83,4±3,5 ^a	53,3±2,3 ^c
	% integridad acrosómica	96,6±1,7 ^a	95,6±1,0 ^a	93,2±1,9 ^b	65,2±3,1 ^c
R4052	% vitalidad	89,1±3,0 ^a	84,5±4,7 ^{ab}	79,7±6,2 ^b	65,9±3,2 ^c
	% integridad acrosómica	98,8±0,4 ^a	94,6±1,2 ^b	91,8±3,1 ^b	77,7±4,6 ^c
R5487	% vitalidad	89,8±3,6 ^a	82,8±2,9 ^b	77,8±3,8 ^c	67,5±4,6 ^d
	% integridad acrosómica	98,8±1,0 ^a	96,6±1,5 ^b	92,4±2,3 ^c	80,1±4,0 ^d

a, b, c, d: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

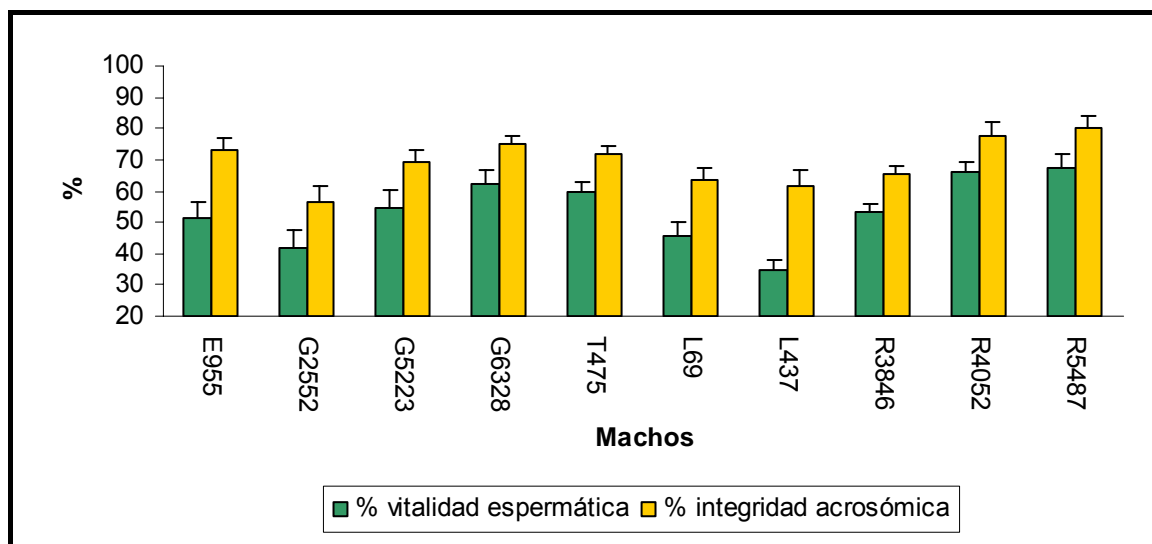


Figura 19. Vitalidad espermática e integridad acrosómica en cada uno de los machos, analizadas tras la descongelación.

El índice de correlación de Spearman para ambos parámetros a tiempo 0 fue de $r = 0,35$, a tiempo 4 de $r = 0,06$, a tiempo 6 de $r = 0,47$ y en el semen descongelado de $r = 0,85$; siendo únicamente no significativa la correlación ($p > 0,05$) calculada a las 4 horas.

4.2.2 Evolución del porcentaje de movilidad espermática durante el proceso de criopreservación.

Como se aprecia en la Tabla 21 y en la Figura 20, durante la primera fase de la congelación se produce, de forma general, un incremento no significativo ($p > 0,05$) tanto del porcentaje de movilidad medida en ausencia de cafeína como el determinado en presencia de esta sustancia estimulante. En los siguientes pasos se produjo una reducción significativa ($p < 0,05$) de ambos índices, especialmente la movilidad medida sin cafeína tras el proceso de descongelación.

Tabla 21. Porcentaje de movilidad espermática, analizada en presencia/ausencia de cafeína en cada uno de los puntos de toma de muestra.

	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
% movilidad sin cafeína.	88,85±8,15 ^a	91,42±4,92 ^a	76,32±17,41 ^b	45,41±14,92 ^c
% movilidad con cafeína.	90,28±6,63 ^a	92,01±7,09 ^a	85,39±10,57 ^{b,*}	66,85±13,17 ^{c,*}

a, b, c: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

*: Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras con/sin cafeína.

Entre los dos primeros tiempos de toma de muestra no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en los resultados del porcentaje de movilidad determinado en ausencia/presencia de cafeína; sin embargo tanto a las 6 horas, como en el análisis llevado a cabo tras la descongelación hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en función de que la determinación se hubiese llevado a cabo con/sin dicha sustancia estimulante (Tabla 21 y Figura 20).

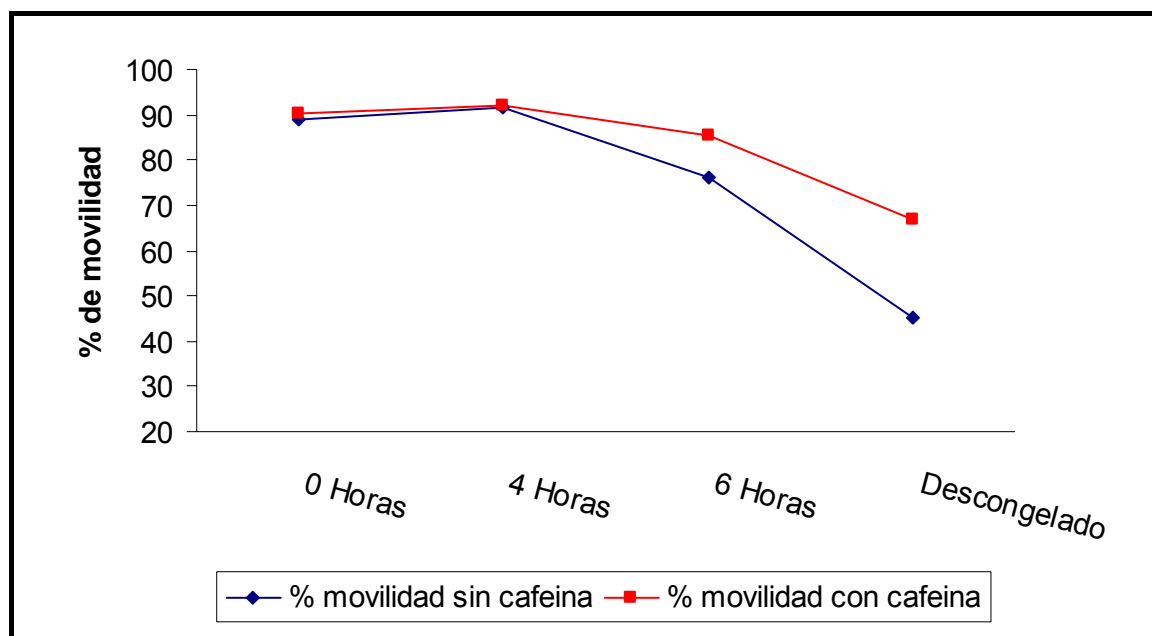


Figura 20. Evolución del porcentaje de movilidad durante el proceso de criopreservación en muestras con/sin cafeína.

Cuando la evolución de estos parámetros se analizó agrupando los datos en función de la raza, se observó, que los eyaculados de machos de raza Large White, seguían el mismo esquema descrito en la evolución de la movilidad espermática que el definido para el conjunto de datos; mientras que en los de raza Landrace difieren, pudiéndose observar ya diferencias significativas ($p < 0.05$) en la movilidad determinada en presencia de cafeína entre la hora 0 y la toma de muestras llevada a cabo a 15 °C (4 horas).

A excepción de los análisis realizados en presencia de cafeína en los tiempos 0 y 6, en el resto de evaluaciones se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los resultados de las dos razas analizadas, siendo en todos los tiempos superior el porcentaje de motilidad en los eyaculados de machos de raza Landrace (Tabla 22).

Tabla 22. Porcentaje de espermatozoides móviles en cada una de las razas analizadas, en presencia/ausencia de cafeína y en cada uno de los tiempos considerados.

Tiempo	Parámetros	Large White	Landrace
0 horas	% mov. sin cafeína	86,7±9,9 ^a	91,0±5,1 ^b
	% mov. con cafeína	88,8±8,1	91,8±4,3
4 horas	% mov. sin cafeína	89,9±5,6 ^a	93,0±3,5 ^b
	% mov. con cafeína	89,8±8,9 ^a	94,2±3,4 ^b
6 horas	% mov. sin cafeína	70,7±19,0 ^a	81,9±13,5 ^b
	% mov. con cafeína	84,6±12,5	86,1±8,2
Descongelado	% mov. sin cafeína	39,3±15,4 ^a	51,6±11,6 ^B
	% mov. con cafeína	62,8±14,4 ^a	71,0±10,3

a, b: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las razas

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores del porcentaje de movilidad (tanto en presencia como en ausencia de cafeína), entre los distintos machos analizados en todos los tiempos de toma de muestra, a excepción de las muestras recogidas a tiempo 4 y analizadas sin la adición de cafeína. Los valores están recogidos en la Tabla 23, así como el comportamiento particular de estos dos parámetros analizado de forma individual durante el proceso de congelación.

Tabla 23. Evolución del porcentaje de movilidad de cada uno de los individuos.

Macho	sin/con cafeína	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
E955	% mov. sin cafeína	71,1±11,6 ^a	82,9±6,1 ^a	40,6±15,1 ^b	20,3±8,4 ^c
	% mov. con cafeína	76,8±7,0 ^a	74,4±7,6 ^a	68,9±17,1 ^{ab}	47,5±19,2 ^b
G2552	% mov. sin cafeína	85,5±2,1 ^a	90,5±2,7 ^b	77,4±9,0 ^{ab}	28,0±7,1 ^c
	% mov. con cafeína	89,0±4,0 ^a	91,5±2,9 ^a	88,1±5,1 ^a	53,4±5,2 ^b
G5223	% mov. sin cafeína	92,1±1,3 ^a	87,8±4,1 ^a	71,7±11,8 ^b	47,4±12,5 ^c
	% mov. con cafeína	91,5±7,3 ^a	94,2±3,3 ^a	82,2±7,8 ^b	67,1±6,6 ^c
G6328	% mov. sin cafeína	91,4±1,6 ^a	93,7±2,4 ^a	86,1±3,8 ^b	48,6±7,4 ^c
	% mov. con cafeína	91,0±1,9 ^a	93,7±3,4 ^a	92,3±2,8 ^a	71,2±6,0 ^b
T475	% mov. sin cafeína	93,4±0,9 ^a	94,4±2,0 ^a	77,8±9,9 ^b	52,1±6,6 ^c
	% mov. con cafeína	95,7±1,3 ^a	95,1±2,0 ^a	91,7±3,9 ^a	74,5±3,5 ^b
L69	% mov. sin cafeína	86,7±7,1 ^a	90,9±2,6 ^a	58,6±10,2 ^b	51,3±8,8 ^c
	% mov. con cafeína	90,8±2,7 ^a	92,1±5,1 ^a	77,2±6,9 ^b	72,6±5,2 ^b
L437	% mov. sin cafeína	93,7±2,8 ^a	93,9±2,4 ^a	88,7±2,7 ^b	40,3±7,2 ^c
	% mov. con cafeína	89,3±3,4 ^a	92,4±2,5 ^a	90,3±1,3 ^a	54,4±6,6 ^b
R3846	% mov. sin cafeína	91,7±4,4 ^{ab}	92,8±2,0 ^b	86,6±5,1 ^a	48,7±7,6 ^c
	% mov. con cafeína	90,9±5,8 ^{ab}	95,5±2,4 ^b	90,0±1,9 ^a	70,5±4,8 ^c
R4052	% mov. sin cafeína	92,1±3,3 ^{ab}	94,3±3,5 ^a	91,3±2,6 ^b	60,5±12,2 ^c
	% mov. con cafeína	93,6±3,0 ^a	96,1±2,0 ^a	86,9±4,3 ^b	81,3±3,1 ^c
R5487	% mov. sin cafeína	90,9±4,1 ^a	92,9±4,9 ^a	84,3±8,0 ^a	57,1±9,3 ^b
	% mov. con cafeína	94,2±3,4 ^a	95,2±1,6 ^a	86,2±12,3 ^b	76,0±3,9 ^c

a, b, c: Distinto superíndice indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

El índice de correlación entre la valoración de la movilidad espermática en presencia/ausencia de cafeína, en cada tiempo, están recogidas en la Tabla 24; y entre estas valoraciones y los resultados de vitalidad e integridad acrosómica en las Tablas 25 y 26.

Tabla 24. Índices de correlación entre la determinación del porcentaje de movilidad en presencia- ausencia de cafeína.

	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
Índice de correlación	0,56*	0,43*	0,46*	0,73*

*: Indica correlación significativa ($p < 0,05$).

Tabla 25. Índices de correlación entre la determinación del porcentaje de movilidad espermática en ausencia de cafeína y los valores de integridad acrosómica y vitalidad.

	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
Integridad Acrosómica.	0,38*	0,17	0,32*	0,43*
Vitalidad.	0,08	0,07	0,43*	0,60*

*: Indica correlación significativa ($p < 0,05$).

Tabla 26. Índices de correlación entre la determinación del porcentaje de movilidad espermática en presencia de cafeína y los valores de integridad acrosómica y vitalidad.

	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
Integridad Acrosómica.	0,37*	0,18	0,35*	0,30*
Vitalidad.	0,29*	0,05	0,39*	0,44*

*: Indica correlación significativa ($p < 0,05$).

4.3 EXPERIMENTO 1. EVALUACIÓN DE LOS PATRONES CINÉTICOS DESCRITOS POR LOS ESPERMATOZOIDES DE VERRACO DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN

4.3.1 Determinación de las subpoblaciones cinéticas presentes en un eyaculado

Siguiendo el procedimiento descrito en el epígrafe 3.11.1.1, obtuvimos que la mejor clasificación mediante el método de las *K-means* de los datos iniciales se consigue cuando estos se agrupan en 40 *bins*. A partir de estos, mediante los algoritmos propuestos por Ciampi *et al* (2007) se construyó el árbol jerárquico aglomerativo (Figura 21).

A partir de este se representó la altura a la que se encontraban los nodos del mismo (Figura 22). Basándonos en estos dos gráficos se llegó a la conclusión de que, para los datos de partida, la mejor propuesta de clasificación era la que los agrupaba en 3 subpoblaciones. Para confirmar que esta teoría se ajustaba a la naturaleza real de los datos originales, se representó la distribución de densidades de dichos datos correspondiente a la proyección del análisis discriminante lineal (Figura 23). En ella, se comprobó la existencia de dos focos de agrupamiento (correspondientes a las dos clases principales) y un tercero más tenue

constituido por la subpoblación con un menor porcentaje de casos. Por último, el índice de Fowlkes-Mallows fue apreciablemente alto (0,87), confirmando la existencia real de 3 subpoblaciones definidas a partir de sus parámetros cinéticos. Las medias de los parámetros cinéticos en cada una de esas tres subpoblaciones se encuentran recogidas en la Tabla 27.

Tabla 27. Valores promedio de los parámetros cinéticos de cada subpoblación.

Parámetros	Subpoblación 1 (SP₁)	Subpoblación 2 (SP₂)	Subpoblación 3 (SP₃)
VCL ($\mu\text{m/s}$)	59,02	98,60	27,61
VSL ($\mu\text{m/s}$)	46,84	44,18	10,04
VAP ($\mu\text{m/s}$)	52,67	82,33	18,28
LIN (%)	78,97	45,71	37,28
STR (%)	88,72	54,91	57,22
WOB (%)	88,81	83,67	64,86
ALH (μm)	1,85	3,14	1,40
BCF (Hz)	6,68	6,21	5,67

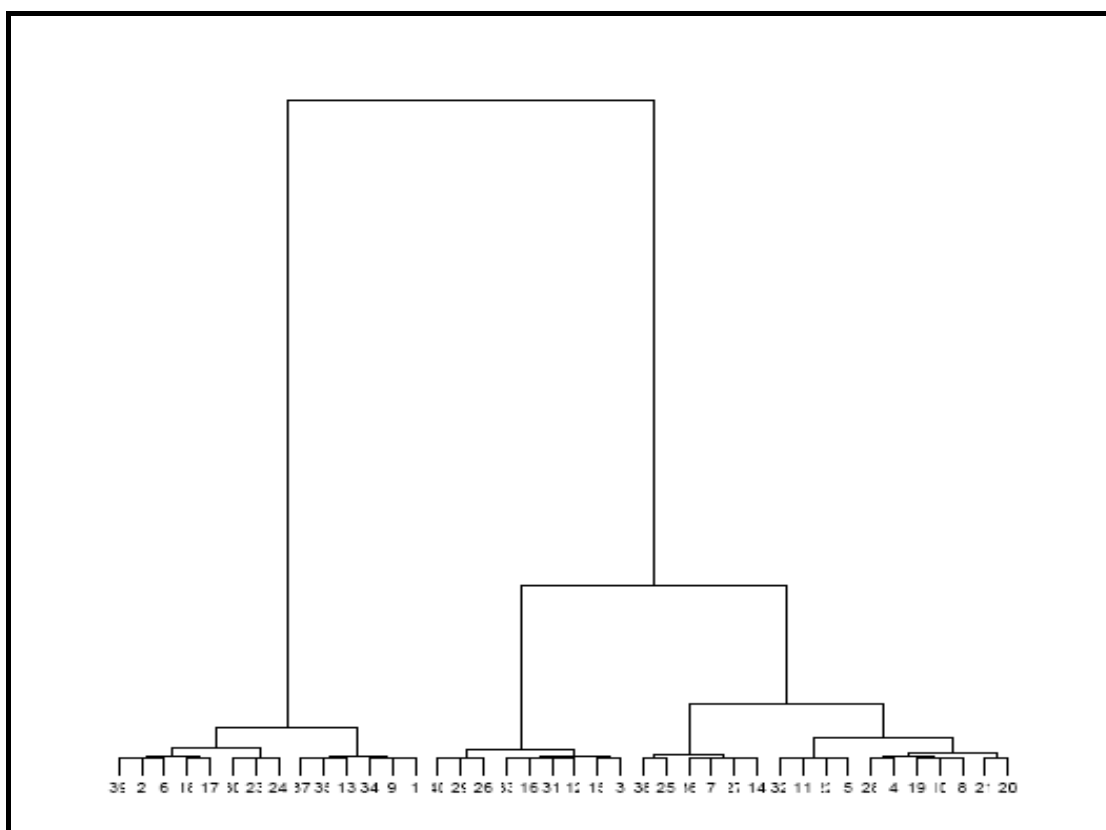


Figura 21. Árbol jerárquico aglomerativo.

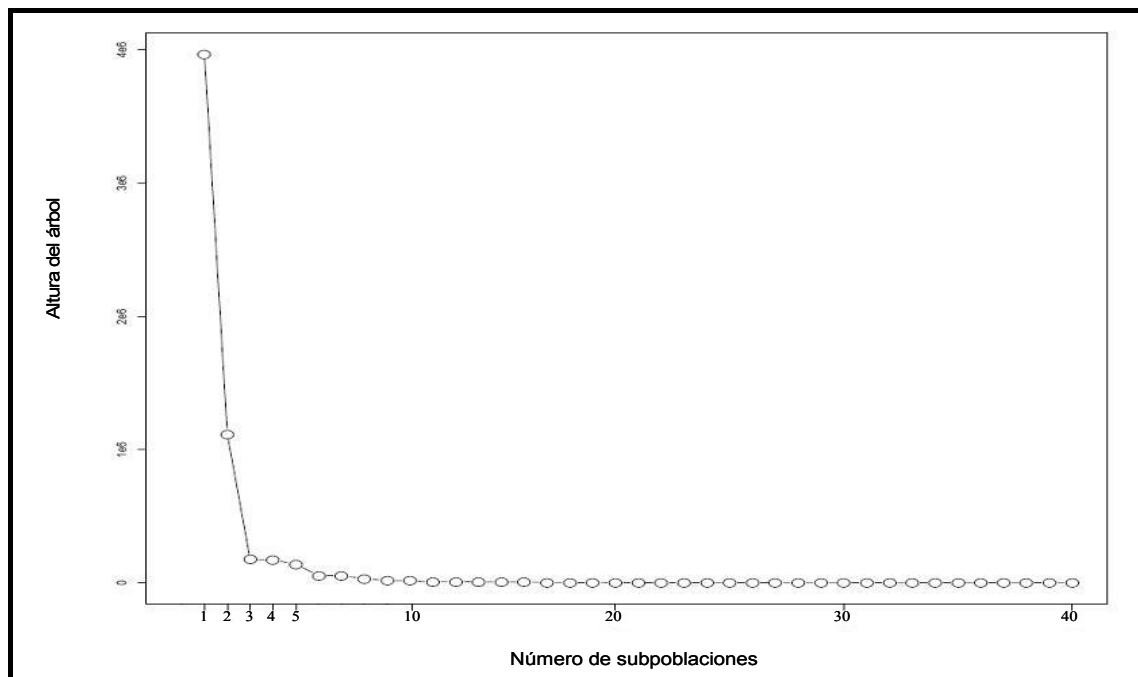


Figura 22. Altura de los nodos de unión en el árbol jerárquico aglomerativo.

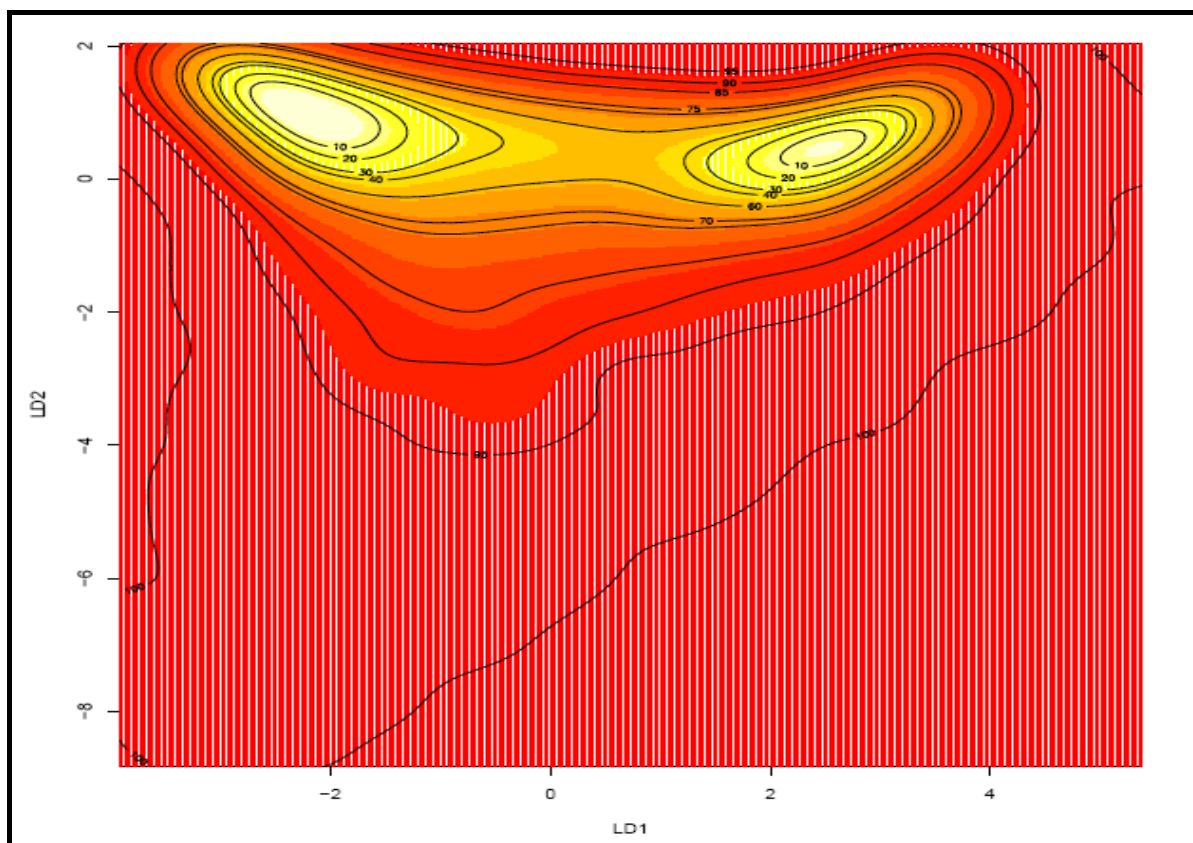


Figura 23. Distribución de densidades de los datos cinéticos tras su proyección.

4.3.2 Evolución de las subpoblaciones espermáticas durante la congelación-descongelación

La clasificación descrita en el apartado anterior nos sirvió como modelo para catalogar a cada una de las células espermáticas analizadas durante el proceso de congelación-descongelación, en una de las tres subpoblaciones definidas. Esto nos permite detallar la evolución de las mismas durante el proceso de criopreservación y la implicación de la raza, el individuo o la adición de cafeína en la distribución poblacional espermática.

El porcentaje de espermatozoides asignado a cada subpoblación en cada uno de los momentos de recogida de muestras, se haya especificado en la Tabla 28 y representado en la Figura 24, cuando la medición se realizó sin añadir cafeína. Los porcentajes correspondientes a la distribución subpoblacional cuando el análisis incluía la presencia de dicha sustancia estimulante, se encuentran recogidos en la Tabla 29 y representados en la Figura 25.

Tabla 28. Evolución de las subpoblaciones espermáticas durante el proceso de criopreservación en muestras sin cafeína añadida.

% subpoblaciones	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
% SP ₁	45,24±8,41 ^a	39,10±11,68 ^b	34,71±12,92 ^b	69,73±8,54 ^c
% SP ₂	10,13±6,51 ^{a,*}	21,41±10,92 ^{b,*}	28,33±12,55 ^{c,*}	9,66±5,74 ^{a,*}
% SP ₃	44,64±9,07 ^a	39,49±13,07 ^b	36,97±17,89 ^c	20,60±8,55 ^{c,**}

a, b, c: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

*, **: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tamaño de las subpoblaciones.

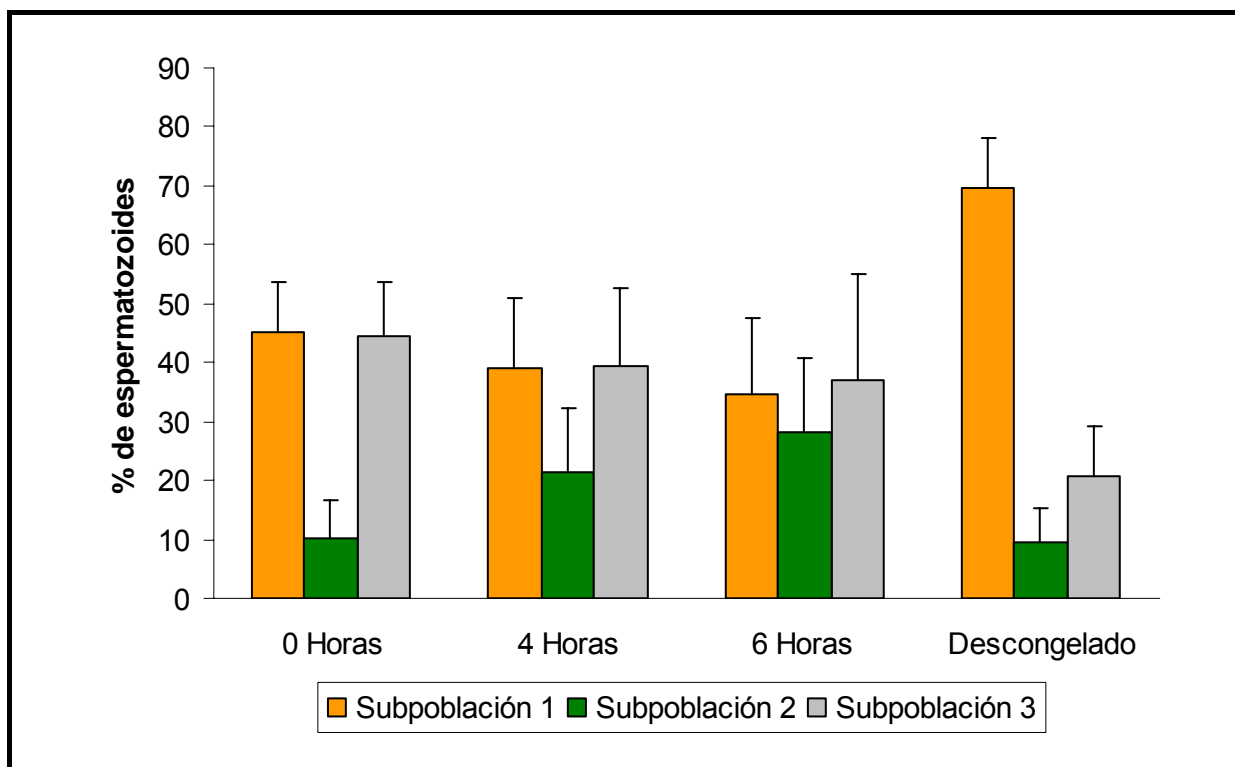


Figura 24. Distribución de las tres subpoblaciones durante el proceso de criopreservación, determinadas en las muestras sin cafeína añadida.

Como se aprecia en la Figura 24 y se recoge en la Tabla 28, en los tres primeros tiempos de toma de muestra no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre el tamaño de las subpoblaciones 1 (SP_1) y la 3 (SP_3); mientras que la subpoblación 2 (SP_2) fue significativamente ($p < 0,05$) menor. Tras la descongelación la situación cambió radicalmente apreciándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tamaños de las tres subpoblaciones. Siendo apreciablemente mayor el tamaño de la SP_1 .

Tabla 29. Evolución de las subpoblaciones espermáticas durante el proceso de criopreservación en muestras con cafeína añadida.

% subpoblaciones	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
% SP_1	55,82±8,67 ^a	46,63±9,45 ^b	40,68±14,98 ^c	83,59±4,26 ^{d,*}
% SP_2	6,15±4,12 ^{a,*}	10,29±7,44 ^{b,*}	19,58±11,77 ^{c,*}	8,33±4,04 ^b
% SP_3	38,04±10,23 ^{a,**}	43,07±10,50 ^b	39,75±18,45 ^{ab}	8,06±3,41 ^c

a, b, c: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

*, **: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tamaño de las subpoblaciones para cada uno de los tiempos.

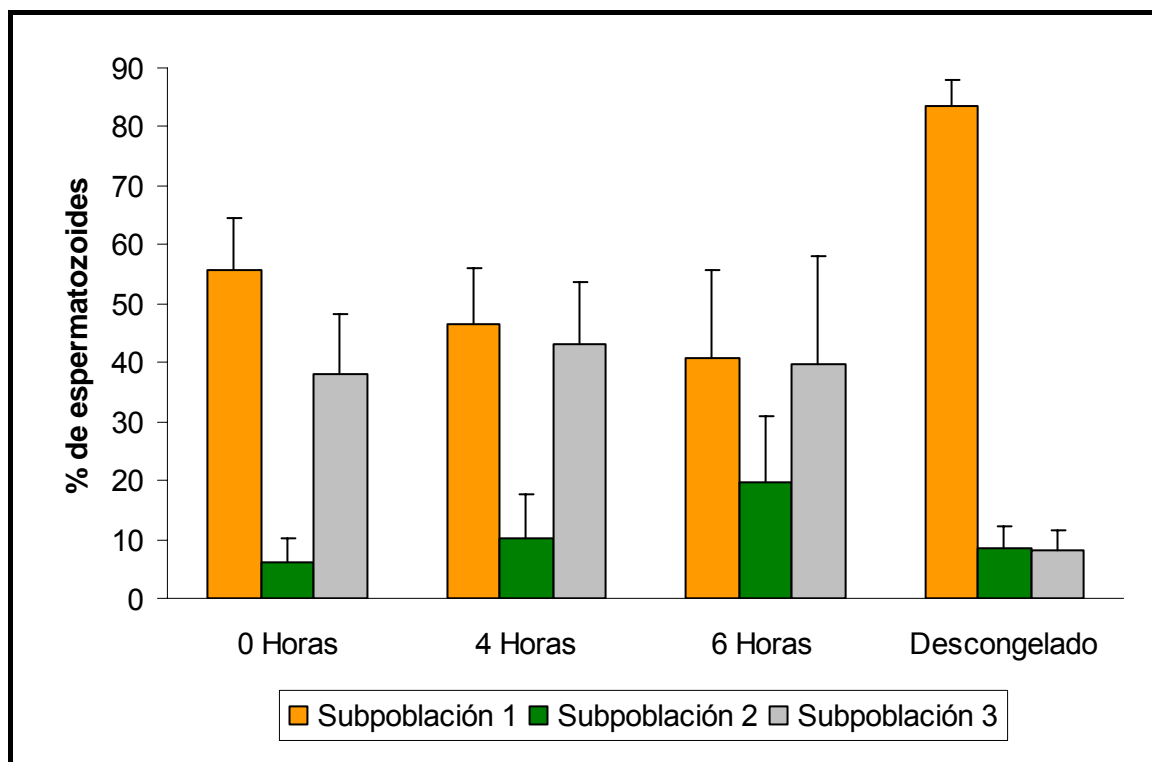


Figura 25. Distribución de las tres subpoblaciones durante el proceso de congelación-descongelación, determinadas en las muestras con cafeína añadida.

Con la adición de cafeína, ya a tiempo cero, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el tamaño de las tres subpoblaciones. A las 4 horas la SP₁ y la SP₃ presentaban una dimensión similar, mientras que la SP₂ era significativamente menor ($p < 0,05$); situación que se repitió a las 6 horas. Por último, tras la descongelación no hubo diferencias entre el tamaño de la SP₂ y la SP₃; mientras que la SP₁ fue significativamente ($p < 0,05$) mayor.

En la Tabla 30 y en las Figuras 26 a 28, se recogen las comparaciones entre las dimensiones de las subpoblaciones analizadas en presencia/ausencia de cafeína.

Tabla 30. Comparación del tamaño subpoblacional entre las muestras analizadas en presencia de cafeína con respecto a las que no fue añadida dicha sustancia.

Tiempo	% subpoblaciones	Sin cafeína	Con cafeína
0 Horas	% SP ₁	45,24±8,41 ^a	55,82±8,67 ^b
	% SP ₂	10,13±6,51 ^a	6,15±4,12 ^b
	% SP ₃	44,64±9,07 ^a	38,04±10,23 ^b
4 Horas	% SP ₁	39,10±11,68 ^a	46,63±9,45 ^b
	% SP ₂	21,41±10,92 ^a	10,29±7,44 ^b
	% SP ₃	39,49±13,07 ^a	43,07±10,50 ^b
6 Horas	% SP ₁	34,71±12,92 ^a	40,68±14,98 ^b
	% SP ₂	28,33±12,55 ^a	19,58±11,77 ^b
	% SP ₃	36,97±17,89	39,75±18,45
Descongelado	% SP ₁	69,73±8,54 ^a	83,59±4,26 ^b
	% SP ₂	9,66±5,74	8,33±4,04
	% SP ₃	20,60±8,55 ^a	8,06±3,41 ^b

a, b: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en el tamaño de la subpoblación entre muestras con/sin cafeína.

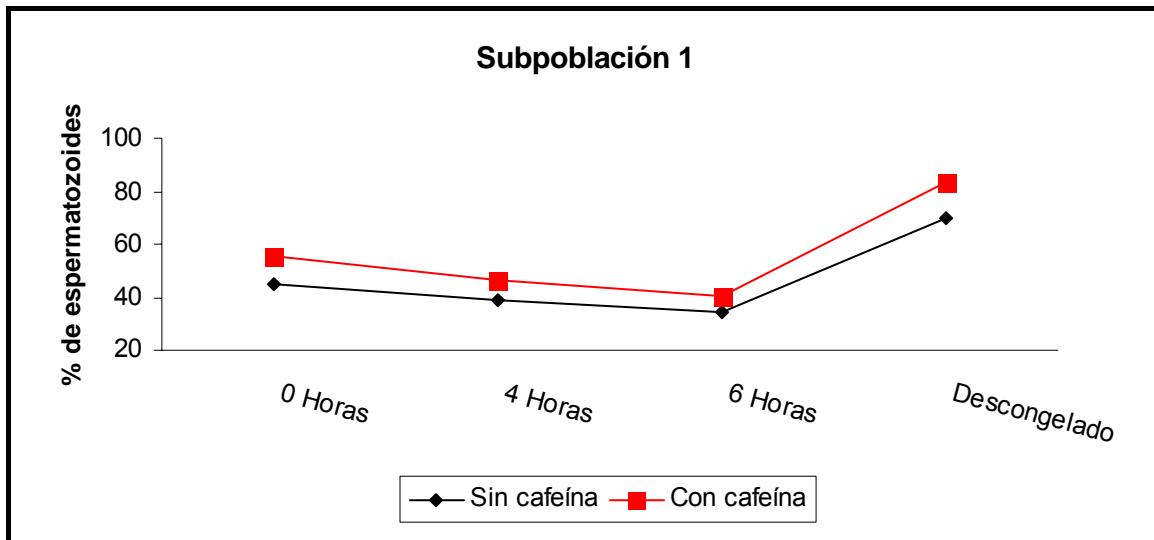


Figura 26. Comparación del tamaño de la SP₁ en muestras con/sin cafeína a lo largo del proceso de criopreservación.

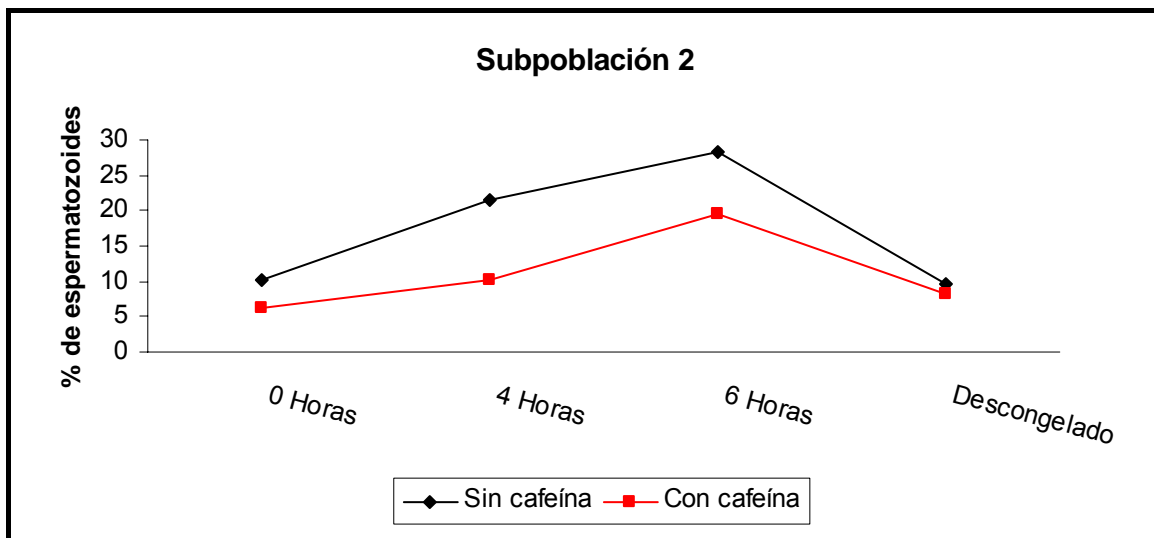


Figura 27. Comparación del tamaño de la SP₂ en muestras con/sin cafeína a lo largo del proceso de criopreservación.

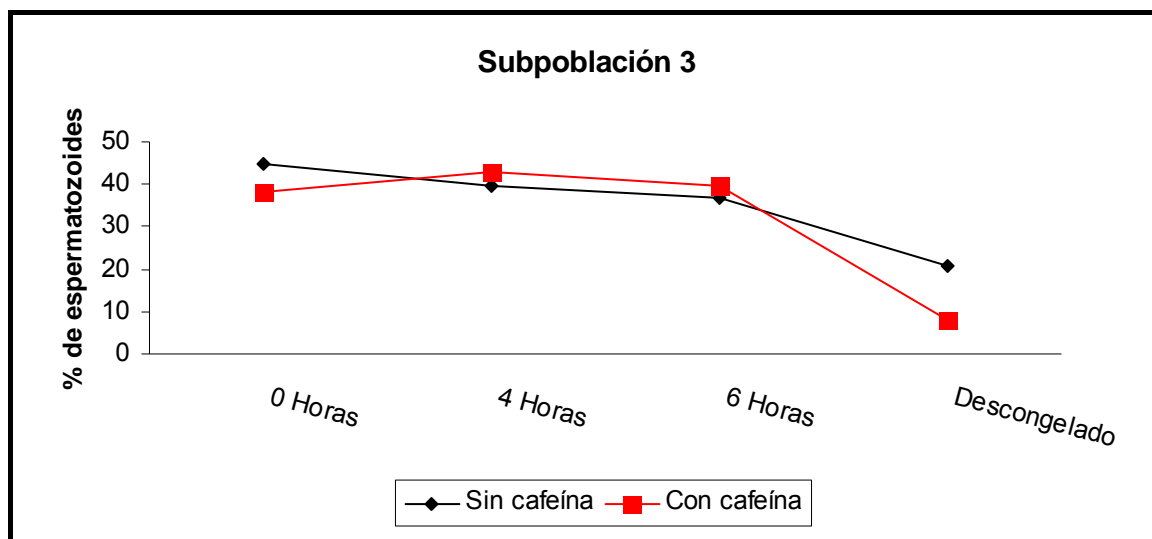


Figura 28. Comparación del tamaño de la SP₃ en muestras con/sin cafeína a lo largo del proceso de congelación-descongelación.

En las Tablas 31 y 32 se recoge la comparación del tamaño de las subpoblaciones espermáticas entre las dos razas analizadas, tanto en presencia como en ausencia de cafeína en cada uno de los tiempos de toma de muestra durante el proceso de congelación-descongelación.

Tabla 31. Comparación del tamaño subpoblacional entre las dos razas empleadas en las muestras analizadas sin cafeína.

Tiempo	% subpoblaciones	Large White	Landrace
0 Horas	% SP ₁	44,55±7,50	45,92±8,88
	% SP ₂	9,76±6,54	10,51±6,19
	% SP ₃	45,68±8,81	43,59±8,85
4 Horas	% SP ₁	34,84±11,59 ^a	43,36±9,61 ^b
	% SP ₂	22,14±12,29	20,69±8,77
	% SP ₃	43,02±13,95 ^a	35,96±10,45 ^b
6 Horas	% SP ₁	32,34±13,38	37,07±11,43
	% SP ₂	31,22±14,04	25,44±9,43
	% SP ₃	36,44±18,25	37,50±16,76
Descongelado	% SP ₁	66,00±9,40 ^a	73,46±4,95 ^b
	% SP ₂	9,95±6,66	9,37±4,32
	% SP ₃	24,03±9,25 ^a	17,17±5,66 ^b

a, b: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tamaño de la subpoblación.

En los machos de raza Large White, la SP₁ y la SP₂ siguieron la misma dinámica que el conjunto global, mientras que la SP₃, a diferencia de éste no sufrió un descenso significativo ($p < 0,05$) en el paso de las 0 a las 4 horas. Fue también diferente estadísticamente ($p < 0,05$) el resultado observado en ese primer punto de toma de muestra con respecto al llevado a cabo en el momento de la descongelación.

A diferencia del caso general, anteriormente descrito, en los individuos de raza Landrace, la SP₁ no sufrió un descenso significativo ($p > 0,05$) entre la toma de las 0 h y la 4 h. Por su parte, el tamaño de las SP₂ tampoco mostró diferencias ($p > 0,05$) entre la toma de muestras de las 4 y las 6 horas. Por último, para la SP₃ no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los resultados obtenidos a las 0 y a las 6 horas, por contra si se observaron ($p < 0,05$) entre la recogida de muestras de las 0 horas y la llevada a cabo tras la descongelación.

Tabla 32. Comparación del tamaño subpoblacional entre las dos razas empleadas en las muestras analizadas con cafeína.

Tiempo	% subpoblaciones	Large White	Landrace
0 Horas	% SP ₁	55,35±9,30	56,28±7,58
	% SP ₂	6,61±3,74	5,70±4,28
	% SP ₃	38,06±11,11	38,02±8,80
4 Horas	% SP ₁	44,83±8,07	48,44±10,00
	% SP ₂	11,80±8,74	8,78±5,03
	% SP ₃	43,38±10,15	42,76±10,43
6 Horas	% SP ₁	42,29±12,75	39,07±16,24
	% SP ₂	24,06±12,70 ^a	15,10±6,24 ^b
	% SP ₃	33,66±17,38 ^a	45,84±16,71 ^b
Descongelado	% SP ₁	83,72±3,70	83,46±4,60
	% SP ₂	6,86±3,27 ^a	9,81±4,04 ^b
	% SP ₃	9,42±3,36 ^a	6,71±2,72 ^b

a, b: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tamaño de la subpoblación.

A diferencia de la dinámica general de las muestras analizadas con cafeína, en los análisis realizados sobre material seminal de raza Large White no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la recogida de muestras de las 4 y las 6 horas para la SP₁. Además, para la SP₂ no fueron diferentes ($p > 0,05$) los resultados obtenidos a las 0 horas y tras la descongelación. Finalmente, para la SP₃ se observó la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la toma de muestras de las 4 horas y la realizada a las 6 horas.

En los machos de raza Landrace, los resultados de la SP₁ siguen la misma dinámica que los expuestos cuando considerábamos el total de eyaculados; por el contrario para la SP₂ se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los resultados de las 4 horas y los obtenidos tras la descongelación y no fueron observadas dichas diferencias ($p > 0,05$) entre las 4 y las 6 horas. Finalmente, para la SP₃, tampoco se encontraron diferencias ($p > 0,05$) entre los resultados obtenidos a las 0 horas y los de las 4 horas.

Cuando se realizó la comparación de los resultados de la distribución subpoblacional entre los 10 machos empleados en este experimento, se pudo observar como no existían diferencias estadísticamente significativas entre los individuos para el tamaño de la SP₁ a las 0 horas y para los resultados de la SP₂ y la SP₃ a las 6 horas, en las muestras analizadas con

cafeína. En el resto de los supuestos, se observó que los datos obtenidos no eran iguales ($p < 0,05$) en función del macho.

En las muestras a las que se añadió cafeína, hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los machos existentes en la distribución subpoblacional en todos los tiempos; a excepción del tamaño de la SP₁ a tiempo 0.

En las Tablas 33 a 42 se encuentran los resultados promedio de la distribución subpoblacional en presencia/ausencia de cafeína, de cada uno de los individuos empleados en este experimento durante el proceso de congelación-descongelación.

Tabla 33. Evolución de la distribución de las subpoblaciones espermáticas en el macho E955 durante el proceso de criopreservación.

Macho	% subpoblaciones	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
E955	% SP ₁	41,24±11,29 ^a	26,64±11,35 ^a	28,96±15,26 ^a	63,38±9,62 ^b
	% SP ₁ + cafeína	45,92±13,22 ^a	44,38±11,97 ^a	45,08±5,62 ^a	83,66±4,00 ^b
	% SP ₂	4,80±4,37 ^{ac}	9,66±1,99 ^{ab}	31,32±20,98 ^b	5,08±2,26 ^c
	% SP ₂ + cafeína	2,34±1,48 ^a	3,48±1,88 ^a	23,76±10,86 ^b	3,24±0,90 ^a
	% SP ₃	53,96±8,08 ^{ab}	63,70±11,61 ^a	39,72±19,62 ^{bc}	31,24±8,61 ^c
	% SP ₃ + cafeína	51,76±13,05 ^a	52,14±12,84 ^a	31,16±9,15 ^b	13,06±3,30 ^b

a, b, c: Distinto superíndice indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 34. Evolución de la distribución de las subpoblaciones espermáticas en el macho G2552 durante el proceso de criopreservación.

Macho	% subpoblaciones	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
G2552	% SP ₁	43,62±3,33 ^a	36,34±6,98 ^a	35,94±13,38 ^a	64,94±12,96 ^b
	% SP ₁ + cafeína	55,95±7,49 ^a	43,36±6,10 ^b	47,08±7,02 ^{ab}	84,30±2,72 ^c
	% SP ₂	7,86±4,36 ^a	31,02±10,09 ^b	31,86±8,54 ^b	6,26±3,52 ^a
	% SP ₂ + cafeína	10,24±5,47 ^{ac}	17,12±9,19 ^{abc}	24,04±8,93 ^b	6,12±3,39 ^c
	% SP ₃	48,52±5,40	32,64±8,30	32,24±18,31	28,76±11,95
	% SP ₃ + cafeína	33,86±7,28 ^a	39,52±7,36 ^a	28,86±14,39 ^a	9,60±1,64 ^b

a, b, c: Distinto superíndice indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 35. Evolución de la distribución de las subpoblaciones espermáticas en el macho G5223 durante el proceso de criopreservación.

Macho	% subpoblaciones	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
G5223	% SP ₁	47,32±6,81 ^a	42,22±9,19 ^a	46,24±7,21 ^a	76,90±6,90 ^b
	% SP ₁ + cafeína	56,86±5,51 ^a	50,86±5,25 ^a	49,98±9,33 ^a	87,52±2,64 ^b
	% SP ₂	9,32±7,34 ^{ac}	14,18±8,02 ^{abc}	23,88±8,63 ^b	6,18±1,51 ^c
	% SP ₂ + cafeína	5,50±2,74	4,64±3,59	12,02±9,12	5,56±1,53
	% SP ₃	43,34±5,58 ^a	43,62±3,17 ^a	29,88±12,09 ^b	16,94±7,49 ^b
	% SP ₃ + cafeína	37,64±8,14 ^a	44,52±8,11 ^a	38,00±15,49 ^a	6,94±3,39 ^b

a, b, c: Distinto superíndice indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 36. Evolución de la distribución de las subpoblaciones espermáticas en el macho G6328 durante el proceso de criopreservación.

Macho	% subpoblaciones	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
G6328	% SP ₁	47,64±6,76 ^a	45,00±9,91 ^{ab}	32,50±4,80 ^b	62,06±6,88 ^c
	% SP ₁ + cafeína	62,32±9,12 ^a	47,16±9,53 ^b	39,26±17,11 ^b	80,56±3,93 ^c
	% SP ₂	17,42±7,56 ^{ab}	22,54±15,62 ^{ab}	36,54±16,13 ^a	11,10±4,92 ^b
	% SP ₂ + cafeína	7,88±1,27 ^a	19,08±10,80 ^b	39,96±14,65 ^c	9,54±2,23 ^a
	% SP ₃	34,94±2,57 ^a	32,46±11,43 ^{ab}	30,98±19,90 ^{ab}	26,86±4,41 ^b
	% SP ₃ + cafeína	29,84±9,77 ^a	33,76±10,74 ^a	20,82±20,59 ^a	9,90±3,47 ^b

a, b, c: Distinto superíndice indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 37. Evolución de la distribución de las subpoblaciones espermáticas en el macho T475 durante el proceso de criopreservación.

Macho	% subpoblaciones	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
T475	% SP ₁	42,94±9,41 ^a	24,04±8,15 ^b	18,08±11,33 ^b	62,44±4,05 ^c
	% SP ₁ + cafeína	55,74±5,62 ^a	38,38±2,97 ^b	30,04±16,25 ^b	82,56±2,98 ^c
	% SP ₂	9,38±3,81 ^a	33,28±4,61 ^b	32,52±17,44 ^{bc}	21,14±4,05 ^c
	% SP ₂ + cafeína	7,1±2,16 ^a	14,68±2,68 ^b	20,54±4,48 ^c	9,82±3,09 ^{ab}
	% SP ₃	47,66±10,53 ^a	42,68±9,35 ^a	49,38±22,92 ^a	16,36±3,61 ^b
	% SP ₃ + cafeína	37,18±7,76 ^a	46,96±2,98 ^a	49,44±19,86 ^a	7,60±2,49 ^b

a, b, c: Distinto superíndice indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 38. Evolución de la distribución de las subpoblaciones espermáticas en el macho L69 durante el proceso de criopreservación.

Macho	% subpoblaciones	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
L69	% SP ₁	54,92±7,90 ^a	37,64±5,04 ^b	36,46±13,15 ^b	71,42±5,56 ^c
	% SP ₁ + cafeína	59,10±7,08 ^a	59,44±7,35 ^a	59,90±10,97 ^a	86,56±3,59 ^b
	% SP ₂	2,42±1,77 ^a	10,74±1,26 ^b	13,36±6,69 ^b	5,30±3,49 ^a
	% SP ₂ + cafeína	2,84±1,97 ^a	5,58±1,71 ^b	18,48±9,20 ^c	7,44±3,69 ^b
	% SP ₃	42,68±8,77 ^a	51,62±5,21 ^a	50,20±16,37 ^a	23,30±7,08 ^b
	% SP ₃ + cafeína	38,06±8,43 ^a	34,96±7,01 ^a	21,62±8,89 ^b	5,98±2,96 ^c

a, b, c: Distinto superíndice indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 39. Evolución de la distribución de las subpoblaciones espermáticas en el macho L437 durante el proceso de criopreservación.

Macho	% subpoblaciones	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
L437	% SP ₁	36,86±3,36 ^{ab}	44,12±7,38 ^a	29,44±8,27 ^b	75,22±7,36 ^c
	% SP ₁ + cafeína	57,14±4,91 ^a	42,06±3,90 ^b	30,64±15,09 ^b	86,26±4,00 ^c
	% SP ₂	16,32±6,39 ^a	24,04±6,98 ^a	26,84±7,44 ^a	6,24±2,44 ^b
	% SP ₂ + cafeína	6,32±2,78 ^a	14,38±4,28 ^b	13,26±2,55 ^b	7,06±3,51 ^a
	% SP ₃	46,88±4,68 ^a	31,88±5,70 ^b	43,70±13,93 ^{ab}	18,56±5,87 ^c
	% SP ₃ + cafeína	36,54±4,29 ^a	43,56±5,46 ^{ab}	56,12±16,79 ^b	6,68±2,31 ^c

a, b, c: Distinto superíndice indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 40. Evolución de la distribución de las subpoblaciones espermáticas en el macho R3846 durante el proceso de criopreservación.

Macho	% subpoblaciones	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
R3846	% SP ₁	42,92±5,16 ^a	36,98±3,73 ^a	37,98±10,69 ^a	72,76±1,95 ^b
	% SP ₁ + cafeína	50,70±5,50 ^a	37,58±5,09 ^b	26,08±10,26 ^c	82,10±3,74 ^d
	% SP ₂	8,50±3,01 ^a	25,44±6,47 ^b	28,18±8,33 ^b	11,58±2,53 ^a
	% SP ₂ + cafeína	2,50±2,27 ^a	5,94±1,06 ^b	16,18±4,12 ^c	9,06±1,52 ^d
	% SP ₃	48,60±7,43 ^a	37,58±6,14 ^a	33,86±18,49 ^{ab}	15,68±2,46 ^b
	% SP ₃ + cafeína	46,80±5,64 ^a	56,44±5,32 ^b	57,76±9,54 ^b	8,84±4,10 ^c

a, b, c, d: Distinto superíndice indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 41. Evolución de la distribución de las subpoblaciones espermáticas en el macho R4052 durante el proceso de criopreservación.

Macho	% subpoblaciones	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
R4052	% SP ₁	48,76±6,49 ^a	50,52±9,94 ^a	44,82±8,19 ^a	70,00±2,65 ^b
	% SP ₁ + cafeína	60,34±9,76 ^a	50,86±11,70 ^a	37,10±8,37 ^b	78,32±3,49 ^c
	% SP ₂	13,74±6,15 ^a	23,84±12,38 ^{ab}	30,10±8,64 ^c	13,44±5,22 ^a
	% SP ₂ + cafeína	11,96±4,14 ^{ab}	9,02±2,73 ^a	15,98±7,70 ^{ab}	15,66±3,10 ^b
	% SP ₃	37,50±6,29 ^a	25,65±2,87 ^b	25,10±8,95 ^{bc}	16,54±4,30 ^c
	% SP ₃ + cafeína	27,72±7,84 ^a	40,12±11,88 ^{ab}	46,92±6,88 ^b	6,00±1,32 ^c

a, b, c: Distinto superíndice indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 42. Evolución de la distribución de las subpoblaciones espermáticas en el macho R5487 durante el proceso de crioconservación.

Macho	% subpoblaciones	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
R5487	% SP ₁	46,14±11,62 ^a	47,52±14,78 ^a	36,64±16,14 ^a	77,92±3,28 ^b
	% SP ₁ + cafeína	54,12±9,48 ^a	52,26±5,51 ^a	41,64±17,39 ^a	84,08±4,72 ^b
	% SP ₂	11,56±3,21 ^a	19,40±8,01 ^b	28,70±9,36 ^b	10,28±2,56 ^a
	% SP ₂ + cafeína	4,86±3,07	8,98±8,32	11,58±6,67	9,84±2,47
	% SP ₃	42,30±14,54 ^a	33,10±10,78 ^a	34,64±20,95 ^a	11,76±2,36 ^b
	% SP ₃ + cafeína	41,00±8,28 ^a	38,74±10,23 ^a	46,76±15,36 ^a	6,04±2,67 ^b

a, b, c: Distinto superíndice indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

4.3.3 Evolución de los parámetros cinéticos individuales durante la congelación-descongelación

Los resultados medios de los parámetros cinéticos medidos en ausencia de cafeína están recogidos en la Tabla 43, mientras que los determinados en presencia de dicha sustancia aparecen expresados en la Tabla 44. La comparación de los valores de dichos parámetros entre ambas situaciones se halla en la Tabla 45.

Tabla 43. Medias de los parámetros cinéticos en ausencia de cafeína durante el proceso de criopreservación.

Parámetro	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
VCL ($\mu\text{m/s}$)	49,93 \pm 10,25 ^a	62,67 \pm 13,66 ^b	71,30 \pm 19,10 ^c	87,81 \pm 14,45 ^d
VSL ($\mu\text{m/s}$)	29,77 \pm 6,02 ^a	33,13 \pm 7,86 ^b	37,76 \pm 12,35 ^c	65,09 \pm 12,41 ^d
VAP ($\mu\text{m/s}$)	40,99 \pm 9,08 ^a	50,37 \pm 11,82 ^b	56,07 \pm 16,58 ^c	71,58 \pm 12,94 ^d
LIN (%)	55,66 \pm 4,84 ^a	52,02 \pm 6,98 ^b	48,23 \pm 7,87 ^c	68,71 \pm 5,19 ^d
STR (%)	70,03 \pm 4,20 ^a	65,33 \pm 6,96 ^b	64,26 \pm 5,94 ^b	86,43 \pm 3,04 ^c
WOB (%)	77,15 \pm 3,79 ^a	77,72 \pm 4,57 ^a	72,29 \pm 6,97 ^b	77,52 \pm 4,24 ^a
ALH (μm)	1,80 \pm 0,25 ^a	2,29 \pm 0,33 ^b	2,51 \pm 0,43 ^c	2,72 \pm 0,43 ^d
BCF (Hz)	6,17 \pm 1,02 ^a	6,25 \pm 1,15 ^a	5,72 \pm 1,08 ^b	8,39 \pm 0,82 ^c

a, b, c, d: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 44. Medias de los parámetros cinéticos en presencia de cafeína, durante el proceso de criopreservación.

Parámetro	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
VCL ($\mu\text{m/s}$)	47,01 \pm 8,23 ^a	49,94 \pm 11,48 ^a	66,95 \pm 20,06 ^b	104,58 \pm 12,61 ^c
VSL ($\mu\text{m/s}$)	31,60 \pm 6,25 ^a	29,53 \pm 6,41 ^b	39,79 \pm 14,15 ^c	85,68 \pm 10,63 ^d
VAP ($\mu\text{m/s}$)	40,11 \pm 7,78 ^a	41,35 \pm 9,85 ^a	53,66 \pm 17,64 ^b	91,88 \pm 11,13 ^c
LIN (%)	62,43 \pm 4,80 ^a	56,77 \pm 5,48 ^a	51,64 \pm 9,27 ^b	79,28 \pm 3,10 ^c
STR (%)	75,05 \pm 3,54 ^a	69,74 \pm 5,38 ^b	68,22 \pm 7,10 ^b	90,70 \pm 1,66 ^c
WOB (%)	80,80 \pm 3,94 ^a	79,36 \pm 3,84 ^b	72,28 \pm 7,39 ^c	86,19 \pm 2,34 ^d
ALH (μm)	1,64 \pm 0,25 ^a	1,80 \pm 0,32 ^b	2,37 \pm 0,60 ^c	2,65 \pm 0,33 ^d
BCF (Hz)	5,98 \pm 1,09 ^a	6,18 \pm 1,08 ^a	5,16 \pm 1,05 ^b	8,97 \pm 0,69 ^c

a, b, c, d: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Cuando se compararon los resultados de los parámetros cinéticos obtenidos entre las dos razas estudiadas, se observó que a las 0 horas no había diferencias significativas entre ellas para ningún parámetro. Sin embargo, a las 4 horas de haber comenzado el proceso de criopreservación los valores de la VSL y el STR medidas en ausencia de cafeína y del LIN y el WOB (tanto en ausencia como en presencia de dicha sustancia) eran significativamente superiores ($p < 0,05$) en los machos de raza Landrace. Esta situación se invirtió a las 6 horas del proceso en los valores de los parámetros medidos en presencia de cafeína: VCL, VSL, VAP, ALH y BCF; siendo estos significativamente ($p < 0,05$) mayores en los individuos de raza Large White. Por último, tras la descongelación, los machos de raza Landrace obtuvieron unos resultados significativamente ($p < 0,05$) superiores a los de raza Large White para los parámetros: VCL, VSL, VAP, BCF (tanto en muestras medidas en ausencia como en presencia de cafeína); LIN y STR (en muestras medidas sin cafeína); y la ALH (en muestras con cafeína añadida).

Tabla 45. Comparación de los resultados de los parámetros cinéticos analizados en ausencia vs. presencia de cafeína a lo largo del proceso de criopreservación.

Tiempo	Parámetros	Sin cafeína	Con cafeína
0 Horas	VCL($\mu\text{m/s}$)	49,93 \pm 10,25	47,01 \pm 8,23
	VSL($\mu\text{m/s}$)	29,77 \pm 6,02	31,60 \pm 6,25
	VAP($\mu\text{m/s}$)	40,99 \pm 9,08	40,11 \pm 7,78
	LIN (%)	55,66 \pm 4,84 ^a	62,43 \pm 4,80 ^b
	STR (%)	70,03 \pm 4,20 ^a	75,05 \pm 3,54 ^b
	WOB (%)	77,15 \pm 3,79 ^a	80,80 \pm 3,94 ^b
	ALH (μm)	1,80 \pm 0,25 ^a	1,64 \pm 0,25 ^b
	BCF (Hz)	6,17 \pm 1,02	5,98 \pm 1,09
4 Horas	VCL($\mu\text{m/s}$)	62,57 \pm 13,66 ^a	49,94 \pm 11,48 ^b
	VSL($\mu\text{m/s}$)	33,13 \pm 7,86 ^a	29,53 \pm 6,41 ^b
	VAP($\mu\text{m/s}$)	50,37 \pm 11,82 ^a	41,35 \pm 9,85 ^b
	LIN (%)	52,02 \pm 6,98 ^a	56,77 \pm 5,48 ^b
	STR (%)	65,33 \pm 6,96 ^a	69,74 \pm 5,38 ^b
	WOB (%)	77,72 \pm 4,57 ^a	79,36 \pm 3,84 ^b
	ALH (μm)	2,29 \pm 0,33 ^a	1,80 \pm 0,32 ^b
	BCF (Hz)	6,25 \pm 1,15	6,18 \pm 1,08
6 Horas	VCL($\mu\text{m/s}$)	71,30 \pm 19,10	66,95 \pm 20,06
	VSL($\mu\text{m/s}$)	37,76 \pm 12,35	39,79 \pm 14,15
	VAP($\mu\text{m/s}$)	56,07 \pm 16,58	53,66 \pm 17,64
	LIN (%)	48,23 \pm 7,87	51,64 \pm 9,27
	STR (%)	64,26 \pm 5,94 ^a	68,22 \pm 7,10 ^b
	WOB (%)	72,29 \pm 6,97	72,28 \pm 7,39
	ALH (μm)	2,51 \pm 0,43	2,37 \pm 0,60
	BCF (Hz)	5,72 \pm 1,08 ^a	5,16 \pm 1,05 ^b
Descongelado	VCL($\mu\text{m/s}$)	87,81 \pm 14,45 ^a	104,58 \pm 12,61 ^b
	VSL($\mu\text{m/s}$)	65,09 \pm 12,41 ^a	85,68 \pm 10,63 ^b
	VAP($\mu\text{m/s}$)	71,58 \pm 12,94 ^a	91,88 \pm 11,13 ^b
	LIN (%)	68,71 \pm 5,19 ^a	79,28 \pm 3,10 ^b
	STR (%)	86,43 \pm 3,04 ^a	90,70 \pm 1,66 ^b
	WOB (%)	77,52 \pm 4,24 ^a	86,19 \pm 2,34 ^b
	ALH (μm)	2,72 \pm 0,43	2,65 \pm 0,33
	BCF (Hz)	8,39 \pm 0,82 ^a	8,97 \pm 0,69 ^b

a, b: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el valor del parámetro.

En la comparación de los resultados de los parámetros cinéticos entre los distintos individuos, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la mayoría de los parámetros analizados en cada uno de los tiempos. En las muestras analizadas sin la adición de cafeína, únicamente no se encontraron diferencias significativas entre machos para los parámetros STR y BCF, analizados a las 6 horas de dar comienzo el proceso de congelación.

En las muestras analizadas en presencia de cafeína a las 0 horas no se encontraron diferencias significativas entre individuos para el parámetro LIN, mientras que, a las 4 horas fue el parámetro WOB en el que no se presentaron diferencias significativas entre machos. Por último a las 6 horas fueron semejantes los resultados de la VSL y el STR entre los individuos analizados.

Finalmente hemos de destacar, que los resultados de los parámetros cinéticos analizados no fueron homogéneos dentro de las congelaciones realizadas con el mismo macho.

4.3.4 Correlaciones de los parámetros cinéticos y la distribución subpoblacional con la motilidad, la vitalidad y la integridad acrosómica

En la Tabla 46 están recogidos los índices de correlación, en cada tiempo, entre el tamaño de cada subpoblación espermática (tanto en presencia-ausencia de cafeína), con: los resultados de vitalidad, integridad acrosómica y porcentaje de motilidad (medida en presencia/ausencia de cafeína).

Tabla 46. Correlaciones entre el tamaño de cada subpoblación en cada tiempo con los valores de la vitalidad, la integridad acrosómica (Int. Acrosómica), el porcentaje de espermatozoides móviles determinado en ausencia de cafeína (% Motilidad) y el porcentaje de espermatozoides móviles determinados en presencia de cafeína (% Motilidad + Caf.).

Tiempo	Subpoblación	Vitalidad	Int. Acrosómica	% Motilidad	% Motilidad + Caf.
0 Horas	SP ₁	0,05	0,04	-0,20	-0,01
	SP ₂	0,20	0,02	0,37*	0,12
	SP ₃	-0,16	-0,01	-0,15	-0,08
	SP ₁ + Cafeína	-0,16	-0,04	0,16	-0,04
	SP ₂ + Cafeína	0,12	0,18	0,19	0,30*
	SP ₃ + Cafeína	0,11	0,01	-0,13	-0,06
4 Horas	SP ₁	-0,04	0,04	-0,02	0,01
	SP ₂	0,25	-0,10	0,35	0,28
	SP ₃	-0,20	0,10	-0,21	-0,23
	SP ₁ + Cafeína	-0,14	0,02	-0,11	0,01
	SP ₂ + Cafeína	0,22	-0,29	0,35*	0,05
	SP ₃ + Cafeína	0,03	0,19	-0,02	0,07
6 Horas	SP ₁	-0,10	-0,07	0,24	-0,06
	SP ₂	0,27	0,13	0,31*	0,32*
	SP ₃	-0,11	-0,04	-0,35*	-0,25
	SP ₁ + Cafeína	-0,30*	-0,22	-0,29*	-0,18
	SP ₂ + Cafeína	0,07	0,03	-0,15	0,28
	SP ₃ + Cafeína	0,21	0,13	0,26	-0,04
Descongelado	SP ₁	-0,06	-0,05	0,36*	0,02
	SP ₂	0,51*	0,36*	0,43*	0,56*
	SP ₃	-0,27*	-0,17	-0,62*	-0,41*
	SP ₁ + Cafeína	-0,35*	-0,23	-0,06	-0,14
	SP ₂ + Cafeína	0,42*	0,27	0,52*	0,52*
	SP ₃ + Cafeína	-0,16	-0,15	-0,58*	-0,54*

*: Indica correlación significativa ($p < 0,05$).

En las Tablas 47 y 48, se recogen las correlaciones significativas ($p < 0,05$) en cada tiempo entre los parámetros medidos en presencia/ausencia de cafeína (respectivamente) y los resultados de vitalidad, integridad acrosómica y porcentaje de motilidad (medida en

presencia/ausencia de cafeína). Hemos prescindido de aquellos índices de correlación no significativos.

Tabla 47. Correlaciones significativas ($p < 0,05$) entre los parámetros cinéticos determinados en ausencia de cafeína en cada tiempo, con: los valores de la vitalidad, la integridad acrosómica (Int. Acrosómica), el porcentaje de espermatozoides móviles determinado en ausencia de cafeína (% Motilidad) y el porcentaje de espermatozoides móviles determinados en presencia de cafeína (% Motilidad + Caf.).

Tiempo	Parámetro	Vitalidad	Int. Acrosómica	% Motilidad	% Motilidad + Caf.
0 Horas	VCL	-	-	0,48	-
	VSL	-	-	0,37	-
	VAP	-	-	0,45	-
	STR	-	-	-0,34	-
	ALH	-	-	0,29	-
	BCF	-	-	-	0,29
4 Horas	VCL	-	-	0,28	0,31
	BCF	-	-	-	0,28
6 Horas	VCL	0,45	-	0,55	0,46
	VSL	0,38	-	0,57	0,31
	VAP	0,42	-	0,53	0,37
	BCF	0,33	-	0,47	-
Descongelado	VCL	0,49	0,56	-	-
	VSL	0,46	0,56	-	-
	VAP	0,49	0,59	-	0,28
	LIN	0,41	0,46	0,36	0,42
	STR	0,36	0,35	0,38	0,32
	WOB	0,37	0,41	0,37	0,45
	ALH	0,30	0,38	-	-

Tabla 48. Correlaciones significativas ($p < 0,05$) entre los parámetros cinéticos determinados en presencia de cafeína en cada tiempo, con: los valores de la vitalidad, la integridad acrosómica (Int. Acrosómica), el porcentaje de espermatozoides móviles determinado en ausencia de cafeína (% Motilidad) y el porcentaje de espermatozoides móviles determinados en presencia de cafeína (% Motilidad + Caf.).

Tiempo	Parámetro	Vitalidad	Int. Acrosómica	% Motilidad	% Motilidad + Caf.	
0 Horas	VCL	-0,31	-	-	-	
	VSL	-0,39	-	-	-	
	VAP	-0,35	-	-	-	
	LIN	-0,36	-0,30	-	-	
	STR	-0,28	-0,32	-	-0,29	
	WOB	-0,30	-	-	-	
	STR	-	0,32	-	-	
4 Horas	STR	-	0,32	-	-	
	6 Horas	LIN	-	-	-0,31	-
		WOB	-	-	-0,31	-
		ALH	-	-	-0,40	-
		BCF	0,39	-	0,32	-
VCL		-	-	-	0,29	
Descongelado	STR	-	-0,31	-	-	
	ALH	-	-	0,30	0,32	
	BCF	-	-	0,29	-	

4.4 EXPERIMENTO 2. COMPARACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES CINÉTICAS, EL PORCENTAJE DE MOVILIDAD, LA VITALIDAD Y LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA DE ESPERMATOZOIDES DESCONGELADOS, DILUIDOS EN BTS O MRA THAW[®]

4.4.1 Análisis cinético

Utilizando como modelo la estructura subpoblacional descrita a partir de los datos de los parámetros cinéticos del análisis realizado tras la recolección (epígrafe 4.3.1), hemos clasificado los espermatozoides descongelados-diluidos en ambos diluyentes y en presencia/ausencia de cafeína en las 3 subpoblaciones definidas (Tabla 49).

Tabla 49. Distribución, en cada una de las subpoblaciones descritas, de los espermatozoides descongelados analizados en BTS y MRA Thaw[®] en ausencia/presencia de cafeína.

% subpoblaciones	BTS	BTS + caf	MRA Thaw [®]	MRA Thaw [®] + caf
% SP ₁	69,73±8,46 ^a	83,59±4,22 ^b	83,51±7,36 ^b	84,18±5,24 ^b
% SP ₂	9,66±5,68 ^a	8,33±3,99 ^a	5,96±3,26 ^b	6,45±2,67 ^b
% SP ₃	20,60±8,47 ^a	8,06±3,37 ^b	10,53±7,52 ^b	9,37±4,91 ^b

a, b: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre diluyentes.

En las Figuras 29 a 31, representadas en las siguientes páginas, se recoge el porcentaje de espermatozoides contenidos en cada una de las subpoblaciones, en función del diluyente empleado y la presencia/ausencia de cafeína.

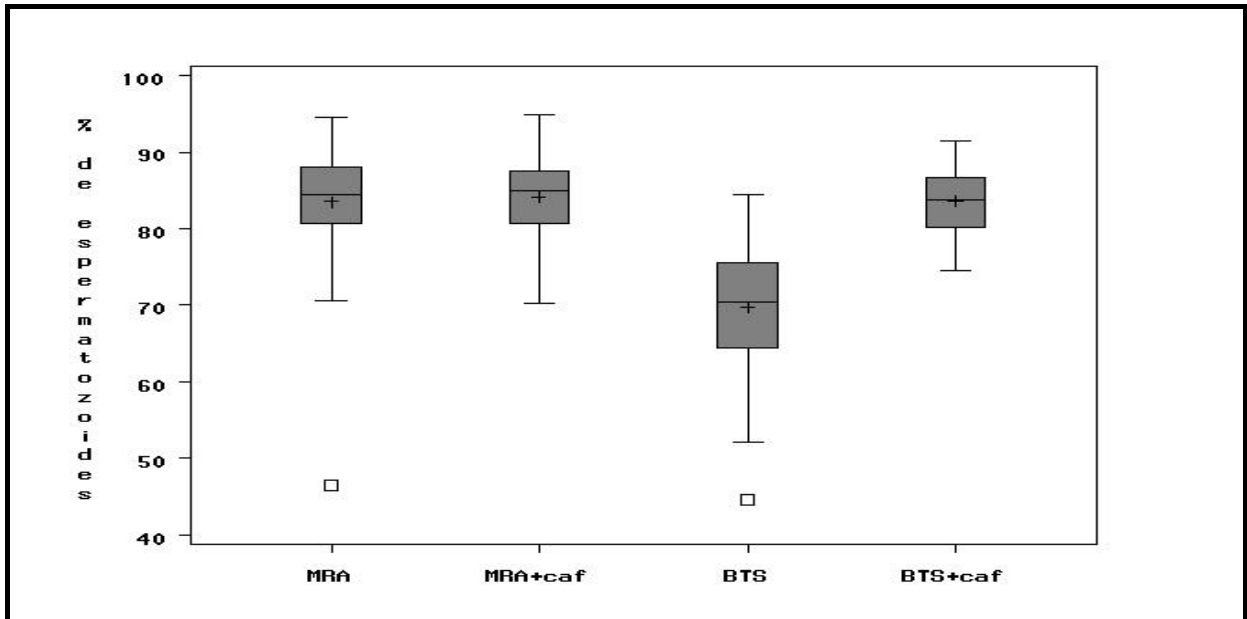


Figura 29. Porcentaje de espermatozoides pertenecientes a la SP₁ en cada uno de los diluyentes con/sin cafeína.

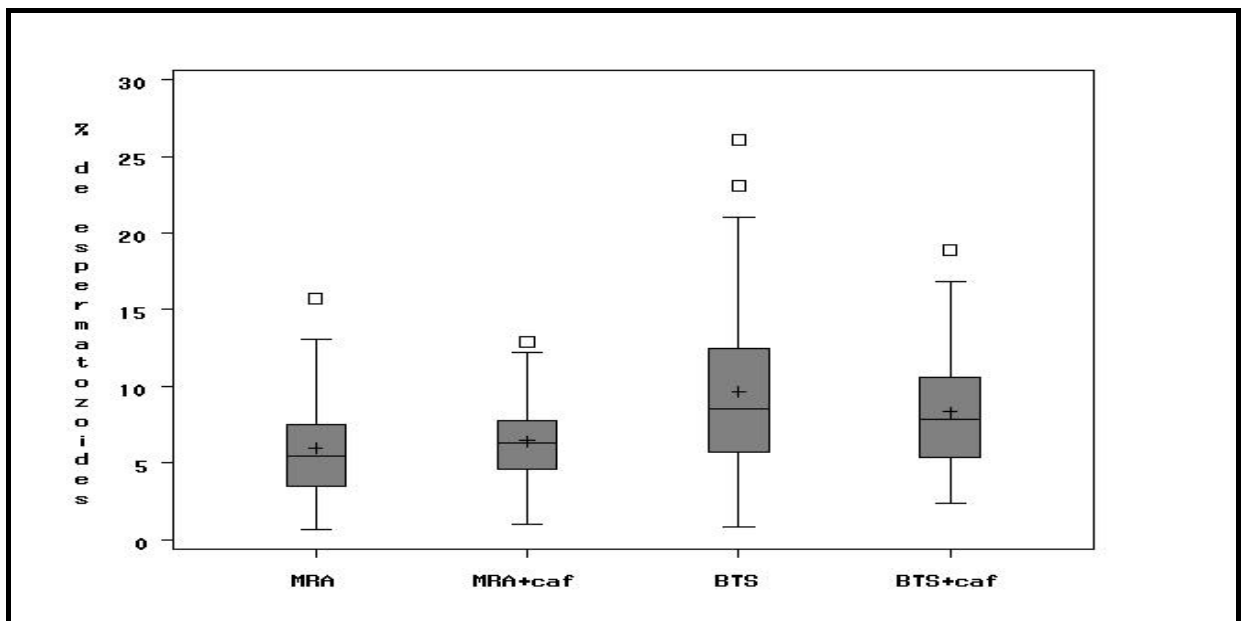


Figura 30. Porcentaje de espermatozoides pertenecientes a la SP₂ en cada uno de los diluyentes con/sin cafeína.

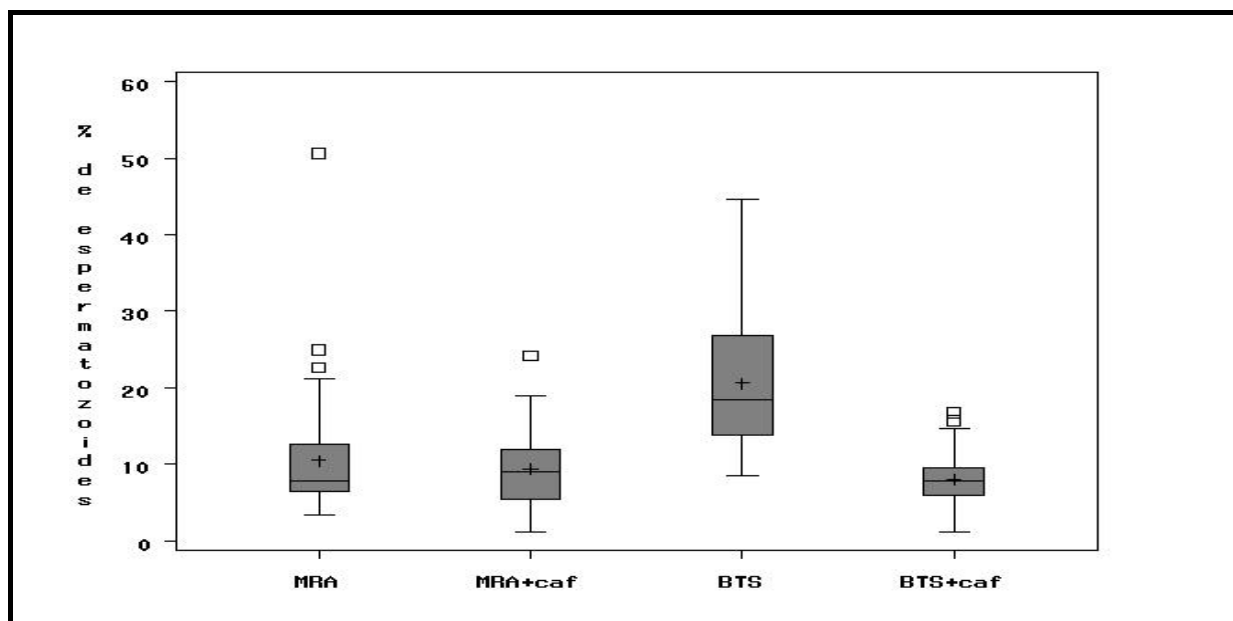


Figura 31. Porcentaje de espermatozoides pertenecientes a la SP₃ en cada uno de los diluyentes con/sin cafeína.

Los resultados promedio de cada parámetro cinético tratado de forma individual se encuentran recogidos en la Tabla 50. Como se puede apreciar en ella no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la práctica totalidad de los resultados de estos parámetros medidos en las muestras diluidas en MR-A Thaw[®], MR-A Thaw[®] con cafeína añadida y BTS con cafeína añadida. Sin embargo, si hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre la mayoría de los resultados de los tres grupos anteriores y los obtenidos de las muestras diluidas en BTS sin la adición de cafeína.

Tabla 50. Parámetros cinéticos determinados en cada uno de los diluyentes de descongelación considerados en presencia/ausencia de cafeína.

Parámetros	BTS	BTS + Caf	MRA Thaw [®]	MRA Thaw [®] + caf
VCL ($\mu\text{m/s}$)	91,06 ^a	105,20 ^b	104,02 ^b	106,45 ^b
VSL ($\mu\text{m/s}$)	67,54 ^a	85,88 ^b	86,95 ^b	88,62 ^b
VAP ($\mu\text{m/s}$)	74,30 ^a	92,25 ^b	91,52 ^b	94,13 ^b
LIN (%)	69,29 ^a	79,11 ^b	79,18 ^b	79,70 ^b
STR (%)	86,81 ^a	90,60 ^b	90,11 ^b	91,02 ^b
WOB (%)	78,01 ^a	86,11 ^b	86,30 ^b	86,12 ^b
BCF (Hz)	8,43 ^a	8,94 ^b	9,18 ^b	9,13 ^b
ALH (μm)	2,80 ^a	2,68 ^{ab}	2,55 ^b	2,62 ^{ab}

a, b: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre diluyentes.

A parte de la evaluación de los parámetros cinéticos considerados de forma individual, el análisis del porcentaje de espermatozoides móviles puso de manifiesto, que: cuando la valoración se realizó en ausencia de cafeína este valor era significativamente mayor ($p < 0,05$) en la muestras descongeladas en el medio MR-A Thaw[®] (55,34% vs. 45,41%) con respecto al BTS. Sin embargo, si el análisis de la motilidad espermática se llevaba a cabo en un medio

enriquecido con una concentración de cafeína 1 mM la situación se invertía, siendo, al mismo nivel de significación que el anteriormente descrito, más alta la proporción de células móviles en las muestras descongeladas en BTS (66,85% vs. 60,33%). Cuando las comparaciones se realizaron enfrentando los resultados obtenidos en el mismo diluyente con/sin la adición de cafeína se encontraron diferencias significativas tanto en el MR-A Thaw[®] como en el BTS ($p < 0,05$) (Tabla 51 y Figura 32).

Tabla 51. Porcentaje de espermatozoides móviles en cada uno de los diluyentes de descongelación considerados con/sin cafeína.

	BTS	BTS+Caf	MRA Thaw [®]	MRA Thaw [®] + Caf
% movilidad	45,41±14,92 ^a	66,85±13,17 ^b	55,34±13,85 ^c	60,33±13,21 ^d

a, b, c, d: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre diluyentes.

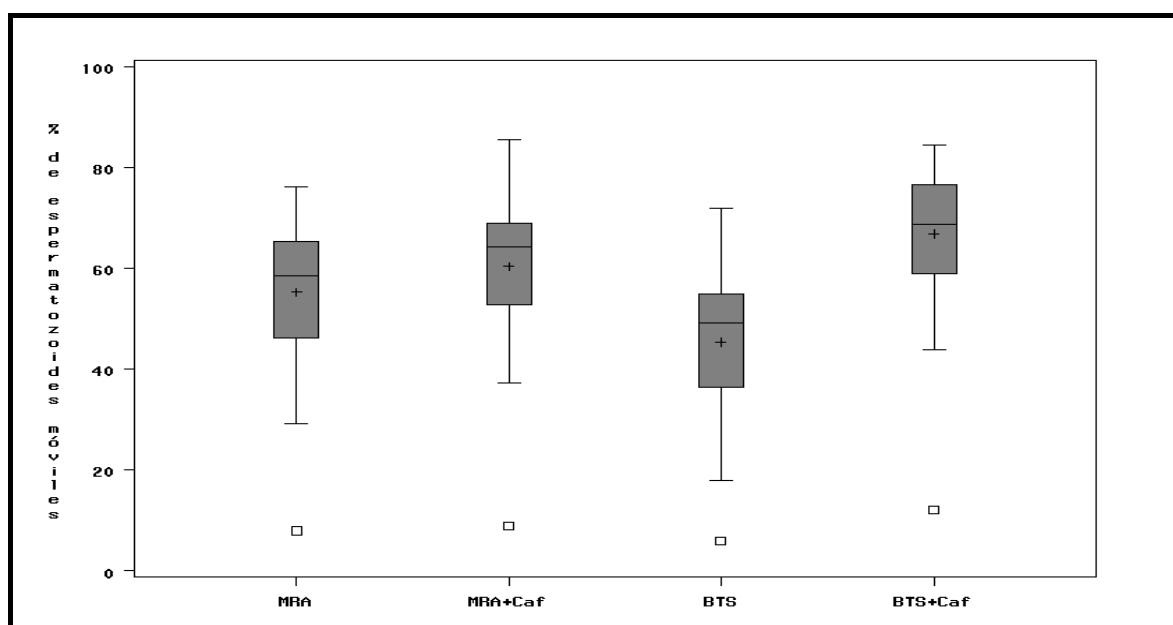


Figura 32. Porcentaje de espermatozoides móviles en cada uno de los diluyentes de descongelación con/sin cafeína.

4.4.2 Vitalidad e integridad acrosómica

El porcentaje de espermatozoides que mantuvieron íntegro su plasmalema tras el proceso de criopreservación fue significativamente superior ($p < 0,05$) en las pajuelas descongeladas en el medio BTS (53,62% vs. 32,05%). Igualmente, el porcentaje de células espermáticas con el acrosoma íntegro fue significativamente superior ($p < 0,05$) para el

diluyente BTS (69,47% vs. 66,36%). Los resultados se han expresados en la Tabla 52 y en las Figuras 33 y 34.

Tabla 52. Vitalidad espermática e integridad acrosómica en los dos diluyentes de descongelación considerados.

	BTS	MRA
% vitalidad espermática	53,62±10,97 ^a	32,05±10,92 ^b
% integridad acrosómica	69,47±8,06 ^a	66,36±6,06 ^b

a, b: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre diluyentes.

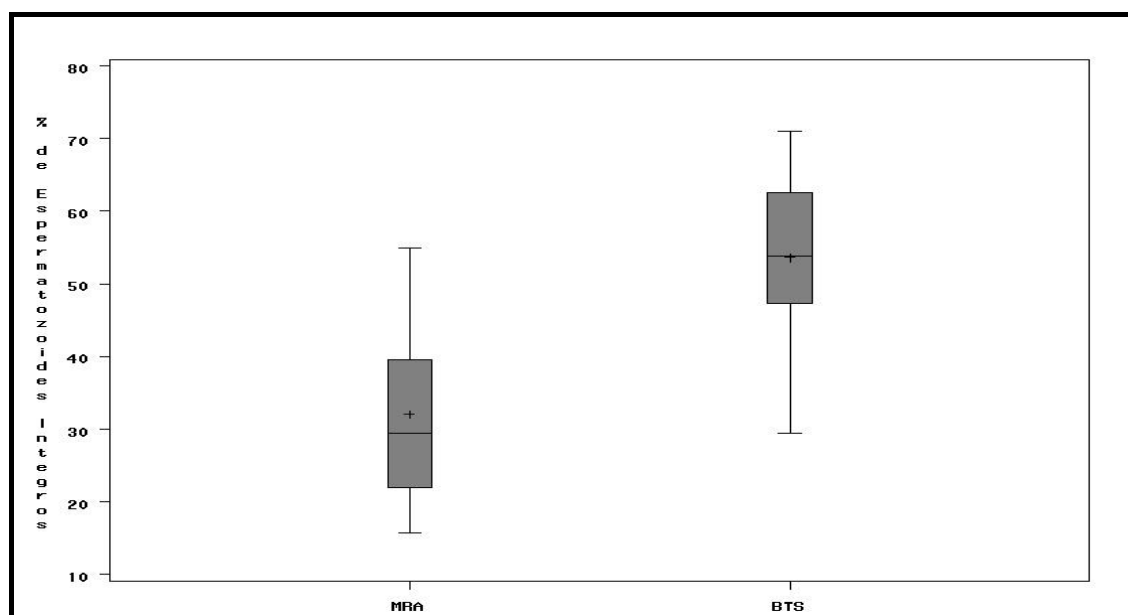


Figura 33. Porcentaje de vitalidad espermática en cada diluyente de descongelación

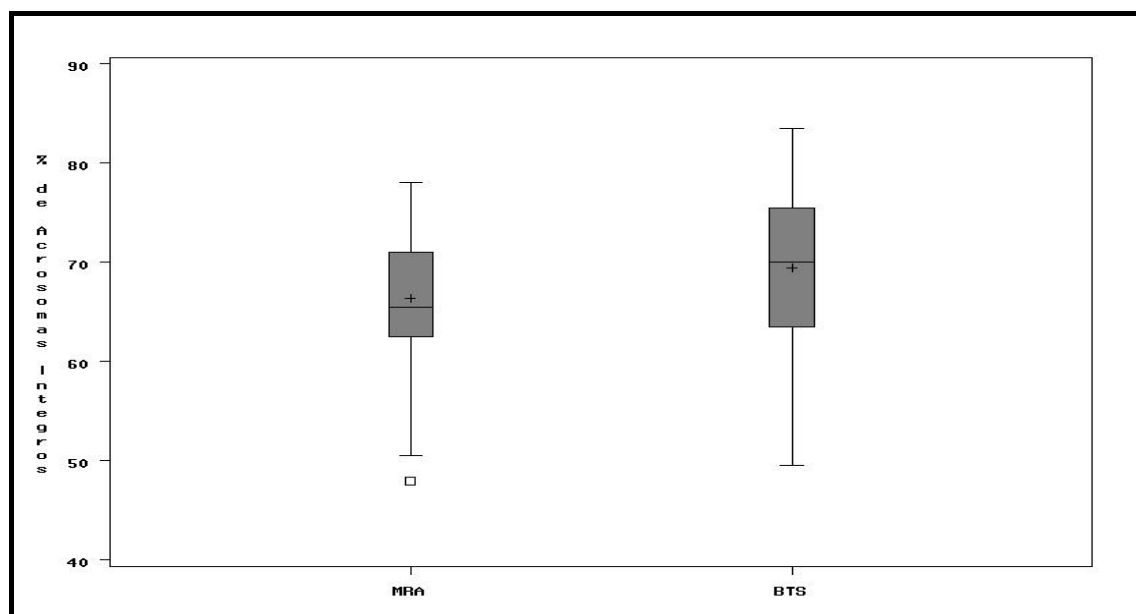


Figura 34. Porcentaje de integridad acrosómica cada diluyente de descongelación.

4.5 EXPERIMENTO 3: EVALUACIÓN DE LA MORFOMETRÍA DE LA CABEZA ESPERMÁTICA DE VERRACO DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN

4.5.1 Determinación de las subpoblaciones morfométricas presentes en un eyaculado

Nuestro primer objetivo fue verificar la hipótesis de la distribución poblacional de las células espermáticas en función de sus características morfométricas. Como en el caso de la definición de subpoblaciones a partir de los parámetros cinéticos seguimos el procedimiento descrito en el epígrafe 3.11.1.1. En este caso, obtuvimos que la mejor clasificación mediante el método de las *K-means* de los datos iniciales se conseguía cuando estos se agrupaban en 20 *bins*. A partir de estos, mediante los algoritmos propuestos por Ciampi *et al* (2007), se construyó un árbol jerárquico aglomerativo y se representó la altura de los nodos de unión del mismo. Basándonos en estas dos representaciones, llegamos a la conclusión de que la mejor clasificación posible era en dos subpoblaciones distintas. Sin embargo, cuando intentamos confirmar esta apreciación mediante la realización de la proyección de los datos, obtuvimos un bajo índice de Fowlkes-Mallows (0,68). Además, la representación de densidad de los datos proyectados (Figura 35), describió que estos seguían una distribución normal, lo que irremediamente nos lleva a la conclusión de la existencia de una única población de células espermáticas. Por lo tanto, descartamos la estructuración subpoblacional de las células espermáticas en función de sus parámetros morfométricos. De esta manera de aquí en adelante, todos los resultados se van a referir a la evolución de estos parámetros tratados de forma individualizada.

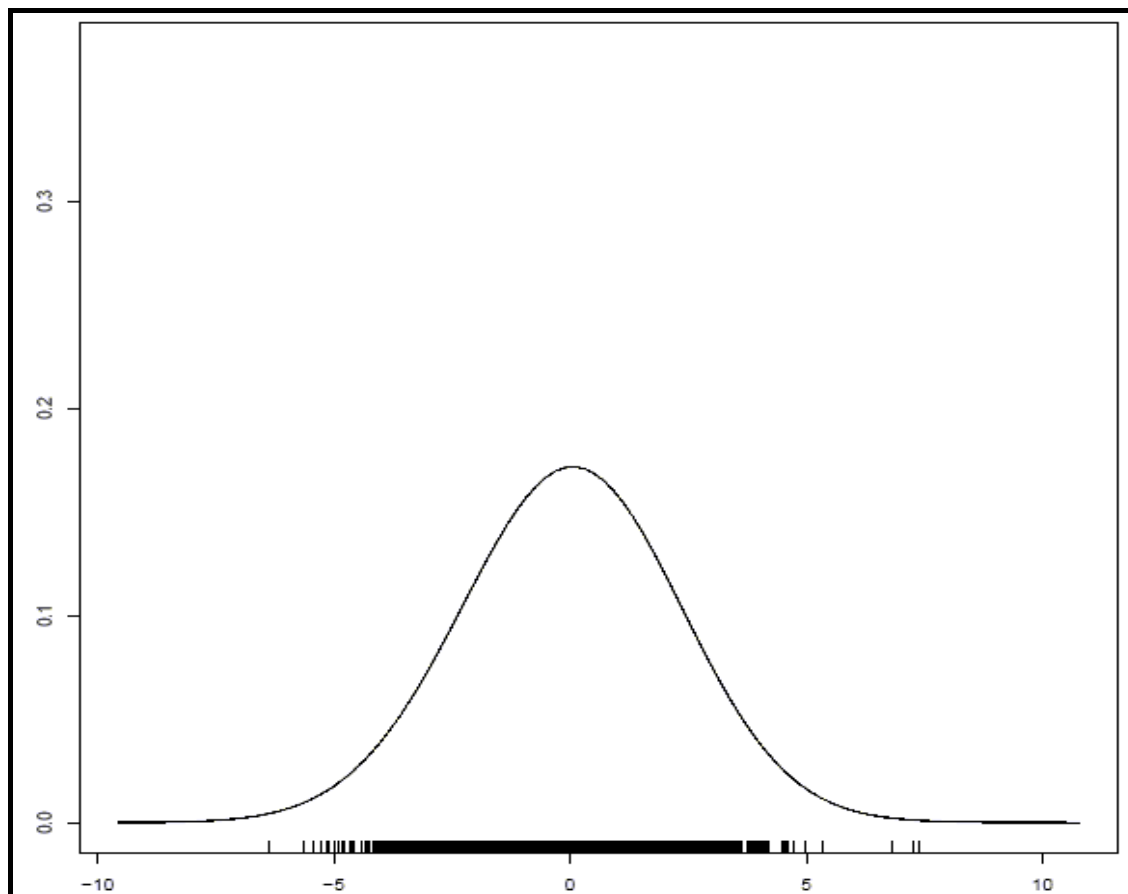


Figura 35. Distribución de los datos morfométricos tras su proyección.

4.5.2 Evolución de los parámetros morfométricos individuales durante la congelación-descongelación

En la Tabla 53 y en las Figuras 36 a 43 se recoge la evolución de los resultados de los 8 parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide de verraco durante los procesos de congelación-descongelación.

Tabla 53. Evolución de los parámetros morfométricos durante el proceso de criopreservación.

Parámetro	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
Longitud	8,46±0,17 ^a	8,47±0,19 ^a	8,45±0,20 ^a	8,22±0,21 ^b
Anchura	4,17±0,10	4,16±0,11	4,17±0,10	4,18±0,12
Área	29,78±0,72 ^a	29,66±0,82 ^a	29,61±0,79 ^a	28,66±0,94 ^b
Perímetro	22,96±0,39 ^a	22,92±0,37 ^a	22,95±0,37 ^a	22,51±0,45 ^b
Elipticidad	2,03±0,07 ^a	2,04±0,08 ^a	2,03±0,08 ^a	1,97±0,08 ^b
Rugosidad	0,71±0,02	0,71±0,01	0,71±0,01	0,71±0,02
Elongación	0,34±0,02 ^a	0,34±0,02 ^a	0,34±0,02 ^a	0,32±0,02 ^b
Regularidad	0,93±0,01 ^a	0,93±0,01 ^a	0,93±0,01 ^a	0,94±0,01 ^b

a, b: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

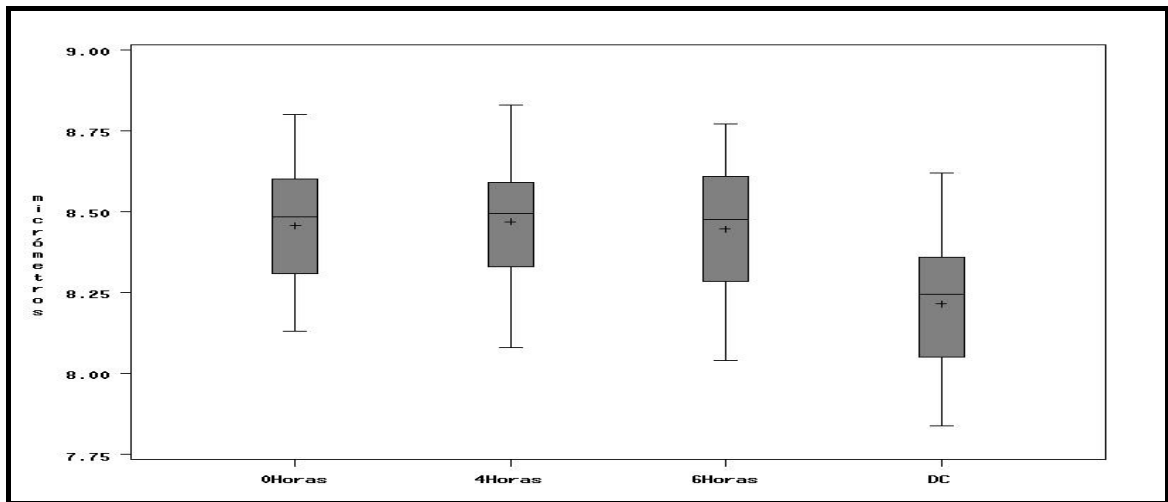


Figura 36. Evolución de la longitud de la cabeza espermática durante el proceso de criopreservación.

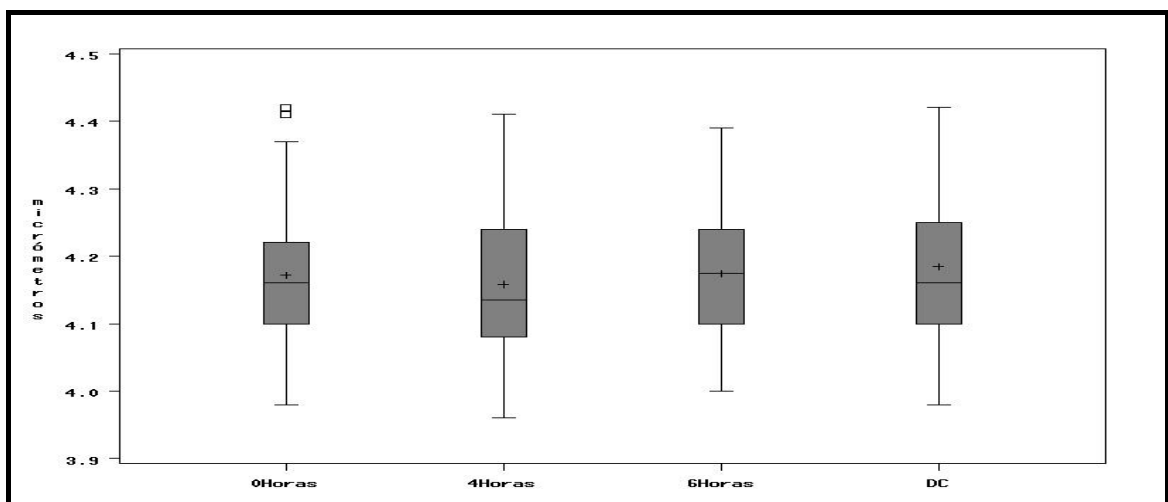


Figura 37. Evolución de la anchura de la cabeza espermática durante el proceso de criopreservación.

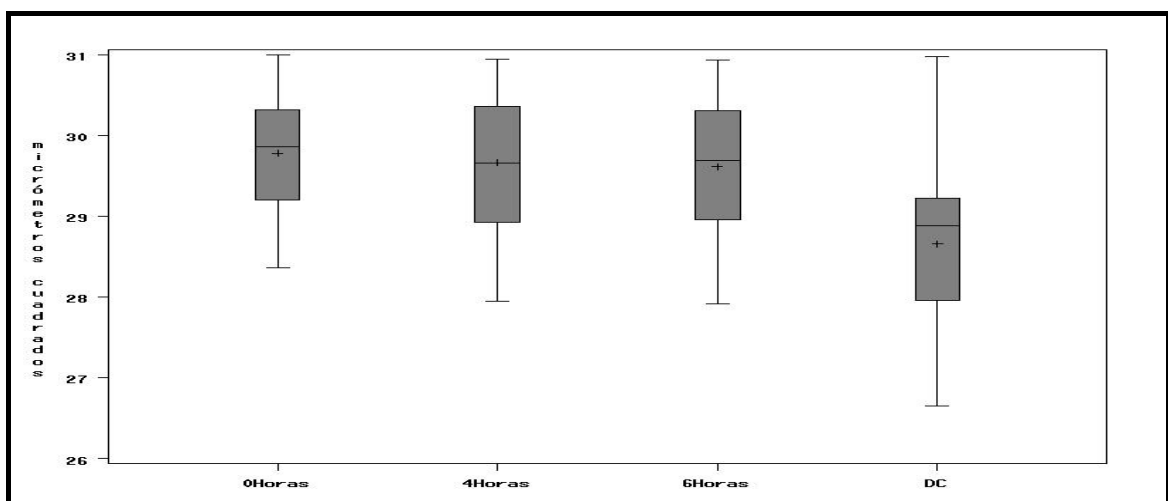


Figura 38. Evolución del área de la cabeza espermática durante el proceso de criopreservación.

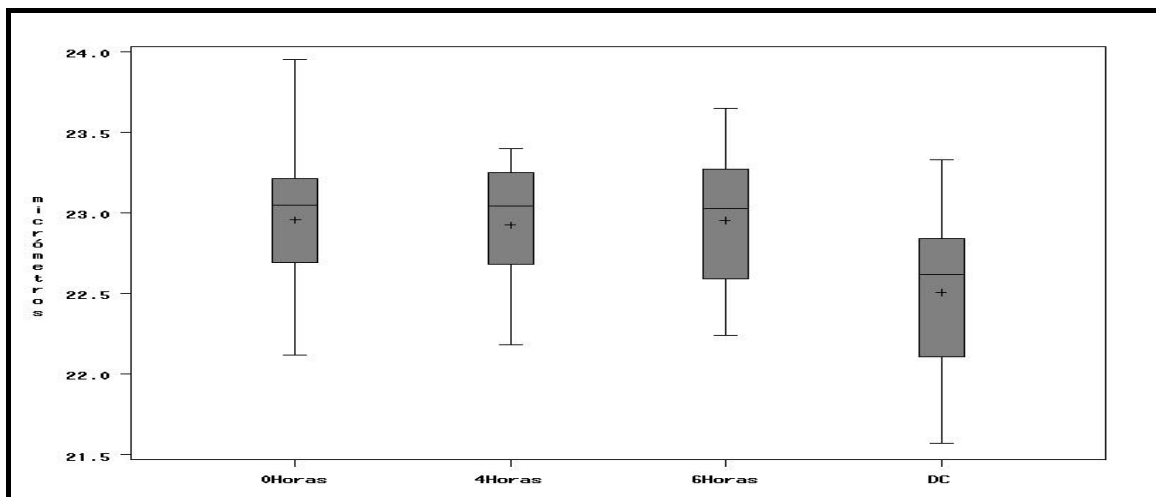


Figura 39. Evolución del perímetro de la cabeza espermática durante el proceso de criopreservación.

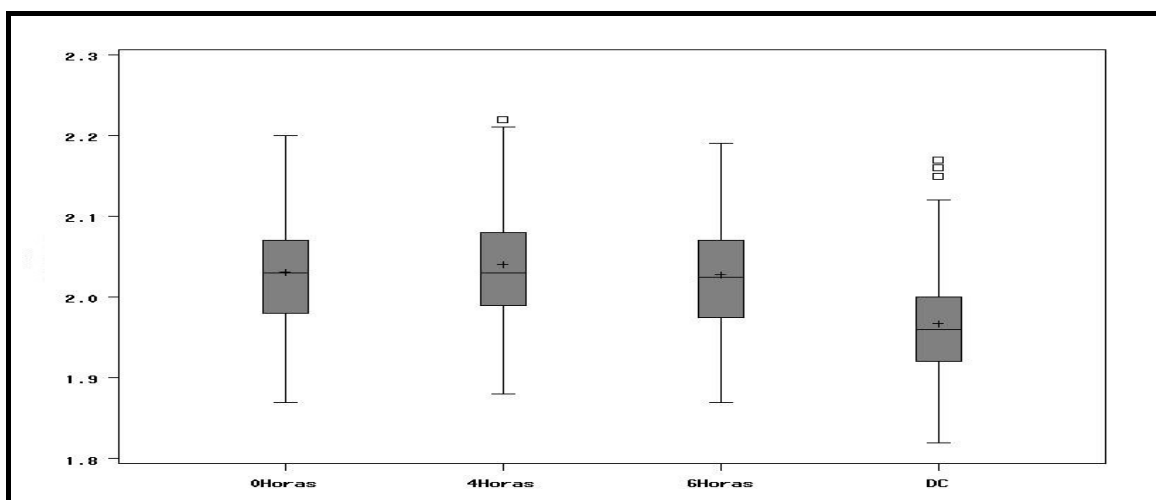


Figura 40. Evolución de la elipticidad de la cabeza espermática durante el proceso de criopreservación.

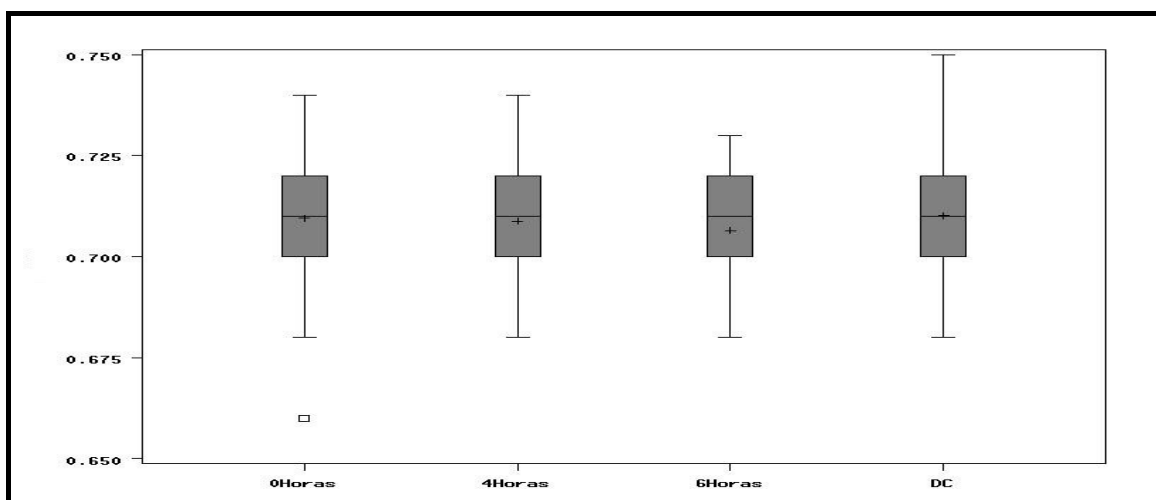


Figura 41. Evolución de la rugosidad de la cabeza espermática durante el proceso de criopreservación.

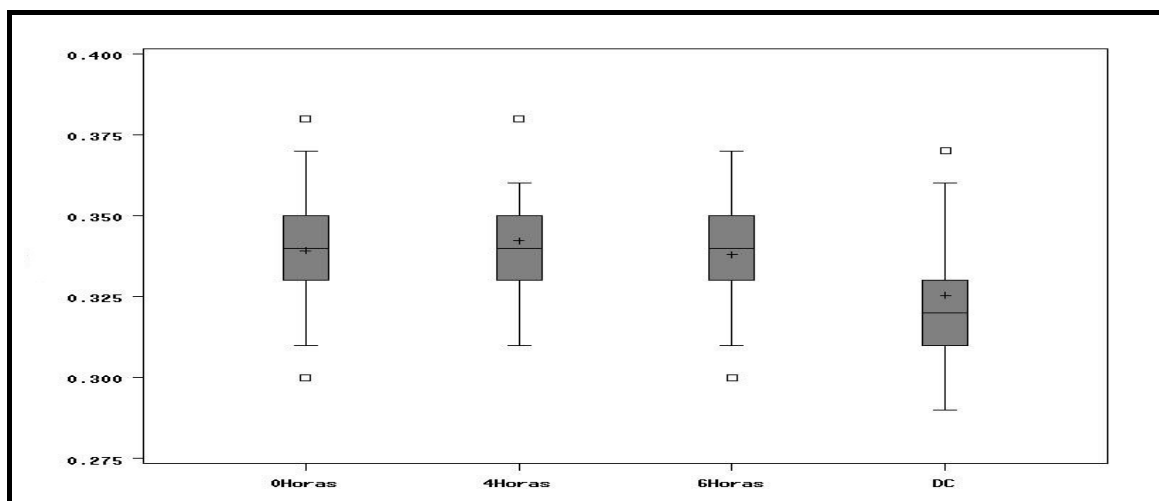


Figura 42. Evolución de la elongación de la cabeza espermática durante el proceso de criopreservación.

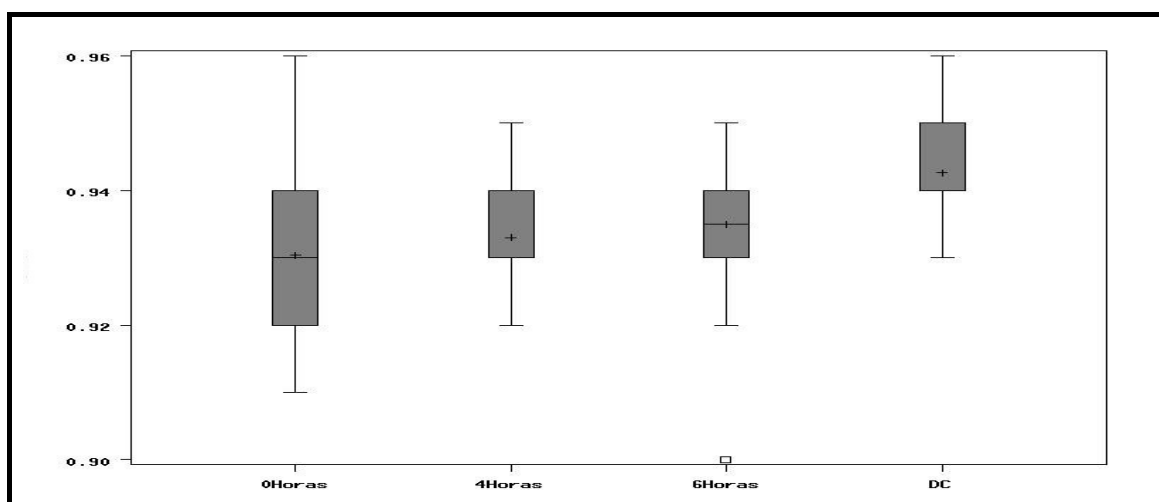


Figura 43. Evolución de la regularidad de la cabeza espermática durante el proceso de criopreservación.

La comparación de los datos de las dos razas analizadas en este experimento, así como las diferencias entre ambas en cada tiempo se hayan recogidos en la Tabla 54.

Los parámetros morfométricos en la raza Large White siguieron la misma evolución que en el conjunto global anteriormente descrito (ver Tabla 53). En el caso de los datos derivados de los análisis realizados sobre espermatozoides de raza Landrace todos los parámetros, a excepción de la regularidad, siguen la evolución descrita en el caso general. Así, para este parámetro en concreto, no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) en sus valores entre la recogida de muestras de las 6 horas y la realizada postdescongelación. Si existieron dichas diferencias entre esta última y las realizadas a las 0 y a las 4 horas.

Tabla 54. Comparación de los resultados de los parámetros morfométricos entre las dos razas consideradas.

Parámetro	Tiempo	Landrace	Large White
Longitud	0 Horas	8,39±0,20 ^a	8,53±0,11 ^b
	4 Horas	8,40±0,23 ^a	8,54±0,10 ^b
	6 Horas	8,38±0,22 ^a	8,52±0,15 ^b
	Descongelado	8,14±0,24 ^a	8,29±0,13 ^b
Anchura	0 Horas	4,19±0,12	4,15±0,08
	4 Horas	4,16±0,12	4,16±0,10
	6 Horas	4,19±0,11	4,16±0,09
	Descongelado	4,17±0,13	4,20±0,10
Área	0 Horas	29,57±0,77 ^a	29,99±0,64 ^b
	4 Horas	29,33±0,84 ^a	30,00±0,68 ^b
	6 Horas	29,34±0,70 ^a	29,91±0,82 ^b
	Descongelado	28,27±0,91 ^a	29,05±0,84 ^b
Perímetro	0 Horas	22,81±0,38 ^a	23,10±0,36 ^b
	4 Horas	22,75±0,41 ^a	23,09±0,25 ^b
	6 Horas	22,79±0,34 ^a	23,13±0,34 ^b
	Descongelado	22,31±0,45 ^a	22,70±0,37 ^b
Elipiticidad	0 Horas	2,01±0,09 ^a	2,06±0,03 ^b
	4 Horas	2,03±0,10	2,06±0,04
	6 Horas	2,01±0,09 ^a	2,05±0,04 ^b
	Descongelado	1,96±0,10	1,98±0,04
Rugosidad	0 Horas	0,71±0,02	0,71±0,01
	4 Horas	0,71±0,02	0,71±0,01
	6 Horas	0,71±0,01	0,70±0,01
	Descongelado	0,71±0,02	0,71±0,01
Elongación	0 Horas	0,33±0,02 ^a	0,34±0,01 ^b
	4 Horas	0,34±0,02	0,34±0,01
	6 Horas	0,33±0,02 ^a	0,34±0,01 ^b
	Descongelado	0,32±0,02 ^a	0,33±0,01 ^b
Regularidad	0 Horas	0,93±0,01	0,93±0,01
	4 Horas	0,93±0,01	0,93±0,01
	6 Horas	0,94±0,01	0,93±0,01
	Descongelado	0,94±0,01	0,94±0,01

a, b: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre razas.

En las Tablas 55 a 64 se recogen los resultados de los parámetros cinéticos de los 10 machos seleccionados para este estudio. Hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) tanto entre individuos como entre congelaciones de un mismo individuo, en todos los parámetros y tiempos.

Tabla 55. Parámetros morfométricos de la cabeza espermática del macho E955 durante el proceso de criopreservación.

Macho	Parámetro	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
E955	Longitud	8,56±0,27 ^a	8,56±0,26 ^a	8,56±0,29 ^a	8,31±0,34 ^b
	Anchura	4,20±0,17 ^a	4,25±0,14 ^{ab}	4,23±0,17 ^{ab}	4,31±0,20 ^b
	Área	30,32±1,38 ^{ab}	30,50±1,19 ^a	30,40±1,43 ^{ab}	29,71±2,00 ^b
	Perímetro	23,14±0,63	23,18±0,54	23,22±0,70	22,97±0,87
	Elipticidad	2,04±0,10 ^a	2,02±0,09 ^a	2,03±0,10 ^a	1,93±0,10 ^b
	Rugosidad	0,71±0,02	0,71±0,02	0,71±0,03	0,71±0,03
	Elongación	0,34±0,02 ^a	0,34±0,02 ^a	0,34±0,02 ^a	0,32±0,02 ^b
	Regularidad	0,93±0,02 ^a	0,94±0,02 ^{ab}	0,94±0,02 ^{ab}	0,95±0,03 ^b

a, b: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 56. Parámetros morfométricos de la cabeza espermática del macho G2552 durante el proceso de criopreservación.

Macho	Parámetro	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
G2552	Longitud	8,62±0,25 ^a	8,64±0,26 ^a	8,63±0,27 ^a	8,40±0,32 ^b
	Anchura	4,26±0,16	4,26±0,14	4,27±0,16	4,31±0,19
	Área	30,63±1,25 ^a	30,70±1,26 ^a	30,63±1,27 ^{ab}	29,79±1,83 ^b
	Perímetro	23,24±0,49 ^a	23,24±0,53 ^a	23,32±0,61 ^a	22,80±0,75 ^b
	Elipticidad	2,02±0,09 ^a	2,03±0,09 ^a	2,02±0,10 ^a	1,95±0,10 ^b
	Rugosidad	0,71±0,02	0,71±0,02	0,71±0,03	0,72±0,03
	Elongación	0,34±0,02 ^a	0,34±0,02 ^a	0,34±0,02 ^a	0,32±0,02 ^b
	Regularidad	0,94±0,02 ^a	0,94±0,02 ^a	0,95±0,02 ^{ab}	0,95±0,03 ^b

a, b: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 57. Parámetros morfométricos de la cabeza espermática del macho G5223 durante el proceso de criopreservación.

Macho	Parámetro	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
G5223	Longitud	8,60±0,26 ^a	8,56±0,27 ^a	8,59±0,27 ^a	8,38±0,29 ^b
	Anchura	4,09±0,17	4,09±0,17	4,08±0,16	4,13±0,18
	Área	30,03±1,15 ^a	29,81±1,20 ^a	29,88±1,27 ^a	29,06±1,61 ^b
	Perímetro	23,43±0,60 ^a	23,23±0,53 ^{ab}	23,28±0,58 ^{ab}	22,98±0,71 ^b
	Elipticidad	2,11±0,11 ^a	2,10±0,11 ^a	2,11±0,10 ^a	2,03±0,10 ^b
	Rugosidad	0,69±0,03	0,69±0,02	0,69±0,02	0,69±0,02
	Elongación	0,36±0,02 ^{ab}	0,35±0,02 ^{ab}	0,36±0,02 ^a	0,34±0,02 ^b
	Regularidad	0,92±0,03 ^a	0,92±0,02 ^a	0,92±0,03 ^a	0,94±0,03 ^b

a, b: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 58. Parámetros morfométricos de la cabeza espermática del macho G6328 durante el proceso de criopreservación.

Macho	Parámetro	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
G6328	Longitud	8,35±0,25 ^a	8,37±0,26 ^a	8,34±0,26 ^a	8,06±0,27 ^b
	Anchura	4,09±0,15	4,08±0,16	4,08±0,15	4,10±0,17
	Área	29,23±1,22 ^a	28,94±1,31 ^a	28,80±1,24 ^a	27,80±1,29 ^b
	Perímetro	22,72±0,53 ^a	22,65±0,53 ^a	22,62±0,60 ^a	22,10±0,57 ^b
	Elipticidad	2,04±0,10 ^a	2,06±0,10 ^a	2,05±0,10 ^a	1,97±0,10 ^b
	Rugosidad	0,71±0,02	0,71±0,02	0,71±0,03	0,72±0,02
	Elongación	0,34±0,02 ^a	0,35±0,02 ^a	0,34±0,02 ^a	0,33±0,02 ^b
	Regularidad	0,92±0,02	0,93±0,02	0,93±0,02	0,93±0,03

a, b: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 59. Parámetros morfométricos de la cabeza espermática del macho T475 durante el proceso de criopreservación.

Macho	Parámetro	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
T475	Longitud	8,50±0,28 ^a	8,56±0,24 ^a	8,47±0,33 ^{ab}	8,33±0,29 ^b
	Anchura	4,12±0,17	4,13±0,15	4,14±0,17	4,16±0,18
	Área	29,74±1,44	30,05±1,18	29,74±1,57	28,88±1,54
	Perímetro	22,09±0,66	23,17±0,50	23,13±0,69	22,66±0,69
	Elipticidad	2,07±0,11 ^a	2,08±0,09 ^a	2,05±0,11 ^{ab}	2,01±0,11 ^b
	Rugosidad	0,71±0,02	0,70±0,02	0,70±0,03	0,71±0,02
	Elongación	0,35±0,02 ^a	0,35±0,02 ^a	0,34±0,02 ^{ab}	0,33±0,02 ^b
	Regularidad	0,92±0,02 ^a	0,92±0,02 ^a	0,93±0,03 ^a	0,94±0,03 ^b

a, b: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 60. Parámetros morfométricos de la cabeza espermática del macho L69 durante el proceso de criopreservación.

Macho	Parámetro	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
L69	Longitud	8,72±0,27 ^a	8,77±0,30 ^a	8,75±0,30 ^a	8,56±0,33 ^b
	Anchura	4,04±0,16	4,02±0,17	4,05±0,18	4,00±0,18
	Área	29,79±1,25 ^a	29,71±1,27 ^a	29,70±1,53 ^a	28,85±1,49 ^b
	Perímetro	23,28±0,63 ^a	23,32±0,56 ^a	23,27±0,61 ^{ab}	22,91±0,72 ^b
	Elipticidad	2,16±0,11	2,18±0,13	2,16±0,12	2,14±0,13
	Rugosidad	0,69±0,03	0,69±0,02	0,69±0,03	0,69±0,03
	Elongación	0,37±0,02	0,37±0,03	0,37±0,02	0,36±0,03
	Regularidad	0,93±0,02 ^a	0,93±0,02 ^a	0,94±0,02 ^b	0,93±0,03 ^{ab}

a, b: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 61. Parámetros morfométricos de la cabeza espermática del macho L437 durante el proceso de criopreservación.

Macho	Parámetro	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
L437	Longitud	8,47±0,27 ^a	8,46±0,24 ^a	8,44±0,29 ^a	8,18±0,30 ^b
	Anchura	4,18±0,15	4,15±0,16	4,18±0,15	4,14±0,18
	Área	29,72±1,20 ^a	29,43±1,24 ^a	29,52±1,29 ^a	28,24±1,57 ^b
	Perímetro	22,87±0,54 ^a	22,80±0,50 ^a	22,86±0,60 ^a	22,36±0,75 ^b
	Elipticidad	2,03±0,09 ^a	2,04±0,10 ^a	2,02±0,10 ^a	1,98±0,10 ^b
	Rugosidad	0,71±0,02	0,71±0,02	0,71±0,03	0,71±0,03
	Elongación	0,34±0,02 ^a	0,34±0,02 ^a	0,34±0,02 ^{ab}	0,33±0,02 ^b
	Regularidad	0,94±0,02	0,94±0,02	0,94±0,02	0,94±0,03

a, b: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 62. Parámetros morfométricos de la cabeza espermática del macho R3846 durante el proceso de criopreservación.

Macho	Parámetro	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
R3846	Longitud	8,18±0,27 ^a	8,14±0,26 ^a	8,16±0,27 ^a	7,87±0,29 ^b
	Anchura	4,14±0,14	4,10±0,14	4,13±0,17	4,09±0,17
	Área	28,75±1,18 ^a	28,26±1,09 ^a	28,49±1,18 ^a	26,93±1,44 ^b
	Perímetro	22,39±0,49 ^a	22,29±0,45 ^a	22,43±0,54 ^a	21,75±0,67 ^b
	Elipticidad	1,98±0,09 ^a	1,99±0,09 ^a	1,98±0,11 ^a	1,93±0,10 ^b
	Rugosidad	0,72±0,02	0,71±0,02	0,71±0,03	0,72±0,03
	Elongación	0,33±0,02 ^a	0,33±0,02 ^a	0,33±0,02 ^a	0,32±0,02 ^b
	Regularidad	0,93±0,02 ^a	0,93±0,03 ^a	0,93±0,03 ^a	0,94±0,03 ^b

a, b: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 63. Parámetros morfométricos de la cabeza espermática del macho R4052 durante el proceso de criopreservación.

Macho	Parámetro	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
R4052	Longitud	8,27±0,26 ^a	8,32±0,30 ^a	8,25±0,28 ^a	8,01±0,30 ^b
	Anchura	4,22±0,14 ^a	4,16±0,15 ^b	4,20±0,15 ^{ab}	4,22±0,16 ^a
	Área	28,87±1,21 ^a	28,87±1,37 ^a	28,81±1,34 ^a	27,87±1,43 ^b
	Perímetro	22,54±0,61	22,50±0,67	22,48±0,61	22,07±0,73
	Elipticidad	1,96±0,09 ^a	2,00±0,10 ^a	1,97±0,09 ^a	1,90±0,09 ^b
	Rugosidad	0,71±0,03	0,72±0,02	0,72±0,02	0,72±0,03
	Elongación	0,32±0,02 ^a	0,33±0,02 ^a	0,33±0,02 ^{ab}	0,31±0,02 ^b
	Regularidad	0,95±0,03	0,94±0,03	0,94±0,03	0,95±0,03

a, b: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 64. Parámetros morfométricos de la cabeza espermática del macho R5487 durante el proceso de criopreservación.

Macho	Parámetro	0 Horas	4 Horas	6 Horas	Descongelado
R5487	Longitud	8,31±0,27 ^a	8,31±0,28 ^a	8,27±0,29 ^a	8,06±0,33 ^b
	Anchura	4,38±0,16	4,36±0,16	4,37±0,17	4,38±0,17
	Área	30,71±1,29 ^a	30,36±1,27 ^a	30,20±1,37 ^a	29,47±1,62 ^b
	Perímetro	22,96±0,54 ^a	22,87±0,59 ^a	22,94±0,64 ^a	22,49±0,74 ^b
	Elipticidad	1,90±0,09 ^a	1,91±0,10 ^a	1,90±0,10 ^a	1,84±0,09 ^b
	Rugosidad	0,73±0,02	0,73±0,02	0,72±0,03	0,73±0,03
	Elongación	0,31±0,02 ^a	0,31±0,02 ^a	0,31±0,02 ^a	0,30±0,02 ^b
	Regularidad	0,93±0,02 ^a	0,94±0,02 ^b	0,94±0,02 ^b	0,94±0,03 ^b

a, b: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos

4.5.3 Correlaciones de los parámetros morfométricos con la vitalidad, la integridad acrosómica y la motilidad

En la Tabla 65 están recogidos los índices de correlación, en cada tiempo, entre los resultados de los parámetros morfométricos y los resultados de vitalidad, integridad acrosómica y motilidad medida mediante el sistema CASA en presencia/ausencia de cafeína.

Tabla 65. Índices de correlación entre los parámetros cinéticos, en cada tiempo, con: los valores de la vitalidad, la integridad acrosómica (Int. Acrosómica), el porcentaje de espermatozoides móviles determinado en ausencia de cafeína (% Motilidad) y el porcentaje de espermatozoides móviles determinados en presencia de cafeína (% Motilidad + Caf.).

Tiempo	Parámetro	Vitalidad	Int. Acrosómica	Motilidad	Motilidad + Caf.
0 Horas	Longitud	-0,12	-0,16	-0,31*	-0,27
	Anchura	0,08	0,14	-0,13	-0,04
	Área	0,02	0,02	-0,28	-0,22
	Perímetro	-0,01	0,05	-0,15	-0,27
	Elipticidad	-0,11	-0,16	-0,08	-0,11
	Rugosidad	0,03	-0,07	-0,08	0,14
	Elongación	-0,14	-0,20	-0,06	-0,11
	Regularidad	-0,08	-0,04	-0,26	-0,17
4 Horas	Longitud	-0,22	-0,20	-0,25	-0,32*
	Anchura	0,13	0,11	-0,06	0,23
	Área	-0,02	0,01	-0,23	-0,38*
	Perímetro	-0,17	-0,10	-0,22	-0,32*
	Elipticidad	-0,23	-0,19	-0,11	-0,02
	Rugosidad	0,25	0,21	0,07	-0,04
	Elongación	-0,23	-0,17	-0,10	-0,04
	Regularidad	-0,13	-0,19	-0,10	-0,04
6 Horas	Longitud	-0,46*	-0,41*	-0,60*	-0,32*
	Anchura	0,13	0,05	0,03	-0,02
	Área	-0,18	-0,31*	-0,49*	-0,26
	Perímetro	-0,27	-0,33*	-0,52*	-0,29
	Elipticidad	-0,40*	-0,30*	-0,40*	-0,19
	Rugosidad	0,24	0,11	0,18	0,15
	Elongación	-0,36*	-0,28	-0,43*	-0,19
	Regularidad	-0,27	0	-0,01	-0,13
Descongelado	Longitud	-0,39*	-0,37*	-0,25	-0,26
	Anchura	0,23	0,23	-0,23	-0,24
	Área	-0,11	-0,08	-0,37*	-0,36*
	Perímetro	-0,25	-0,17	-0,24	-0,35*
	Elipticidad	-0,41*	-0,39*	0,01	0
	Rugosidad	0,32*	0,23	-0,10	0,12
	Elongación	-0,41*	-0,40*	0,04	0,02
	Regularidad	-0,01	0,01	-0,13	-0,24

*: Indica correlación significativa ($p < 0,05$).

4.6 EXPERIMENTO 4: DETERMINACIÓN DE LA CONGELABILIDAD DE UN EYACULADO A PARTIR DE LOS RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS CONVENCIONAL Y COMPUTERIZADO POR IMÁGENES DIGITALES

4.6.1 Correlación de los parámetros individuales con la congelabilidad

En la Tabla 66 se recogen los índices de correlación entre el porcentaje de espermatozoides móviles determinados de forma subjetiva y el porcentaje de células morfológicamente normales, ambos a tiempo 0, con respecto al porcentaje de vitalidad (congelabilidad) tras la descongelación del material seminal.

Tabla 66. Índices de correlación entre la congelabilidad y el porcentaje de movilidad medido de forma subjetiva y el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales.

	% de movilidad determinado de forma subjetiva.	% de espermatozoides morfológicamente normales.
r con la congelabilidad.	0,03	0,35*

*: Indica correlación significativa ($p < 0,05$).

En la Tabla 67 se recogen los índices de correlación entre el porcentaje de espermatozoides móviles determinados mediante el equipo ISAS a las 0 horas (tanto con la adición de cafeína, como en ausencia de dicha sustancia estimulante), con respecto al porcentaje de vitalidad tras la descongelación del material seminal.

Tabla 67. Índices de correlación entre la congelabilidad y el porcentaje de movilidad medida con el sistema CASA.

Parámetros	r
% movilidad sin cafeína.	0,21
% movilidad con cafeína.	0,28*

*: Indica correlación significativa ($p < 0,05$).

En la Tabla 68 se recogen los índices de correlación entre la vitalidad y el índice de integridad acrosómica, con respecto a la congelabilidad.

Tabla 68. Índices de correlación entre la congelabilidad y el porcentaje de vitalidad y el porcentaje de acrosomas íntegros.

Parámetros	r
% de espermatozoides vivos	0,53*
% de acrosomas íntegros	0,36*

*: Indica correlación significativa ($p < 0,05$).

En la Tabla 69 se recogen los índices de correlación entre el tamaño de cada subpoblación y el porcentaje de vitalidad tras la descongelación (congelabilidad).

Tabla 69. Correlaciones con la congelabilidad del tamaño de cada subpoblación.

Subpoblaciones	0 Horas
SP ₁	0,09
SP ₂	0,10
SP ₃	-0,09
SP ₁ + Cafeína	-0,17
SP ₂ + Cafeína	-0,14
SP ₃ + Cafeína	0,17

*: Indica correlación significativa ($p < 0,05$).

En la tabla 70 se recogen los índices de correlación entre los parámetros cinéticos medidos con el sistema CASA y la congelabilidad.

Tabla 70. Correlaciones con la congelabilidad de los parámetros cinéticos.

Parámetro	r
VCL ($\mu\text{m/s}$)	0,12
VCL + caf ($\mu\text{m/s}$)	-0,21
VSL ($\mu\text{m/s}$)	0,04
VSL + caf ($\mu\text{m/s}$)	-0,28*
VAP ($\mu\text{m/s}$)	0,13
VAP + caf ($\mu\text{m/s}$)	-0,25
LIN (%)	0,05
LIN + caf (%)	-0,32*
STR (%)	-0,15
STR + caf (%)	-0,31*
WOB (%)	0,24
WOB + caf (%)	-0,19
ALH (μm)	-0,06
ALH + caf (μm)	-0,23
BCF (Hz)	0,45*
BCF + caf (Hz)	0,57*

*: Indica correlación significativa ($p < 0,05$).

En la Tabla 71 se recogen los índices de correlación entre los parámetros morfométricos medidos con el sistema CASA, a las 0 horas y el porcentaje de vitalidad determinado tras la descongelación del material seminal.

Tabla 71. Correlaciones entre los parámetros morfométricos y el % de vitalidad tras la descongelación.

Parámetros	r
Longitud	-0,48*
Anchura	0,12
Área	-0,09
Perímetro	-0,25
Elipticidad	-0,34*
Rugosidad	0,21
Elongación	-0,35*
Regularidad	-0,20

*: Indica correlación significativa ($p < 0,05$).

4.6.2 Modelos de regresión lineal

Modelo 1. Los parámetros de partida fueron los del espermiograma “clásico”: el porcentaje de motilidad determinado de forma subjetiva (MOTSUBJ) y el porcentaje de formas normales (FN).

- Parámetro seleccionado para el modelo: FN.
- Ecuación de regresión: congelabilidad (CON) = $-5,44 + 0,68FN$
- Valor de r^2 ajustado: 0,09.

Modelo 2. Los parámetros de partida fueron los del espermiograma “avanzado”: la vitalidad (VIT), la integridad acrosómica (ACRO) y el porcentaje de motilidad medido mediante el sistema CASA en presencia/ausencia de cafeína (MOTCAF/MOTSIN).

- Parámetros seleccionados para el modelo: VIT y MOTCAF.
- Ecuación de regresión: $CON = -89,30 + 1,35VIT + 0,30MOTCAF$
- Valor de r^2 ajustado: 0,27.

Modelo 3. Los parámetros de partida fueron los empleados en la definición de los dos modelos anteriores.

- Parámetros seleccionados para el modelo: FN, VIT y ACRO.
- Ecuación de regresión: $CON = -220,86 + 0,66FN + 1,17VIT + 1,20ACRO$
- Valor de r^2 ajustado: 0,35.

Modelo 4. Los parámetros de partida fueron los 8 parámetros morfométricos: longitud (L), anchura (W), área (A), perímetro (P) y las 4 funciones derivadas de los mismos [elipticidad (ELI), rugosidad (RUG), elongación (ELO) y regularidad (REG)].

- Parámetros seleccionados para el modelo: LON y PER.
- Ecuación de regresión: $CON = 230,93 - 57,47L + 13,43PER$
- Valor de r^2 ajustado: 0,32.

Modelo 5. Los parámetros de partida fueron los 8 parámetros cinéticos medidos en ausencia de cafeína (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH y BCF) y en presencia de dicha sustancia estimulante (VCLc, VSLc, VAPc, LINc, STRc, WOBc, ALHc y BCFc).

- Parámetros seleccionados para el modelo: WOB, BCFc y STRc.
- Ecuación de regresión: $CON = 25,39 + 3,15BCFc + 0,77WOB - 0,67STRc$
- Valor de r^2 ajustado: 0,19.

Modelo 6. Los parámetros de partida fueron los de la distribución subpoblacional cinética medida en ausencia de cafeína (SP₁, SP₂ y SP₃), y en presencia de dicha sustancia estimulante (SP_{1c}, SP_{2c} y SP_{3c}).

- Parámetro seleccionado para el modelo: SP₃.
- Ecuación de regresión: $CON : 67,88 - 0,33SP_3$
- Valor de r^2 ajustado: 0,05.

Modelo 7. Los parámetros de partida fueron todos los parámetros individuales (tanto cinéticos como morfométricos) medidos por un sistema CASA/ASMA, y la distribución subpoblacional cinética.

- Parámetros seleccionados para el modelo: L, P, ALHc, SP₁, BCFc y VCLc.
- Ecuación de regresión: $CON = 148,25 - 64,79L + 16,91P + 29,60ALHc + 0,20SP_1 + 5,42BCFc - 0,54VCLc$
- Valor de r^2 ajustado: 0,52.

Modelo 8. Utilizamos todos los parámetros medidos en el espermograma clásico/avanzado y los derivados del sistema CASA/ASMA.

- Parámetros seleccionados para el modelo: FN, VIT, L, P, SP₂, ALHc.
- Ecuación de regresión: $CON = 106,76 + 0,48FN + 1,08VIT - 63,70 LON + 14,78PER - 0,42SP_2 + 9,66ALHc$
- Valor de r^2 ajustado: 0,55.

4.7 EXPERIMENTO 5: CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DEL SEMEN DE VERRACO SOMETIDO A CONDICIONES DE CAPACITACIÓN TRAS LA DESCONGELACIÓN

4.7.1 Evolución del porcentaje de movilidad durante la incubación

Los resultados del porcentaje de movilidad de cada uno de los grupos considerados tras la descongelación, y en los dos tiempos de recogida de muestras durante el periodo de incubación (a los 30 y a los 60 minutos de iniciada ésta en el MCT) están recogidos en la Tabla 72 y en la Figura 44.

Tabla 72. Porcentaje de movilidad en cada uno de los grupos durante el proceso de capacitación.

Tiempo	Buenos	Medios	Malos
Descongelado	62,20±10,03 ^{a,*}	43,47±18,91 ^{ab}	31,17±7,48 ^{b,*}
30 minutos	35,09±8,49 ^a	28,08±6,60 ^a	15,52±5,89 ^b
60 minutos	29,70±3,98 ^a	26,39±8,99 ^a	10,15±2,42 ^b

a, b: Diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos. *: Diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

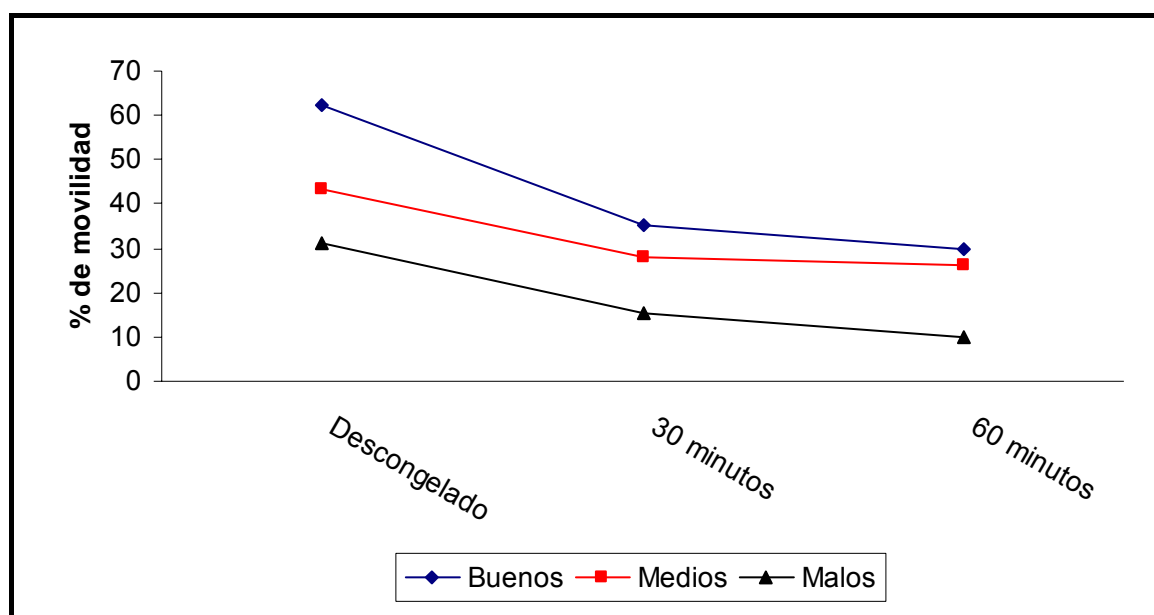


Figura 44. Porcentaje de movilidad en cada uno de los grupos durante el proceso de capacitación.

A pesar de observarse un descenso considerable, no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en el porcentaje de movilidad espermática entre los distintos tiempos de tomas de muestra en el grupo de congeladores medios. Sin embargo, en los otros dos grupos se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras analizadas tras la descongelación y las recogidas a los 30 y 60 minutos de iniciada la incubación, no existiendo esas diferencias entre los resultados de los análisis entre estos dos últimos tiempos de toma de muestras.

4.7.2 Estudio de la distribución subpoblacional cinética durante el proceso de incubación en un medio capacitante tras la descongelación de espermatozoides de porcino

De manera análoga a lo visto en apartados anteriores, se realizó una clasificación de los espermatozoides analizados en las 3 subpoblaciones previamente definidas a partir de los datos obtenidos del análisis a tiempo 0 en ausencia de cafeína (4.3.1). La comparación de la distribución subpoblacional en cada uno de los grupos esta recogida en la Tabla 73, mientras que su evolución se haya representada en las Figuras 45 a 47.

Tabla 73. Comparación de la distribución subpoblacional entre grupos.

Tiempo	% Subpoblaciones	Buenos	Medios	Malos
Descongelado	% SP ₁	74,53±3,94	66,86±10,20	67,70±15,23
	% SP ₂	13,11±2,92	11,41±8,72	6,48±4,02
	% SP ₃	12,36±2,51	21,73±12,90	25,82±13,93
30 minutos	% SP ₁	52,20±4,97	53,60±7,60	38,13±25,43
	% SP ₂	7,91±3,30	5,13±6,19	2,22±4,97
	% SP ₃	39,89±6,49	41,27±2,14	59,64±25,99
60 minutos	% SP ₁	60,69±12,90 ^a	39,57±9,21 ^b	9,45±13,20 ^c
	% SP ₂	6,35±2,75 ^a	6,62±2,43 ^a	0 ^b
	% SP ₃	32,96±8,97 ^a	53,81±8,84 ^b	90,55±13,20 ^c

a, b, c: Diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos.

En el grupo de buenos congeladores (Figura 45) la SP₁ sufrió un descenso significativo ($p < 0,05$) durante la primera parte de la incubación, sin embargo a los 60 minutos de la misma su dimensión se había recuperado no presentando diferencias ($p > 0,05$) con respecto al momento de la descongelación, ni tras 30 minutos de incubación. La SP₂ fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en el momento de la descongelación que en los otros dos tiempos. Finalmente, la SP₃ era significativamente más grande ($p < 0,05$) a los 30 y 60 minutos de incubación que tras la descongelación.

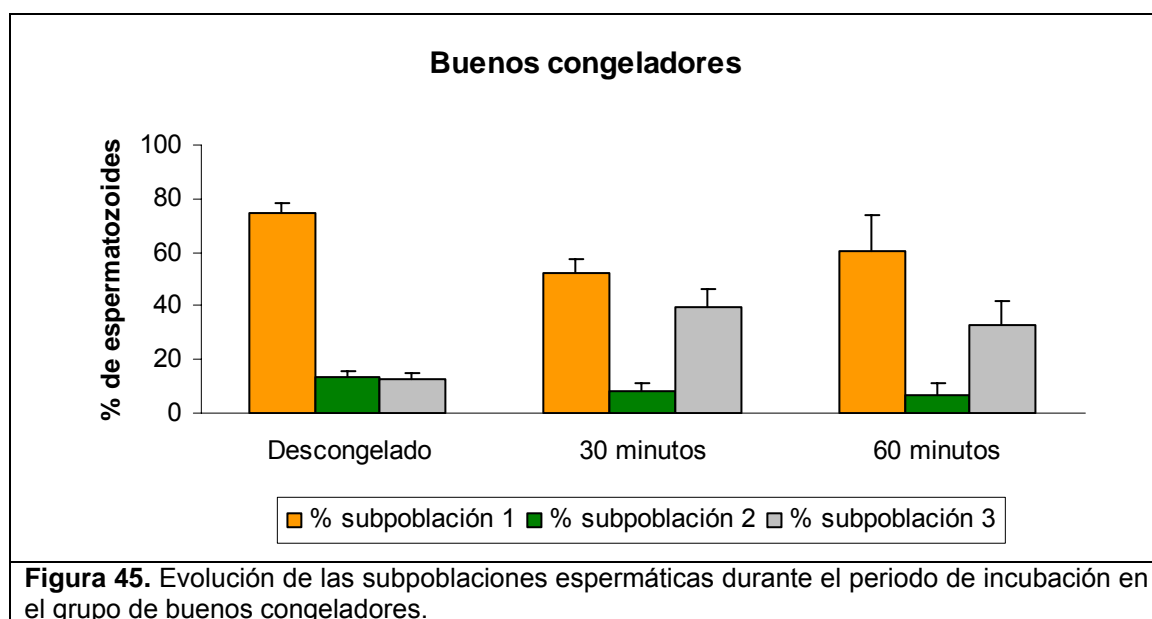
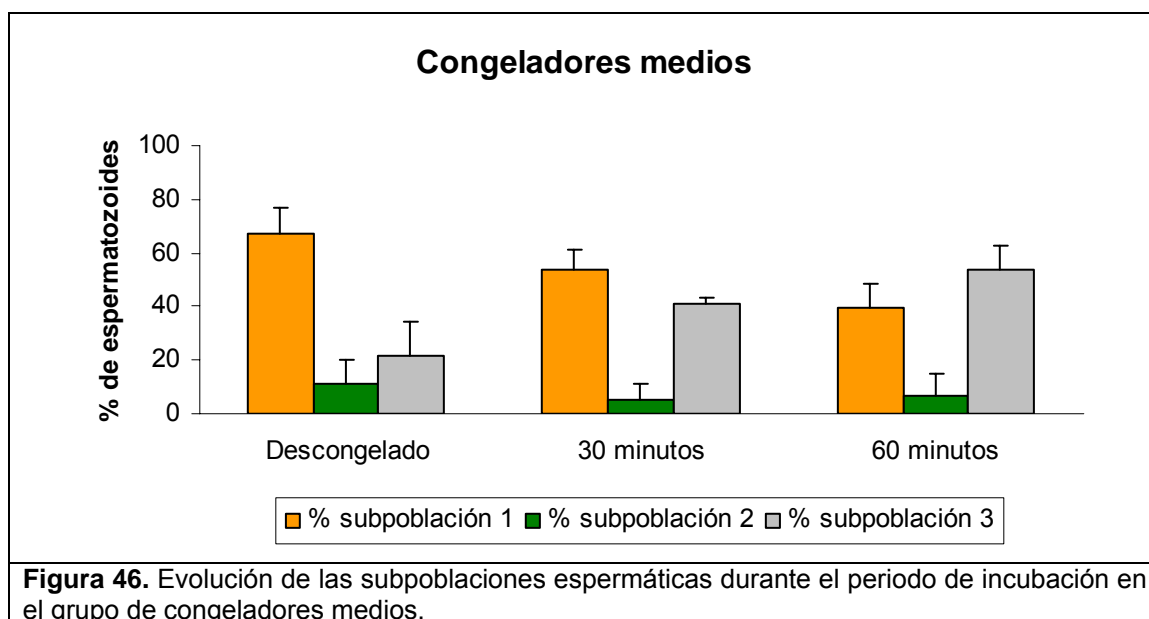


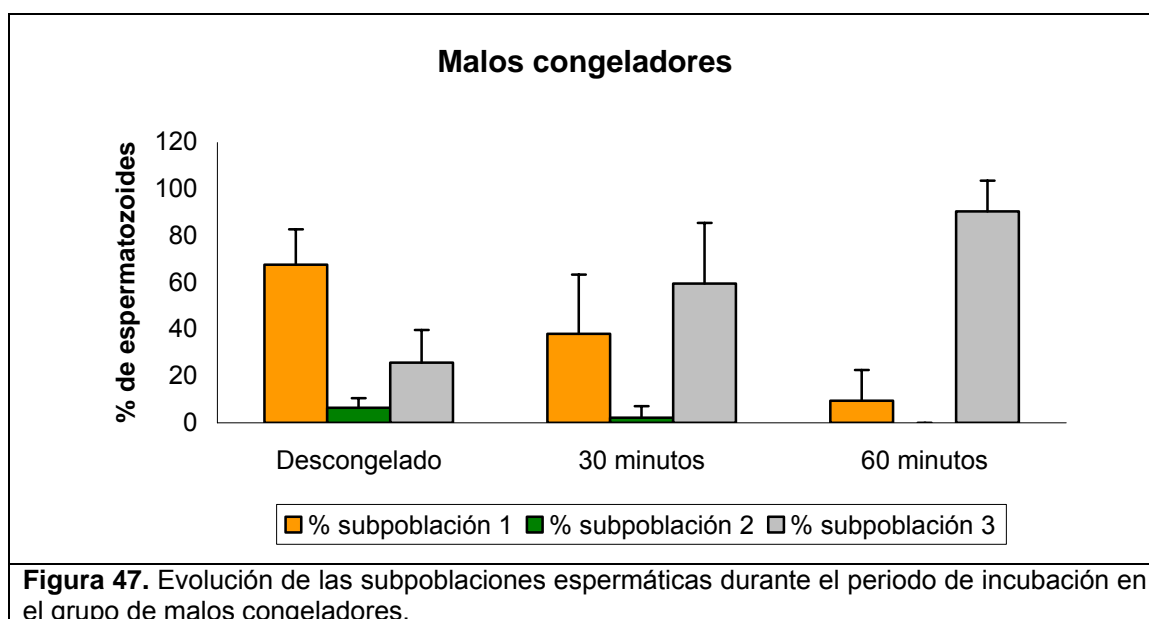
Figura 45. Evolución de las subpoblaciones espermáticas durante el periodo de incubación en el grupo de buenos congeladores.

Como se refleja en la Figura 48, la SP₁ en el grupo de congeladores medios sufrió un descenso durante el periodo de incubación, siendo significativo ($p < 0,05$) entre el momento de la descongelación y los sesenta minutos de incubación. La SP₂ no sufrió variaciones significativas ($p > 0,05$) durante el tiempo de incubación. Por último, el tamaño de la SP₃ fue significativamente distinto ($p < 0,05$) en los 3 puntos de toma de muestra, sufriendo un

incremento desde el momento de la descongelación hasta los treinta minutos de incubación, para a continuación, volver a incrementarse a los 60 minutos del proceso.



En el grupo de malos congeladores (Figura 47), al igual que en el de medios, la SP₁ sufrió un descenso durante la incubación, siendo significativa estadísticamente ($p < 0,05$) entre el momento de la descongelación y los sesenta minutos. Similar comportamiento se apreció en la SP₂, llegando ésta a desaparecer tras 60 minutos de incubación. La SP₃ sufrió un incremento en el proceso siendo el tamaño de ésta, a los 60 minutos, significativamente superior ($p < 0,05$) al calculado en los tiempos anteriores.



4.7.3 Estudio de los parámetros cinéticos de los espermatozoides de porcino durante la incubación en un medio capacitante tras la descongelación

Las medias de grupo de los resultados de los parámetros cinéticos están recogidas en las Tablas 74 a 76. Las comparaciones de los mismos entre grupos se haya indicada en las Tablas 77 a 84. Cuando se compararon los resultados de los tres grupos en cada uno de los tiempos de toma de muestra se determinó, que: en la valoración postdescongelación existían diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en todos los parámetros a excepción de en el STR; a los 30 minutos de comenzar la incubación no existían diferencias significativas entre grupos para los parámetros: VSL, LIN, BCF y STR; sin embargo a la hora de incubación se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en todos los parámetros cinéticos.

Tabla 74. Parámetros cinéticos en el grupo de buenos congeladores.

Parámetros	Descongelado	30 minutos	60 minutos
VCL ($\mu\text{m/s}$)	98,26 ^a	76,46 ^b	89,76 ^a
VSL ($\mu\text{m/s}$)	73,15 ^a	53,84 ^b	68,35 ^c
VAP ($\mu\text{m/s}$)	81,50 ^a	61,17 ^b	74,58 ^c
LIN (%)	71,57 ^a	57,50 ^b	63,81 ^c
STR (%)	87,16 ^a	76,21 ^b	80,53 ^c
WOB (%)	80,79 ^a	72,53 ^b	75,68 ^c
ALH (μm)	2,98 ^a	2,40 ^b	2,55 ^b
BCF (Hz)	8,33 ^a	7,47 ^b	8,26 ^a

a, b, c: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 75. Parámetros cinéticos en el grupo de congeladores medios.

Parámetros	Descongelado	30 minutos	60 minutos
VCL ($\mu\text{m/s}$)	92,93 ^a	69,30 ^b	63,66 ^b
VSL ($\mu\text{m/s}$)	66,99 ^a	50,65 ^b	45,93 ^b
VAP ($\mu\text{m/s}$)	74,09 ^a	56,32 ^b	51,04 ^b
LIN (%)	68,47 ^a	57,85 ^b	54,11 ^b
STR (%)	86,81 ^a	76,22 ^b	72,39 ^b
WOB (%)	77,19 ^a	71,97 ^b	69,87 ^b
ALH (μm)	2,96 ^a	2,03 ^b	2,00 ^b
BCF (Hz)	8,28 ^a	7,28 ^b	6,90 ^b

a, b, c: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 76. Parámetros cinéticos en el grupo de malos congeladores.

Parámetros	Descongelado	30 minutos	60 minutos
VCL ($\mu\text{m/s}$)	81,37 ^a	56,03 ^b	25,72 ^c
VSL ($\mu\text{m/s}$)	60,42 ^a	37,05 ^b	14,74 ^c
VAP ($\mu\text{m/s}$)	65,43 ^a	41,29 ^b	17,22 ^c
LIN (%)	67,42 ^a	50,35 ^b	38,61 ^c
STR (%)	86,40 ^a	74,33 ^b	65,81 ^c
WOB (%)	75,49 ^a	64,18 ^b	54,90 ^c
ALH (μm)	2,58 ^a	1,99 ^b	1,06 ^c
BCF (Hz)	8,85 ^a	6,86 ^b	4,56 ^c

a, b, c: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 77. Resultados de la VCL ($\mu\text{m/s}$) en los tres grupos de eyaculados considerados.

	Buenos	Medios	Malos
Descongelado	98,26 ^a	92,93 ^b	81,37 ^c
30 minutos	76,46 ^a	69,30 ^{ab}	56,03 ^b
60 minutos	89,76 ^a	63,66 ^b	25,72 ^c

a, b, c: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 78. Resultados de la VSL ($\mu\text{m/s}$) en los tres grupos de eyaculados considerados.

	Buenos	Medios	Malos
Descongelado	73,15 ^a	66,99 ^b	60,42 ^c
30 minutos	53,84 ^a	50,65 ^a	37,05 ^b
60 minutos	68,35 ^a	45,93 ^b	14,74 ^c

a, b, c: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 79. Resultados de la VAP ($\mu\text{m/s}$) en los tres grupos de eyaculados considerados.

	Buenos	Medios	Malos
Descongelado	81,50 ^a	74,09 ^b	65,43 ^c
30 minutos	61,17 ^a	56,32 ^{ab}	41,29 ^b
60 minutos	74,58 ^a	51,04 ^b	17,22 ^c

a, b, c: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 80. Resultados del LIN (%) en los tres grupos de eyaculados considerados.

	Buenos	Medios	Malos
Descongelado	71,57 ^a	68,47 ^b	67,42 ^b
30 minutos	57,50	57,85	50,35
60 minutos	63,81 ^a	54,11 ^b	38,61 ^c

a, b, c: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 81. Resultados del STR (%) en los tres grupos de eyaculados considerados.

	Buenos	Medios	Malos
Descongelado	87,16	86,81	86,40
30 minutos	76,21	76,22	74,33
60 minutos	80,53 ^a	72,39 ^b	65,81 ^b

a, b: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 82. Resultados del WOB (%) en los tres grupos de eyaculados considerados.

	Buenos	Medios	Malos
Descongelado	80,79 ^a	77,19 ^b	75,49 ^b
30 minutos	72,53 ^a	71,97 ^a	64,18 ^b
60 minutos	75,68 ^a	69,87 ^b	54,90 ^c

a, b, c: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 83. Resultados de la ALH (μm) en los tres grupos de eyaculados considerados.

	Buenos	Medios	Malos
Descongelado	2,98 ^a	2,96 ^a	2,58 ^b
30 minutos	2,40 ^a	2,03 ^b	1,99 ^b
60 minutos	2,55 ^a	2,00 ^b	1,06 ^c

a, b, c: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

Tabla 84. Resultados de la BCF (Hz) en los tres grupos de eyaculados considerados.

	Buenos	Medios	Malos
Descongelado	8,33 ^a	8,28 ^a	8,85 ^b
30 minutos	7,47	7,28	6,86
60 minutos	8,26 ^a	6,90 ^b	4,56 ^c

a, b, c: Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos.

5. DISCUSIÓN

5.1 EVOLUCIÓN DE LA VITALIDAD, INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y MOTILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES DE VERRACO DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN

Comenzaremos esta discusión haciendo alusión a una cuestión no relacionada directamente, con los objetivos principales de este trabajo; pero es sumamente relevante la existencia de diferencias significativas entre la valoración subjetiva del porcentaje de movilidad espermática realizada dentro del espermiograma clásico, y el resultado de la medida del mismo parámetro evaluado mediante el equipo de análisis computerizado ISAS[®]. Este hecho ha sido descrito previamente para el software SCA[®] (antecesor del ISAS[®]) por Blanco (1998); y posteriormente por Vyt *et al.* (2004b), empleando, en este caso, el equipo Hamilton-Thorne. Dichos autores, como en nuestro estudio, encontraron una escasa correlación entre los resultados de ambas medidas.

Podemos concluir, a partir de la situación anteriormente descrita, que los dos procedimientos siguen una metodología completamente distinta en la determinación de la motilidad espermática. Esta disparidad de criterios, impide la comparación de sus resultados y origina que las conclusiones extrapoladas a partir de uno u otro procedimiento puedan ser, incluso, contradictorias. Así, en nuestro estudio observamos que, a partir de los resultados de la valoración subjetiva del porcentaje de motilidad, no se encuentran diferencias significativas para este parámetro entre los verracos empleados; diferencias que sí fueron descritas cuando los valores empleados eran aportados por el sistema CASA. Esto nos lleva a pensar que los sistemas computerizados presentan un mayor poder discriminante, siendo más adecuados para el análisis cinético espermático; llegando a la misma conclusión otros autores como Holt *et al.* (1997) e Hirai *et al.* (2001).

Hecho el anterior inciso, y centrándonos más en la temática propia de este trabajo, podemos describir como los cambios deletéreos actuantes durante los procesos de congelación-descongelación, van a originar una drástica reducción de la supervivencia espermática. Podemos considerar como altamente satisfactorios unos valores de ésta en torno al 50% (Watson, 1995; 2000; Curry, 2000); siendo, para Watson (2000) los causantes últimos de este fenómeno: los cambios de temperatura, el estrés osmótico causado por la adición del agente crioprotector y la formación y licuefacción del hielo intracelular.

Teniendo en cuenta la anterior aseveración, podemos valorar que la calidad media posdescongelación de los eyaculados empleados en nuestro estudio es satisfactoria, toda vez que los valores medios obtenidos, son: motilidad sin la adición de cafeína: 45,4%, vitalidad: 53,6% e integridad acrosómica: 69,5%. Dichos resultados se encuentran muy próximos

(motilidad: 46%-52%) a los publicados por los autores que diseñaron la técnica de crioconservación que hemos empleado (Bwanga *et al.*, 1990; 1991a; 1991b); así como, a trabajos posteriores que la utilizan [motilidad 44%-52%, vitalidad 43%-61% (Eriksson y Rodríguez-Martínez, 1999; Eriksson *et al.*, 2001; Peláez, 2003)]. Hemos de reseñar, que no siempre fueron usadas las mismas técnicas analíticas en todos los trabajos referidos, a pesar de lo cual la similitud de resultados entre aquellos y los nuestros es obvia. El porcentaje de integridad acrosómica resultó ser superior en los estudios de Bwanga *et al.* (1991 a; c), que en los obtenidos en nuestra prueba (77%-84% vs. 69,5% respectivamente), si bien nuestros resultados se encuentran en el rango de los obtenidos por Peláez (2003). De manera similar a este autor, en nuestro estudio, la valoración de la integridad acrosómica fue llevada a cabo mediante marcadores fluorescentes, pudiendo ser esta la causa de las discrepancias con los trabajos de Bwanga *et al.* Estos autores usaron microscopia de contraste de fases, siendo esta técnica, según Ortman y Rodríguez-Martínez (1994), menos discriminativa que los fluorocromos; esto parece explicar el menor número de acrosomas que fueron identificados como íntegros en nuestros resultados.

Podemos asegurar, por tanto, que la técnica de crioconservación fue empleada de forma correcta y los resultados obtenidos para estos tres parámetros eran los esperados en base a los trabajos publicados con anterioridad.

Como hemos explicado previamente, la “vitalidad” de las células espermáticas es un parámetro medido, en nuestro caso, mediante la evaluación de la integridad del plasmalema, ya que una rotura de este último provoca una muerte celular irremediable. Según Parks y Graham (1992), la membrana plasmática es la estructura espermática en que más tempranamente se manifiestan las lesiones causadas por el proceso de criopreservación, siendo además, la más severamente dañada; de ahí que nos decantásemos por este parámetro como nuestro indicador de referencia tras la descongelación

Las alteraciones en la membrana se produjeron, ya, en la primera fase de enfriamiento que hemos definido (bajada de la temperatura hasta 15 °C durante 4 horas de incubación), al comprobarse la existencia de una disminución significativa de la vitalidad celular. Esto parece coincidir con el trabajo de Watson (1995), en el que se afirma que los daños en el plasmalema comenzarían por debajo de los 20 °C, por otra parte, esas alteraciones serían independientes de la curva de temperatura empleada, apareciendo aunque ésta fuese muy suave (Holt y North, 1984; De Leeuw *et al.*, 1999). Resultados similares a los nuestros fueron descritos por Cremades *et al.* (2005), constatando un descenso muy similar, salvo que éste no fue significativo, pudiendo ser la causa de esta diferencia la utilización, por su parte, de un índice combinado (integridad de membrana, integridad acrosomal e integridad mitocondrial) para representar la vitalidad celular.

Para Drobnis *et al.* (1993), el mecanismo último que producirá esta alteración en la membrana por enfriamiento, es la separación lateral de fases, la cual desencadena un conjunto de consecuencias que comienzan por una pérdida de fluidez de la misma. A continuación, se produce un incremento de la permeabilidad del plasmalema y pérdida de su capacidad selectiva, lo que acarreará cambios en la composición del medio interno y alteraciones del metabolismo celular. Desde un punto de vista estructural, el resultado final será la rotura de la membrana plasmática (Watson y Plummer, 1985); cuya manifestación en nuestro estudio fue una pérdida de vitalidad espermática.

También, según describe Watson (2000), los elementos citoesqueléticos son sensibles a las bajadas de temperaturas, produciéndose despolimerizaciones de los filamentos de actina, lo que finalmente provocará la desestabilización de la membrana. Un resultado final similar se producirá como consecuencia del ataque de las ROS a los componentes del citoesqueleto, mientras que la acción de estas sustancias a nivel de la membrana provoca alteraciones tanto de su estructura, como de su composición.

Finalmente, en esta descripción de los procesos lesionales sobre la membrana, para Maxwell y Johnson (1997a) el fenómeno de “criocapacitación”, es uno de los principales causantes de los daños en el plasmalema cuando se reduce la temperatura a la que se ven sometidos los espermatozoides.

En la siguiente etapa, tras centrifugar la suspensión espermática, eliminar el plasma seminal y añadir el diluyente de refrigeración, procedimos a la incubación a 5 °C durante 2 horas. Es obvio, que los mecanismos deletéreos asociados a la bajada de temperatura, como al valor final de ésta alcanzado, van a seguir actuando, siendo, según Watson (1995) más severos, al considerar que los mayores daños causados por estos mecanismos se van a producir en el intervalo comprendido entre los 12 °C y los 2 °C. Además de una temperatura menor, el semen es sometido a una centrifugación y eliminación del plasma seminal, lo que conllevará la eliminación de los compuestos y enzimas antioxidantes presente en él; produciéndose con mayor intensidad la peroxidación lipídica por parte de las ROS (Brouwers *et al.*, 2005).

A pesar de que nuestros resultados vuelven a mostrar la existencia de una disminución significativa de la vitalidad espermática, el descenso sufrido por ésta es aproximadamente de la misma magnitud que en el paso anterior. Esto nos indica que las células espermáticas no son en este paso más sensibles a la pérdida de su integridad que en el anterior. Incluso en otros trabajos (Cremades *et al.*, 2005), se describe un incremento no significativo de la viabilidad celular en el paso de los 17 °C a los 5 °C, hecho que sin duda es paradójico, ya que implicaría que espermatozoides que han perdido dicha viabilidad la recuperarían, lo que es ha todas luces improbable. En contraposición al anterior trabajo, Eriksson *et al.* (2001), obtuvieron mediante el estudio por citometría de flujo de la integridad del plasmalema, unos

resultados de viabilidad razonablemente similares a los nuestros (83% en el trabajo de Eriksson *et al.* y 78,4% en el nuestro). Con estos resultados, dichos autores demostraron (al igual que en nuestro trabajo), la existencia de un descenso significativo de la viabilidad espermática durante la etapa de enfriamiento del semen desde los 15 °C hasta los 5 °C.

En la última etapa en la que dividimos el proceso de congelación van a actuar los tres agentes deletéreos citados por Watson (2000): la adicción del agente crioprotector, y la formación y licuefacción de cristales de hielo intracelulares. El primero de ellos va a actuar a través de un efecto tóxico y por estrés osmótico (Watson 1995; 2000; Gao *et al.*, 1997). El resultado va a ser un incremento de la permeabilidad celular y la alteración del transporte de agua a su través (Curry y Watson, 1994). El resultado final de la adicción del agente crioprotector, como demostraron Ball *et al.* (2001) tras la adicción de diversos crioprotectores a diluciones de semen equino, fue una reducción de la vitalidad espermática.

Además del propio efecto adverso de la formación de cristales de hielo intracelularmente, se va a producir un intenso estrés osmótico (Mazur, 1985); siendo el resultado final de ambos procesos la rotura mecánica de la membrana.

Medrano *et al.* (2002) en semen de porcino y Mohammad *et al.* (1997) en semen humano, pudieron constatar, mediante el uso del criomicroscopio, que el mayor daño en la membrana se producía durante las fases de congelación-descongelación. Medrano *et al.* (2002) indicaron además, que era más concretamente durante la descongelación cuando se visualizaban el mayor porcentaje de células dañadas. Aunque, como apuntan los mismos autores, la difusión de las sustancias marcadoras fluorescentes se podría encontrar impedida durante la fase de congelación, pudiéndose haber producido el daño durante ésta, aunque el marcado que la hace patente apareciese en la fase en la que aumenta la temperatura.

En contraposición con todo lo anterior Maxwell y Johnson (1997a), afirman que los principales daños de integridad en la membrana se producen durante el enfriamiento hasta 5 °C, a causa del proceso de criocapacitación.

Nuestros resultados respaldan la teoría de Medrano *et al.* (2002), al observarse que en los procesos de congelación realizados, el mayor descenso de la vitalidad se produce en el periodo comprendido entre la adicción del agente crioprotector y la descongelación. Dicha situación se repite en otros estudios, en los que se congela semen de verraco, como los llevados a cabo por Cremades *et al.* (2005) o por Eriksson *et al.* (2001).

Como en el caso de la vitalidad espermática, la integridad acrosomal sufrió descensos significativos en cada uno de los pasos en los que dividimos el proceso de criopreservación. Las causas últimas las podemos achacar a los mismos fenómenos deletéreos implicados en el descenso de la vitalidad, al ser la pérdida de la integridad acrosomal un proceso que comparte muchas similitudes con el anteriormente descrito. De forma general el daño acrosómico está

producido por una pérdida de continuidad y vesiculación de la membrana plasmática en la zona apical de la cabeza, y la rotura de la membrana acrosómica. Si bien, hay otros mecanismos implicados, más específicos, como el producido por el proceso de criocapacitación; éste a través de un acúmulo intracelular de Ca^{2+} desencadenará una reacción acrosómica similar a la fisiológica (Green y Watson, 2001b) y por tanto una pérdida de la integridad acrosomal.

A pesar de que los mecanismos implicados en su alteración son muy parecidos, la membrana acrosómica externa es más resistente que el plasmalema (Watson, 1995); habiendo sido probado este hecho por Ortman y Rodríguez-Martínez (1994), Eriksson y Rodríguez-Martínez (2000b) y Peláez (2003) en semen de porcino y por Valcarcel *et al.* (1997) en semen de ovino. A una conclusión similar podemos llegar a tenor de nuestros resultados, al ser, en cada uno de los puntos de toma de muestra, más elevado el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma íntegro que el de células viables. Al igual que Peláez (2003) en semen porcino y Valcarcel *et al.* (1997) en ovino, consideramos la integridad de membrana un criterio para la valoración de la calidad del semen criopreservado más restrictivo o crítico que el porcentaje de acrosomas normales. La correlación entre los valores de ambos parámetros fue inferior a 0,5 en los tres primeros puntos de toma de muestra, mientras que el análisis postdescongelación fue de 0,85, indicando que los mecanismos que alteran tanto uno como otro parámetro son muy similares durante la fase de congelación-descongelación. Finalmente, fue en ésta última fase, al igual que para la vitalidad, donde se constató un mayor descenso de la integridad del acrosoma. Esto demostró, que dicha estructura es más sensible a los procesos de formación-dilución de los cristales de hielo, y/o la adicción del agente crioprotector, que al descenso previo de la temperatura.

La movilidad de los espermatozoides de verraco se va a ver drásticamente afectada por el proceso de congelación (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1996; Woelders *et al.*, 1996; Cerolini *et al.*, 2001). Detrás de este efecto están los factores deletéreos ya citados para explicar la bajada de los valores de integridad acrosómica y vitalidad. Si bien, los mecanismos que producen la pérdida de la capacidad cinética son particulares. Así, los daños a nivel de la membrana a causa del descenso de temperatura, van a alterar el metabolismo energético (hecho agravado por la pérdida de enzimas del medio interno), lo que irremediablemente produce un descenso de la síntesis de ATP que acarreará una pérdida de la motilidad (Watson, 1995); pudiendo considerar de esta manera, que el porcentaje de espermatozoides móviles puede actuar como un indicador de la actividad metabólica espermática. La peroxidación lipídica causada por las ROS va a ser más intensa a nivel de la pieza intermedia (Brouwers *et al.*, 2005), encontrándose correlacionados el incremento de dichas sustancias y el descenso de la movilidad postdescongelación, o este mismo fenómeno y la pérdida de SOD (Alvarez *et al.*, 1992; Brouwers *et al.*, 2005). A los daños por las ROS, hemos de sumar las alteraciones mecánicas que produce la formación-dilución de hielo sobre el axonema.

Nuestros resultados muestran como el porcentaje de espermatozoides móviles sufren una fuerte disminución tras la técnica de criopreservación, pero a diferencia de la vitalidad y la integridad acrosómica, ésta no es constante durante todo el proceso. Así, en el primer paso (incubación hasta 15 °C), incluso, se produce un ligero incremento de sus valores, siendo descrito un resultado similar por Cremades *et al.* (2005), que al igual que nosotros emplean semen de cerdo y por Rasul *et al.* (2001) en congelaciones llevadas a cabo con semen de búfalo. Por el contrario, Huang *et al.* (1999) analizando la movilidad del semen de porcino durante la conservación en fresco del mismo, describen una disminución no significativa de la motilidad espermática durante el periodo de enfriamiento hasta 15 °C. La explicación a nuestros resultados pudiera ser debida a que: la medición inicial de la movilidad espermática se realizó inmediatamente tras la dilución, por lo que el espermatozoide podría encontrarse en una fase de adaptación al nuevo medio, restándole capacidad móvil y por tanto presentando un porcentaje de motilidad inferior al que potencialmente podría expresar.

Nuestros resultados, indican un descenso significativo del porcentaje de espermatozoides móviles durante el periodo de incubación a 5 °C, sin embargo en el trabajo de Cremades *et al.* (2005), se afirma que durante este periodo se produjo una subida no significativa de los valores de este parámetro. Por el contrario Huang *et al.* (1999), empleando semen de cerdo y Rasul *et al.* (2001) con semen de búfalo comunican, al igual que en nuestro experimento, una disminución, salvo que esta no fue significativa. Por último, Eriksson *et al.* (2001) utilizando la misma técnica de criopreservación y la misma especie de procedencia de material seminal que en nuestro estudio, describen una disminución significativa del porcentaje de espermatozoides móviles en la etapa de enfriamiento hasta 5 °C, siendo en este punto sus resultados similares a los nuestros (en ambos casos un 76 % de espermatozoides móviles). La elección de estos trabajos para comparar nuestros resultados no se ha hecho al azar, ya que en todos ellos la valoración del porcentaje de motilidad se ha realizado mediante un sistema CASA, con lo que el valor comparativo de los mismos es mayor que si utilizásemos mediciones realizadas de forma subjetiva.

Finalmente, el descenso más brusco del porcentaje de motilidad espermática se produjo durante la fase de adición del agente crioprotector-congelación-descongelación. Esta reducción refleja que durante este periodo se producen los más extensos y graves daños funcionales y morfológicos en la célula espermática.

Siguiendo la evolución descrita en nuestro estudio, podemos concluir que la motilidad espermática se va a ver poco deprimida durante la primera fase de enfriamiento a 15 °C, para a continuación empezar a descender y sufrir el efecto deletéreo más apreciable durante la congelación. Esto puede ser debido a una aparición más tardía de los signos deletéreos producidos por la congelación en la función motil. También debemos considerar la posibilidad de que dicha función presente una menor sensibilidad a las primeras alteraciones,

para posteriormente sufrir cambios más apreciables. En cualquier caso, al igual que para la vitalidad y para la integridad del acrosoma, son las alteraciones producidas durante las fases de congelación-descongelación las que más van a condicionar el resultado final de la motilidad.

La adicción de cafeína previamente a la valoración de la motilidad, supuso un incremento en los valores medios de la misma en cada uno de los puntos de toma de muestra, aunque en los dos primeros ese incremento no fue significativo. Esto concuerda con los resultados encontrados por otros autores (Domínguez *et al.*, 1985; Fattouh y Abdau, 1991; Peláez, 2003), los que como nosotros, observaron que el efecto de la cafeína era más acusado en muestras, que sin ésta sustancia, mostraban una motilidad escasa y débil o nulo en aquellas donde era más elevada previamente.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto, podemos deducir que la integridad acrosómica es el parámetro que menos sensibilidad muestra durante el proceso de criopreservación. Por su parte, el porcentaje de motilidad fue superior a la vitalidad en el comienzo del proceso y tras la incubación a 15 °C. Esto podría indicarnos que los daños en la membrana no afectan, en un principio, a la capacidad móvil de la célula espermática, ya que habrá espermatozoides con la membrana lesionada y sin embargo presentan movimiento. Tras la incubación a 15 °C [al igual que Eriksson *et al.* (2001)], y tras la descongelación [al igual que el mismo Eriksson *et al.* (2001) y Medrano y Holt (1998); Eriksson y Rodríguez-Martínez (2000b); Peláez (2003)] hay un menor número de espermatozoides móviles que vivos, situación que se invierte al suplementar el medio con cafeína, pudiendo llegar a concluir, al igual que Peláez (2003), que la movilidad del semen descongelado es francamente inferior a la que verdaderamente podría expresar.

La presencia en el semen descongelado de un porcentaje inferior de espermatozoides móviles que de vivos, podría deberse [como apuntan Medrano y Holt (1998)] a que estos espermatozoides se encuentran en una situación de bajo estado metabólico inmediatamente tras la descongelación, que se vería revertida por la adicción de cafeína. Peláez (2003) respalda esta teoría, al observar un incremento del porcentaje de espermatozoides móviles tras incubar el semen descongelado a 37 °C.

Parece obvio, que la estimación de la motilidad, solamente, no se puede considerar como un parámetro suficiente en la valoración del material seminal tras la criopreservación, siendo preferible el resultado de la integridad de membrana como mejor índice de criorresistencia, atestiguado además, por su uso con este fin en diversos trabajos de investigación (Thurston *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2005b).

Tomando la integridad de membrana como criterio para determinar la respuesta a la congelación, podemos observar que no hubo diferencias significativas entre razas para este

parámetro en los distintos puntos de toma de muestra. Ésta afirmación parece coincidente con un estudio de Roca *et al.*, (2006), quienes no atribuyen a la raza relevancia a la hora de explicar la variabilidad en la respuesta a la congelación. En nuestro caso, si encontramos diferencias para el porcentaje de motilidad entre razas, presentando los machos de raza Landrace mejores índices en cada uno de los puntos de toma de muestra, lo que sugiere una mejor capacidad motil de los espermatozoides de esta raza tanto en semen fresco como tras la descongelación. Por último, los valores del porcentaje de acrosomas íntegros, al igual que la vitalidad no mostraron diferencias entre las dos razas analizadas.

Donde se detectaron diferencias para los tres parámetros analizados fue en la comparación de los resultados individuales, observaciones similares obtuvieron otros autores que emplearon nuestras mismas técnicas como Eriksson y Rodríguez-Martínez (2000b, 1999) y Peláez (2003); así para Roca *et al.* (2006), éste es el principal factor que explica la variabilidad de respuesta a la congelación en la especie porcina, aunque es un hecho frecuente en diferentes especies (Watson, 1995; Holt, 2000b).

5.2 EXPERIMENTO 1: EVALUACIÓN DE LOS PATRONES CINÉTICOS DESCRITOS POR LOS ESPERMATOZOIDEOS DE VERRACO DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACION

La introducción de la tecnología de análisis mediante imágenes digitales en la práctica andrológica ha permitido la valoración objetiva de la motilidad espermática, aportándonos, además, una serie de parámetros antes desconocidos. Estos avances han ampliado nuestro conocimiento sobre la funcionalidad espermática, constituyéndose en el caso concreto de la crioconservación de semen porcino en una nueva herramienta, que permite una mejor comprensión de dicho proceso. Es esta mejora de las técnicas empleadas, fue uno de los requisitos fijados en el pasado por Reed (1985) para mejorar los resultados de dichos procesos de congelación. El papel de esta nueva tecnología no se ha reducido a aportar una nueva plétora de parámetros, sino que nos ha permitido demostrar la estructuración subpoblacional cinética de los eyaculados de los mamíferos (Abaigar *et al.*, 1999; Quintero-Moreno *et al.*, 2003a; 2003b; 2007; Chantler *et al.*, 2004; Cremades *et al.*, 2005; Martínez-Pastor *et al.*, 2005a; b; 2006; Rivera *et al.*, 2006; Ramio-Lluch *et al.*, 2006; Núñez-Martínez *et al.*, 2006). Esta estructuración nos aporta información que de otra manera pasaría inadvertida o sería mal interpretada, al suponer la distribución homogénea de dichos parámetros, cuando la realidad es bien distinta (Quintero-Moreno, 2003a; Chantler *et al.*, 2004).

El análisis multivariante, instrumento imprescindible para definir las subpoblaciones espermáticas, no sólo nos permite describir la estructuración del eyaculado; sino que también se convierte en una herramienta estadística que sintetiza la información procedente de los parámetros cinéticos (Quintero-Moreno *et al.*, 2003a). Hemos de destacar, como apunta el autor anteriormente citado, que además de las fuentes de variación descritas para los sistemas CASA, los resultados del análisis subpoblacional se van a ver condicionados por el método estadístico elegido, al variar éste en función del grupo investigador que desarrolle el trabajo.

Los procedimientos estadísticos aplicados en nuestro estudio comienzan con la realización de una clasificación no jerárquica de las observaciones a partir de los resultados de los parámetros cinéticos individuales, tras lo que obtenemos un número amplio de subpoblaciones iniciales, también denominadas “pre-clusters” o “bins”. A continuación, estos pre-clusters se someten a una clasificación jerárquica de la que resultan las subpoblaciones finales. Este esquema (aunque empleando algoritmos distintos) es el seguido por Abaigar *et al.* (1999) y Cremades *et al.* (2005).

Sin embargo, otros autores (Quintero-Moreno *et al.*, 2003a; b; 2004; 2007; Martínez-Pastor *et al.*, 2005a, b, 2006; Núñez-Martínez *et al.*, 2006; Rivera *et al.*, 2006; Ramio-Lluch *et al.*, 2006) emplean esquemas distintos a los nuestros; llevando a cabo inicialmente un análisis de componentes principales (PCA) o algún método derivado a partir de él. Dicha aproximación no parece la más adecuada, al ser el PCA un método que ya de partida presupone la existencia de una única población normal multivariante y no la potencial existencia de múltiples subpoblaciones, tal y como es el objeto de la presente sección. Esta falta de cumplimiento de las premisas de partida puede ser fuente de importantes desviaciones en los resultados finales.

A partir de este paso, los autores que emplean inicialmente técnicas de PCA, pueden seguir un modelo similar al nuestro (agrupamiento no jerárquico + agrupamiento jerárquico), como realizan Martínez-Pastor *et al.*, en sus trabajos; u otros distintos en el resto de los casos.

El modelo desarrollado en nuestro estudio es innovador, al emplear algoritmos distintos a los usados por Abaigar *et al.* (1999) y Cremades *et al.* (2005). En la realización de la clasificación no jerárquica empleamos el bien conocido método de las k-medias; por el contrario la clasificación jerárquica se realiza utilizando el recientemente introducido algoritmo jerárquico aglomerativo de Ciampi *et al.*, (2007). En dicho esquema se definieron inicialmente 40 “bins” o pre-clusters, número muy superior a los descritos en otros trabajos [Martínez-Pastor *et al.* (2005a, b y 2006) definen 15 para datos procedentes de semen de ciervo y Abaigar *et al.* (1999) 9 trabajando con semen de cerdo y 13 con semen de gacela]; esta apreciablemente mayor cantidad de subpoblaciones iniciales, fue posible gracias al elevado número de observaciones (6.634) de los que parte el proceso de clasificación. Al

poder trabajar con un número superior de *pre-clusters* se obtienen ventajas apreciables en cuanto a la consistencia de los resultados en múltiples repeticiones del análisis.

Es sorprendente, que a pesar de los diferentes métodos analíticos y estadísticos (no solo los algoritmos, sino que también los parámetros individuales elegidos varían en función del autor), empleados en los anteriores trabajos, el número de subpoblaciones cinéticas definidas, independientemente de la especie estudiada, se sitúa entre 3 y 4; únicamente Núñez-Martínez *et al.* (2006) se distancian de esta tónica general al describir la existencia de 11 subpoblaciones en el semen fresco de perro y 9 tras su descongelación. En nuestro caso, el número idóneo de subpoblaciones definidas por el modelo estadístico fue de 3. Dicho resultado coincidió con el de otros trabajos realizados en porcino, como el de Cremades *et al.* (2005), Quintero-Moreno *et al.* (2003a; 2004) y Abaigar *et al.* (1999); aunque otros autores en esta misma especie describen la existencia de 4 subpoblaciones (Rivera *et al.*, 2006; Ramio-Lluch *et al.*, 2006). Hemos de resaltar que estos autores emplean el mismo método estadístico que Quintero-Moreno *et al.* (2003a; b; 2004; 2007), y sin embargo los resultados no son coincidentes; dicha situación se repite en los estudios de Martínez-Pastor *et al.* (2005a; b; 2006) con semen de ciervo. Las causas de esta falta de concordancia, desde nuestro punto de vista, serían debidas no sólo a la debilidad del método estadístico que aplican sino también, a las variaciones producidas en los resultados debido a las fuentes de variación, que actúan sobre las mediciones realizadas sistemas CASA, y al uso de material seminal en diverso estado fisiológico. Al igual que Quintero-Moreno (2003a), podemos concluir que existe un cierto vínculo filogenético (estamos tratando animales de la misma clase: mamíferos) entre las especies analizadas, que haría que el número de subpoblaciones cinéticas sea muy próximo entre ellas (3-4).

Las diferencias entre los distintos trabajos publicados aumentan cuando se comparan el tamaño y las características de las subpoblaciones definidas. En nuestro caso, nos centraremos en los estudios que, empleando semen de verraco fresco, definen como nosotros 3 subpoblaciones cinéticas. Así Cremades *et al.* (2005) y Quintero-Moreno *et al.* (2003a), describen la existencia de una subpoblación predominante (90% de las observaciones), presentando los espermatozoides pertenecientes a ella un movimiento rectilíneo. En estos dos trabajos también se coincide en el tamaño de los otros dos grupos, representando el más numeroso al 9% de las observaciones y el menor el 1%; si bien sus características son completamente diferentes en función del autor del estudio.

Nuestros resultados, al menos en cuanto a distribución subpoblacional, fueron más parecidos a los de Abaigar *et al.* (1999). En ambos trabajos se definieron dos subpoblaciones principales, muy próximas en cuanto a dimensión [en nuestro caso los tamaños de la subpoblación 1 (SP₁) y la subpoblación 3 (SP₃) se situaron en torno al 45%]; mientras que la tercera subpoblación es significativamente más pequeña [la subpoblación 2 (SP₂) representaba

el 10% de las observaciones]. Si en la distribución de las subpoblaciones espermáticas nuestros resultados guardan alguna similitud con los de Abaigar *et al.* (1999); éstas desaparecen al comparar las características de las subpoblaciones definidas. En los grupos principales del trabajo de los citados autores, se encuentran los espermatozoides muy activos (alta VCL) diferenciándose ambas subpoblaciones por la progresividad de los mismos (VSL); mientras que en la subpoblación más pequeña se integran los espermatozoides con unos parámetros cinéticos de progresividad y vigorosidad muy disminuidos. Por contra, en nuestro trabajo la SP₂ (subpoblación más pequeña) agrupa a las células espermáticas más vigorosas y que más espacio recorren (alta VCL y VAP), sin embargo sus trayectorias son muy sinuosas (elevada ALH y bajo LIN y STR) y la ganancia de espacio neta es menor (baja VSL) con respecto a la de los espermatozoides de la SP₁. Estos últimos se caracterizan precisamente por describir trayectorias más rectilíneas (alto VSL, STR y LIN), mientras que sus movimientos son menos vigorosos y zigzagueantes (menor VCL, VAP y ALH), aunque presenten una mayor BCF. Por último, los espermatozoides de la SP₃ presentan unos parámetros de progresividad (VSL, LIN y STR) y vigorosidad (VCL, VAP, ALH y BCF) muy reducidos con respecto a las dos subpoblaciones anteriores; es decir sus trayectorias son cortas y sinuosas, reflejando una capacidad móvil muy pobre.

Las diferentes características móviles de las subpoblaciones, para Quintero-Moreno (2003a), son un reflejo de la actividad del metabolismo espermático. Dicho autor, respalda su teoría al observar la correlación entre las variaciones subpoblacionales con respecto a los cambios sufridos por los valores de las pruebas funcionales espermáticas, como la producción de L-lactato o el ORT. También podemos inferir dicha conclusión a partir de los cambios que sufre la distribución subpoblacional tras el tratamiento con sustancias, como la cafeína o el bicarbonato, que modifican el metabolismo celular (Abaigar *et al.*, 1999).

Siguiendo la línea de pensamiento descrita en el párrafo anterior, en nuestro estudio, podemos suponer que en la SP₃ se encuentran las células espermáticas con una baja actividad metabólica que se traducirá en una escasa capacidad móvil. Por el contrario, los espermatozoides de la SP₂ presentan unos valores de los parámetros cinéticos muy próximos a los descritos por Schmidt y Kampt (2004) como definitorios del estado de hiperactivación (alta VCL y ALH y bajo LIN); previamente en el trabajo de Cremades *et al.* (2005) se constata que en una de las subpoblaciones definidas, las células espermáticas presentan unas características muy próximas a las exhibidas por las células espermáticas hiperactivadas. Por último, en la SP₁ podemos considerar que se agrupan los espermatozoides con una capacidad motil “normal” (por ende un metabolismo normal). En algún trabajo (Cremades *et al.*, 2005), se hipotetiza que las subpoblaciones con estas características (progresivas y ligeramente vigorosas), pueden ser las implicadas en el proceso de fecundación, aunque este extremo nunca ha sido confirmado.

El origen último de las subpoblaciones es discutido, así para Quintero-Moreno (2003a) su origen se encuentra en la mezcla en el eyaculado de poblaciones espermáticas en distinto estado de desarrollo provenientes del epidídimo; dichas subpoblaciones manifiestan distintos estados fisiológicos y metabólicos. Por contra Abaigar *et al.* (1999), aunque también consideran probable la teoría anterior, creen más factible que el origen se encuentre en la fase de espermatogénesis debido a un genotipo heterogéneo en las células germinales. Para llegar a esta conclusión, dichos autores se basaron en los estudios (Olds-Clarke *et al.*, 1992a; 1992b) sobre el haplotipo-t del ratón, en el que algunos, pero no todos de los espermatozoides de los individuos heterocigóticos mostraban características (alteraciones en la motilidad y el transporte espermático) atribuibles a mutaciones específicas sobre las células espermáticas. Dichos efectos, junto con el incremento del número de espermatozoides morfológicamente anormales que se observa en los cruzamientos cosanguíneos (Roldan *et al.*, 1998), sugiere el origen genético de tales cambios y por tanto sería factible que un genotipo heterogéneo produjese espermatozoides con distinta capacidad móvil.

La distribución subpoblacional sufre apreciables cambios durante todo el proceso de congelación-descongelación. Las dos subpoblaciones principales (SP₁ y SP₃) decrecieron significativamente en el almacenamiento a 15 °C, y después en la fase de enfriamiento hasta 5 °C, aunque en este caso dicho descenso no fue estadísticamente significativo. Por el contrario, en estos dos mismos pasos del proceso, la SP₂ se incrementó, en ambos, significativamente. El incremento porcentual de este grupo, fue aproximadamente igual a la disminución sufrida por las dos subpoblaciones principales, por lo que podemos suponer que hubo un trasvase de células espermáticas desde la SP₁ y la SP₃ hacia la SP₂ en los estadios iniciales del proceso; más aún si tenemos en cuenta que durante estas primeras fases el descenso del porcentaje de espermatozoides móviles no fue muy acusado.

Como indicamos con anterioridad, en la SP₂ se encuentran los espermatozoides con patrones cinéticos muy similares a los observados en la hiperactivación; así el incremento de esta subpoblación durante las primeras fases de enfriamiento, se puede interpretar como que el propio proceso induce la hiperactivación. La explicación de este incremento la encontramos en el concepto de criocapacitación, descrito para el espermatozoide de porcino por Maxwell y Johnsson (1997a). No obstante, como recientes estudios de Saravia *et al.* (2007) demuestran, no existe analogía entre los desórdenes en la membrana entre la capacitación propiamente dicha (proceso en el que se engloba la aparición de espermatozoides hiperactivados) y la criocapacitación; la evidencia de que son procesos distintos también deriva del hecho de que ambos presentan vías de regulación distintas (Bravo *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2006). Nuestros resultados no contradicen dichos descubrimientos, ya que a pesar de que la capacitación y la criocapacitación sean procesos distintos, pueden compartir rasgos comunes, como puede ser el mismo patrón de tinción por el colorante CTC o los mismos patrones cinéticos. Debemos puntualizar, que estas dos pruebas son indirectas e indican la expresión

del proceso, pero no las causas últimas del mismo o los mecanismos por los que estos se desarrollan. Guardando las distancias (empleo de distintos animales donantes de semen y diferentes métodos analíticos y estadísticos), nuestros resultados son bastante concordantes, en este aspecto, con los presentados en el trabajo de Cremades *et al.* (2005). Estos autores realizan una segunda clasificación *cluster* sobre la subpoblación mayoritaria, definiendo una subpoblación, que como nuestra SP₂, presenta las características de contener las células hiperactivadas. La evolución de esta subpoblación siguió el mismo camino que la citada SP₂, incrementándose durante el periodo de almacenamiento a 15 °C y en la fase de enfriamiento hasta 5 °C.

No debemos de olvidar tampoco el posible efecto que tiene sobre los patrones cinéticos la dilución del material seminal en distintos diluyentes (Farrell *et al.*, 1996; Verstegen *et al.*, 2002; Rijjselaere *et al.*, 2003); así como el efecto de la centrifugación sobre la motilidad espermática (Carbajo *et al.*, 2004).

Tras la descongelación se produjo el cambio más radical, con un incremento (duplicó su tamaño) de la SP₁, una disminución hasta niveles iniciales de la SP₂ y un desplome de la SP₃. La distribución subpoblacional se vió alterada drásticamente con respecto al momento inicial, resultando paradójico que la subpoblación que sufrió un incremento relativo mayor fuese la SP₁, correspondiente a los espermatozoides con una actividad motil “normal”. Este incremento en la población con espermatozoides que expresan un movimiento lineal y rápido también fue descrito por Cremades *et al.* (2005), tras la descongelación de semen de verraco. En los trabajos de Martínez-Pastor *et al.* (2005b; 2006) también se observa un incremento tras la descongelación del semen de ciervo, de la subpoblación que engloba células con características coincidentes con las de la SP₁.

Es obvio que los espermatozoides pertenecientes a las distintas subpoblaciones van a reaccionar de forma completamente distinta a los procesos comprendidos en esta fase. En la drástica reducción de la SP₃ debemos tener en cuenta que el porcentaje de espermatozoides pertenecientes a cada subpoblación, lo estamos expresando en función del número de espermatozoides móviles y no del número total de espermatozoides analizados. Como apuntamos con anterioridad, se produce una drástica reducción del porcentaje de células móviles tras la descongelación. Esto nos impulsa a suponer que los espermatozoides que han perdido dicha capacidad móvil provienen esencialmente de la SP₃. Nuestro razonamiento se apoya en los daños sufridos por el metabolismo espermático (Watson y Plummer, 1985) durante el periodo descrito; además se van a afectar dos estructuras claves en el desarrollo de la motilidad espermática: la mitocondria (Peña *et al.*, 2003a; Nishizano *et al.*, 2004) y el flagelo (Courstens *et al.*, 1989; McClean *et al.*, 2007). Estas alteraciones provocan la pérdida de la movilidad de las células que ya la tenían debilitada previamente. Por otra parte, son también las causantes de la disminución de espermatozoides pertenecientes a la SP₂ al impedir

el desarrollo de los patrones cinéticos vigorosos propios de este grupo. Así, la subpoblación que va a sufrir un incremento relativo durante esta fase del proceso de congelación-descongelación va a ser la SP₁. Tampoco debemos olvidar el posible efecto del diluyente en el que se mide la motilidad (BTS), y que quizás este medio sea más apropiado para desarrollar un movimiento lineal; por otra parte la adición de Equex [como apuntan Abaigar *et al.* (1999)] favorece el desarrollo de trayectorias rectilíneas.

La adición de cafeína supuso, en todos los casos, un incremento del tamaño de la SP₁ a costa de la reducción de las otras dos subpoblaciones. No obstante, la reducción de estas varía en función del momento en que se produjo la toma de muestras. A las 0 horas tanto la SP₂ como la SP₃ disminuyeron su dimensión; por el contrario a las 4 y a las 6 horas solo la SP₂ redujo su tamaño en las muestras analizadas en presencia de cafeína, con respecto al control. Esto nos puede indicar que la cafeína en esos dos momentos puntuales inhibe la capacidad de adquirir un patrón próximo a la hiperactivación. Tras la descongelación, el incremento de la SP₁ se realizó, fundamentalmente, a expensas de la reducción de la SP₃; mientras que la SP₂ mantuvo un porcentaje relativo de espermatozoides similar al control. Fue en este punto, tras la descongelación, cuando más obviamente fue observado el efecto de la cafeína sobre los patrones cinéticos, incrementando el porcentaje de espermatozoides con un movimiento lineal.

Al contrario que con el porcentaje de motilidad, los resultados de la distribución subpoblacional muestran que la acción de la cafeína no se restringe a las muestras que presentan una capacidad móvil disminuida (toma de muestras de las 6 horas y posdescongelado); así los efectos de esta sustancia sobre los patrones cinéticos se pueden observar, incluso, en semen recién recogido.

El incremento experimentado, en nuestro trabajo, por la SP₁ a tiempo 0, es comparable al descrito por Abaigar *et al.* (1999) en su subpoblación 1, empleando al igual que nosotros una concentración de cafeína de 1 mM. En ambos estudios se produjo un incremento del grupo que exhibe un patrón rectilíneo y rápido. Como dichos autores, atribuimos estos cambios a la acción inhibitoria de la cafeína sobre la fosfodiesterasa, esto producirá un incremento de las concentraciones intracelulares de AMPc (Rees *et al.*, 1990), que actuará como estimulante de la motilidad. Este mecanismo lo podemos hacer extensivo al resto de tiempos de toma de muestras en nuestro caso.

La distribución subpoblacional a tiempo 0 no se vio afectada por la raza de los machos empleados [al contrario de lo descrito por Quintero-Moreno *et al.* (2007) en semen de conejo]. Sin embargo, en el curso de la congelación-descongelación si se observaron diferencias entre las dos razas en el tamaño de la SP₁ (siempre mayor en la raza Landrace) y la SP₃ (siempre mayor en la raza Large White). Por tanto, podemos considerar que las dos razas en este aspecto van a tener distinta respuesta ante los procesos de crioconservación. En

las muestras suplementadas con cafeína aparecen diferencias en la distribución subpoblacional entre las dos razas, distintas a las anteriores, por lo que la reacción a la adición de esta sustancia la podemos considerar que es dependiente de la raza.

Tanto en las muestras analizadas en ausencia de cafeína, como en la mayoría en las que esta sustancia está presente, la distribución subpoblacional es distinta entre los 10 individuos empleados en el estudio. Esta conclusión, el efecto del individuo sobre la distribución subpoblacional, es una constante en los trabajos en los que se emplea el análisis de subpoblaciones (Quintero-Moreno *et al.*, 2003a, 2003b; 2007; Núñez-Martínez *et al.*, 2006; Cremades *et al.*, 2005).

Los resultados de los parámetros cinéticos tratados individualmente se incrementaron durante todos los pasos del proceso (no debemos olvidar que las subpoblaciones que se incrementaron fueron o la SP₁ o la SP₂, que son las que se caracterizan por unos valores altos de dichos parámetros); alcanzándose los máximos tras la descongelación. El tratamiento de los parámetros cinéticos de forma individual nos puede dar una falsa sensación de mejora de la capacidad motil espermática, como apuntan Katkov y Lulat (2000), tras analizar varios trabajos en los que se evalúan dichos parámetros tras la descongelación; cuando realmente lo que se produce es un cambio en el patrón cinético exhibido por los espermatozoides. Nuestros resultados fueron comparables (con las consabidas precauciones al emplear distintos métodos analíticos), a los publicados en otros trabajos en los que se utiliza el mismo procedimiento de conservación de semen de verraco (Eriksson *et al.*, 2000b; Peña *et al.*, 2003a; Saravia *et al.*, 2007); al igual que en nuestro caso, en los trabajos de estos autores también se produce un incremento de los valores de los parámetros cinéticos.

Tras la adición de cafeína pudimos observar, por lo general, un incremento de los valores de los parámetros indicativos de un movimiento lineal (LIN, STR, VSL) y disminución de la ALH. Tras la descongelación se hizo patente un acusado incremento de la VCL y la VAP. Estos cambios no dejan de reflejar un incremento de las células espermáticas que describen trayectorias más lineales y relativamente veloces (las contenidas en la SP₁), por lo que una vez más estamos ante un cambio en el patrón de motilidad espermática.

Al igual que para la distribución subpoblacional, se observaron diferencias en los resultados de los parámetros cinéticos individuales en función de la raza, individuo y eyaculado.

Las correlaciones entre la distribución subpoblacional y los valores de vitalidad, integridad acrosómica y motilidad, fueron durante los 3 primeros pasos del proceso no significativas (salvo contadas excepciones), al contrario de lo descrito por Quintero-Moreno *et al.* (2007) en semen de conejo. En nuestro caso, esto nos indica que son pruebas que miden aspectos o cualidades distintas de las células espermáticas, aumentando nuestro conocimiento

global sobre ellas. Tras la descongelación aumentó el número de correlaciones significativas encontradas entre unos y otros, indicativo de los profundos cambios que sufren estos parámetros tras el almacenamiento criogénico; no obstante el valor de r rara vez supero 0,40. Cuando los correlacionados fueron los parámetros cinéticos, los valores de r fueron por lo general inferiores a los de las subpoblaciones. Las correlaciones entre los parámetros cinéticos en presencia de cafeína fueron distintas, en su mayoría, a las descritas en ausencia de dicha sustancia, con lo que su adición nos aporta información extra de las células espermáticas.

5.3 EXPERIMENTO 2: COMPARACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES CINÉTICAS, EL PORCENTAJE DE MOVILIDAD, LA VITALIDAD Y LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA DE ESPERMATOZOIDES DESCONGELADOS, DILUIDOS EN BTS O MRA[®] THAW

Tras consultar la bibliografía a nuestro alcance, este parece ser el primer trabajo realizado con el diluyente MR-A Thaw[®]. Nuestra principal intención fue comparar los patrones cinéticos de los espermátocitos descongelados de porcino, en dos diluyentes distintos; uno el tradicionalmente empleado, el BTS, y el otro, en el nuevo MR-A Thaw[®]. En semen fresco diluido, se ha descrito como las características móviles de los espermátocitos se ven condicionadas por el medio en el que estos se hallan inmersos (Farrell *et al.*, 1996; Verstegen *et al.*, 2002; Rijjselaere *et al.*, 2003). Igualmente, se ha podido comprobar que las propiedades y composición del medio de descongelación modifican los parámetros cinéticos del semen criopreservado de ovino (Mortimer y Maxwell, 2004). Como todos estos autores, pudimos apreciar como la utilización de distintos diluyentes altera las características móviles de los espermátocitos, en nuestro caso de porcino y tras su descongelación.

La distribución subpoblacional fue sustancialmente distinta en ambos medios, la SP₁ se encuentra fuertemente incrementada en el diluyente MR-A Thaw[®]; por el contrario la SP₂ y la SP₃ son menores en este medio que en el BTS. Cuando a ambos medios se les adicionó cafeína, se observa como aquellas muestras descongeladas en MR-A Thaw[®] no sufren cambios notables en la distribución subpoblacional. Sin embargo, como ya hemos descrito, esta sustancia propicia un incremento del número de células clasificadas dentro de la SP₁ y una disminución de la SP₃, con lo que sus valores no difieren de los encontrados en el nuevo diluyente. La SP₂ al igual que en las muestras diluidas únicamente en BTS es ligeramente mayor que la presentada por el nuevo diluyente, tanto con/sin cafeína.

Podemos concluir que con el empleo del MRA-Thaw[®] tras la descongelación, se incrementa la proporción de espermatozoides que manifiestan un patrón de movimiento progresivo, y se reduce la proporción de células espermáticas con un movimiento próximo a la hiperactivación o una capacidad móvil degradada. En principio, con el uso exclusivo de este nuevo diluyente se consigue una expresión de la motilidad espermática, tras la descongelación, muy próxima a la de las muestras en las que se ha empleado el BTS suplementado con cafeína.

Ante nuestro interés por comprobar la implicación de la composición del diluyente en los resultados obtenidos, nos pusimos en contacto con la casa fabricante; desde ella se nos informó que uno de los componentes del MR-A Thaw[®] era una sustancia estimulante “tipo cafeína”. Esta composición explica la semejanza de los patrones cinéticos descritos para este medio con los observados en el BTS tratado con cafeína y por qué estos no se modifican tras una nueva adición de esta sustancia en el nuevo diluyente de descongelación.

Los valores individuales de los parámetros cinéticos siguen la tónica general descrita para la distribución de subpoblaciones, siendo similares en los tres diluyentes que contienen sustancias estimulantes (BTS tratado con cafeína, MR-A-Thaw[®] y MR-A Thaw[®] tratado con cafeína) y distintos a los encontrados para los espermatozoides descongelados en BTS.

En cualquier caso, la conclusión que podemos extraer es clara: los patrones cinéticos de los espermatozoides descongelados de cerdo cambian en función de la composición del medio donde estos se encuentren diluidos.

El porcentaje de motilidad también se vio afectado por el medio de dilución, siendo significativamente inferior en las muestras diluidas con BTS. No obstante, para este parámetro sí se produjeron diferencias entre el MR-A Thaw[®] y el mismo medio suplementado con cafeína, siendo en este último supuesto más elevado el porcentaje de motilidad. El valor más elevado, sin embargo, fue para los espermatozoides diluidos en BTS suplementado con cafeína.

Por último, las muestras descongeladas en MR-A Thaw[®] presentaron una drástica reducción en el porcentaje de espermatozoides con la membrana íntegra (vitalidad), y aunque menos acusada, en el porcentaje de acrosomas no dañados. Podemos afirmar que el nuevo medio MR-A Thaw[®] mejora la apariencia de la capacidad mótil del espermatozoide descongelado de verraco, pero por contra, protege menos su membrana y vesícula acrosómica, reduciendo el porcentaje de células útiles posdescongelación. A la espera de los pertinentes estudios con inseminaciones en campo, el nuevo diluyente parece menos aconsejable que el BTS como diluyente de descongelación para semen de cerdo.

5.4 EXPERIMENTO 3: EVALUACIÓN DE LA MORFOMETRÍA DE LA CABEZA ESPERMÁTICA DE VERRACO DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN

Como en el caso del análisis computerizado de la motilidad, los sistemas ASMA nos han aportado una nueva técnica para el estudio de las características espermáticas. Los nuevos parámetros aportados nos van a permitir explicar más profundamente los fenómenos que afectan a la célula espermática en los procesos biotecnológicos (como la congelación), a los que las sometemos. La nueva información nos facilitará predecir los resultados finales de dichos procesos y seleccionar el material más apto para ellos.

Nuestro primer objetivo fue intentar determinar la existencia de subpoblaciones espermáticas a partir de los parámetros morfométricos, empleando el ya descrito modelo compuesto por un sistema de clasificación no jerárquica, seguido de un procedimiento de clasificación jerárquico. Al contrario que con los parámetros cinéticos, nos fue imposible hacer una división de las observaciones en subpoblaciones diferenciadas; como muestra a las claras la distribución de densidades de dichas observaciones, solo existe un único comportamiento. Este resultado coincide con el de Thurston *et al.* (2001), en el que empleando un método estadístico comparable al utilizando en el presente trabajo, tampoco pudieron delimitar subpoblaciones basándose en los parámetros morfométricos. Sin embargo, dichos autores sí pudieron verificar la existencia de 3 subpoblaciones espermáticas a partir de los datos aportados por los descriptores de forma de Fourier; pero no nos encontraríamos con una clasificación morfométrica, sino más bien, la podemos considerar como morfológica.

Resultados distintos a los nuestros han sido descritos por Peña *et al.* (2005b), los cuales describieron la existencia de 4 subpoblaciones morfométricas en semen de verraco, aunque en su determinación emplean un sistema no idóneo de clasificación, al realizar previamente a los algoritmos clasificatorios un PCA. En el semen bovino, también se ha descrito la existencia de subpoblaciones morfométricas (Rubio-Guillén *et al.*, 2007), aunque al igual que en el caso anterior usa métodos estadísticos basados en el análisis de componentes principales. Existe otra aproximación válida para la clasificación de las células espermáticas en función de sus parámetros morfométricos, si bien solo sería aplicable a aquellas especies como el hombre (Moruzzi *et al.*, 1988; Pérez-Sánchez *et al.*, 1994), el caballo (Hidalgo *et al.*, 2007a) o la alpaca (Buendía *et al.*, 2002); en las que existe una gran variabilidad morfológica a simple vista. El procedimiento consiste, en primer lugar, en el establecimiento de una clasificación visual de las distintas formas de la cabeza del espermatozoide presentes en un eyaculado, a continuación sobre una serie de cabezas modelo de cada una de esas formas se realiza una medición y los parámetros obtenidos se utilizan para establecer un patrón morfométrico de dicha forma. Por último, esos patrones se aplican

al total de células analizadas. Debemos de puntualizar que esto no deja de ser una técnica morfológica más que morfométrica.

El procedimiento anteriormente descrito es de difícil aplicación en el caso del semen de porcino, al presentar una variabilidad morfológica muy escasa. Esta situación se ve reflejada por los bajos valores de las medidas de dispersión (desviación estandar en nuestro caso), para los resultados de los parámetros morfométricos y que son coincidentes con las obtenidas por García-Herreros *et al.* (2006).

Dada nuestra imposibilidad a la hora de clasificar a las células espermáticas en función de sus parámetros morfométricos, nuestro estudio se focalizó en las variaciones sufridas por estos a lo largo del proceso de congelación-descongelación. En las comparaciones de los resultados de estas medidas con otros trabajos hemos de obrar con precaución, dadas las distintas condiciones analíticas empleadas. En nuestro caso, la elección del objetivo de 100X y la toma de 100 capturas por muestra se produjo tras un estudio de estandarización previo llevado a cabo en nuestro laboratorio (Tejerina *et al.*, 2005). El Diff-Quick se empleó como colorante al proporcionar un adecuado contraste, ser una técnica de fácil realización y ser empleada con éxito en la práctica andrológica (Hidalgo *et al.*, 2006; Coetzee *et al.*, 1999a; 1999b; 2000).

Los resultados de los parámetros morfométricos obtenidos en el análisis del semen fresco (0 horas), son ligeramente inferiores (a excepción del perímetro) en comparación con los obtenidos en un trabajo previo llevado a cabo por nuestro grupo (Tejerina *et al.*, 2005). La explicación a esta discordancia vendría dada, no solo por el uso de individuos distintos, sino también, por el cambio de modelo de cámara de videograbación (Tejerina *et al.*, 2006b) y del software de análisis empleado.

Salvando las diferencias en cuanto a las condiciones analíticas empleadas en ellos, nuestros resultados son realmente similares, a los de los trabajos que han empleado previamente los sistemas ASMA en la medición morfométrica de la cabeza del espermatozoide de cerdo (García-Herreros *et al.*, 2006; Peña *et al.*, 2005b; Hirai *et al.*, 2001).

La respuesta de los parámetros morfométricos a las primeras fases del proceso de congelación (desde la recogida hasta el enfriamiento a 5 °C), es similar en todos ellos: no se produjeron cambios significativos en sus valores. Podemos afirmar, entonces, que los factores deletéreos actuantes durante los primeros pasos del proceso de criopreservación, tienen un nulo efecto sobre la morfometría de la cabeza espermática de verraco. Sólo hemos podido encontrar un estudio donde se sigue una metodología similar a la nuestra, realizado sobre espermatozoides de caprino (Marco-Jiménez *et al.*, 2006); al contrario que en nuestro caso, se apreció una disminución significativa de la longitud, el perímetro y área de la cabeza espermática tras el enfriamiento a 5 °C. Estos hallazgos nos indican el distinto

comportamiento que exhiben las células espermáticas de distintas especies ante los procesos de enfriamiento; aunque también pueden estar involucrados en la aparición de estas diferencias entre especies otro tipo de factores, como por ejemplo el uso de diluyentes diferentes.

En nuestro estudio, es tras la adición del agente crioprotector, la congelación y la descongelación del material seminal, cuando se detectan la existencia de cambios significativos en la morfometría de la cabeza espermática. Se produjo una reducción significativa de la longitud, el área y el perímetro de la misma; los cambios en estos parámetros medidos de forma directa, produjo que los valores de los parámetros derivados de ellos también se modificasen, incrementándose significativamente la regularidad y disminuyendo la elongación y la elipticidad. Por su parte, tanto la anchura de la cabeza espermática como la rugosidad no se vieron afectadas durante este paso del proceso de crioconservación.

Podemos deducir de estos cambios, que el mayor efecto se produce sobre el eje longitudinal de la cabeza espermática, siendo los cambios del perímetro y del área consecuencia de esa reducción en la longitud. Estas modificaciones van a suponer un acortamiento de la cabeza espermática, y al no modificarse la anchura, esta estructura en el semen descongelado presenta una forma más redondeada que en el semen fresco. La reducción del eje longitudinal de la cabeza espermática tras la descongelación fue descrita también para los espermatozoides epididimarios de ciervo (Esteso *et al.*, 2006). Hemos de destacar que en la práctica totalidad de estudios que en las diferentes especies analizan el efecto de la congelación sobre la morfometría (Marco-Jiménez *et al.*, 2006; Gravance *et al.*, 1998b; Hidalgo *et al.*, 2007b; Rubio-Guillén *et al.*, 2007; Rijsselaere *et al.*, 2004), se ha constatado una disminución del área de la cabeza espermática (bien por disminuir la longitud, la anchura o ambas simultáneamente) y consecuentemente el tamaño final de la misma.

Las causas finales de estos cambios deben ser achacables a los tres fenómenos deletéreos fundamentales que se producen durante esta fase de congelación-descongelación, es decir: el estrés osmótico causado por la adición del agente crioprotector, y la formación/dilución de hielo.

Los mecanismo finales por los que se produce esa reducción de tamaño son diversos; entre ellos se encontraría la pérdida de integridad acrosómica tras la descongelación (Peláez, 2003; Bwanga *et al.*, 1991 a, c), lo que provocará la exocitosis de los componentes de la matriz acrosomal y consecuentemente una pérdida del volumen global de la célula. La deshidratación progresiva que sufre la célula durante el proceso biotecnológico (England, 1993) acarreará, así mismo, una disminución de volumen de la cabeza espermática. A este fenómeno debemos de sumar la reducción del espacio ocupado por el núcleo al producirse una condensación de la cromatina durante la congelación (Royère *et al.*, 1988) No debemos

olvidar las alteraciones citoesqueléticas (Watson, 2000; Petrunkina *et al.*, 2004) que sufre el espermatozoide y que tendrán repercusiones en la morfometría espermática. También hemos de tener en cuenta que las alteraciones que se producen en la membrana plasmática a causa de los procesos de congelación (Parks y Graham, 1992; Peña *et al.*, 2005b) pueden tener su repercusión en el tamaño celular. El plasmalema es el encargado de regular el intercambio de sustancias con el exterior y mantener el volumen interno, la pérdida de funcionalidad del mismo produce una salida de contenido citoplasmático y la consecuente reducción de volumen. Esta teoría fue formulada por Marco-Jiménez *et al.* (2006), tras describir la existencia de diferencias entre el tamaño de la cabeza espermática de espermatozoides de caprino con la membrana íntegra y aquellos en los que se encuentra dañada, presentando estos un área menor. En este estudio (como en otros muchos) y al igual que en nuestro caso, la integridad del plasmalema se vió drásticamente reducida tras el proceso de criopreservación, por lo que de ser cierta esta teoría, este fenómeno se traducirá en un menor tamaño medio de la cabeza espermática. Dentro de esta explicación también tendrían cabida los efectos de la adición del agente crioprotector (Hammerstedt *et al.*, 1992), el cual sería responsable de la salida de agua del compartimento intracelular, causando la reducción del tamaño de la cabeza espermática. En el momento de la descongelación las células con la membrana funcional integrarán agua y podrán recuperar su volumen celular, mientras que las muertas seguirán presentando un tamaño menor. De este modo, como apuntan Marco-Jiménez *et al.* (2006), la morfometría espermática actuaría de modo indirecto como indicador de la funcionalidad de la membrana espermática.

No obstante, aunque tras la descongelación, en nuestro trabajo las correlaciones con la vitalidad son significativas para los parámetros longitud, elipticidad, rugosidad y elongación; los valores del r no son excesivamente altos y 3 de ellos (longitud, elipticidad y elongación) presentan correlaciones negativas con la vitalidad, lo que anula en nuestro caso esta teoría, ya que de ser cierta, a mayor vitalidad en las muestras, mayor longitud debería de tener la cabeza espermática

Con respecto a las correlaciones con la motilidad (con/sin cafeína) y la integridad acrosómica, solo cabe la pena destacar algunos de los valores del r obtenidos a las 6 horas con respecto a la motilidad sin cafeína. En el resto de tiempos, o no son significativas las correlaciones obtenidas, o si lo son sus valores no fueron llamativos; indicándonos que unos y otros parámetros median características espermáticas diferentes y no muy relacionadas.

Como en un trabajo previo de nuestro grupo (Tejerina *et al.*, 2005), se han encontrado diferencias significativas en los valores de los parámetros morfométricos entre las dos razas consideradas. Mientras que para el área no hay diferencias entre razas; para el resto de parámetros directos (longitud, anchura y perímetro) los machos de raza Large White presentaron valores más elevados que los de raza Landrace. Hay también diferencias entre

razas en los parámetros indirectos: elipticidad y elongación, aunque no en todos los tiempos de toma de muestras, esto nos sugiere una distinta respuesta al proceso de congelación para estos parámetros en función de la raza.

El origen de estas diferencias entre razas según Thurston *et al.* (2001) es genético, siendo las diferencias morfométricas la respuesta fenotípica de un genotipo distinto. Podemos apuntillar que su origen se puede encontrar en el proceso selectivo por el que hemos conseguido unas líneas genéticas con unas características morfométricas externas distintas, originando de manera no intencionada diferencias a nivel microscópico en la morfometría de la cabeza del espermatozoide. Obviamente, si estamos en lo correcto, también se deberían verificar diferencias morfométricas entre las cabezas espermáticas de subespecies distintos, como así ha sido demostrado (Beletti *et al.*, 2005) y por descontado entre especies diferentes (Cummins y Woodall, 1985).

Finalmente, encontramos diferencias significativas para todos los parámetros morfométricos entre los individuos analizados, lo cual es un hecho común en los trabajos en el que este aspecto es evaluado (Gravance *et al.*, 1995; Ball y Mohamed, 1995; Soler *et al.*, 2005; García-Herreros *et al.*, 2006; Gravance *et al.*, 1998b; Estes *et al.*, 2006; Sancho *et al.*, 1998), independientemente de la especie estudiada. También observamos diferencias para los parámetros morfométricas entre las congelaciones de un mismo individuo, lo que tampoco supone un hecho extraño en la bibliografía (Ball y Mohamed, 1995).

5.5 EXPERIMENTO 4: DETERMINACIÓN DE LA CONGELABILIDAD DE UN EYACULADO A PARTIR DE LOS RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS CONVENCIONAL Y COMPUTERIZADO POR IMÁGENES DIGITALES

La disponibilidad de nuevas pruebas analíticas nos aporta información adicional de los fenómenos que afectan al espermatozoide en el proceso de criopreservación. Eventualmente, la conjunción de estos nuevos conocimientos, junto con los derivados de las pruebas más tradicionales nos proporciona una mayor capacidad estimativa sobre el resultado último del proceso tecnológico en cuestión. Como describen Curry (2000) y Holt (2000b) la aptitud para resistir a los factores deletéreos actuantes durante los procesos de congelación-descongelación, dependen fundamentalmente del individuo (dentro de la misma especie). Así, podemos clasificar a los machos en dos categorías: “buenos congeladores” y “malos congeladores”. A esta situación no es ajena la especie porcina, y como apuntan Roca *et al.* (2006), el individuo donante de semen es el principal factor que explica las diferencias

observadas en los parámetros de calidad seminal tras la descongelación; presentando estas diferencias interindividuales una base genética según Thurston *et al.* (2002).

La utilización de la criopreservación de los espermatozoides de porcino a nivel industrial deberá de contemplar obligatoriamente la selección de aquellos machos que se manifiesten como buenos congeladores. En esta función los sistemas CASA/ASMA nos pueden ser de enorme utilidad al aportar información de aspectos hasta ahora desconocidos.

Los estudios de correlación se han llevado a cabo tomando como referencia la medida de los parámetros a tiempo cero (tras la recogida) y correlacionándolos con la vitalidad posdescongelación. La elección de dicho parámetro como índice de congelabilidad se produce al ser el que más drásticamente se ve afectado por el proceso de crioconservación. Cuando el parámetro estudiado fue el porcentaje de espermatozoides móviles determinado de forma subjetiva, se encontró un r no significativo y apreciablemente bajo; su valor se incremento cuando se realizó la medición con el sistema CASA, y se hizo significativo, cuando además de valorarlo de forma automática, se realiza el análisis en presencia de cafeína. En el caso del porcentaje de formas normales encontramos una correlación significativa ($r = 0,35$), con lo que existe la tendencia de que cuanto mayor porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales existan inicialmente en un eyaculado, mejor será la congelabilidad del mismo. Un valor aproximado del r fue descrito para el porcentaje de acrosomas íntegros, pudiendo extrapolar la anterior conclusión a este parámetro. Más elevado es el r para el porcentaje de integridad de la membrana espermática (vitalidad); esto nos lleva a pensar que a mayor robustez de este parámetro en el momento inicial, mejor resistencia presentaran ante los procesos deletéreos que se producen durante la congelación-descongelación.

Ninguno de los tamaños subpoblacionales presenta un r significativo con la congelabilidad; así a pesar de la existencia de una estructura heterogénea dentro de los eyaculados de porcino, ninguna subpoblacion presenta una mayor o menor sensibilidad al proceso de crioconservación. Un hecho similar fue descrito por Quintero-Moreno (2003a), al intentar correlacionar la estructura subpoblacional de los eyaculados de porcino y conejo con la correspondiente fertilidad de los mismos. Sin embargo, Davis *et al.* (1995) describen como en el caso del semen humano, si existen correlaciones significativas entre el tamaño subpoblacional y la congelabilidad de los eyaculados; aunque hemos de tener en cuenta, no solo que trabaja con una especie radicalmente distinta al cerdo, sino que también emplea algoritmos estadísticos distintos a los usados en este trabajo.

En cuanto a los valores del r para los parámetros cinéticos, son significativos para el LIN, VSL y STR determinados en presencia de cafeína. Los valores fueron negativos, por lo que existe una tendencia en la que cuanto menor sea el movimiento rectilíneo en presencia de cafeína mejor será la congelabilidad de dichos espermatozoides. Este hecho tiene otra posible explicación, y es que, cuanto menor es la respuesta a la cafeína (esta proporciona un

movimiento más lineal) mejor será la respuesta a la congelación del material seminal en cuestión. La BCF, tanto en presencia como en ausencia de cafeína muestra valores altos del r (en presencia de cafeína el r de la BCF fue el más alto de todos los parámetros estudiados), por tanto, aquellos eyaculados en los que se manifiesta una mayor actividad flagelar presentaran a posteriori, una mejor aptitud para la congelación.

En cuanto a los parámetros morfométricos solo fueron significativos los valores del r para la elipticidad, la elongación y la longitud, presentando todos ellos valores negativos. Fue significativamente elevado el r para la longitud, por lo que existe una tendencia a que cuanto menos elongada sea la cabeza del espermatozoide, este presente una mejor capacidad para soportar los daños que le inflinge el proceso de criopreservación. Otros autores como Thurston *et al.* (2001) y Esteso *et al.* (2006), también han descrito interesantes correlaciones entre el tamaño de las subpoblaciones morfológicas o determinados parámetros morfométricos, respectivamente, y la congelabilidad. La explicación de todos estos fenómenos, como apuntan Curry *et al.* (1996), es que el volumen y la forma de la cabeza espermática influyen en el intercambio de calor y los movimientos de agua e iones que se producen durante la congelación, existiendo formas más eficientes para soportar los efectos deletéreos que se producen durante dicho fenómeno. Como en nuestro estudio, pero a un nivel superior Garde *et al.* (2003), describen que los espermatozoides de las especies que mejor congelan son más pequeños, indicando que el tamaño y forma de los mismos deben tener algún tipo de implicación en el proceso de criopreservación. Estos descubrimientos, según Esteso *et al.* (2006), implican que debemos adaptar las condiciones de congelación-descongelación a la morfometría predominante dentro de los eyaculados de un macho para optimizar los resultados del proceso, e incluso se podría dar el caso de transformar individuos “malos congeladores” en “buenos congeladores”.

No obstante, las correlaciones con la congelabilidad solo nos indican tendencias y únicamente aportan datos parciales. Al igual que Quintero-Moreno (2003a), en la predicción de la fertilidad a partir de los parámetros cinéticos, nos parece más acertado emplear modelos de regresión lineal para acercarnos a predecir la congelabilidad de un eyaculado. Estos algoritmos presentan la ventaja estadística de explicar la variabilidad en los resultados; además se “construyen” integrando valores de varios parámetros, pudiendo de esta manera evaluar cuales son los que presentan un mayor peso en el resultado final. Esta última consideración, hace que éste sea un método más apropiado al encontrarnos ante un proceso multifactorial.

A partir de lo que consideramos espermiograma “rutinario” (porcentaje de espermatozoides móviles y porcentaje de células espermáticas morfológicamente normales), se obtiene un modelo de regresión en el que solo se incluye el porcentaje de células morfológicamente normales y su valor del r^2 ajustado es muy discreto. Cuando los parámetros

tratados son los derivados de un espermiograma “avanzado”, que incluye la determinación de la vitalidad espermática, la integridad acrosómica y el porcentaje de motilidad medido mediante un sistema CASA en presencia/ausencia de cafeína; se observa que el valor del r^2 ajustado asciende a 0,27, en un modelo que incluye la vitalidad y el porcentaje de motilidad en presencia de cafeína. Como se puede apreciar, la utilización de técnicas avanzadas repercute en un incremento del valor estimativo del modelo de regresión resultante.

Cuando se conjugan los datos del espermiograma clásico y del avanzado, el modelo resultante está constituido por el porcentaje de formas normales, la vitalidad y la integridad acrosómica obteniéndose un r^2 ajustado de 0,35. Como observamos, el modelo propuesto mejora los dos anteriores y no incluye los porcentajes de motilidad, por lo que estos tienen un escaso peso en la estimación de la congelabilidad, siendo preponderantes los parámetros indicativos del estado de la membrana, del acrosoma y de la morfología espermática.

Los parámetros morfométricos son igualmente sometidos a un proceso de regresión lineal obteniéndose un valor del r^2 ajustado de 0,32, a partir de un modelo que incluye la longitud y el perímetro de la cabeza espermática. Por tanto, este valor es muy cercano al del modelo anterior, por lo que solo con los parámetros morfométricos tendremos una capacidad explicativa de la variabilidad postdescongelación muy próxima a la obtenida con las pruebas más tradicionales (vitalidad, integridad acrosómica, y porcentaje de formas normales). Por otra parte nuestros resultados para el r^2 fueron similares a los descritos en el estudio de Peña *et al.* (2005b), salvo que en su modelo los parámetros con más peso fueron la elipticidad y la regularidad.

Muy distintos son los resultados a partir de los parámetros cinéticos individuales y el tamaño subpoblacional (medidos tanto en presencia/ausencia de cafeína), obteniéndose valores del r^2 ajustado inferiores a los modelos anteriores, especialmente en el caso del tamaño subpoblacional.

Sin embargo, cuando el modelo se construye a partir de todos los parámetros aportados por los sistemas CASA/ASMA (incluido el tamaño subpoblacional) se obtiene un valor del r^2 ajustado de 0,52, a partir de un modelo que incluye la longitud y el perímetro de la cabeza espermática, el valor de la ALH, BCF y VCL medidos en presencia de cafeína y el tamaño de la SP₁ medido en ausencia de dicha sustancia. Por tanto, la capacidad predictiva es ampliamente superior a la aportada por las pruebas más tradicionales.

Por último, cuando todos los parámetros empleados en los modelos anteriores se combinan en uno solo, son elegidos por tener un mayor peso en la explicación de la variación postdescongelación: el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales, la vitalidad, la longitud y el perímetro de la cabeza espermática, el porcentaje de células presentes en la SP₂ en las muestras analizadas sin cafeína y la ALH. El valor del r^2 ajustado

para este modelo es de 0,55. Como observamos, el valor del r^2 ajustado es solo marginalmente superior al del modelo anterior, que incluía las mediciones de los sistemas CASA/ASMA. Por otra parte, la inclusión de estos parámetros (incluido los tamaños subpoblacionales), mejora sustancialmente el valor del r^2 ajustado de un modelo que sólo contenga parámetros “convencionales”, y por tanto el potencial estimativo de la congelabilidad, justificando plenamente la realización del análisis CASA/ASMA y el posterior subpoblacional cinético, a la hora de intentar estimar la aptitud para la congelación de un eyaculado. De esta manera, la aportación de nueva información nos permite mejorar la selección de los individuos en aras de encontrar los más aptos para dicho proceso.

5.6 EXPERIMENTO 5: CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DEL SEMEN DE VERRACO SOMETIDO A CONDICIONES DE CAPACITACIÓN TRAS LA DESCONGELACIÓN

Como hemos descrito ampliamente, las células espermáticas sufren daños severos durante la congelación. Estas alteraciones pueden afectar a las funciones que ejercen si se les diese utilidad biológica, es decir, dificultarían que se llevase a cabo la fecundación. Para tener éxito en dicho proceso el espermatozoide deberá sufrir previamente una serie de cambios, englobados bajo la denominación de capacitación, que entre otras fenómenos desencadena un cambio en el patrón cinético que recibe el nombre de “hiperactividad” (Ho y Suárez, 2001); caracterizándose por un escaso movimiento progresivo, muy vigoroso y con amplios batidos flagelares (Yanagimachi, 1994).

En nuestro experimento (el único de estas características que conocemos hasta el momento), sometimos a los espermatozoides de verraco descongelados y provenientes de eyaculados con distinta aptitud para la congelación (buenos-medios-malos) a una incubación en el probado medio capacitante TCM (García-Herreros *et al.*, 2005) y evaluamos su comportamiento cinético durante un periodo de 1 hora.

Inicialmente se constataron diferencias significativas para el porcentaje de espermatozoides móviles entre el grupo de eyaculados buenos congeladores y el de malos congeladores, indicando ya diferencias entre los grupos de machos establecidos por su integridad de membrana. El descenso del porcentaje de motilidad se produjo en los tres grupos de eyaculados a lo largo del proceso, siendo significativo en el grupo de eyaculados buenos y malos congeladores a los 30 minutos. En el caso de los eyaculados congeladores medios, el descenso existe pero no fue significativo, este hecho intuimos que es debido a la alta variabilidad interindividual existente. El porcentaje de espermatozoides móviles continuó decreciendo significativamente en todos los eyaculados analizados durante la segunda parte

del periodo de incubación, aunque este varió en función de los grupos. Mientras que en el grupo de malos congeladores el valor del porcentaje de motilidad decreció hasta un tercio de su valor original; en los otros dos grupos lo hizo aproximadamente hasta la mitad, no existiendo entre ambos diferencias significativas. Al igual que nosotros, Rota *et al.* (1999) observaron descensos hasta la mitad del valor original del porcentaje de motilidad, cuando el semen descongelado de perro se incubaba en un medio capacitante. No obstante, la reducción de este parámetro también se constató en diluyentes no capacitantes como el BTS (Cremades *et al.*, 2005).

Como ha sido mencionado con anterioridad, tras la descongelación es superior el número de espermatozoides móviles al de viables en todos los grupos de eyaculados, con lo que podemos considerar que los daños en la membrana durante el periodo de incubación desencadenaron en última instancia la pérdida de la capacidad móvil. Esto explicá también, por qué aquellos eyaculados con mas espermatozoides dañados durante el proceso de crioconservación, sean también los que van a registrar un mayor descenso de la motilidad durante este periodo de incubación.

La evolución del tamaño subpoblacional fue diferente en los 3 grupos de eyaculados a lo largo de la prueba. En el grupo de buenos congeladores, hasta los 30 minutos de incubación, se produjo una reducción del porcentaje de espermatozoides con movimiento lineal (SP₁) y próximo a la hiperactivación (SP₂), mientras que la SP₃, en la que se encuentran los espermatozoides con una capacidad motil degradada, se incrementó. Sin embargo, esta tendencia se rompió a los 60 minutos con un incremento de la SP₁; mientras que las otras dos subpoblaciones restantes redujeron su tamaño.

En el grupo de congeladores medios, durante el primer periodo de incubación, se observó un comportamiento similar al descrito para los eyaculados del grupo anterior. Sin embargo a los 60 minutos se constató nuevamente un descenso del valor de la SP₁, mientras que el valor de la SP₃ se situó por encima de la anterior.

En el grupo de malos congeladores, el descenso del tamaño de la SP₁ fue constante y muy acentuado, la SP₂ llega a desaparecer a los 60 minutos de incubación y la SP₃ se incrementó hasta convertirse mayoritaria (90% del total) en la que se agrupaban los espermatozoides móviles.

Podemos llegar a la conclusión de que el grupo al que pertenezca el eyaculado va a determinar la evolución de la distribución subpoblacional en un medio capacitante. Así, los eyaculados buenos congeladores sufren una depresión inicial en el porcentaje de espermatozoides con movimiento más rectilíneo, pero a continuación su valor relativo se recupera y alcanza un valor cercano al inicial. El grupo de congeladores medios sufren esa depresión inicial y continua de forma atenuada hasta los 60 minutos. Finalmente, el grupo de

malos congeladores sufrió una drástica reducción del porcentaje de espermatozoides con capacidad para desarrollar un movimiento vigoroso o lineal, siendo mayoritarias las células con una capacidad motil degradada.

Esta situación pone de manifiesto nuestra teoría de que los daños durante la congelación/descongelación se van a manifestar durante el periodo de incubación (pudiendo extrapolar también al tránsito por el aparato reproductor de la hembra) en una menor capacidad móvil. Por otra parte, los daños más extensos detectados en los eyaculados malos congeladores van a repercutir más intensamente en el desarrollo de su motilidad; finalmente en este grupo de eyaculados en conjunción con un escaso número de espermatozoides móviles, la calidad del movimiento de los remanentes es escasa. Por el contrario, en los eyaculados buenos congeladores, las células espermáticas que conservan la motilidad tienen capacidad para recuperarse del primer contacto con el medio de capacitación y volver a desarrollar movimientos rectilíneos. Aún no siendo la capacidad motil el único factor determinante en el resultado final, nuestros resultados pueden apoyar los de Gil *et al.* (2005), al describir estos autores como en una prueba de FIV, los espermatozoides de los eyaculados buenos congeladores presentan un mayor porcentaje de penetración ovocitaria y de formación blastocitaria, que el de los malos congeladores.

Los parámetros cinéticos evaluados individualmente reflejan la situación descrita en la distribución cinética, con una recuperación de sus valores tras una caída inicial en el grupo de buenos congeladores, un descenso suave durante todo el proceso en el de congeladores medios y un descenso brusco en el de malos congeladores.

Nuestros valores fueron superiores a los descritos por García-Herreros *et al.* (2005), quienes, en el mismo medio que el empleado en esta prueba, realizaron la capacitación del semen fresco. No obstante, el diferente estado fisiológico tras la congelación de las células espermáticas puede afectar el resultado final. También encontramos diferencias notables con los datos aportados por Schmidt y Kamp (2004) y Suárez *et al.* (1992), dichos autores caracterizan el movimiento de los espermatozoides hiperactivados de verraco; por tanto, no podemos considerar que en nuestro caso las células analizadas hayan alcanzado ese estado.

Debemos de considerar que tanto en semen fresco de verraco (García-Herreros *et al.*, 2005), como en semen descongelado de perro (Rota *et al.*, 1999) el estado de hiperactivación no se alcanza hasta las dos horas de incubación en el medio capacitante. En nuestro experimento sólo se han analizado los cambios producidos durante la primera hora, por lo que sería posible que con el transcurso de un mayor periodo de tiempo, en el grupo de eyaculados buenos congeladores, se podría llegar a observar dicho proceso como consecuencia de una capacitación previa.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

De acuerdo con el planteamiento de objetivos, desarrollo y resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

Primera: La aplicación de un procedimiento estadístico, basado en una primera etapa en el algoritmo clasificatorio no jerárquico de las *K-means*, seguido de la clasificación jerárquica aglomerativa propuesta por Ciampi *et al.*, permite para el semen fresco de verraco, un agrupamiento de los espermatozoides en tres subpoblaciones, definidas a partir de los parámetros cinéticos individuales. Sin embargo, este procedimiento estadístico no es aplicable para el análisis subpoblacional a partir de los parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide, toda vez que éstos, presentan una naturaleza distributiva de carácter uniforme.

Segunda: La distribución subpoblacional varía a lo largo del proceso de congelación-descongelación. Se constata un incremento de los espermatozoides móviles con características próximas a la hiperactivación, desde la recogida seminal hasta el final de la incubación a 5 °C. Asimismo tras la descongelación, son mayoritarias las células espermáticas que describen trayectorias más lineales y regulares, y presentan una velocidad lineal más alta.

Tercera: La adición de cafeína induce un cambio en la distribución subpoblacional en todos los tiempos, al producir un incremento de las células que presentan trayectorias más lineales y regulares.

Cuarta: La distribución subpoblacional, en función de los parámetros cinéticos individuales, varía con la raza, el individuo y el diluyente de descongelación.

Quinta: Todos los cambios morfométricos tienen lugar en la etapa comprendida entre la adición del agente crioprotector y la descongelación; y todos ellos derivan de una reducción significativa del eje longitudinal de la cabeza del espermatozoide.

Sexta: La incorporación a los modelos de regresión lineal de los parámetros cinéticos y morfométricos, así como la caracterización subpoblacional, incrementa la estimación de la congelabilidad del semen de verraco; toda vez que los coeficientes de regresión ajustados son mayores que cuando se emplean únicamente los parámetros derivados del análisis convencional (0,52 vs. 0,35).

Séptima: La incubación del semen descongelado durante una hora en un medio capacitante, permite detectar diferencias en la distribución subpoblacional, parámetros cinéticos y porcentaje de espermatozoides móviles, en función de la congelabilidad. Siendo en los eyaculados de mejor congelabilidad mayoritaria la SP₁, y más elevados tanto los parámetros cinéticos como el porcentaje de motilidad.

7. CONCLUSIONS

7. CONCLUSIONS.

In accordance with the formulation of the objectives, the development and the results obtained for this Doctoral Thesis, the following conclusions have been reached:

First: The application of a statistical procedure, based firstly on non-hierarchical K-means classifying algorithms, followed by agglomerative hierarchical classification as proposed by Ciampi *et al.*, allows fresh boar semen to be grouped into three sub-populations, defined by individual kinetic parameters. However, this statistical procedure cannot be applied to sub-population analysis by morphometric parameters of boar semen heads, because the nature of their distribution is a uniform character.

Second: Sub-population distribution varies throughout the freezing- thawing process. An increase can be observed in spermatozoid motility with characteristics close to hyperactivation from the moment of semen collection to the end of incubation at 5 °C. Likewise, following thawing, the sperm cells showing more lineal and regular trajectories, and presenting a higher lineal velocity, are in the majority.

Third: The addition of caffeine brought about a change in sub-population distribution at all times, producing an increase in cells displaying more lineal and regular trajectories.

Fourth: Sub-population distribution on the basis of individual kinetic parameters varies according to breed, individual, and thawing diluent.

Fifth: All morphometric changes occur in the stage between the addition of the cryopreservation agent and the thawing process; and they are all the result of a significant reduction in the length of the spermatozoid head.

Sixth: The incorporation to the lineal regression models of kinetic and morphometric parameters, as well as sub-population characteristics, increases boar semen freezability estimates, as long as adjusted regression co-efficients are greater than when only parameters derived from conventional analysis are used (0.52 vs. 0.35).

Seventh: The incubation of thawed semen in a capacitating medium for an hour permitted the detection of sub-population distribution differences, kinetic parameters and percentage of mobile spermatozooids, according to freezability. SP1 was majority in the ejaculates showed best freezability, in these the kinematic parameters and percentage of motility were more elevated than in the others two groups.

8. RESUMEN

8. RESUMEN

La utilización de dosis congeladas seminales en los esquemas de manejo de la reproducción del sector porcino es muy restringida. La causa no deja de ser otra, que la incapacidad de alcanzar con este método los resultados obtenidos con el material seminal almacenado a temperatura de refrigeración (15 °C). No obstante, la investigación en el campo de la crioconservación de los espermatozoides de verraco no ha cesado, intentando mejorar los resultados de la técnica. El trabajo aquí presentado, es parte y fruto de ese constante interés.

Nuestros objetivos se han centrado en la evaluación de los fenómenos acaecidos durante el proceso de congelación-descongelación mediante una nueva tecnología: *el análisis digital de imágenes*. Las principales ventajas que aporta esta técnica son: la capacidad de realizar un análisis objetivo, la individualización de cada una de las células espermáticas valoradas, la determinación de parámetros imposibles de determinar mediante la tradicional observación subjetiva y la agilización de la valoración morfométrica, permitiéndonos contar con una herramienta analítica adicional para evaluar los fenómenos que tienen lugar durante el proceso de criopreservación.

Las ventajas no se limitan a los aspectos técnicos, al permitirnos el análisis por imágenes digitales desarrollar una nueva perspectiva en la valoración seminal: el análisis de subpoblaciones espermáticas en función de los parámetros cinéticos. Este nuevo enfoque es posible gracias a la capacidad de los sistemas CASA para analizar de forma individualizada dichos parámetros en cada célula espermática. De esta manera, se ha podido comprobar como los espermatozoides de un mismo eyaculado no presentan una distribución homogénea, si no que se agrupan en subpoblaciones diferenciadas por los resultados de los parámetros medidos por los sistemas de análisis digital de imagen.

En nuestro estudio, aplicamos esta nueva tecnología a la evaluación de los cambios morfométricos de la cabeza del espermatozoide de verraco, durante el proceso de congelación-descongelación. De manera similar, se estudian los cambios cinéticos durante dicho proceso y en la posterior incubación en un medio capacitante. Así mismo, hemos empleado los datos proporcionados por los sistemas CASA para la estimación “a priori” de la congelabilidad de los eyaculados empleados.

Para la consecución de nuestros objetivos, realizamos 50 congelaciones de eyaculados recogidos de 10 verracos (5 congelaciones por verraco), de dos razas distintas [Landrace (25 congelaciones) y Large White (25 congelaciones)]. Se realizó la valoración de la integridad acrosómica, la vitalidad espermática, el porcentaje de espermatozoides móviles (mediante el

sistema CASA en presencia/ausencia de cafeína) y los parámetros morfométricos y cinéticos durante el proceso de congelación-descongelación. Los puntos de toma de muestras para estas valoraciones se establecieron: tras la recogida seminal (0 horas), previamente a la centrifugación (4 horas), antes de la adición del agente crioprotector (6 horas) y tras la descongelación en diluyente BTS. En el último punto considerado se realizó, adicionalmente, un estudio comparativo cinético, de la vitalidad y la integridad acrosómica entre el material descongelado en BTS y en el nuevo MRA-Thaw[®]. Finalmente, se evaluó la respuesta cinética a la incubación en un medio de capacitación, de muestras seminales clasificadas con un criterio selectivo de respuesta a la congelación (buena, media o mala congelabilidad).

Según avanza el proceso de congelación-descongelación, se observa una disminución de la vitalidad y la integridad acrosómica, alcanzando valores tras la descongelación en BTS del 53,6% y 69,5% respectivamente. Por otra parte, el porcentaje de motilidad comienza a disminuir a partir de la toma de muestra realizada previamente a la centrifugación, el resultado de este parámetro analizado en ausencia de cafeína tras el proceso de congelación es del 45,41%, y en presencia de dicha sustancia estimulante del 66,85%.

A partir de los parámetros cinéticos, realizamos un análisis de subpoblaciones mediante un procedimiento estadístico novedoso. Dicho procedimiento está compuesto, por una primera etapa en la que se realiza un agrupamiento no jerárquico mediante el método de las *K-means*; y seguidamente se aplica el algoritmo de agrupamiento jerárquico aglomerativo de Ciampi *et al.* Empleando este nuevo esquema describimos como los espermatozoides móviles en muestras recién recogidas (0 horas) se agrupaban en 3 subpoblaciones (SP₁, SP₂ y SP₃) con características cinéticas diferenciadas. Así, en la SP₁ se agrupan las células que presentan movimientos progresivos y una alta velocidad lineal; en la SP₂ se encuentran los espermatozoides que describen trayectorias sinuosas y una velocidad circular elevada; por último, la SP₃ se caracteriza por contener espermatozoides con unos parámetros cinéticos degradados. El porcentaje relativo de estas subpoblaciones varía a lo largo del proceso; siendo al comienzo del mismo el porcentaje de espermatozoides englobados en la SP₁ (45,24%) y en la SP₃ (44,64%) muy similar. Las dimensiones de las citadas subpoblaciones, descendieron prácticamente al unísono en los dos siguientes pasos del proceso, a expensas del incremento de la SP₂, que alcanza su mayor tamaño relativo (28,33%) en el momento previo a la adición del agente crioprotector. Tras la descongelación del material seminal en BTS, la mayoría de los espermatozoides móviles se agrupan en la SP₁ (69,73%), mientras que la SP₂ (9,66%) y la SP₃ (20,66%) se vieron muy reducidas.

La adición de cafeína, supone en todos los casos un incremento de la SP₁. Por otra parte, hay diferencias en la distribución subpoblacional entre las dos razas consideradas, a las 4 horas de iniciado el proceso y tras la descongelación. Por último, constatamos también,

diferencias significativas en la distribución subpoblacional entre los 10 individuos considerados.

El análisis de los parámetros cinéticos individualizadamente, muestra como sus valores reflejan el cambio en los patrones cinéticos descrito con anterioridad. De esta manera, sus resultados se incrementan a lo largo del proceso de criopreservación, alcanzando el máximo tras la descongelación.

La distribución subpoblacional cinética posdescongelación es distinta en los dos diluyentes empleados. En el MRA-Thaw[®] es mayor la proporción de células espermáticas móviles englobadas en la SP₁ (83,51%) que en el BTS (69,73%), por el contrario las otras dos subpoblaciones son mayores en el BTS [SP₂ (9,66% vs. 5,96%) y SP₃ (20,60% vs. 10,53%)]. La adición de cafeína no supuso cambios en las dimensiones de las subpoblaciones en el MRA-Thaw[®]; sin embargo, se incrementa el tamaño de la SP₁ (83,59%) en las muestras descongeladas en BTS. Con estos resultados observamos como no existen diferencias entre ambos diluyentes tras la adición de cafeína, en el tamaño de la SP₁ y la SP₃; ni entre el BTS suplementado con cafeína y el MRA-Thaw[®] sin dicha sustancia. Hay también diferencias entre ambos diluyentes para los resultados de vitalidad espermática, integridad acrosómica y porcentaje de motilidad medido tanto en presencia como en ausencia de cafeína.

Tomando como base el modelo estadístico propuesto en el caso del análisis cinético, es imposible clasificar a las células espermáticas en subpoblaciones a partir de sus parámetros morfométricos.

Los cambios en la morfometría de la cabeza espermática suceden en el periodo comprendido entre la adición del agente crioprotector y la descongelación en BTS. Durante ésta, observamos una disminución de la longitud (8,45 vs. 8,22 μm), área (29,61 vs. 28,66 μm^2), perímetro (22,95 vs. 22,51 μm), elipticidad (2,03 vs. 1,97) y un incremento de la regularidad (0,93 vs. 0,94).

En todos los tiempos se observan diferencias entre razas, individuos y congelaciones de un mismo macho para uno o más de los parámetros morfométricos analizados.

Los mayores valores del r (coeficiente de correlación) entre los parámetros determinados a tiempo 0 y la congelabilidad son para la BCF valorada en presencia de cafeína (0,57), la vitalidad (0,53) y la longitud de la cabeza espermática (-0,48). Por el contrario, los valores del r calculados para las dimensiones de las subpoblaciones cinéticas no son significativos en ningún caso. Sin embargo, utilizando modelos de regresión lineal, el mejor valor del r^2 (coeficiente de regresión) ajustado (0,55) es para un modelo que contiene: el porcentaje de formas normales, la vitalidad espermática, la longitud y el perímetro de la cabeza, el tamaño de la SP₂ determinado en ausencia de cafeína y la ALH valorada en presencia de dicha sustancia estimulante. Por tanto, en dicho modelo tienen cabida el tamaño

subpoblacional, junto con parámetros morfométricos y cinéticos. Además, mediante un modelo constituido únicamente a partir de los datos obtenidos mediante sistemas CASA, obtuvimos un r^2 ajustado de 0,52; sustancialmente mayor que el que aporta el modelo construido a partir de los resultados obtenidos por métodos clásicos (0,35).

Por último, la incubación en un medio capacitante tras la descongelación, supone que la distribución subpoblacional espermática varíe de acuerdo a la congelabilidad que inicialmente tenga el semen empleado. Tras 60 minutos de incubación, la SP₃ es el grupo predominante en los eyaculados de mala (90,55%) y media (59,64%) congelabilidad. Por el contrario, en el grupo de eyaculados que se habían clasificado como buenos congeladores, seguía siendo la SP₁ (67,70%) el grupo que más células móviles agrupaba. Obviamente, los parámetros cinéticos evolucionan en cada grupo de aptitud para la congelación, siguiendo los cambios del tamaño de las subpoblaciones. Siendo, al final del proceso, más elevados en el grupo de buenos congeladores; el grupo de eyaculados con una aptitud para la congelación media presenta unos valores intermedios, mientras que el grupo de malos congeladores presenta unos parámetros cinéticos muy degradados.

9. SUMMARY

9. SUMMARY

The use of frozen semen in pig reproduction is very limited. The reason for this is an inability to achieve the same results with this method as those achieved with refrigerated semen stored at a temperature of 15 °C. However, research in the field of cryopreservation of boar spermatozooids continues, with the aim of improving results obtained by the technique. The research presented here is both part and product of this constant interest.

Our aim has been to focus on the evaluation of phenomena produced during the freezing-thawing process using new technology; *digital image analysis*. The main advantages that this technique offers are: the ability to carry out an objective analysis, the individualisation of each of the sperm cells evaluated, the definition of parameters otherwise impossible to define through traditional subjective observation and the increased agility of morphometric evaluation, all of which comprises an additional analytical tool with which to evaluate those phenomena occurring during the cryopreservation process.

The advantages are not limited to technical aspects, as digital image analysis facilitates the development of a new perspective in semen evaluation: the analysis of sperm sub-populations on the basis of kinetic parameters. This new approach is made possible thanks to the capacity of the CASA systems to analyse the said parameters individually for each sperm cell. In this way, it has been possible to demonstrate how spermatozooids from one ejaculate do not show homogeneous distribution, but rather are grouped in sub-populations which can be differentiated by the results of the parameters measured by the digital image analysis systems.

In this study, the new technology has been applied to the evaluation of morphometric changes to boar spermatozoid heads during the freezing-thawing process. Likewise, kinetic changes during the same process, and during posterior incubation in a capacitating medium, were studied. In addition, data provided by the CASA systems has been used to estimate “*a priori*” freezability of ejaculate used.

In order to achieve the aims of this study, 50 ejaculates were frozen, collected from 10 boars (5 ejaculates per boar) representing two distinct breeds (Landrace –25 ejaculates- and Large White- 25 ejaculates). Acrosome integrity, sperm vitality, percentage of mobile sperm (using the CASA system with and without caffeine), and morphometric and kinetic parameters during the freezing-thawing process were all evaluated. A timetable was established for the collection of samples to be evaluated for all of the above conditions: Following semen collection (0 hours), prior to centrifugation (4 hours), before the addition of the cryoprotective agent (6 hours), and following thawing in BTS diluent. In addition, with regards to the latter point, a comparative kinetic study of vitality and acrosomic integrity

between semen thawed using BTS and that using the new MRA-Thaw[®] was carried out. Finally, kinetic response to incubation in a capacitating medium was evaluated for semen samples classified according to selective freezing response criteria (good, medium or poor freezability).

As the freezing-thawing process progresses, a decrease in vitality and acrosome integrity can be observed, reaching values of 53.6% and 69.5% respectively after BTS thawing. As regards percentage of motility, this begins to decrease from sample collection prior to centrifugation onwards. The results for this parameter analysed without caffeine after freezing is 45.41%, and with this stimulant present, 66.85%

Using the kinetic parameters, an analysis of sub-populations was carried out via a new statistical procedure. This is a composite procedure, where firstly a non-hierarchical grouping is made using the K-means method; then, Ciampi *et al.*'s agglomerative hierarchical grouping algorithm is applied. Through the use of this new procedure, it is possible to demonstrate how mobile spermatozooids from freshly collected samples (0 hours) form 3 sub-population groups (SP₁, SP₂ y SP₃) with different kinetic characteristics. Thus, cells presenting progressive movement and high lineal velocity are grouped together in SP₁; SP₂ contains those spermatozooids with sinuous trajectories and a high circular velocity; and finally SP₃ is characterised by spermatozooids presenting degraded kinetic parameters. The relative percentages of these sub-populations varies throughout the process; at the beginning, the percentage of spermatozooids grouped together in SP₁ (45.24%) and in SP₃ (44.64%) is very similar. The size of these aforementioned sub-populations decreased almost in unison during the next two stages of the process, as SP₂ increased, this latter reaching its greatest relative size (28.33%) at the stage prior to the addition of the cryoprotective agent. Following thawing of semen in BTS, the majority of mobile spermatozooids were grouped in SP₁ (69.73%), whilst SP₂ (9.66%) and SP₃ (20.66%) were greatly reduced in size.

The addition of caffeine causes an increase in SP₁ in every case. In addition, differences were observed in sub-population distribution between the two breeds studied, at four hours after initiating the process and following thawing. Lastly, significant differences in sub-population distribution were also observed for each of the 10 animals studied.

Individual analysis of kinetic parameters shows how these values reflect the changes in kinetic patterns described earlier. Thus, results increase throughout the process of cryopreservation, reaching a maximum following thawing.

Post-thawing sub-population kinetic distribution is different for the two diluents used. With MRA-Thaw[®], there is a higher proportion of mobile sperm cells grouped together in SP₁ (83.51%) than with BTS (69.73%), whilst the other two sub-populations are greater with BTS: SP₂ (9.66% vs. 5.96%) and SP₃ (20.60% vs. 10.53%). The addition of caffeine did not

bring about a change in sub-population size with MRA-Thaw[®]; however SP₁ size for samples thawed with BTS increased (83.59%). With these results it can be observed that differences do not exist between the diluents following the addition of caffeine in SP₁ and SP₃; nor between BTS supplemented by caffeine and MRA-Thaw[®] without the said substance. There are, however, differences between the diluents as regards results for sperm vitality, acrosome integrity and motility percentage when measured both with and without caffeine.

If the statistical model proposed in the case of kinetic analysis is taken as a base, it is impossible to classify sperm cells into sub-populations according to morphometric parameters.

Morphometric changes to the sperm head take place in the period between the addition of the cryoprotective agent and thawing in BTS. During the latter, a decrease in length was observed (8.45 vs. 8.22 μm), area (29.61 vs. 28.66 μm^2), perimeter (22.95 vs. 22.51 μm), ellipticity (2.03 vs. 1.97), together with an increase in regularity (0.93 vs. 0.94).

At all stages differences were observed between breeds, individuals and frozen samples from the same male for one or more of the morphometric parameters analysed.

The highest values for r (correlation co-efficient) between parameters determined at 0 hours and freezability were for BCF evaluated with caffeine present (0.57), vitality (0.53) and sperm head length (-0.48). In contrast, r values calculated for kinetic sub-population size were in no case significant. However, using lineal regression models, the highest adjusted value (0.55) for r^2 (regression co-efficient) is for a model which has: the percentage of normal forms, sperm vitality, head length and perimeter, SP₂ size determined without caffeine and ALH evaluated with the said stimulant present. Thus, the said model could include sub-population size, together with morphometric and kinetic parameters. In addition, using a model based solely on data obtained from CASA systems, an adjusted r^2 of 0.52 was obtained, substantially higher than that obtained from the model based on results obtained using classical methods (0.35), which do not employ CASA systems.

Finally, incubation in a capacitating medium following thawing caused sperm sub-population distribution to vary according to the original freezability of the sperm used. After 60 minutes of incubation, SP₃ is the predominant group for ejaculate classified as having poor (90.55%) and medium (59.64%) freezability. In contrast, for ejaculate classified as having good freezability, SP₁ (67.70%) continued to be the group with the most mobile cells. Obviously, kinetic parameters vary in each group in terms of aptness for freezability, reflecting sub-population size changes. At the end of the process, they are highest in the good freezability group; the ejaculate belonging to the medium freezability group has intermediate values, whilst the poor freezability group presents degraded kinetic parameters.

10. BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aalseth, E.P. y Saacke, R.G.** (1986). Vital staining and acrosomal evaluation of bovine sperm. *Gamete res.*, 15: 73-81.
- Abad, M.; García, J.C.; Sprecher, D.J.; Kirkwood, R.N.** (2006). Timing and supplemental seminal plasma effects on fertility of criopreserved boar spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.*, 41: 323.
- Abaigar, T.; Cano, M.; Pickard, A.R.; Holt, W.V.** (2001). Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize ejaculate quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhor*). *Reproduction*, 122: 265-273.
- Abaigar, T.; Holt, W.V.; Harrison, R.A.; del Barrio, G.** (1999). Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhor*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol. Reprod.*, 60: 32-41.
- Aitken, R.J.; Sutton, M.; Warner, P.; Richardson, D.W.** (1985). Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 73: 441-449.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D.** (1989). *Molecular biology of the cell*. Second Edition. Garland Publishing. New York, EEUU.
- Almlid, T. y Hofmo, P.O.** (1996). A brief review of frozen semen application under norwegian AI service conditions. *Reprod. Dom. Anim.*, 31 (Suppl. 1): 169-173.
- Althouse, G.C. y Hopkins, S.M.** (1995). Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluorophores. *Theriogenology*, 43: 595-603.
- Alvarez, J.G. y Storey, B.T.** (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: 232-241.
- Amann, R.P.** (1981). A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J. Androl.*, 2: 37-58.
- Amann, R.P.** (1989). Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.*, 10: 89-98.
- Amann, R.P.** (1988). Computerized evaluation of stallion sperm. En: "Proceedings of the 32th annual convention of the american association of equine practitioners" Lexington, KY, EEUU. Pp: 453-473.
- Amann, R.P.** (1979). Computerized measurements of sperm velocity and percentage of mobile sperm. En: "The spermatozoon". Eds.: Fawcett, D.W. y Bedford, J.M. Urban and Schwarsenberg, Baltimore, EEUU. Pp: 425-431

Amann, R.P. y Hammerstedt, R.H. (1993). In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J. Androl.*, 14: 397-406.

Amann, R.P. y Katz, D.F. (2004). Reflections on CASA after 25 years. *J. Androl.*, 25: 317-325.

de Ambrogi, M.; Ballester, J.; Saravia, F.; Caballero, I.; Johannisson, A.; Wallgren, M.; Andersson, M.; Rodríguez-Martínez, H. (2006). Effect of storage in short- and long-term commercial extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. *Int. J. Androl.*, 29: 543-552.

Angulo, C.; Rauch, M.C.; Droppelmann, A.; Reyes, A.M.; Slebe, J.C.; Delgado-Lopez, F. (1998). Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: cellular localization and transport of hexoses and vitamin C. *J. Cell. Biochem.*, 71: 189-203.

Anzar, M.; Hassan, M.M.; Graham, E.F.; Deyo, R.C.; 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.M.; Kroetsch, T.G.; Pauls, K.P. (2002). Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol. Reprod.*, 66: 354-360.

Aparicio, I.M. (2006). Estudio de la implicación de diferentes quinasas en la regulación de la función celular del espermatozoide de *Sus domesticus*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de Cáceres, España.

Atherton, R.W.; Radany, E.W.; Band, G.; Radany, R.W.; Kitchin, R.M.; Polakoski, K. (1979). A correlation between a spectrophotometric quantitation of rabbit spermatozoa motility and velocity. *Arch. Androl.*, 3: 301-308.

Aziz, N.; Fear, S.; Taylor, C.; Kingsland, C.R.; Lewis-Jones, D.I. (1998). Human sperm head morphometric distribution and its influence on human fertility. *Fertil. Steril.*, 70: 883-891.

Bailey, J.L. y Buhr, M.M. (1995). Regulation of internal Ca^{++} by chilled bull and boar spermatozoa. *Cryobiology*, 32: 259-269.

Ball, B.A.; Gravance, C.G.; Wessel, M.T.; Sabuer, K. (2003). Activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) in reproductive tissues of the stallion and effects of angiotensin II on sperm motility. *Theriogenology*, 59: 901-914.

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

Ball, B.A. y Vo, A. (2001). Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *J. Androl.*, 22: 1061-1069.

Ballachey, B.E.; Saacke, R.G., Evenson, D.P. (1988). The sperm chromatin structure assay: relationship with alternate test of sperm quality and heterospermic performance of bulls. *J. Androl.*, 9: 109-115.

- Bamba, K.** (1988). Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology*, 29: 1245-1251.
- Beletti, M.E.; Costa, F.; Viana, M.P.** (2005). A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. *Anim. Reprod. Sci.*, 85: 105-116.
- Benchai, M.; Braun, V.; Lornage, J.; Hadj, S.; Salle, B.; 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.; Turner, K.O.; Meizel, S.; Hedrik, J.L.** (1989). Zona pellucida-induced acrosome reaction in boar sperm. *Biol. Reprod.*, 40: 525-530.
- Betancourt, M.; Resendiz, A; Fierro, E.C.** (2006). Effect of two insecticides and two herbicides on the porcine sperm motility patterns using computer-assisted semen analysis (CASA) in vitro. *Reprod. Toxicol.*, 22: 508-512.
- Blanco, O.M.** (1998). Análisis objetivo de la motilidad espermática: evaluación de los espermatozoides de verraco y su relación con la fertilidad. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria de Murcia, España.
- Bolarín, A; Roca, J.; Rodríguez-Martínez, H.; Hernandez, M.; Vazquez, J.M.; Martínez, E.A.** (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: 669-680.
- Bonet, S.; Briz, M.; Pinart, E.; Sancho, S.; García, N.; Badía, E.; Bassols, J.; Pruneda, A.; Bussalleu, E.; Yeste, M.; Casas, I.; Carreras, A.** (2006). Análisis de la morfología espermática al microscopio electrónico de barrido y al microscopio electrónico de transmisión. En: “*Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino*”. Eds.: Bonet, S.; Martínez, E.; Rodríguez, J.E.; Barrera, X. Universidad de Gerona, Red temática nacional de reproducción porcina, Gerona, España. Pp: 39-50.
- Boone, W.R.; Jones, J.M.; Shapiro, S.S.** (2000). Using videotaped specimens to test quality control in a computer-assisted semen analysis system. *Fertil. Steril.*, 73: 636-640.
- Bordignon, V. y Smith, L.C.** (1999). Ultraviolet-irradiated spermatozoa activate oocytes but arrest preimplantation development after fertilization and nuclear transplantation in cattle. *Biol. Reprod.*, 61: 1513-1520.
- Brahmkshtri, B.P.; Edwin, M.J.; John, M.C.; Nainar, A.N.; Krishnan, A.R.** (1999). Relative efficacy of conventional sperm parameters and sperm penetration bioassay to assess bull fertility in vitro. *Anim. Reprod. Sci.*, 54: 159-168.
- Bravo, M.M.; Aparicio, I.M.; García-Herreros, M.; Gil, M.C.; Peña, F.J.; García-Marín, L.J.** (2005). Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation-like state in boar spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, 71: 88-96.

Breining, E.; Beorlegui, N.B.; O'Flaherty, C.M.; Beconi, M.T. (2005). Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, 63: 2126-2135.

Brinsko, S.P.; Crockett, E.C.; Squires, E.L. (2000). Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoa motility after cooling and storage. *Theriogenology*, 54: 129-136.

Brouwers, J.F.; Silva, P.F.; Gadella, B.M. (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: 458-469.

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

van Buiten, A.; Remmen, J.; Colenbrander, B. (1998). Fertility of shetland pony stallion used in different breeding systems: a retrospective study. *Vet. Quart.*, 20: 13-19.

Bussalleu, E.; Pinart, E.; Briz, M.D.; Sancho, S.; García-Gil, N.; Bassols, J.; Pruneda, A.; Yeste, M.; Casas, I.; Bonet, S. (2006). Filtración de dosis seminales en distintas matrices. En: "*Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino*". Eds.: Bonet, S.; Martínez, E.; Rodríguez, J.E.; Barrera, X. Universidad de Gerona, Red temática nacional de reproducción porcina, Gerona, España. Pp: 201-214.

Bwanga, C.O.; De Braganca, M.M.; Einarsson, S.; Rodríguez-Martínez, H. (1990). Cryopreservation of boar semen in mini- and maxi- straws. *J. Vet. Med. A.*, 37: 651-658.

Bwanga, C.O.; Einarsson, S.; 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.O.; Einarsson, S.; Rodríguez-Martínez, H. (1991b). Deep freezing of boar semen packaged in plastic bags and straws. *Reprod. Dom. Anim.*, 26: 117-125.

Calamera, J.; Buffone, M.; Ollera, M.; Alvarez, J.; Doncel, G.F. (2003). Superoxide dismutase content and fatty acid composition in subsets of human spermatozoa from normozoospermic, asthenozoospermic, and polyzoospermic semen samples. *Mol. Reprod. Dev.*, 66: 422-430.

Carbajo, G.; Cuello, C.; Ruiz, M.; Vázquez, J.M.; Martínez, E.A.; Roca, J. (2004). Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *J. Androl.*, 25: 389-396.

Carbonell, M. y Navarro, R. (1990). Evaluación económica de la inseminación artificial con semen congelado en cerdas. *Vet. Mex.*, 21: 17-21.

Casey, P.J.; Gravance, C.G.; Davis, R.O.; Chabot, D.D.; Liu, I.K.M. (1997). Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. *Theriogenology*, 47: 575-582.

- Cerolini, S.; Maldjian, A.; Pizzi, F.; Gliozzi, T.M.** (2001). Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*, 121: 395-401.
- Chan, J.Z.; Krause, W.; Bohring, C.** (2002). Computer-assisted analysis of sperm morphology with the aid of lectin staining. *Andrologia*, 34: 379-383.
- Chan, S.Y.; Tsoi, W.L.; Leung, J.; Ng, V.; Lo, T.; 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.
- Chan, S.Y.; Wang, C.; Song, B.L.; Lo, T.; Leung, A.; Tsoi, W.L.; Leung, J.** (1989). Computer-assisted image analysis of sperm concentration in human semen before and after swim-up separation: comparison with assessment by haemocytometer. *Int. J. Androl.*, 12: 339-345.
- Chang, A.P.; Wolters, C.A.; Weinrieb, S.A.** (1983). The neglected laboratory test. The semen analysis. *J. Androl.*, 4: 280-282.
- Chantler, E.; Abraham-Peskir, J.; Roberts, C.** (2004). Consistent presence of two normally distributed sperm subpopulations within normozoospermic human semen: a kinematic study. *Int. J. Androl.*, 27: 350-359.
- Chatterjee, S. y Gagnon, C.** (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev.*, 59: 451-458.
- Check, J.H.; Epstein, R.; Nowroozi, K.; Shanis, B.S.; Wu, C.H.; Bollendorf, A.** (1989). The HOST test as a useful adjunct to the semen analysis to predict fertility potential. *Fertil. Steril.*, 52: 159-161.
- Cheng, F.P.; Fazeli, A.R.; Voorhout, W.F.; Tremoleda, J.L.; Bevers, M.M.; Colenbrander, B.** (1998). 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.
- Ciampi, A.; Lechevallier, Y.; Castejón, M.; 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
- Coetzee, K.; Bermes, N.; Krause, W.; Menkveld, R.** (2001a). Comparison of normal sperm morphology outcomes from two different computer-assisted semen analysis systems. *Andrologia*, 33: 159-163.
- Coetzee, K.; Menkveld, R.** (2001b). Validation of a new disposable counting chamber. *Arch. Androl.*, 47: 153-156.
- Coetzee, K.; Kruger, T.F.; Lombard, C.J.** (1999a). Repeatability and variance analysis on multiple computer assisted (IVOS) sperm morphology readings. *Andrologia*, 31: 163-168.
- Coetzee, K.; Kruger, T.F.; Lombard, C.J.; Shaughnessy, D.; Oehninger, S.; Ozgur, K.; Pomeroy, K.O.; Muller, C.H.** (1999b). Assessment of interlaboratory and intralaboratory sperm morphology readings with the use of a Hamilton Thorne Research integrated visual optical system semen analyzer. *Fertil. Steril.*, 71: 80-84.

- Colebrander, B.; Gadella, B.M.; Stout, T.A.E.** (2003). The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reprod. Dom. Anim.*, 38: 305-311.
- Colenbrander, B.; Puyk, H.; Zandee, A.R.; Parlevliet, J.** (1992). Evaluation of the stallion for breeding. *Acta Vet. Scand.*, 88: 29-38.
- Cooper, T.G.** (1998). The epididymis: cellular and molecular aspects. En: *"Interactions between epididymis secretions and spermatozoa"*. Eds: Jones, R.C.; Holland, M.K.; Doberska, C. J. *Reprod. Fert. Suppl.* 53. pp: 119-136.
- Cooper, T.G.** (1986). *The epididymis, sperm maturation and fertilisation*. Springer verlag, Heidelberg, Alemania.
- Cooper, T.G.; Atkinson, A.D.; Nieschlag, E.** (1999). Experience with external quality control in spermatology. *Human. Reprod.*, 14: 765-769.
- Cooper, T.G.; Bjorndahl, L.; Vreeburg, J.; Nieschlag, E.** (2002). Semen analysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization. *Int. J. Androl.*, 25: 306-311.
- Cormier, N.; Sirard, M.A.; Bailey, J.L.** (1997). Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J. Androl.*, 18: 461-468.
- Courtens, J.L.; Ekwall, H.; Paquignon, M.; 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.G. y Einarsson, S.** (1971). Fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet. Scand.*, 12: 125-127.
- Cremades, T.; Roca, J.; Rodríguez-Martínez, H, Abaigar, T.; Vázquez, J.M.; Martínez, E.A.** (2005). Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa. *J. Androl.*, 26: 610-618.
- Cross, N.L.; Morales, P.; Overstreet, J.W.; Hanson, F.W.** (1986). Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res.*, 15: 213-216.
- Cummings, J.M.; Woodwall, P.F.** (1985). On mammalian sperm dimensions. *J. Reprod. Fertil.*, 75: 153-175.
- Curry, M.R.; Millar, J.D.; Tamuli, S.M.; Watson, P.F.** (1996). Surface area and volume measurements for ram and human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 55: 1325-1332.
- Curry, M.R. y Watson, P.F.** (1994). Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology*, 31: 39-46.
- Curry, M.R.** (2000). Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews Reprod.*, 5: 46-52.
- David, G.; Serres, C.; Jouannet, P.** (1981). Kinematic of human spermatozoa. *Gamete Res.*, 4: 83-95.
- Davis, R.O.; Bain, D.E.; Siemers, R.J.; Thal, D.M.; Andrew, J.B.; Gravance, C.G.** (1992a). Accuracy and precision of the CellForm-Human automated sperm morphometry instrument. *Fertil. Steril.*, 58: 763-769.

- Davis, R.O.; Drobnis, E.Z.; Overstreet, J.W.** (1995a). 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.O.; Gravance, C.G.; Overstreet, J.W.** (1999b). A standardized test for the visual analysis of human sperm morphology. *Fertil. Steril.*, 63: 1058-1063.
- Davis, R.O.; Gravance, C.G.; Thal, D.M.; Miller, M.G.** (1994). Automated analysis of toxicant-induced changes in rat sperm head morphometry. *Reprod. Toxicol.*, 8:521-529.
- Davis, R.O. y Katz, D.F.** (1993). Operational standards for CASA instruments. *J. Androl.*, 14: 385-394.
- Davis, R.O. y Katz, D.F.** (1992c). Standardization and comparability of CASA instruments. *J. Androl.*, 13: 81-86.
- Davis, R.O., Overstreet, J.W.; Asch, R.H.; Ord, T.; Silber, S.J.** (1991). Movement characteristics of human epididymal sperm used for fertilization of human oocytes in vitro. *Fertil. Steril.*, 56: 1128-1135.
- Davis, R.O.; Rothmann, S.A.; Overstreet, J.W.** (1992b). Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies. *Fertil. Steril.*, 57: 648-653.
- Delgado, J.V.** (2000). La conservación de la biodiversidad de los animales domésticos locales para el desarrollo rural sostenible. *Arch. Zootec.*, 49: 317-326.
- Diemer, T.; Huwe, P.; Ludwig, M.; Schroeder-Printzen, I.; Michelmann, H.W.; Schiefer, H.G.; Weidner, W.** (2003). Influence of autogenous leucocytes and *Escherichia coli* on sperm motility parameters in vitro. *Andrologia*, 35: 100-105.
- Dobrinski, I.; Smith, T.T.; Suarez, S.S.; Ball, S.A.** (1997). Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*, 56: 861-869.
- Domínguez, J.C.; Anel, L.; Boixo, J.C.; 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.
- Donnelly, E.T.; Lewis, S.E.; McNally, J.A.; Thompson, W.** (1998). In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil. Steril.*, 70: 305-314.
- Donnelly, G.P.; McClure, N.; Kennedy, M.S.; Lewis, S.E.** (1999). Direct effect of alcohol on the motility and morphology of human spermatozoa. *Andrologia*, 31: 43-47.
- Dostolava, Z.; Calvete, J.J.; Sanz, L.; Topfer-Petersen, E.** (1994). Quantitation of boar spermadhesins in accessory gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta.*, 120: 48-54.
- Douglas-Hamilton, D.H.; Smith, N.G.; Kuster, C.E.; Vermeiden, J.P.W.; Althouse, G.C.** (2005). Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. *J. Androl.*, 26: 107-114.

- Drobnis, E.Z.; Crowe, L.M.; Berger, T.; Anchoroguy, T.J.; Overstreet, J.W.; Crowe, J.H.** (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.Z.; Yudin, A.I.; Cherr, G.M.; Katz, D.F.** (1988). Kinematic of hamster sperm during penetration of the cumulus cell matrix. *Gamete Res.*, 21: 367-383.
- Dube, C.; Beaulieu, C.; Reyes-Moreno, C.; Guilemette, C.; Bailey, J.L.** (2004). Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation and tyrosine phosphorylation. *Theriogenology*, 62: 874-886.
- Dubois, M.; Jouannet, P.; David, G.** (1974). Spermatozoa motility in human cervical mucus. *Nature*, 252: 711-713.
- van Duijn, A. y Rikmenspoel, R.** (1960). The mean velocity and velocity distributions of normal bull spermatozoa at different hydrogen ion concentrations, derived from photo-electric measurements. *J. Agric. Sci.*, 54: 300-309.
- Dunphy, B.C.; Kay, R.; Borrat, C.L.R.; Cook, I.D.** (1989). Quality control during the conventional analysis of semen, as essential exercise. *J. Androl.*, 10: 378.
- Duty, S.M.; Calafat, A.M.; Silva, M.J.; Brock, J.W.; Ryan, L.; Chen, Z.; Overstreet, J.; Hauser, R.** (2004). The relationship between environmental exposure to phthalates and computer-aided sperm analysis motion parameters. *J. Androl.*, 25: 293-302.
- Elliot, F.I.; Sherman, J.K.; Eliot, E.J.; Sullivan, J.J.** (1973). A photographic method of measuring percentage of progressively sperm cells using dark-fields photography. En: "*Proceedings of the 8th international symposium on zootechnology*", Milan, Italia. Pp: 160-168.
- Ellington, J.E.; Evenson, D.P.; Deavila, J.; Jost, L.K.; Wright, R.W.** (2000). Bull sperm that attach to oviductal cells in vitro support superior embryonic development rates as compared to sperm that do not attach. En: "*Proceedings of 14th international meetings on animal reproduction*", Stockholm, Suecia. Vol.:1; pp: 78.
- Enciso, M.; López-Fernández, C.; Fernández, J.L.; García, P.; Gosálbez, A.; Gosálbez, J.A.** (2006). New method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright-field or fluorescence microscopy. *Theriogenology*, 65: 308-316.
- England, G.C.** (1993). Cryopreservation of dog semen: a review. *J. Reprod. Fertil.*, 47: 243-255.
- Ericsson, S.A.; Garner, D.L.; Thomas, C.A.; Downing, T.W.; Marshall, C.E.** (1993). Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 39: 1009-1024.
- Eriksson, B.M. y Rodríguez-Martínez, H.** (2000a). Deep-freezing of boar semen in plastic film "cochettes". *J. Vet. Med. A.*, 47: 89-97.

- Eriksson, B.M. 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.M. y Rodríguez-Martínez, H.** (2000c). Freezing of boar semen, problems and possibilities. En: "4th annual conference of european society for domestic animal reproduction". ESDAR newsletter 5:6.
- 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 congreso ibérico de reproducción animal", Lugo, España. Libro de ponencias y comunicaciones, Pp: 364-368.
- Eriksson, B.M.; Vázquez, J.M.; Martínez, E.A.; Roca, J.; Lucas, X.; Rodríguez-Martínez, H.** Effects 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 andrology special interest group. European society for human reproduction and embryology.** (1998). Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. *Hum. Reprod.* 13: 142-145.
- Esteso, M.C.; Fernández Santos, M.R.; Soler, A.J.; Montoro, V.; Quintero-Moreno, A.; Garde, J.J.** (2006). The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm heads. *Reprod. Dom. Anim.*, 41: 241-246.
- Evenson, D.P.; Darzynkiewicz, Z.; Melamed, M.R.** (1982). Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J. Histochem. Cytochem.*, 30: 279-280.
- Evenson, D.P.; Darzynkiewicz, Z.; Melamed, M.R.** (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, 210: 1131-1133.
- Evenson, D.P.; Larson, K.L.; Jost, L.K.** (2002). Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.*, 23: 25-43.
- Evenson, D.P.; Thompson, L.; 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.M.; Jasko, D.J.; Graham, J.K.; Squires, E.L.** (1992). Assessment of *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, 32: 23-27.
- Farrell, P.; Trouern-Trend, V.; Foote, R.H.; Douglas-Hamilton, D** (1995). Repeatability of measurements on human, rabbit and bull sperm by computer-assisted sperm analysis when comparing individual fields and means of 12 fields. *Fertil. Steril.*, 64: 208-210.
- Farrell, P.B.; Foote, R.H.; McArdle, M.M.; Trouern-Trend, V.L.; Tardiff, A.L.** (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.B.; Presicce, G.A.; Brockett, C.C.; Foote, R.H. (1998). Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, 49: 871-879.

Fatehi, A.N.; Bevers, M.M.; Schoevers, E.; Roelen, B.A.; Colenbrander, B.; Gadella, B.M. (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.S.M. y Abdou, M.S.S. (1991). Effect of caffeine on the post-thaw motility of buffalo spermatozoa. *Theriogenology*, 36: 149-154.

Fazeli, A.; Duncan, A.E.; Watson, P.F.; Holt, W.V. (1999). Sperm-oviduct interaction: induction on capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol. Reprod.*, 60: 879-886.

Fazeli, A.R.; Steenweg, W.; Bevers, M.M.; van den Broek, J.; Bacher, V.; Parlevliet, J.; Colenbrander, B. (1995). Relation between stallion sperm binding to homologous hemizona and fertility. *Theriogenology*, 44: 751-760.

Fazeli, A.R.; Zhang, B.R.; Steenweg, W.; Larsson, B.; Bevers, M.M.; van den Broek, J.; Rodríguez-Martínez, H.; Colenbrander, B. (1997). Relationship between sperm-zona pellucida binding assay and the 56-day nonreturn rate of cattle inseminated with frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 48: 853-863.

Fernández, J.L.; Muriel, L.; Rivero, M.T.; Goyanes, V.; Vázquez, R.; Álvarez, J.G. (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J. Androl.*, 24: 59-66.

Figa-Talamanca, I.; Dell'Orco, V.; Pupi, A.; Dondero, F.; Gandini, L.; Lenzi, A.; Lombardo, F.; Scavalli, P.; Mancini, G. (1992). Fertility and semen quality of workers exposed to high temperatures in the ceramics industry. *Reprod. Toxicol.*, 6: 517-523.

Fiser, P.S. y Fairfull, R.W. (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.S.; Fairfull, R.W.; Hansen, C.; Panich, P.L.; Shrestha, J.N.B.; 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.

Flesch, F.M.; Voorhout, W.F.; Colenbrander, B.; van Golde, L.M.; Gadella, B.M. (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.

Fowlkes, E.; Mallows, C. (1983). A new method for comparing two hierarchical clusterings. *J. Ame. Stat. Assoc.*, 78: 553-569.

- Franken, D.R.; Lombard, C.J.; Acosta, A.A.; Oehninger, A.; Kruger, T.F.; Hodgen, G.D.** (1993). The hemizona assay: its role in identifying male factor infertility in assisted reproduction. *Fertil. Steril.*, 59: 1075-1080.
- Fraser, L.; Barrat, C.L.; Canale, D.; Cooper, T.; DeJonge, C.; Irvine, S.; Mortimer, D.; Oehninger, S.; Tesarik, J.** (1997). Consensus workshop on advanced diagnostic andrology techniques. ESHRE andrology special interest group. *Hum. Reprod.*, 12: 873.
- Fraser, L.; Lecewicz, M.; Strzezek, J.** (2002). Fluoreometric assessment of viability and mitochondrial status of boar spermatozoa following liquid storage. *Pol. J. Vet. Sci.*, 5: 85-92.
- Fraser, L. y Strzezek, J.** (2004). The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 °C and 16 °C. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 42: 49-55.
- 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.
- Freund, M. y Oliveira, N.** (1987). Visual versus cinemicrographic evaluation of human sperm motility and morphology. *Arch. Androl.*, 19: 25-32.
- Fuller, S.J. y Whittingham, D.G.** (1996). Effect of cooling mouse spermatozoa to 4 °C on fertilization and embryonic development. *J. Reprod. Fertil.*, 108: 139-145.
- 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.
- Gadella, B.M. y Harrison, R.A.** (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.M. y Harrison, R.A.** (2000). The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase-A dependent changes in phospholipid transbilayer behaviour in the sperm plasma membrane. *Development*, 127: 2407-2420.
- Gadella, B.M.; Rathi, R.; Brouwers, J.F.H.M.; Stout, T.A.E.; Colenbrander, B.** (2001). Capacitation and the acrosome reaction in equine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 68: 239-247.
- Gagnon, C.** (1995). Regulation of sperm motility at the axonemal level. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7: 847-855.
- Gao, D.; Mazur, P.; Criser, J.K.** (1997). Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. En: "Reproductive tissue banking: scientific principles". Eds: Karow, A.M. y Critser, J.K. Academic press, San Diego, EEUU. Pp: 263-328.
- García-Herrerros, M.; Aparicio, I.M.; Baron, F.J.; García-Marín, L.J.; Gil, M.C.** (2006). Standardization of sample preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. *Int. J. Androl.*, 29: 553-563.

García-Herreros, M.; Aparicio, I.M.; Nuñez, I.; García-Marín, L.J.; Gil, M.C.; Peña Vega, F.J. (2005) Boar sperm velocity and motility patterns under capacitating and non-capacitating incubation conditions. *Theriogenology*, 63: 795-785.

García, P.; Pérez, B.; Gosálvez, J. (2006). Estudio del nivel de fragmentación del ADN en semen de verraco. En: “Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino”. Eds: Bonet, S.; Martínez, E.; Rodríguez, J.E.; Barrera, X. Universidad de Gerona y Red temática nacional de reproducción porcina, Gerona, España. Pp: 125-132.

García-Artiga, C.; Fontanillas, J.C.; Pérez, J.; García-Cuenca, I.; Martín-Rillo, S.; Pérez-García, T. (1994). Técnicas de tinción espermática. *Porci*, 21: 11-18.

García-Macías, V.; de Paz, P.; Martínez-Pastor, F.; Álvarez, M.; Gomes-Alves, S.; Bernardo, J.; Anel, E.; Anel, L. (2007). DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull semen. *Int. J. Androl.*, 30: 88-98.

Garde, J.J.; Soler, A.J.; Cassinello, J.; Crespo, C.; Malo, A.F.; Espeso, G.; Gomendio, M.; Roldan, E.R.S. (2003). Sperm cryopreservation in three species of endangered gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorrr*, *G. dorcas neglecta*). *Biol. Reprod.*, 69: 602-611.

Garner, D.L. y Johnson, L.A. (1995). Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol. Reprod.*, 53: 276-284.

Garner, D.L.; Johnson, L.A.; Yue, S.T.; Roth, B.L.; Haugland, R.P. (1994). Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J. Androl.*, 15: 620-629.

Garner, D.L.; Pinkel, D.; Johnson, L.A.; Pace, M.M. (1986). Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol. Reprod.*, 34: 127-138.

Garner, D.L. y Thomas, C.A. (1999). Organell-specific probe JC-1 identifies membrane differences in the mitochondrial function of bovine sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, 53: 85-92.

Garret, C. y Baker, H.W. (1995). A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads. *Fertil. Steril.*, 63: 1306-1317.

de Geyter, C.; De Geyter, M.; Nieschlag, E. (1998). Diagnostic accuracy of computer-assisted sperm motion analysis. *Hum. Reprod.*, 13: 2512-2520.

Gil, J.; Januskauskas, A.; Haard, M.G.M.; Johanisson, A.; Söderquist, L. (2000). Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus and Triladyl. *Reprod. Dom. Anim.*, 35: 69-77.

Gil, M.A.; Roca, J.; Cremades, T.; Hernández, M.; Vázquez, J.M.; Rodríguez-Martínez, H.; Martínez, E.A. (2005) Does multivariate analysis of post-thaw sperm characteristics accurately estimate in vitro fertility of boar individual ejaculates?. *Theriogenology*. 64: 305-316.

- Gill, H.S.; van Arsdalen, K.; Hypolite, J.; Levin, R.M.; Ruzich, J.V.** (1988). Comparative study of two computerized semen motility analyzers. *Andrologia*, 20: 433-440.
- Gillan, L.; Evans, G.; Maxwell, W.M.C.** (1997). Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, 9: 481-487.
- Gillan, L.; Gareth, E.; Maxwell, W.M.C.** (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63: 445-457.
- González Urdiales, R.; Tejerina, F.; Domínguez, J.C.; Alegre, B.; Ferreras, A.; Peláez, J.; Bernal, S.; Cárdenas, S.** (2006). Técnicas de análisis rutinario de la calidad espermática: motilidad, vitalidad, concentración, resistencia osmótica y morfología espermática. En: “*Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino*”. Eds: Bonet, S.; Martínez, E.; Rodríguez, J.E.; Barrera, X. Universidad de Gerona y Red temática nacional de reproducción porcina, Gerona, España. Pp: 19-38.
- Goulart, A.R.; de Alencar Hausen, M.; Monteiro-Leal, L.H.** (2003). Comparison of three computer methods of sperm head analysis. *Fertil. Steril.*, 80: 625-630.
- de Graaf, S.P.; Evans, G.; Maxwell, W.M.; O'Brien, J.K.** (2006). In vitro characteristics of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa after sex sorting and re-freezing. *Reprod. Fertil. Dev.*, 18: 867-874.
- Graham, J.K.** (2001). Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim. Reprod. Sci.*, 68: 249-265.
- Graham, J.** (1996). Cryopreservation in stallion spermatozoa. *Vet. Clin. North. Ame.*, 12: 131-147.
- Graham, J.K.; Kunze, E.; Hammerstedt, R.H.** (1990). Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol. Reprod.*, 43: 55-64.
- Graham, E.F.; Rajaman, A.H.J.; Schmehl, M.K.L.; Maki-Laurila, M.; Bower, R.E.** (1971). Fertility studies with frozen boar spermatozoa. *A. I. Diergest.*, 19: 61.
- Gravance, C.G.; Champion, Z.J.; Casey, P.J.** (1998a). Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology*, 49: 1219-1230.
- Gravance, C.G.; Champion, Z.J.; Liu, I.K.; Casey, P.J.** (1997). Sperm head morphometry analysis of ejaculate and dismount stallion semen samples. *Anim. Reprod. Sci.*, 49: 71-76.
- Gravance, C.G.; Garner, D.L.; Baumber, J.; Ball, B.A.** (2000). Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology*, 53: 1691-1703.
- Gravance, C.G.; Lewis, K.M.; Casey, P.J.** (1995). Computer automated sperm head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa. *Theriogenology*, 44: 989-1002.
- Gravance C.G.; Vishwanath, R.; Pitt, C.; Garner, D.L.; Casey, P.J.** (1998b). Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *J. Androl.*, 19: 704-709.

- Gravance, G.C.; Vishwanath, R.; Pitt, C.; Casey, P.J.** (1996). Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. *Theriogenology*, 46: 1205-1215.
- Green, C.E.; Bredl, J.; Holt, W.V.; Watson, P.F.; Fazeli, A.** (2001a). Carbohydrate mediation of boar sperm binding to oviductal epithelial cells in vitro. *Reproduction*, 122: 305-315.
- Green, C.E. y Watson, P.F.** (2001b). Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, 122: 889-898.
- Grunert, J.H.; de Geyter, C.; Bordt, J.; Schneider, H.P.; Nieschlag, E.** (1989). Does computerized image analysis of sperm movement enhance the predictive value of semen analysis for in-vitro fertilization results? *Int. J. Androl.*, 12: 329-338.
- Guillan, L.; Evans, G.; Maxwell, W.M.C.** (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63: 445-457.
- Hafez, E.S.E.** (2002). Anatomía del aparato reproductor del macho. Parte I. Anatomía funcional de la reproducción. En: “*Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición.*”. Eds: Hafez, E.S.E. y Hafez, B. Mc Graw-Hill, México. Pp: 3-12.
- Hamamah, S.; Royère, D.; Nicolle, J.C.; Paquignon, M.; Lansac, J.** (1990). Effects of freezeng-thawing on the spermatozoon nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. *Reprod. Nutr. Dev.*, 30: 59-64.
- Hammerstedt, R.H.; Graham, J.K.; Nolan, J.P.** (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.*, 11: 73-88.
- Hammitt, D.G. and Martín, P.A.** (1989). Fertility of frozen-thawed porcine semen following controlled-rate freezing in straws. *Theriogenology*, 32: 369-384.
- Hancock, J.L. and Howell, G.J.R.** (1959). The collection of boar semen. *Vet. Rec.*, 71: 664-665.
- Harkema, W.; Harrison, R.A.P.; Miller, N.G.A.; Topper, E.K.; Woelders, H.** (1998). Enhanced binding of zona pellucida proteins to the acrosomal region of inact boar spermatozoa in response to fertilizing conditions: a flow cytometric study. *Biol. Reprod.*, 58: 421-430.
- Harper, M.J.K.** (1993). Sperm and egg transport. En: “*Reproduction in mammals. Book 1. Germ cell and fertilization. Second Edition.*” Eds: Austin, C.R. y Short, R.V. Cambridge University Press, Cambridge, U.K. Pp: 102-127.
- Harrison, K.L.; Baker, N.J.; Harrison, M.** (1989). Sperm morphology evaluation using a rapid haematological stain. *Australian J. Med. Lab. Sci.*, 10: 75-76.
- Harrison, R.A.; Ashworth, P.J.; Miller, N.G.** (1996). Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol. Reprod. Dev.*, 45: 378-391.

- Harrison, R.A.P. y Gadella, B.M.** (2005). Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology*, 63: 342-351.
- Harrison, R.A. y Vickers, S.E.** (1990). Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 88: 343-352.
- Hay, M.A.; King, W.A.; Gartley, C.J.; Leibo, S.P.; Goodrowe, K.L.** (1997). Canine spermatozoa cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology*, 48: 1329-1342.
- Hedger, M.O. y Meinhardt, A.** (2003). Cytokines and the immune-testicular axis. *J. Reprod. Immunol.*, 58: 1-26.
- Henault, M.A. y Killian, G.J.** (1995). Effects of sperm preparation and bull fertility on in vitro penetration of zona-free bovine oocytes. *Theriogenology*, 43: 739-749.
- Hidalgo, M.; Rodríguez, I.; Dorado, J.** (2006). Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology*, 66: 996-1003.
- Hidalgo, M.; Rodríguez, I.; Dorado, J.; Sanz, J.; Soler, C.** (2005). Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry. *Vet. Med. Czech.*, 50: 24-32.
- Hidalgo, M.; Rodríguez, I.; Dorado, J.; Soler, C.** (2007a). Morphometric classification of spanish thoroughbred stallion sperm heads. *Anim. Reprod. Sci.*, in press.
- Hidalgo, M.; Rodríguez, I.; Dorado, J.M.** (2007b). The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Anim. Reprod. Sci.*, 100: 61-72.
- Hingst, O.; Blottner, S.; Franz, C.** (1995). Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue and acridine staining. *Andrologia*, 27: 275-279.
- Hinting, A.; Comhaire, F.; Vermeulen, L.; Dhont, M.; Vermeulen, A.; Vandekerckhove, D.** (1990). Value of sperm characteristics and the results of in-vitro fertilization for predicting the outcome assisted reproduction. *Int. J. Androl.*, 13: 59-56.
- Hirai, M.; Boersma, A.; Hoeflich, A.; Wolf, E.; Foll, J.; Aumuller, T.R.; 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.
- Hjollund, N.H.; Bonde, J.P.; Jensen, T.K.; Ernst, E.; Henriksen, T.B.; Kolstad, H.A.; Giwercman, A.; Skakkebaek, N.E.; Olsen, J.** (1998). Semen quality and sex hormones with reference to metal welding. *Reprod. Toxicol.*, 12: 91-95.
- Ho, H.C. y Suarez, S.S.** (2001). Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction*, 122: 519-526.

- Hoflack, G.; Rijsselaere, T.; Maes, D.; Dewulf, J.; Opsomer, G.; de Kruif, A.; van Soom, A.** (2005). Validation and usefulness of the Sperm Quality Analyzer (SQA-IIC) for bull semen analysis. *Reprod. Dom. Anim.*, 40: 237-244.
- Holt, C.; Holt, W.V.; Moore, H.D.** (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.V.; Moore, H.D.; Reed, H.C.; Curnock, R.M.** (1997). Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J. Androl.*, 18: 312-323.
- Holt, W.V.; Watson, P.; Curry, M.; Holt, C.** (1994b). Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems used in practical workshop. *Fertil. Steril.*, 62: 1277-1282.
- Holt, W.V.; Head, M.F.; North, R.D.** (1992). Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *Biol. Reprod.*, 46: 1086-1094.
- Holt, W.V.; Moore, H.D.; Hillier, S.G.** (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.V y North, R.D.** (1994a). 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.V. y North, R.D.** (1991). Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 91: 451-461.
- Holt, W.V. y North, R.D.** (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.V. y Palomo, M.J.** (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.V.** (2000a). Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 3-22.
- Holt, W.V.** (2000b). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53: 47-58.
- Holt, W.V** (1996). Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. *Reprod. Dom. Anim.*, 31: 17-24.
- Holt, W.V. y Pickard, A.R.** (1999). Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Reviews Reprod.*, 4: 143-150.

- Huang, S.Y.; Kuo, Y.H.; Lee, W.C.; Tsou, H.L.; Lee, Y.P.; Chang, H.L.; Wu, J.J.; Yang, P.C.** (1999). Substantial decrease of heat-shock protein 90, precedes the decline of sperm motility during cooling of boar spermatozoa. *Theriogenology*, 51: 1007-1016.
- Hunter, R.H. y Rodríguez-Martínez, H.** (2002). Analysing mammalian fertilisation: reservations and potential pitfalls with an in vitro approach. *Zygote*, 10: 11-15.
- Iguer-Ouada, M. y Verstegen, J.P.** (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.* Pp:115-132.
- Ivanova, M. y Mollova, M.** (1993). Zona-penetration in vitro test for evaluating boar sperm fertility. *Theriogenology*, 40: 397-410.
- Iwamoto, T.; Hiroaki, H.; Furuichi, Y.; Wada, K.; Satoh, M.; Satoh, M.; Osada, T.; Gagnon, C.** (1995). Cloning of boar SPMI gene which is expressed specifically in seminal vesicle and codes for a sperm motility inhibitor protein. *FEBS Lett.*, 368: 420-424.
- Jagoe, J.R.; Washbrook, N.P.; Hudson, E.A.** (1986). Morphometry of spermatozoa using semiautomatic image analysis. *J. Clin. Pathol.*, 39: 1347-1352.
- Janick, J. y McLeod, J.** (1970). The measurements of human spermatozoa motility. *Fertil. Steril.*, 21: 140-146.
- Januskauskas, A.; Gil, J.; Söderquist, L.; Haard, M.G.M.; Haard, M.C.H.; Johannisson, A.** (1999). Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*, 52: 641-658.
- Januskauskas, A.; Johannisson, A.; Rodríguez-Martínez, H.** (2001). Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from swedish AI bulls. *Theriogenology*, 55: 947-961.
- Januskauskas, A.; Johannisson, A.; Rodríguez-Martínez, H.** (2003). Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, 60: 743-758.
- Januskauskas, A. y Rodríguez-Martínez, H.** (1995). Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen/thawed bull semen. *Acta Vet. Scand.*, 36: 571-574.
- Jecht, E.W. y Russo, J.J.** (1973). A system for the quantitative analysis of human sperm motility. *Andrologie*, 5: 215-221.
- Jeyendran, R.S.; van der Ven, H.H.; Pérez-Peláez, M.; Grabo, B.G.; Zaneveld, L.J.D.** (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.L.; Li, Q.W.; Li, W.Y.; Hu, J.H.; Zhao, H.W.; Zhang, S.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, J.E.; Boone, W.R.; Blackhurst, D.W. (1996a). Manual versus computer-automated semen analysis. Part I: comparison of counting chambers. *Fertil. Steril.*, 65: 150-155.

Johnson, J.E.; Boone, W.R.; Blackhurst, D.W. (1996b). Manual versus computer-automated semen analysis. Part III: Comparison of old versus new design MicroCell chambers. *Fertil. Steril.*, 65: 446-447.

Johnson, L.A.; Weize, K.F.; Fiser, P.; Maxwell, W.M.C. (2000). Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 143-172.

Johnson, L.A. (1998). Current developments in swine semen: preservation, artificial insemination and sperm sexing. *Proc. 15th Cong. Int. Pig. Vet. Soc.* 1: 225-230.

Johnson, L.A. (1985). Fertility results using frozen boar spermatozoa: 1970 to 1985. En: “*Deep freezing of boar semen*”. Eds: Johnson, L.A. y Larsson, K. Swedish university of agricultural sciences, Uppsala, Suecia. Pp: 199-222.

Jouannet, P.; Volochine, B.; Deguent, P.; Serres, C.; David, G. (1977). Light scattering determination of various characteristics parameters of spermatozoa motility in a series of human sperm. *Andrologia*, 9: 36-49.

Juonala, T.; Salonen, E.; Nurttila, T.; Andersson, M. (1999). Three fluorescence methods for assessing boar sperm viability. *Reprod. Dom. Anim.*, 34: 83-87.

Kaneto, M.; Harayama, H.; Miyake, M.; Kato. (2002). Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins. *Anim. Reprod. Sci.*, 73: 197-209.

Karow, A.M. (1997). Pharmacological interventions in vitro. En: “*Reproductive tissue banking*”. Eds: Karow, A.M. y Critser, J.K. Academic Press, San Diego, EEUU. Pp: 167-227.

Katkov, I.I. y Lulat, A.G. (2000). Do conventional CASA parameters reflect recovery of kinematics after freezing? “CASA paradox” in the analysis of recovery of spermatozoa after cryopreservation. *Cryoletters*, 21: 141-148.

Katz, D.F. y Dott, H.M. (1975). Methods of measuring swimming speed of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 45: 263-272.

Katz, D.F.; Davis, R.O.; Delandmeter, B.A.; Overstreet, J.W. (1985). Real-time analysis of sperm motion using automatic video image digitization. *Compt. Methods. Programs Biomed.*, 21: 173-182.

Kovacs, A. y Foote, R.H. (1992). Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotech. Histochem.*, 67: 119-124.

- Kraemer, M.; Fillion, C.; Martin-Pont, B.; Auger, J.** (1998). Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrack 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.
- Krause, W.** (1995). The significance of computer-assisted semen analysis (CASA) for diagnosis in andrology and fertility prognosis. *Int. J. Androl.*, 18: 32-35.
- Kuster, C.E.; Singer, R.S.; Althouse, G.C.** (2004). Determining sample size for the morphological assessment of sperm. *Theriogenology*, 61: 691-703.
- Lai, Y.M.; Lee, J.F.; Huang, H.Y.; Soong, Y.K, Pao, C.C.** (1997). The effect of human papillomavirus infection on sperm cell motility. *Fertil. Steril.*, 67: 1152-1155.
- Larsen, L.; Scheike, T.; Jensen, T.K.; Bonde, J.P.; Ernst, E.; Hjollund, N.H.; Zhou, Y.; Skakkebaed, N.E.; Giwercman, A.** (2000). Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish first pregnancy study team. *Hum. Reprod.*, 15: 1562-1567.
- Larson, J.L. y Miller, D.J.** (1999). Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol. Reprod. Dev.*, 52: 445-449.
- Larsson, B. y Rodríguez-Martínez, H.** (2000). Can we use in vitro fertilization test to predict semen fertility? *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61: 327-336.
- Larsson, K.; Einarsson, S.; Swensson, T.** (1977). The development of a practicable method for deep freezing of boar spermatozoa. *Nord. Vet. Med.*, 29: 113-118.
- Lasso, J.L.; Noiles, E.E.; Álvarez, J.G.; Storey, B.T.** (1994). Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *J. Androl.*, 15: 255-265.
- Le Lannou, D.; Griveau, J.F.; Le Pichon, J.P.; Quero, J.C.** (1992). Effects of chamber depth on the motion pattern of human spermatozoa in semen or in capacitating medium. *Hum. Reprod.*, 10: 1417-1421.
- de Leeuw, F.E.; Chen, H.C.; Colenbrander, B.; Verkleij, A.J.** (1990). Cold induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, 27: 171-183.
- Lefebvre, R. y Suárez, S.S.** (1996). Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biol. Reprod.*, 54: 575-582.
- Levin, R.M.; Shofer, J.; Greenberg, S.H.** (1980). A quantitative method for determining the effects of drugs on spermatozoa motility. *Fertil. Steril.*, 33: 631-635.
- Lindemann, C.B. y Gibbons, B.H.** (1975). Adenosine triphosphate-induced motility and sliding of filaments in mammalian sperm extracted with Triton X-100. *J. Cell. Biol.*, 65: 147-162.
- Lindemann, C.B. y Kanous, K.S.** (1989). Regulation of mammalian sperm motility. *Arch. Androl.*, 23: 1-22.

- Liu, D.Y.; Clarke, G.N.; Baker, H.W.** (1991). Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates in vitro. *J. Androl.*, 12: 231-239.
- López, M.L. y de Souza, W.** (1991). Distribution of filipin-sterol complexes in the plasma membrane of stallion spermatozoa during the epididymal maturation process. *Mol. Reprod. Dev.*, 28: 158-168.
- Lynham, J.A. y Harrison, R.A.P.** (1998). Use of stored pig eggs to assess boar sperm fertilizing functions in vitro. *Biol. Reprod.*, 58: 539-550.
- McClellan, R.V.; Holt, W.V.; Johnston, S.D.** (2007). Ultrastructural observations of cryoinjury in kangaroo spermatozoa. *Cryobiology*, 54: 271-280.
- Mack, S.O.; Tash, J.S.; Wolf, D.P.** (1989). Effect of measurement conditions on quantification of hyperactivated human sperm subpopulations by digital image analysis. *Biol. Reprod.*, 40: 1162-1169.
- Mack, S.O.; Wolf, D.P.; Tash, J.S.** (1988). Quantification of specific parameters of motility in large numbers of human sperm by digital image processing. *Biol. Reprod.*, 38: 270-281.
- MacQueen, J.B.** (1967). Some methods for classification and analysis of multivariate observations. En: "Proceedings of 5th Berkeley symposium on mathematical statistics and probability". Berkeley, EEUU. Pp: 281-297.
- Maes, D.G.; Mateusen, B.; Rijsselaere, T.; de Vlieghe, S.; van Soom, A.; de Kruif, A.** (2003). Motility characteristics of boar spermatozoa after addition of prostaglandin F₂ alpha. *Theriogenology*, 60: 1435-1443.
- Mahmoud, A.M.A.; Depoorter, B.; Piens, N.; Comhaire, F.H.** (1997). The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration. *Fertil. Steril.*, 68: 340-345.
- Makler, A.; MacLusky, N.J.; Chodos, A.; Haseltine, F.; 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.; Mohilever, J.** (1980). Sperm semi-autoanalysis by a combination multiple exposure photography (MEP) and computer techniques. *Int. J. Fertil.*, 25: 62-66.
- Maldjian, A.; Pizzi, F.; Gliozzi, T.; Cerolini, S.; Penny, P.; Noble, R.** (2005). Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology*, 63: 411-421.
- MAPA (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación).** 2007. WWW. mapa.es/es/ganaderia/pags/hechosydatos/cifras.htm.
- Marco-Jiménez, F.; Viudes de Castro, M.P.; Balasch, S.; Mocé, E.; Silvestre, M.A.; Gómez, E.A.; Vicente, J.S.** (2006). Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology*, 52: 295-304.
- Marin, S.; Chiang, K.; Bassilian, S.; Lee, W.N.; Boros, L.G.; Fernández-Novell.** (2003). Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Lett.*, 554: 342-346.

- Marshburn, P.B.; McIntire, D.; Carr, B.R.; Byrd, W.** (1992). Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. *Fertil. Steril.*, 58: 179-176.
- Martín-Rillo, S.; Martínez, E.; García-Artiga, C.; De Alba, C.** (1996). Boar semen evaluation in practise. *Reprod. Dom. Anim.*, 31: 519-526.
- Martín-Rillo, S.; de Alba-Romero, C.; Corcuera, B.; García-Artiga, C.; 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: 396-376.
- Martínez, E.A.; Vázquez, J.M.; Matás, C.; Roca, J.; Coy, P.; Gadea, J.** (1993). Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Theriogenology*, 40: 547-557.
- Martínez, E.A.; Roca, J.; Vázquez, J.M.; Lucas, X.; Gil, M.A.** (2001). Inseminación intrauterina profunda en la especie porcina: una nueva tecnología. En: “*III Cong. Ibérico Reprod. Anim.*”, Oporto, Portugal. Livro de resumos: 41-49.
- Martínez-Pastor, F.; García-Macías, V.; Álvarez, M.; Chamorro, C.; Herráez, P.; de Paz, P.; 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.; Díaz-Corujo, A.R.; Anel, E.; Herráez, P.; Anel, L.; 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.; Herráez, P.; Anel, L.; de Paz, P.** (2005b). Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. *Biol. Reprod.*, 72: 316-327.
- Matás, C.; Gadea, J.; Ruiz, S.; Romar, R.; Coy, P.; García, E.** (2006). Técnicas para la evaluación de la capacitación espermática. En: “*Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino.*” Eds: Bonet, S.; Martínez, E.; Rodríguez, J.E.; Barrera, X. Universidad de Gerona y Red temática nacional de reproducción porcina, Gerona, España. Pp: 153-164.
- Matás, C.; Martínez, E.; Vázquez, J.M.; Roca, J.; Gadea, J.** (1996). In vitro penetration assay of boar sperm fertility: effect o various factors on the penetrability of immature pig oocytes. *Theriogenology*, 46: 503-513.
- Mattioli, M.; Barboni, B.; Lucidi, P.; Seren, E.** (1996). Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. *Theriogenology*, 45: 373-381.
- Maxwell, W.M.C. y Johnson, L.A.** (1997a). Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.*, 46: 408-418.

Maxwell, W.M.C. y Johnson, L.A. (1997b). Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, 48: 209-219.

Maxwell, W.M.; Long, C.R.; Johnson, L.A.; Dobrinsky, J.R.; Welch, G.R. (1998). The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in presence or absence of seminal plasma. *Reprod. Fertil. Dev.*, 10: 347-357.

Mazur, P. (1985). Basic concepts in freezing cells. En: “*Deep freezing of boar semen*”. Eds: Johnson, L.A. y Larsson, K. Swedish university of agricultural sciences, Uppsala, Suecia. Pp: 91-111.

Mazur, P. (1965). Causes of injury in frozen and thawed cells. *Fed. Proc.*, 24: 175-182.

Medrano, A.; Watson, P.F.; Holt, W.V. (2002). Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Reproduction*, 123: 315-322.

Medrano, A. y Holt, W.V. (1988). Variación individual en la susceptibilidad del semen porcino al congelado-descongelado. *Arch. Zootec.*, 47: 319-327.

Miro, J.; Lobo, V.; Quintero-Moreno, A.; Medrano, A.; Pena, A.; Rigau, T. (2005). Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen. *Theriogenology*, 63: 1706-1716.

Mixner, J.P. y Saroff, J. (1954). Interference by glicerol with differential staining of bull spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, 37: 652.

Moore, H.D.M. y Hibbitt, K.G. (1977). Fertility of boars spermatozoa after freezing in the absence of seminal vesicular proteins. *J. Reprod. Fertil.*, 50: 349-352.

Morris, L.H.A. y Allen, W.R. (2002). Reproductive efficiency of intensively managed throughbred mares in Newmarket. *Equine Vet. J.*, 34: 51-60.

Mortimer, D.; Aitken, R.J.; Mortimer, S.T.; Pacey, A.A. (1995). Workshop report: clinical CASA—the quest for consensus. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7: 951-959.

Mortimer, D.; Curtis, E.F.; Dravland, J.E. (1987). Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *J. Reprod. Fertil.*, 81:127-135.

Mortimer, D. y Mortimer, S.T. (1988). Influence of system parameter settings on human sperm motility analysis using CellSoft. *Hum. Reprod.*, 3: 621-625.

Mortimer, D. (1990). Objective analysis of sperm motility and kinematics. En: “*Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility*”. Eds: Keel, B.A. y Webster, B.W. CRC Press, Boca Ratón, EEUU. Pp: 97-133.

Mortimer, S.T. y Mortimer, D. (1990). Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J. Androl.*, 11: 195-203.

- Mortimer, S.T. y Maxwell, W.M.** (2004). Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction*, 127: 285-291.
- Mortimer, S.T. y Swan, M.A.** (1999a). Effect of image sampling frequency on established and smoothing-independent kinematic values of capacitating human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 14: 997-1004.
- Mortimer, S.T. y Swan, M.A.** (1999b). The development of smoothing-independent kinematic measures of capacitating human sperm movement. *Hum. Reprod.*, 14: 986-996.
- Mortimer, S.T.; Swan, M.A.; Mortimer, D.** (1998). Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 13: 2139-2146.
- Mortimer, S.T.** (2000). CASA—practical aspects. *J. Androl.*, 21: 515-524.
- Mortimer, S.T.** (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movements in mammals. *Hum. Reprod. Update*, 3: 403-409.
- Moruzzi, J.F.; Wyrobek, A.J.; Mayall, B.H.; Gledhill, B.L.** (1988). Quantification and classification of human sperm morphology by computer-assisted image analysis. *Fertil. Steril.*, 50: 142-152.
- Müller, K.; Pomorski, T.; Müller, P.; Zachowski, A.; Herrmann, A.** (1999). Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryo treatment. *J. Cell. Sci.*, 112: 11-20.
- Nagy, S.; Hallap, T.; Johannisson, A.; Rodríguez-Martínez, H.** (2004). Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.*, 80: 225-235.
- Nagy, S.; Jansen, J.; Topper, E.K.; Gadella, B.M.** (2003). A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol. Reprod.*, 68: 1828-1835.
- Neild, D.M.; Gadella, B.M.; Chaves, M.G.; Miragaya, M.H.; Colenbrander, B.; Agüero, A.** (2003). Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*, 59: 1693-1705.
- Neuwinger, J.; Behre, H.M.; Nieschlag, E.** (1990a). Computerized semen analysis with sperm tail detection. *Hum. Reprod.*, 5: 719-723.
- Neuwinger, J.; Behre, H.M.; Nieschlag, E.** (1990b). External quality control in the andrology laboratory: an experimental multiventer trial. *Fertil. Steril.*, 54: 308-314.
- Neuwinger, J.; Knuth, U.A.; Nieschlag, E.** (1990c). Evaluation of the Hamilton-thorn 2030 motility analyser for routine semen analysis in an infertility clinic. *Int. J. Androl.*, 13: 100-109.
- Nishizano, H.; Shioda, M.; Takeo, T.; Irie, T.; Nagaka, N.** (2004). Decrease of fertilizing ability of mouse spermatozoa after freezing and thawing is related to cellular injury. *Biol. Reprod.*, 71: 973-978,

Nolan, J.P. y Hammerstedt, R.H. (1997). Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *FASEB J.*, 11: 670-682.

Núñez-Martínez, I.; Morán, J.M.; Peña, F.J. (2006). A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. *Reprod. Dom. Anim.*, 41: 408-415.

Olds-Clarke, P. y Segó, R. (1992a). Calcium alters capacitation and progressive motility of uterine spermatozoa from +/+ and congenic tw32/+ mice. *Biol. Reprod.*, 47: 629-635.

Olds-Clarke, P. y Wivell, W. (1992b). Impaired transport and fertilization in vivo of calcium-treated spermatozoa from +/+ or congenic tw32/+ mice. *Biol. Reprod.*, 47: 621-628.

Ombelet, W.; Menkveld, R.; Kruger, T.F.; Steeno, O. (1995). Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. *Hum. Reprod. Update*, 1: 543-557.

Ombelet, W.; Pollet, H.; Bosmans, E.; Vereecken, A. (1997). Results of a questionnaire on sperm morphology assessment. *Hum. Reprod.*, 12: 1015-1020.

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.W.; Katz, D.F.; Hanson, F.W.; Fonseca, J.R. (1979). A simple, inexpensive method for objective assessment of human sperm movement characteristics. *Fertil. Steril.*, 31: 162-172.

Paquignon, M. y Courot, M. (1976). Fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa. En: "*Proc. 8th Int. Cong. Anim. Reprod. A.I.*" 4: 1041-1044.

Parks, J.E.; Arion, J.E.; Foote, R.H. (1987). Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 37: 1249-1258.

Parks, J.E. y Graham, J.K. (1992a). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38: 209-222.

Parks, J.E. y Linch, D.V. (1992b). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29: 255-266.

Parks, J.E. (1997). Hypothermian and mammalian gametes. En: "*Reproductive tissue banking: scientific principles.*" Eds: Karow, A.M. y Critser, J.K. Academic Press, San Diego, EEUU. Pp: 229-261.

Pasteur, X.; Sabido, O.; Maubon, I.; Perrin-Cottier, M.; Laurent, J.L. (1991). Quantitative assessment of chromatin stability alteration in human spermatozoa induced by freezing and thawing. A flow cytometric study. *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, 13: 383-390.

Paulenz, H. y Hofmo, P.O. (1996). Routine assessment of sperm concentration at a boar A.I. station using a Coulter Counter. *Reprod. Dom. Anim.*, 31: 257-258.

- Paulenz, H.; Söderquist, L.; Pérez-Pé, R.; Berg, K.A.** (2002). Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*, 57: 823-836.
- Pedigo, N.G.; Vernon, M.W.; Curry T.E. jr.** (1989). Characterization of a computerized semen analysis system. *Fertil. Steril.*, 52: 659-666.
- Peláez, J.; Breininger, E.; Alegre, B.; Peña, F.J.; Domínguez, J.C.** (2006). In vitro evaluation of the quality and fertilizing capacity of boar semen frozen in 0.25 ml straws. *Reprod. Dom. Anim.*, 41: 153-161.
- Peláez, J.** (2003). Criopreservación de semen porcino: aportaciones al estudio de la calidad seminal y la capacidad fecundante. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de León, España.
- Peña, F.J.; Johannisson, A.; Wallgren, M.; Rodríguez-Martínez, H.** (2005a). A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. *Int. J. Androl.*, 28: 107-114.
- Peña, F.J.; Saravia, F.; García-Herreros, M.; Núñez-Martínez, I.; Tapia, J.A.; Johannisson, A.; Wallgren, M.; Rodríguez-Martínez, H.** (2005b). Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality. *J. Androl.*, 26: 716-723.
- Peña, F.J.; Johannisson, A.; Wallgren, M.; Rodríguez-Martínez, H.** (2003a). 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.J.; Johannisson, A.; Wallgre, M.; Rodríguez-Martínez, H.** (2003b). Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theriogenology*, 60: 677-689.
- Peña, F.J. y Rodríguez-Martínez, H.** (2006). Citometría de flujo: aplicaciones en el estudio del espermatozoide. En: “Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino”. Eds: Bonet, S.; Martínez, E.; Rodríguez, J.E.; Barrera, X. Universidad de Gerona y Red temática nacional de reproducción porcina. Gerona, España. Pp: 133-144.
- Pérez-Llano, B.; Yenes-García, P.; García-Casado, P.** (2003). Four subpopulations of boar spermatozoa defined according to their response to the short hypoosmotic swelling test and acrosome status during incubation at 37 °C. *Theriogenology*, 60: 1401-1407.
- Pérez-Llano, B.; González, J.L.; Clemente, M.J.; García-Casado, P.** (1999). El test de endósmosis (HOST) en semen de ganado porcino. *Albéitar*, 30: 16-17.
- Pérez-Llano, B.; González, J.L.; García-Casado, P.** (1998). Nueva técnica de ORT corta para su evaluación. *Albéitar*, 21: 6-7.
- Pérez-Llano, B.; Lorenzo, J.L.; Yenes, P.; Trejo, A.; García-Casado, P.** (2001). A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology*, 56: 387-398.

- Pérez-Sánchez, F.; de Monserrat, J.J.; Soler, C.** (1994). Morphometric analysis of human sperm morphology. *Int. J. Androl.*, 17: 248-255.
- Petrunkina, A.M. y Topfer-Petersen, E.** (2000). Heterogeneous osmotic behaviour in boar sperm populations and its relevance for detection of changes in plasma membrane. *Reprod. Fertil. Dev.*, 12: 297-305.
- Petrunkina, A.M.; Simon, K.; Gunzel-Apel, A.R., Topfer-Petersen, E.** (2004). Requirement for an intact cytoskeleton for volume regulation in boar spermatozoa. *Reproduction*, 127: 105-115.
- Pinart, E.; Bussalleu, E.; Yeste, M.; Briz, M.; Sancho, S.; García-Gil, N.; Bassols, J.; Pruneda, A.; Casas, I.; Bonet, S.** (2006). Protocolo de triple marcaje con fluorocromos para el análisis funcional de los espermatozoides de porcino. En: *“Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino”*. Eds: Bonet, S.; Martínez, E.; Rodríguez, J.E.; Barrera, X. Universidad de Gerona y Red temática nacional de reproducción porcina. Gerona, España. Pp: 81-92.
- Polge, C.** (1985). Sperm freezing, past, present and future. En: *“Deep freezing of boar semen”*. Eds: Johnson, L.A. y Larsson, K. Swedish university of agricultural sciences, Uppsala, Suecia. Pp: 167-173.
- Polge, C.; Salomon, S.; Wilmut, I.** (1970). Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet. Rec.*, 87: 424-428.
- Poulos, A. y White, I.G.** (1973). The phospholipid composition of human spermatozoa and seminal plasma. *J. Reprod. Fertil.*, 35: 265-272.
- Pratap, N.; Reddy, V.N.V.; Sarma, P.A.; Honnappa, T.G.** (2000). Employment of the hypoosmotic swelling test (HOST) to evaluate sperm membrane integrity of fresh and frozen buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Buffalo J.*, 16: 207-213.
- Pursel, V.G. y Johnson, L.A.** (1974). Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology*, 1: 63-67.
- Pursel, V.G. y Johnson, L.A.** (1971). Procedure for the preservation of boar spermatozoa by freezing. *USDA ARS bull*, 44: 1-5.
- Pursel, V.G. y Johnson, L.A.** (1975). Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.*, 40: 99-102.
- Quintero-Moreno, A.** (2003a). Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Tesis doctoral. Universidad autónoma de Barcelona. España
- Quintero-Moreno, A.; Rigau, T.; Rodríguez-Gil, J.E.** (2007). Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulations in rabbit semen to predict semen fertility and litter size. *Reprod. Dom. Anim.*, 42: 312-319.
- Quintero-Moreno, A.; Rigau, T.; Rodríguez-Gil, J.E.** (2004). Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology*, 61: 673-690.

- Quintero-Moreno, A.; Miró, J.; Rigau, T.; Rodríguez-Gil, J.E.** (2003b). Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, 59: 1973-1990.
- Ramesha, K.P.; Krishnamurthy, L.; Reddy, A.O.; Rao, M.K.; Balakrishnan, C.R.** (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.; Rodríguez-Gil, J.E.** (2006). OC5 filtration through sephadex columns does not alter subpopulation characteristics in fresh boar semen. *Reprod. Dom. Anim.*, 41: 104.
- Ramos, L.; Hendriks, J.C.; Peelen, P.; Braat, D.D.; Wetzels, A.M.** (2002). Use of computerized karyometric image analysis for evaluation of human spermatozoa. *J. Androl.*, 23:882-888.
- Rasul, Z.; Ahmad, N.; Anzar, M.** (2001). Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J. Androl.*, 22: 278-283.
- Rathi, R.; Colenbrander, B.; Bevers, M.M.; Gadella, B.M.** (2001). Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 65: 462-470.
- Rathi, R.; Nielen, M.; Cheng, F.P.; van Buiten, Colenbrander, B.** (2000). Exposure of progesterone receptors on the plasma membranes of stallion spermatozoa as a parameter for prediction of fertility. *J. Reprod. Fert.*, 56: 87-91.
- Reed, H.C.B.** (1985). Current use of frozen boar semen-Future need of frozen boar semen. En: "Deep freezing of boar semen". Eds: Johnson, L.A. y Larsson, K. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suecia. Pp: 225-237.
- Rees, J.M.; Ford, W.; Hull, M.** (1990). Effect of caffeine and pentoxifyllene on the motility and metabolism of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 90: 147-156.
- Rigau, T.; Piedrafita, J.; Reverter, A.; Canal, M.; Rodríguez-Gil, J.E.** (1996). The rate of L-lactate production: feasible parameter for the fresh diluted boar semen quality analysis. *Anim. Reprod. Sci.*, 43: 161-172.
- Rijsselaere, T.; van Soom, A.; Hoflack, G.; Maes, D.; de Kruif, A.** (2004). Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser. *Theriogenology*, 62: 1292-1306.
- Rijsselaere, T.; van Soom, A.; Maes, D.; de Kruif, A.** (2003). Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology*, 60: 1553-1568.
- Rivera, M.M.; Quintero-Moreno, A.; Barrera, X.; Palomo, M.J.; Rigau, T.; Rodríguez-Gil, J.E.** (2005). Natural mediterranean photoperiod does not affect the main parameters of boar-semen quality analysis. *Theriogenology*, 64: 934-946.

- Rivera, M.M.; Quintero-Moreno, A.; Barrera, X.; Rigau, T.; Rodríguez-Gil, J.E.** (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. Dom. Anim.*, 41: 386-393.
- Roca, J.; Hernández, M.; Carvajal, G.; Vázquez, J.M.; Martínez, E.A.** (2006). Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J. Anim. Sci.*, 84: 2692-2699.
- Roca, J.; Rodríguez, M.J.; Gil, M.A.; Carvajal, G.; García, E.M.; Cuello, C.; Vázquez, J.M.; Martínez, E.A.** (2005). Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J. Androl.*, 26: 15-24.
- Roca, J.; Martínez, E.A.; Vázquez, J.M.; Vázquez, J.L.** (2000). Cryopreservation of pig spermatozoa: new trends for its commercial application. En: "4th Annual Conf. European Soc. Dom. Anim. Reprod." Praga, Rep. Checa. ESDAR newsletter 5:7.
- Rodríguez-Gil, J.E.; Montserrat, A.; Rigau, T.** (1994). Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology*, 42: 815-829.
- Rodríguez-Martínez, H.** (2003a). El transporte espermático en la cerda: ¿Qué nos enseña para la evaluación y uso de espermatozoides en la inseminación artificial?. En: "Memorias del IV congreso ibérico de reproducción animal". Las Palmas de Gran Canaria, España. Pp: 19-29.
- Rodríguez-Martínez, H.** (2003b). Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod. Dom. Anim.*, 38: 312-318.
- Rodríguez-Martínez, H.; Eriksson, B.; Lundengeim, N.** (1996). Freezing boar semen in flat plastic bags, membrane integrity and fertility. *Reprod. Dom. Anim.*, 31: 161-168.
- Rodríguez-Martínez, H.** (2006). Can we increase the estimative value of semen assessment?. *Reprod. Dom. Anim.*, 41: 2-10.
- Rodríguez-Martínez, H.** (2005). Predicción in vitro de la fertilidad de los verracos. *Porci*, 85: 7-19.
- Rodríguez-Martínez, H.** (2001). Sperm function in cattle and pigs: morphological and functional aspects. *Arch. Animal Breed.*, 44: 102-113.
- Rodríguez-Martínez, H.** (1999). Nuevas tendencias de evaluación de la fertilidad en el macho. En: "II congreso Ibérico de reproducción animal". Lugo, España. Libro de ponencias y comunicaciones: 302-316.
- Rothschild, L. y Swann, M.** (1949). The fertilization reaction in the sea urchin egg. *J. Exp. Biol.*, 26: 164-169.
- Roldan, E.R.S.; Cassinello, J.; Abaigar, T.; Gomendio, M.** (1998). Inbreeding, fluctuating asymmetry and ejaculate quality in an endangered ungulate. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 265: 243-248.

- Rota, A.; Peña, A.I.; Linde-Forsberg, C.; 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.
- Royère, S.; Hamamah, J.C.; Nicolle, C.; Barhelemy, J.; Lansac, J.** (1988). Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: fluorescence acridine orange staining and Feulgen-DNA cytophotometric studies. *Gamete Res.*, 21: 51-57.
- Royère, D.; Hamamah, S.; Nicolle, J.C.; Lansac, J.** (1991). Cryopreservation and chromatin alterations during freezing-thawing human sperm. En: "Comparative spermatology twenty years after". Eds: Baccetti, B. Serono symposia publications from Raven press, Nueva York, EEUU. Vol. 75: 893-897.
- Rubes, J.; Lowe, X.; Moore, D.; Perreault, S.; Slott, V.; Evenson, D.; Selevan, S.G.; Wyrobek, A.J.** (1998). Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men. *Fertil. Steril.*, 70: 715-723.
- Rubio-Guillén, J.; Gonzalez, D.; Garde, J.J.; Estes, M.C.; Fernández Santos, M.R.; Rodríguez-Gil, J.E.; Madrid-Bury, N.; Quintero-Moreno, A.** (2007). Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reprod. Dom. Anim.*, 42: 354-357.
- Sackee, R.G.; Dalton, J.; Nadir, S.; Nebel, R.L.; Bame, J.** (2000). Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61: 663-677.
- Sáiz, C.F. y Marigorta, V.P.** (2003). Resultados bioquímicos de la analítica seminal. En: "Memorias del XXVI curso internacional de reproducción animal", Instituto nacional de investigación agraria y alimentaria, Madrid, España. Pp: 285-297.
- Saling, P.M. y Storey, B.T.** (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.
- Samper, J.C., Hellander, J.C.; Crabo, B.G.** (1991). Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *J. Reprod. Fertil.*, 44: 107-114.
- Sancho, M.; Pérez-Sánchez, F.; Tablado, L.; de Monserrat, J.J.; Soler, C.** (1998). Computer assisted morphometric analysis of ram sperm heads: evaluation of different fixative techniques. *Theriogenology*, 50: 27-37.
- Sanocka, D. y kurpysz, M.** (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 23: 2-12.
- Saravia, F.; Hernández, M.; Wallgren, M.; Johannisson, A.; Rodríguez-Martínez, H.** (2007). Controlled cooling during semen cryopreservation does not induce capacitation of spermatozoa from two portions of the boar ejaculates. *Int. J. Androl.*, 30: 485-499.

Saravia, F.; Wallgren, M.; Nagy, S.; Johannisson, A.; Rodríguez-Martínez, H. (2005). Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology*, 63: 1320-1333.

van der Schans, G.P.; Haring, R.; van Dijk-Knijenburg, H.C.; Bruijnzeel, P.L.; den Ders, N.H. (2000). An immunochemical assay to detect DNA damage in bovine sperm. *J. Androl.*, 21: 250-257.

Schembre, M.A.; Mayor, D.A.; Suttie, J.J.; Maxwell, W.M.; Evans, G. (2002). Capacitation-like changes in equine spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, 14: 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.; 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, España. Pp: 77.

Schilling, E.; Vengust, M.; Smidt, D. (1984). ORT: un nuevo sistema para predecir la congelabilidad y la capacidad de almacenamiento de los espermatozoides de verraco. En: "*Proc. 8th IPVS Congress*", Belgica. Pp: 346.

Schmassmann, A.; Mikuz, G.; Bartsch, G.; Rohr, H. (1982). Spermometrics: objective and reproducible methods for evaluating sperm morphology. *Eur. Urol.*, 8: 274-279.

Schmidt, H. y Kamp, G. (2004). Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction*, 128: 171-179.

Scharaeder, S.M.; Chapin, R.E.; Clegg, E.D.; Davis, R.O.; Fourcroy, J.L.; Katz, D.L.; Rothmann, S.A.; Roth, G.; Turner, T.W.; Zinaman, M. (1992). Laboratory methods for assessing human sperm quality in epidemiologic studies. *Reprod. Toxicol.*, 6: 275-279.

Seaman, E.K.; Goluboff, E.; Barchama, N.; Fisch, H. (1996). Accuracy of semen counting chambers as determined by the use of latex beads. *Fertil. Steril.*, 66: 662-665.

Selles, E.; Gadea, J.; Romar, R.; Matás, C.; Ruiz, S. (2003). Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Reprod. Dom. Anim.*, 38: 66-72.

Senger, P.L. (2005). *Pathways to pregnancy and parturition, second edition*. Ed: Senger, P.L. Current Conceptions, inc. Pullman, Washington, EEUU.

Serres, C.; Jouannet, P.; David, G. (1984). Influence of the flagellar wave development and propagation on the human sperm movement in seminal plasma. *Gamete Res.*, 9: 183-185.

Shamsuddin, M. y Larsson, B. (1993). In vitro development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors. *Reprod. Dom. Anim.*, 28: 77-84.

- Shang, X.J.; Ye, Z.Q.; Xiong, C.L.; Huang, D.H.; Wang, Y.M.** (2003). Analysis of the changes of movement function and viability in human spermatozoa induced by reactive oxygen species. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 9: 439-442.
- Sherins, R.J.** (1991). Clinical use and misuse of automated semen analysis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 637: 424-435.
- Shibahara, H.; Obara, H.; Ayustawati, T.; Hirano, Y.; Suzuki, T.; Ohno, A.; Takamizawa, S.; Suzuki, M.** (2004). Prediction of pregnancy by intrauterine insemination using CASA estimates and strict criteria in patients with male factio infertility. *Int. J. Androl.*, 27: 63-68.
- Silva, P.F.N. y Gadella, B.M.** (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65: 958-978.
- Skinner, M.K.** (1991). Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Rev.* 12: 45-77.
- Slott, V.L.; Suárez, J.D.; Poss, P.M.; Linder, R.E.; Strader, L.F.; Perrault, S.D.** (1993). Optimization of the Hamilton-Thorne computerized sperm motility analysis sytem for use with rat spermatozoa in toxicological studies. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 21: 298-307.
- Sokoloski, J.E.; Blasco, L.; Storey, B.T.; Wolf, D.P.** (1977). Turbidometric analysis of human sperm motility. *Fertil. Steril.*, 28: 1337-1341.
- Soler, C.; Gadea, B.; Soler, A.J.; Fernández-Santos, M.R.; Estes, M.C.; Núñez, J.; Moreira, P.N.; Núñez, M.; Gutiérrez, R.; Sancho, M.; Garde, J.J.** (2005). Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red deer sperm morphometry by computerized analysis with ISAS. *Theriogenology*, 64:1236-1243.
- Soler, C.; Núñez, J.; Núñez, M.; Sancho, M.; Gutiérrez, R.** (2006). Técnicas de análisis computerizado de semen. En: *"Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino"*. Eds: Bonet, S.; Martínez, E.; Rodríguez, J.E.; Barrera, X. Universidad de Gerona y Red temática nacional de reproducción porcina. Gerona, España. Pp: 51-68.
- Soler, C.; Pérez-Sánchez, F.; Schulze, H.; Bergmann, M.; Oberpenning, F.; Yeung, C.; Cooper, T.G.** (2000). Objective evaluation of the morphology of human epididymal sperm heads. *Int. J. Androl.*, 23: 77-84.
- Soler, C.; Yeung, C.H.; Cooper, T.G.** (1994). Development of sperm motility patterns in the murine epididymis. *Int. J. Androl.*, 17: 271-278.
- Spiropoulos, J.** (2001). Computerized semen analysis (CASA): effect of semen concentration and chamber depth on measurements. *Arch. Androl.*, 46: 37-42.
- Steinholt, H.C.; Chandler, J.E.; Tirado, V.** (1991). Evaluating acrosome reaction steps with brightfield and differential interference contrast microscopy techniques. *J. Dairy. Sci.*, 74: 3822-3826.
- Strzerek, J.** (2002). Secretory activity of boar seminal vesicles glands. *Reproductive Biol.*, 2-3: 243-266.

Suárez, S.S.; Dai, X.-B.; DeMott, R.P.; Redfern, K.; Mirando, M.A. (1992). Movement characteristics of boar sperm obtained from the oviduct or hyperactivated *In Vitro*. *J. Androl.*, 13:75-80.

Suárez, S.S.; Katz, D.F.; Overstreet, J.W. (1983). Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization. *Biol. Reprod.*, 29: 1277-1287.

Sukcharoen, N.; Keith, J.; Irvine, D.S.; Aitken, R.J. (1996). Prediction of the in-vitro (IVF) potential of human spermatozoa using sperm function test: the effect of the delay between testing and IVF. *Hum. Reprod.*, 11: 1030-1034.

Sukcharoen, N.; Keith, J.; Irvine, D.S.; Aitken, R.J. (1995). Definition of the optimal criteria for identifying hyperactivated human spermatozoa at 25 Hz using in-vitro fertilization as a functional end-point. *Hum. Reprod.*, 10: 2928-2937.

Suzuki, K.; Geshi, M.; Yamauchi, N.; Nagai, T. (2003). Functional changes and motility characteristics of Japanese Black Bull spermatozoa separated by Percoll. *Anim. Reprod. Sci.*, 3-4: 157-172.

Swierstra, E.E. (1968). Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoa transit through the epididymis. *Anat. Rec.*; 161: 171-186.

Szasz, F.; Sirivaidyapong, S.; Cheng, F.P.; Voorhout, W.F.; Marks, A.; Colenbrander, B. (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.

Tablado, L.; Pérez-Sánchez, F.; Núñez, J.; Núñez, M.; Soler, C. (1998). Effects of exposure to static magnetic fields on the morphology and morphometry of mouse epididymal sperm. *Bioelectromagnetics*, 19: 377-383.

Taitzoglou, I.A.; Chapman, D.A.; Zervos, I.A.; Killian, G.J. (2004). Effect of plasmin on movement characteristics of ejaculated bull spermatozoa. *Theriogenology*, 62: 553-561.

Tan, L.F.; Wang, S.L.; Sun, X.Z.; Li, Y.N.; Wang, Q.L.; Ji, J.M.; Chen, L.S.; Wang, X.R. (2002). Effects of fenvalerate exposure on the semen quality of occupational workers. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 8: 273-276.

Tatemoto, H.; Horiuchi, T.; Maeda, T.; Terada, T.; Tsutsumi, Y. (1994). Penetration by bull spermatozoa into the zona pellucida of dead bovine oocytes recovered from frozen-thawed ovaries. *Theriogenology*, 42: 465-474.

Tejerina, F.; Domínguez, J.C.; González Urdiales, R.; Alegre, B.; Alegre, E.; Castejón, M.; Ferreras, A.; Cárdenas, S.; Bernal, S.; Campos, J. (2005). Morphometric characterization of the boar sperm head by using a Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) programme. *Reprod. Dom. Anim.*, 40: 368-369.

Tejerina, F.; González Urdiales, R.; Alegre, B.; Castejón, M.; Martín, A.J.; Cárdenas, S.; García, J.C.; Bernal, S.; Domínguez, J.C. (2006a). Measure of sperm concentration in boar ejaculates: traditional systems versus the new Nucleocounter. *Reprod. Dom. Anim.*, 41: 113.

- Tejerina, F.; González, R.; Alegre, B.; Alegre, E.; Castejón, M.; Martín, A.J.; Cárdenas, S.; García, J.C.; Abad, F.; Domínguez, J.C.** (2006b). Video camera as source of variation of the motility parameters from computer analysis of boar semen. *Reprod. Dom. Anim.*, 41: 114.
- Thilmant, P.** (1997). Congélation du sperm de verrat en paillette de 0,5 ml. Résultats sur le terrain. *Ann. Méd. Vet.*, 141: 457-462.
- Thomas, A.D.; Meyers, S.A.; Ball, B.A.** (2006). Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology*, 65: 1531-1550-
- Thomas, C.A.; Garner, D.L.; DeJarnette, J.M.; Marshall, C.E.** (1998). Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.*, 58: 786-793.
- Thomas, C.A.; Garner, D.L.; DeJarnette, J.M.; Marshall, C.E.** (1997). Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 56: 991-998.
- Thundathil, J.; Gil, J.; Januskauskas, A.; Larsson, B.; Soderquist, L.; Mapletoft, R.; Rodríguez-Martínez, H.** (1999). Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed bull semen and fertility with artificial insemination. *Int. J. Androl.*, 22: 366-373.
- Thurston, L.M.; Holt, W.V.; Watson, P.F.** (2003). Post-thaw functional status of boar spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison. *Theriogenology*, 60: 101-113.
- Thurston, L.M.; Siggins, K.; Mileham, A.J.; Watson, P.F.; Holt, W.V.** (2002). Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biol. Reprod.*, 66: 545-554.
- Thurston, L.M.; Watson, P.F.; Mileham, A.J.; Holt, W.V.** (2001). Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J. Androl.*, 22: 382-394.
- Topfer-Petersen, E.; Januschke, E.; Schmoeckel, C.; Schill, W.B.** (1984). Ultrastructural localization of lectin binding sites of the acrosomal membrane system of boar spermatozoa. *Andrologia*, 16: 322-332.
- Toth, G.P.; Stober, J.A.; Read, E.J.; Zenick, H.; Smith, K.** (1989). The automated analysis of rat sperm motility following subchronic epichlorhydrin administration: methodologic and statistical considerations. *J. Androl.*, 10: 401-415.
- Turner, R.M.** (2006). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod. Fertil. Dev.*, 18: 25-38.
- Turner, R.M.** (2003). Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? *J. Androl.*, 24: 790-803.
- Upreti, G.C.; Payne, S.R.; Duganzich, D.M.; Oliver, J.E.; Smith, J.F.** (1996). Enzyme leakage during cryopreservation of ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 41: 27-36.

- Valcárcel, A.; de las Heras, M.A.; Pérez, L.; Moses, D.F.; Baldassarre, H.** (1997). Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/hoeschst 33258 staining. *Anim. Reprod. Sci.*, 41: 483-489.
- Vantman, D.; Koukoulis, G.; Dennison, L.; Zinaman, M.; Sherins, R.J.** (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.
- Vázquez, J.M.; Martínez, E.; Roca, J.; Coy, P.; 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.M.; Martínez, E.A.; Martínez, P.; García-Artiga, C.; Roca, J.** (1997). Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology*, 47: 913-922.
- Vázquez, J.M.; Martínez, E.A.; Roca, J.; Vázquez, J.L.; Lucas, X.; Gil, M.A.** (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.". Estocolmo, Suecia. 2: 289.
- Verheyen, G.; Joris, H.; Crits, K.; Nagy, Z.; Tounare, H.; van Steirteghem, A.** (1997). Comparison of different hypo-osmotic swelling solutions to select viable immotile spermatozoa for potential use in intracytoplasmic sperm injection. *Human. Reprod. Update*, 3: 195-203.
- Verstegen, J.; Iguer-Ouada, M.; Onclin, K.** (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practise. *Theriogenology*, 57: 149-179.
- Vine, M.F.; Setzer, R.W. jr; Everson, R.B.; Wyrobek, A.J.** (1997). Human sperm morphometry and smoking, caffeine, and alcohol consumption. *Reprod. Toxicol.*, 11: 179-184.
- Vyt, P.; Maes, D.; Dejonckheere, E.; Castryck, F.; van Soom, A.** (2004a). Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. *Reprod. Dom. Anim.*, 39: 8-12.
- Vyt, P.; Maes, D.; Rijsselaere, T.; Dejonckheere, E.; Castryck, F.; van Soom, A.** (2004b). Motility assessment of porcine spermatozoa: a comparison of methods. *Reprod. Dom. Anim.*, 39: 447-453.
- Waberski, D.; Magnus, F.; Ardon, F.; Petrunkina, A.M.; Weitze, K.F.; Topfer-Petersen, E.** (2006). Binding of boar spermatozoa to oviductal epithelium in vitro in relation to sperm morphology and storage time. *Reproduction*, 131: 311-318.
- Wagner, H.G. y Thibier, M.** (2000). World statistics for artificial insemination in small ruminants and swine. En: "Proc. 14th Int. Cong. Anim. Reprod.". Estocolmo, Suecia. 2: 77.
- Wang, A.W.; Zhang, H.; Ikemoto, I.; Andersson, D.J.; Loghlin, K.R.** (1997). Reactive oxygen species generation by seminal cell during cryopreservation. *Urology*, 49: 921-925.
- Wang, C.; Leung, A.; Tsoi, W.L.; Leung, J.; Ng, V.; Lee, K.F.; Chan, S.Y.** (1991). Computer-assisted assessment of human sperm morphology: comparison with visual assessment. *Fertil. Steril.*, 55: 983-988.

- Ward, C.R. y Storey, B.T** (1984). Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescent assay. *Dev. Biol.*, 104: 287-296.
- Watson, P.F. y Plummer, J.M.** (1985). The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. En: "Deep freezing of boar semen". Eds: Johnson, L.A. y Larsson, K. Swedish university of agricultural sciences, Uppsala, Suecia. Pp: 113-127.
- Watson, P.F.** (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." Viena, Austria. ESDAR newsletter 6: 24-25.
- Watson, P.F.** (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61: 481-492.
- Watson, P.F.** (1996). Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod. Dom. Anim.*, 31: 135-140.
- Watson, P.F.** (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7: 871-891.
- Watson, P.F.** (1990). Artificial insemination and the preservation of semen. En: "Marshall's physiology of reproduction. 4th edition. Vol. 2: Reproduction in the male". Ed: Lamming, G.E. Churchill Livingstone, New York, EEUU. Pp: 747-869.
- Watson, P.F.** (1975). Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes o frozen ram spermatozoa. *Vet. Rec.*, 97: 12-15.
- Weitze, K.F.; Rabeler, J.; Willmen, T.; Waberski, D.** (1990). Interaction between inseminate, uterine and ovarian function in the sow. I: Influence of seminal plasma and strogens in the inseminate on intragenital transport, time of ovulation and fertility in gilts. *Reprod. Dom. Anim.*, 25: 191-196.
- Wells, M.E. y Awa, O.A.** (1970). New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, 53: 227-233.
- Westendorf, P.; Richter, L.; Treu, H.** (1975). Zur tiefgefrierung von ebersperma Labor-und Besamungsergebnisse mit dem Hulsengerger Pailletten-Verfahren. *Dtsch. Tierarztl. Wschr.*, 82: 261-300.
- Westhoff, D.; Kamp, G.** (1997). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is bound to the fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *J. Cell. Sci.*, 110: 1821-1829.
- Welzels, A.M.; Janssen, H.J.; Goverde, H.J.; Bastiaans, B.A.; Takahashi, K.; Rolland, R.** (1993). The influence of sperm density on the motility characteristics of washed human spermatozoa. *Int. J. Androl.*, 16: 15-19.
- Wheeler, M.B. y Seidel, G.D.** (1987). Zona pellucida penetration assay for capacitation of bovine sperm. *Gamete Res.*, 18: 237-250.

- White, I.G.** (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod. Fert. Dev.*, 5: 639-658.
- Williams, A.C. y Ford, W.C.** (2001). The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. *J. Androl.*, 22: 680-695.
- Williamson, P.; Mattocks, K.; Schlegal, R.A.** (1983). Merocyanine 540, a fluorescent probe sensitive to lipid packaging. *Biochim. Biophys. Acta*, 732: 387-393.
- Woelders, H.; Matthijs, A.; den Besten, M.** (1996). Variation in "freezability" of boar semen. *Reprod. Dom. Anim.*, 31: 153-159.
- Woelders, H.** (1997). Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Vet. Quart.*, 19: 135-138.
- Woelders, H.** (1990). Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. *Reprod. Dom. Anim.*, 145:164.
- Working, P.K. y Hurtt, M.E.** (1987). Computerized videomicrographic analysis of rat sperm motility. *J. Androl.*, 8: 330-337.
- World Health Organization (WHO).** (1999). WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Ed: World Health Organization. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra.
- Wrobel, K-H; Dellmann H-D.** (1993) Sistema reproductor masculino. En: "*Histología veterinaria. Segunda edición.*" Eds: Dellmann H-D . Acribia S.A., Zaragoza, España. Pp: 245-266.
- Yanagida, K.; Hoshi, K.; Sato, A.; Burkman, L.** (1990). Automated semen analysis shows an increase in sperm concentration and motility with time in Makler chambers having a excess sample volume. *Hum. Reprod.*, 5: 193-196.
- Yanagimachi, R.; Yanagimachi, H.; Rogers, B.J.** (1976). The use of zona-free animal ova as a test- system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 15: 471-476.
- Yanagimachi, R.** (1994). Mammalian fertilization. En: "*Physiology of reproduction. Second edition.*". Eds: Knobil, E. y Neill, J.K. Raven Press Ltd, New York, EEUU. Pp: 189-317.
- Yanagimachi, R.** (1970). The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J. Reprod. Fertil.*, 23: 193-196.
- Yeung, C.H. y Nieschlag, E.** (1993). Performance and comparison of CASA systems equipped with different phase-contrast optics. *J. Androl.*, 14: 222-228.
- Yeung, C.H.; Oberlander, G.; Cooper, T.G.** (1992). Characterization of the motility of maturing rat spermatozoa by computer-aided objective measurement. *J. Reprod. Fertil.*, 96: 427-441.

- Yoshida, M.** (2000). Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61: 349-355.
- Zaneveld, L.J.D. y Jeyendran, R.S.** (1990). Hypoosmotic swelling test. En: “*Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility*”. Eds: Keel, B.A. y Webster, B.W. CRC press, Boca Ratón, Florida, EEUU. Pp: 91-110.
- Zeng, W.X. y Terada, T.** (2001). Protection of boar spermatozoa from cold shock damage by 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Theriogenology*, 55: 615-627.
- Zhang, B.R.; Larsson, B.; Lundeheim, N.; Haard, M.G.M., Rodríguez-Martínez, H.** (1999). Prediction of bull fertility by combined in vitro assessment of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering and AI-program. *Int. J. Androl.*, 22: 253-260.
- Zhang, B.R.; Larsson, B.; Lundeheim, N.; Rodríguez-Martínez, H.** (1998). Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. *Int. J. Androl.*, 21: 207-216.
- Zhang, B.R.; Larsson, B.; Rodríguez-Martínez, H.** (1995). Influence of batches of bovine oocytes on the outcome of an intact zona pellucida binding assay and in vitro fertilization. *Int. J. Androl.*, 18: 213-220.
- Zinaman, M.J.; Uhler, M.L.; Vertuno, E.; Fisher, S.G.; Clegg, E.D.** (1996). Evaluation of computer-assisted semen analysis (CASA) with IDENT stain to determine sperm concentration. *J. Androl.*, 17: 288-292.

11. ANEXOS

11. ANEXOS

En las siguientes páginas se recogen los resultados de los análisis realizados en cada una de las congelaciones llevadas a cabo para completar el presente trabajo investigador.

Macho: E955 Raza: Large White Fecha: 09/09/2005 Congelación: 1

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 233 Volumen (ml): 141 Mot. Subjetiva (%): 75 Cal. Mov.: 3
Formas Normales (%): 84 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 6 G.C.P. (%): 5 G.C.D. (%): 5

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf (%)
0 horas	75,25	93,50	56,90	72,92
4 horas	83,25	95,00	81,06	80,36
6 horas	82,50	96,50	69,72	94,84
Descongelado en BTS	40,75	69,50	31,52	44,98
Descongelado en MRA	23,50	65,50	40,95	40,38

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida.

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	38,29	23,07	28,99	52,86	73,25	69,14	1,40	6,58
4 horas	45,78	26,11	33,81	54,48	74,88	70,06	1,65	6,87
6 horas	107,80	47,45	82,36	47,66	61,37	76,68	3,67	5,30
Descongelado en BTS	62,31	48,28	52,87	69,26	84,39	79,16	1,91	7,57
Descongelado en MRA	83,89	70,73	73,84	77,89	90,72	84,03	2,10	9,25

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	41,30	29,56	35,23	63,11	77,32	77,49	1,33	4,91
4 horas	33,67	21,25	26,14	58,60	78,12	72,42	1,20	6,46
6 horas	106,12	64,95	86,51	58,49	73,14	78,27	3,32	4,88
Descongelado en BTS	79,53	66,22	70,01	78,62	90,08	85,82	2,20	8,49
Descongelado en MRA	74,60	63,42	66,54	77,87	88,96	85,34	1,96	8,27

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	42,9	2,0	55,1	59,0	3,3	37,7
4 horas	43,8	8,6	47,6	46,6	2,3	51,1
6 horas	28,4	59,7	11,9	44,4	39,8	15,7
Descongelado en BTS	69,1	3,2	27,7	83,5	2,6	13,9
Descongelado en MRA	80,3	2,6	17,2	80,6	1,0	18,4

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,59	4,30	30,68	23,30	2,00	0,71	0,33	0,95
4 horas	8,53	4,30	30,68	23,13	1,99	0,72	0,33	0,94
6 horas	8,59	4,26	30,64	23,32	2,02	0,71	0,34	0,94
Descongelado	8,23	4,27	29,18	23,06	1,93	0,69	0,32	0,95

Macho: E955

Raza: Large White

Fecha: 14/09/2005

Congelación: 2

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración ($10^6/ml$): 321 Volumen (ml): 181 Mot. Subjetiva (%): 90 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 80 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 8 G.C.P. (%): 3 G.C.D. (%): 9

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf (%)
0 horas	88,50	95,50	88,61	66,39
4 horas	84,50	98,00	94,97	63,03
6 horas	78,50	90,50	35,14	52,11
Descongelado en BTS	52,50	70,00	21,59	54,40
Descongelado en MRA	31,75	71,00	46,03	52,87

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida.

Tiempo.	VCL ($\mu m/s$)	VSL ($\mu m/s$)	VAP ($\mu m/s$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
0 horas	38,16	22,80	29,00	54,13	73,24	71,34	2,10	3,96
4 horas	39,25	18,46	28,48	43,83	64,74	65,61	2,27	3,75
6 horas	36,84	19,34	28,17	47,56	65,64	69,18	2,02	3,91
Descongelado en BTS	54,35	39,38	45,09	62,91	80,56	74,92	1,68	6,58
Descongelado en MRA	71,26	59,79	62,90	76,35	87,74	84,12	1,87	8,09

Análisis con cafeína añadida.

Tiempo.	VCL ($\mu m/s$)	VSL ($\mu m/s$)	VAP ($\mu m/s$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
0 horas	27,58	19,22	22,58	63,22	79,39	76,35	1,50	3,73
4 horas	31,73	20,22	27,51	63,79	75,63	82,47	1,55	3,89
6 horas	55,13	33,71	44,76	55,57	71,10	76,04	2,84	3,03
Descongelado en BTS	74,80	60,80	65,04	75,85	88,97	83,53	2,07	8,09
Descongelado en MRA	76,54	62,29	66,88	72,08	86,50	80,71	2,03	8,13

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	40,3	3,2	56,5	53,3	0	46,7
4 horas	27,8	11,9	60,3	54,7	6,7	38,7
6 horas	33,3	5,6	61,1	45,2	15,1	39,7
Descongelado en BTS	55,9	5,1	39,0	78,4	4,7	16,8
Descongelado en MRA	80,8	2,3	16,9	70,3	5,5	24,2

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (μm)	Anchura (μm)	Área (μm^2)	Perímetro (μm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,61	4,18	30,50	23,44	2,06	0,70	0,35	0,93
4 horas	8,62	4,27	30,71	23,40	2,02	0,71	0,34	0,94
6 horas	8,58	4,26	30,68	23,47	2,02	0,70	0,34	0,94
Descongelado	8,34	4,36	30,31	23,01	1,92	0,72	0,31	0,94

Macho: E955

Raza: Large White

Fecha: 27/09/2005

Congelación: 3

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10^6 /ml): 303 Volumen (ml): 192 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 3
 Formas normales (%): 84 A. de Cabeza (%): 6 A. de Cola (%): 1 G.C.P. (%): 0 G.C.D. (%): 9

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf (%)
0 horas	92,50	97,00	67,36	75,80
4 horas	81,75	95,50	80,58	71,82
6 horas	72,50	83,50	39,50	82,93
Descongelado en BTS	53,75	74,00	18,02	57,01
Descongelado en MRA	31,00	73,00	52,01	58,19

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida.

Tiempo.	VCL (μ m/s)	VSL (μ m/s)	VAP (μ m/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μ m)	BCF (Hz)
0 horas	36,43	19,97	29,70	53,66	70,10	74,75	1,96	3,69
4 horas	37,73	18,81	28,30	47,25	65,83	69,98	2,07	4,33
6 horas	54,64	30,10	46,10	55,14	66,81	80,95	2,54	3,43
Descongelado en BTS	55,27	40,67	45,26	64,06	80,67	75,76	1,94	6,36
Descongelado en MRA	77,17	64,73	68,65	77,98	89,83	84,81	2,00	8,58

Análisis con cafeína añadida.

Tiempo.	VCL (μ m/s)	VSL (μ m/s)	VAP (μ m/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μ m)	BCF (Hz)
0 horas	32,56	20,46	26,47	59,17	74,41	77,10	1,77	3,67
4 horas	33,72	23,21	28,84	63,00	76,24	79,54	1,65	4,20
6 horas	62,32	39,46	49,30	57,01	74,04	73,60	3,14	3,25
Descongelado en BTS	63,39	53,17	57,18	79,01	89,62	86,52	1,64	7,63
Descongelado en MRA	87,94	75,76	80,24	82,18	91,73	88,42	2,11	8,89

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	41,2	8,8	50	48,2	3,6	48,2
4 horas	29,0	10,3	60,7	56,4	2,6	41,0
6 horas	52,3	18,2	29,5	51,7	16,7	31,7
Descongelado en BTS	65,7	2,9	31,4	85,5	2,6	11,8
Descongelado en MRA	82,0	1,4	16,6	87,5	3,8	8,7

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (μ m)	Anchura (μ m)	Área (μ m ²)	Perímetro (μ m)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,56	4,18	30,25	23,16	2,05	0,71	0,34	0,93
4 horas	8,55	4,25	30,46	23,17	2,01	0,71	0,34	0,94
6 horas	8,63	4,26	30,93	23,27	2,03	0,72	0,34	0,93
Descongelado	8,30	4,30	29,58	22,80	1,93	0,72	0,32	0,95

Macho: E955

Raza: Large White

Fecha: 14/10/2005

Congelación: 4

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 340 Volumen (ml): 145 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 3
 Formas normales (%): 79 A. de Cabeza (%): 1 A. de Cola (%): 12 G.C.P (%): 2 G.C.D (%): 6

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf (%)
0 horas	85,50	98,50	62,60	85,82
4 horas	85,50	98,00	78,83	84,83
6 horas	77,50	91,50	27,15	61,49
Descongelado en BTS	55,75	72,00	24,23	68,90
Descongelado en MRA	36,00	73,50	58,58	68,10

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida.

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	28,41	18,66	23,63	58,45	71,32	77,72	1,53	3,93
4 horas	34,97	13,90	25,46	35,68	50,78	68,02	2,03	4,40
6 horas	51,95	18,17	39,48	36,76	49,96	71,67	2,93	4,02
Descongelado en BTS	63,87	44,79	51,06	61,62	81,56	72,78	2,16	7,30
Descongelado en MRA	87,43	73,91	78,50	81,41	91,64	87,92	2,21	9,09

Análisis con cafeína añadida.

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	34,24	15,36	24,25	42,33	61,23	66,94	2,14	4,25
4 horas	34,53	18,13	27,52	48,11	61,50	75,61	1,96	3,74
6 horas	57,98	34,83	48,20	55,72	69,04	78,10	2,86	3,57
Descongelado en BTS	84,32	69,05	74,43	78,03	89,80	85,89	2,27	7,72
Descongelado en MRA	97,40	83,74	88,09	81,60	91,74	87,30	2,36	9,16

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	56,8	0	43,2	24,3	3,0	72,8
4 horas	16,5	6,8	76,7	34,9	3,6	61,4
6 horas	15,4	30,8	53,8	47,7	16,9	35,4
Descongelado en BTS	52,1	8,5	39,4	81,8	3,5	14,7
Descongelado en MRA	87,4	3,9	8,8	86,9	3,2	9,9

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,54	4,21	30,47	23,17	2,03	0,71	0,34	0,93
4 horas	8,52	4,21	30,25	23,04	2,03	0,72	0,34	0,93
6 horas	8,50	4,15	29,73	23,02	2,05	0,71	0,34	0,93
Descongelado	8,32	4,24	29,51	22,63	1,97	0,72	0,32	0,94

Macho: E955

Raza: Large White

Fecha: 28/10/2005

Congelación: 5

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración ($10^6/ml$): 310 Volumen (ml): 285 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 3
 Formas normales (%): 75 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 13 G.C.P. (%): 4 G.C.D. (%): 8

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf (%)
0 horas	86,25	97,50	80,00	83,19
4 horas	73,50	84,00	79,31	71,94
6 horas	63,00	83,50	31,52	52,94
Descongelado en BTS	53,25	80,00	6,08	12,17
Descongelado en MRA	53,00	76,50	8,01	8,99

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida.

Tiempo.	VCL ($\mu m/s$)	VSL ($\mu m/s$)	VAP ($\mu m/s$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
0 horas	35,43	16,43	26,64	41,13	59,46	66,64	1,99	4,09
4 horas	40,44	16,12	30,10	36,31	51,37	69,21	2,28	3,76
6 horas	56,35	24,81	45,65	40,71	53,22	76,24	2,95	3,68
Descongelado en BTS	82,91	62,76	68,59	71,25	87,25	79,83	2,68	7,76
Descongelado en MRA	84,41	73,47	77,39	81,27	90,48	88,03	2,03	8,37

Análisis con cafeína añadida.

Tiempo.	VCL ($\mu m/s$)	VSL ($\mu m/s$)	VAP ($\mu m/s$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
0 horas	36,45	21,10	29,55	52,49	66,68	75,44	1,94	3,70
4 horas	30,35	14,91	21,99	43,86	62,19	66,61	1,83	3,70
6 horas	66,29	33,69	54,59	46,95	60,25	75,24	3,24	3,07
Descongelado en BTS	89,90	77,54	81,96	83,12	92,17	89,25	2,21	8,14
Descongelado en MRA	82,72	69,96	74,91	80,01	89,74	87,64	2,04	7,72

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	25,0	10,0	65,0	44,8	1,8	53,4
4 horas	16,1	10,7	73,2	29,3	2,2	68,5
6 horas	15,4	42,3	42,3	36,4	30,3	33,3
Descongelado en BTS	75,6	5,7	18,7	89,1	2,8	8,1
Descongelado en MRA	85,0	2,1	13,0	82,2	4,3	13,5

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (μm)	Anchura (μm)	Área (μm^2)	Perímetro (μm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,50	4,16	29,70	22,65	2,05	0,73	0,34	0,93
4 horas	8,59	4,22	30,41	23,14	2,03	0,71	0,34	0,94
6 horas	8,52	4,22	30,03	23,03	2,02	0,71	0,34	0,94
Descongelado	8,35	4,37	29,99	23,33	1,92	0,69	0,31	0,96

Macho: G2552

Raza: Large White

Fecha: 20/12/2005

Congelación: 1

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 191 Volumen (ml): 267 Mot. Subjetiva (%): 85 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 88 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 6 G.C.P (%): 4 G.C.D (%): 2

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	85,00	98,50	87,18	91,72
4 horas	85,50	94,00	88,70	85,99
6 horas	78,00	91,00	81,60	83,91
Descongelado en BTS	48,00	63,50	38,91	58,91
Descongelado en MRA	20,25	64,50	47,13	47,99

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida.

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	34,03	18,67	25,27	50,89	70,29	69,03	1,37	6,94
4 horas	62,75	34,95	51,98	55,44	67,38	80,32	2,05	6,49
6 horas	70,18	40,29	57,31	53,68	68,50	75,46	2,27	6,57
Descongelado en BTS	78,67	57,23	63,12	65,24	83,59	75,31	2,55	7,98
Descongelado en MRA	102,63	86,94	90,63	78,41	90,97	84,18	2,52	9,84

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	49,83	35,85	43,73	64,31	77,67	79,59	1,50	6,07
4 horas	76,65	38,31	66,13	51,95	62,15	82,99	2,25	5,58
6 horas	58,09	36,14	48,33	54,85	71,56	73,88	1,76	6,14
Descongelado en BTS	108,10	92,10	97,42	80,99	90,80	87,58	2,57	9,11
Descongelado en MRA	99,63	83,66	89,28	78,21	89,24	85,40	2,42	9,13

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	39,7	2,6	57,7	59,3	6,6	34,1
4 horas	48,5	20,0	31,5	39,4	32,3	28,3
6 horas	44,2	23,4	32,5	46,4	14,3	39,3
Descongelado en BTS	67,9	7,5	24,5	86,4	5,4	8,2
Descongelado en MRA	82,2	4,0	13,9	80,6	4,9	14,6

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,63	4,30	30,66	23,30	2,01	0,71	0,33	0,95
4 horas	8,63	4,22	30,27	23,29	2,05	0,70	0,34	0,94
6 horas	8,63	4,26	30,33	23,35	2,03	0,70	0,34	0,95
Descongelado	8,32	4,25	28,96	22,62	1,96	0,71	0,32	0,96

Macho: G2552

Raza: Large White

Fecha: 04/01/2006

Congelación: 2

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 267 Volumen (ml): 213 Mot. Subjetiva (%): 85 Cal. Mov.: 3
 Formas normales (%): 85 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 3 G.C.P. (%): 4 G.C.D. (%): 8

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf (%)
0 horas	83,00	98,00	84,73	85,59
4 horas	84,00	95,50	90,34	93,44
6 horas	82,25	92,00	63,11	80,95
Descongelado en BTS	38,00	58,50	33,88	57,35
Descongelado en MRA	17,50	61,50	38,32	47,14

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida.

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	43,48	28,75	36,00	58,13	73,91	75,75	1,48	6,51
4 horas	75,93	33,75	62,29	45,47	56,17	79,99	2,36	5,86
6 horas	45,99	19,63	32,54	34,93	56,13	60,67	1,89	5,30
Descongelado en BTS	86,06	64,84	69,94	71,64	89,29	79,01	2,89	8,66
Descongelado en MRA	109,85	96,42	99,54	84,92	94,37	88,99	2,58	9,61

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	43,58	28,26	36,87	59,59	74,30	77,76	1,44	6,88
4 horas	46,54	27,97	38,74	57,24	70,94	78,81	1,57	6,26
6 horas	68,81	42,87	57,25	52,82	68,89	73,68	2,23	6,84
Descongelado en BTS	104,61	87,60	92,81	81,79	92,32	87,68	2,61	8,97
Descongelado en MRA	106,45	90,58	95,49	80,63	91,02	87,01	2,69	9,49

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	47,3	4,3	48,4	48,1	6,2	45,7
4 horas	30,8	37,6	31,6	46,2	8,5	45,3
6 horas	13,0	24,1	63,0	45,2	19,4	35,5
Descongelado en BTS	79,7	6,8	13,5	84,3	7,9	7,9
Descongelado en MRA	88,6	4,6	6,8	84,0	5,9	10,1

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,60	4,28	30,84	23,25	2,01	0,72	0,34	0,94
4 horas	8,63	4,29	30,79	23,14	2,01	0,72	0,34	0,95
6 horas	8,63	4,31	30,80	23,25	2,01	0,72	0,33	0,95
Descongelado	8,38	4,34	29,87	22,81	1,93	0,72	0,32	0,96

Macho: G2552

Raza: Large White

Fecha: 11/01/2006

Congelación: 3

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 244 Volumen (ml): 206 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 3
 Formas normales (%): 80 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 5 G.C.P. (%): 3 G.C.D. (%): 12

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	86,50	93,00	81,76	92,97
4 horas	85,00	90,00	90,41	93,20
6 horas	80,75	91,50	90,76	95,10
Descongelado en BTS	39,75	56,50	21,92	54,15
Descongelado en MRA	20,25	62,50	34,89	44,15

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida.

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	51,02	32,69	43,03	57,65	71,86	77,51	1,64	6,79
4 horas	60,76	32,04	47,50	51,31	67,16	74,88	2,16	6,66
6 horas	93,64	54,54	71,55	57,71	74,10	75,66	3,12	6,08
Descongelado en BTS	64,54	48,36	51,89	64,53	84,87	73,37	2,14	8,12
Descongelado en MRA	99,83	85,00	88,45	81,95	92,33	87,31	2,37	9,86

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	59,90	37,87	52,13	59,79	71,39	82,52	1,86	5,87
4 horas	54,51	27,72	44,37	49,11	61,86	78,15	1,77	6,87
6 horas	120,35	78,29	95,07	62,67	77,78	78,63	3,45	7,51
Descongelado en BTS	89,25	75,94	79,54	81,68	92,76	87,06	2,25	9,19
Descongelado en MRA	109,39	90,51	95,25	79,72	92,61	84,94	2,79	9,88

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	46,9	8,6	44,5	48,5	19,6	32,0
4 horas	33,6	21,5	44,9	35,2	18,4	46,4
6 horas	45,2	31,0	23,8	58,3	33,3	8,3
Descongelado en BTS	62,5	1,2	36,2	86,2	2,5	11,2
Descongelado en MRA	89,9	2,9	7,3	85,8	5,8	8,3

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,62	4,25	30,62	23,16	2,03	0,72	0,34	0,94
4 horas	8,65	4,29	30,92	23,22	2,02	0,72	0,34	0,94
6 horas	8,63	4,27	30,63	23,22	2,02	0,71	0,34	0,95
Descongelado	8,33	4,23	29,07	22,62	1,97	0,71	0,33	0,95

Macho: G2552

Raza: Large White

Fecha: 18/01/2006

Congelación: 4

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (106/ml): 262 Volumen (ml): 182 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 78 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 8 G.C.P. (%): 2 G.C.D. (%): 12

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	83,50	97,50	86,36	82,96
4 horas	81,50	94,50	87,42	91,43
6 horas	81,00	88,50	74,51	91,54
Descongelado en BTS	48,25	56,00	22,12	52,40
Descongelado en MRA	20,50	74,00	40,77	44,23

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida.

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	53,48	31,44	44,04	54,01	68,78	76,84	1,72	6,29
4 horas	77,41	37,54	63,98	50,99	61,80	81,56	2,54	6,11
6 horas	92,90	51,40	75,65	55,47	68,79	79,35	2,90	5,79
Descongelado en BTS	77,13	56,19	62,46	65,41	82,70	75,52	2,63	7,86
Descongelado en MRA	92,24	75,64	81,29	77,16	88,18	85,13	2,32	8,32

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	51,36	33,93	44,88	63,90	74,88	83,70	1,57	6,11
4 horas	60,42	35,11	51,19	53,85	65,87	80,00	1,97	6,26
6 horas	95,99	59,20	79,94	57,51	70,94	78,33	2,96	5,58
Descongelado en BTS	95,58	78,75	84,11	78,86	90,39	86,11	2,54	8,72
Descongelado en MRA	100,14	85,50	89,28	80,09	91,33	85,65	2,39	8,94

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	42,3	13,0	44,7	58,2	10,2	31,6
4 horas	35,2	43,2	21,6	45,2	13,9	40,9
6 horas	41,9	43,0	15,1	46,6	33,8	19,5
Descongelado en BTS	70,0	5,0	25,0	84,9	3,8	11,4
Descongelado en MRA	79,3	6,5	14,2	84,9	3,4	11,6

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,61	4,25	30,59	23,21	2,03	0,71	0,34	0,94
4 horas	8,72	4,28	30,94	23,24	2,04	0,72	0,34	0,95
6 horas	8,67	4,24	30,69	23,47	2,05	0,70	0,34	0,94
Descongelado	8,56	4,36	30,98	23,22	1,96	0,72	0,32	0,95

Macho: G2552

Raza: Large White

Fecha: 24/01/2006

Congelación: 5

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 153 Volumen (ml): 182 Mot. Subjetiva (%): 85 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 83 A. de Cabeza (%): 1 A. de Cola (%): 3 G.C.P. (%): 2 G.C.D. (%): 11

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	85,75	95,00	87,33	91,67
4 horas	79,50	95,00	95,45	93,68
6 horas	81,50	93,50	77,21	89,04
Descongelado en BTS	34,50	49,50	22,93	44,15
Descongelado en MRA	20,25	61,00	30,18	42,19

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida.

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	48,69	29,37	40,30	52,21	68,02	73,88	1,61	6,16
4 horas	77,13	37,59	64,42	46,94	55,79	82,95	2,30	5,44
6 horas	80,67	39,73	62,64	46,29	62,39	72,32	2,67	6,09
Descongelado en BTS	59,04	35,14	42,09	53,82	76,95	66,27	2,25	7,26
Descongelado en MRA	108,30	90,61	95,46	81,58	92,62	87,22	2,71	10,64

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	55,65	38,20	48,82	66,25	76,79	84,97	1,72	5,97
4 horas	56,61	33,43	48,19	56,98	68,16	81,94	1,88	6,08
6 horas	61,45	36,88	50,15	51,19	68,41	71,62	2,02	6,05
Descongelado en BTS	109,65	87,38	94,00	77,27	90,07	84,22	2,84	9,43
Descongelado en MRA	106,35	89,27	94,58	80,21	90,74	86,59	2,53	9,50

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	41,9	10,8	47,3	65,5	8,6	25,9
4 horas	33,6	32,8	33,6	50,8	12,5	36,7
6 horas	35,4	37,8	26,8	38,9	19,4	41,7
Descongelado en BTS	44,6	10,8	44,6	79,7	11,0	9,3
Descongelado en MRA	88,0	5,3	6,7	84,4	7,0	8,7

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,62	4,23	30,46	23,25	2,04	0,71	0,34	0,94
4 horas	8,59	4,24	30,60	23,29	2,03	0,71	0,34	0,93
6 horas	8,59	4,28	30,70	23,20	2,01	0,72	0,34	0,94
Descongelado	8,39	4,35	30,06	22,71	1,93	0,73	0,32	0,95

Macho: G5223

Raza: Large White

Fecha: 11/11/2005

Congelación: 1

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10^6 /ml): 267 Volumen (ml): 213 Mot. Subjetiva (%): 85 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 90 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 2 G.C.P. (%): 3 G.C.D. (%): 5

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	80,75	98,50	92,93	95,63
4 horas	73,25	96,50	82,35	97,61
6 horas	78,50	97,00	72,57	83,23
Descongelado en BTS	52,75	66,00	53,67	76,12
Descongelado en MRA	28,75	65,50	73,23	68,34

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida.

Tiempo.	VCL (μ m/s)	VSL (μ m/s)	VAP (μ m/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μ m)	BCF (Hz)
0 horas	38,73	25,96	31,99	60,34	76,11	76,16	1,29	6,81
4 horas	36,70	24,06	29,27	60,98	77,58	75,18	1,33	6,63
6 horas	67,89	37,53	52,52	51,42	68,92	72,79	2,34	6,51
Descongelado en BTS	104,34	87,30	92,08	78,55	90,88	84,67	2,72	8,70
Descongelado en MRA	113,03	98,36	103,02	84,07	93,17	89,17	2,49	9,57

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (μ m/s)	VSL (μ m/s)	VAP (μ m/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μ m)	BCF (Hz)
0 horas	57,66	40,24	50,15	63,79	76,20	81,41	1,83	6,01
4 horas	44,37	29,58	36,20	58,83	74,55	75,31	1,53	5,87
6 horas	59,35	40,05	48,33	54,86	72,52	70,34	1,99	4,94
Descongelado en BTS	106,19	90,82	96,37	83,88	92,74	89,94	2,42	9,52
Descongelado en MRA	114,74	97,65	103,39	83,47	92,59	89,07	2,61	10,08

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	55,0	1,7	43,3	63,7	8,9	27,4
4 horas	57,8	2,4	39,8	50,9	3,6	45,5
6 horas	42,2	24,5	33,3	50,0	6,7	43,3
Descongelado en BTS	81,2	6,7	12,1	91,0	6,2	2,8
Descongelado en MRA	90,0	4,6	5,4	89,3	6,8	3,9

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (μ m)	Anchura (μ m)	Área (μ m ²)	Perímetro (μ m)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,57	4,05	29,66	23,25	2,12	0,69	0,36	0,92
4 horas	8,57	4,04	29,60	23,20	2,13	0,69	0,36	0,92
6 horas	8,59	4,07	29,68	23,07	2,11	0,70	0,36	0,92
Descongelado	8,39	4,16	29,34	23,14	2,02	0,69	0,34	0,94

Macho: G5223

Raza: Large White

Fecha: 18/11/2005

Congelación: 2

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 325 Volumen (ml): 181 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 5
 Formas normales (%): 87 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 0 G.C.P. (%): 3 G.C.D. (%): 10

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	92,00	99,00	90,08	94,81
4 horas	88,00	97,50	85,64	90,40
6 horas	72,50	91,50	76,00	68,70
Descongelado en BTS	64,25	75,00	23,11	61,98
Descongelado en MRA	47,75	60,50	60,14	62,20

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida.

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	39,34	23,73	31,54	54,19	70,04	73,86	1,39	6,59
4 horas	62,13	33,97	49,13	52,53	67,88	75,63	2,22	6,62
6 horas	73,72	43,60	60,80	56,49	69,00	78,32	2,26	7,61
Descongelado en BTS	67,31	51,91	55,29	66,53	85,33	74,76	2,09	8,20
Descongelado en MRA	92,92	79,84	82,60	80,47	92,46	85,02	2,27	10,16

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	46,59	32,56	39,41	60,27	75,00	76,71	1,51	6,21
4 horas	37,80	24,52	29,82	52,78	71,74	68,32	1,36	5,72
6 horas	31,53	21,51	24,53	48,48	71,05	63,14	1,12	4,38
Descongelado en BTS	94,05	80,06	83,99	81,48	91,71	87,27	2,33	9,33
Descongelado en MRA	92,60	79,15	82,47	81,67	93,06	86,84	2,35	9,84

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	42,7	4,5	52,8	50,4	3,5	46,1
4 horas	37,8	21,3	40,9	42,9	1,8	55,4
6 horas	49,1	28,1	22,8	38,7	0	61,3
Descongelado en BTS	66,7	4,2	29,2	87,9	3,3	8,8
Descongelado en MRA	86,8	0,7	12,6	89,2	2,2	8,7

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,66	4,15	30,32	23,33	2,09	0,70	0,35	0,93
4 horas	8,59	4,03	29,61	23,05	2,14	0,70	0,36	0,92
6 horas	8,64	4,12	29,98	23,17	2,10	0,70	0,35	0,93
Descongelado	8,37	4,14	29,13	22,90	2,03	0,70	0,34	0,93

Macho: G5223

Raza: Large White

Fecha: 30/11/2005

Congelación: 3

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 328 Volumen (ml): 127 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 3
 Formas normales (%): 81 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 2 G.C.P. (%): 4 G.C.D. (%): 13

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	86,50	99,00	91,43	95,79
4 horas	71,75	92,50	85,81	90,14
6 horas	71,25	86,00	48,91	79,86
Descongelado en BTS	48,75	69,00	48,31	58,51
Descongelado en MRA	22,00	58,50	61,28	59,15

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida.

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	49,17	31,42	40,20	57,59	73,20	76,00	1,65	6,46
4 horas	59,86	30,36	48,44	50,10	65,34	75,13	1,97	5,85
6 horas	61,18	35,51	45,78	46,00	67,54	64,39	2,09	5,69
Descongelado en BTS	101,18	85,29	89,79	80,61	92,06	86,16	2,63	8,78
Descongelado en MRA	116,00	101,06	106,72	83,96	91,72	89,96	2,57	9,53

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	53,29	35,97	44,04	62,64	76,19	78,95	1,73	5,79
4 horas	46,44	28,61	38,66	59,41	72,39	79,65	1,53	6,94
6 horas	78,54	51,12	67,02	57,52	72,27	77,98	2,19	5,79
Descongelado en BTS	115,57	101,76	106,74	85,87	93,73	90,80	2,51	9,14
Descongelado en MRA	113,87	99,58	103,53	85,26	95,09	89,04	2,73	9,64

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	54,5	6,4	39,1	60,9	7,2	31,9
4 horas	34,90	20,2	45,0	53,3	10,0	36,7
6 horas	35,6	20,0	44,4	44,1	23,5	32,4
Descongelado en BTS	84,4	5,0	10,6	86,5	6,8	6,8
Descongelado en MRA	87,9	5,5	6,5	88,9	5,9	5,2

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,59	4,06	30,13	23,51	2,12	0,68	0,36	0,91
4 horas	8,65	4,08	29,97	23,25	2,12	0,70	0,36	0,93
6 horas	8,64	4,10	29,86	23,27	2,11	0,69	0,36	0,93
Descongelado	8,39	4,09	28,91	22,88	2,05	0,69	0,34	0,93

Macho: G5223

Raza: Large White

Fecha: 06/12/2005

Congelación: 4

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 237 Volumen (ml): 160 Mot. Subjetiva (%): 85 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 89 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 2 G.C.P (%): 4 G.C.D (%): 5

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	87,25	98,00	94,01	94,49
4 horas	81,50	97,50	92,17	95,73
6 horas	80,50	91,00	82,29	89,57
Descongelado en BTS	47,50	66,50	54,07	73,28
Descongelado en MRA	27,25	77,00	64,57	68,88

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida.

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	55,63	31,80	47,09	54,22	66,45	79,15	1,82	6,26
4 horas	50,58	28,13	39,24	53,55	69,62	74,47	1,92	6,53
6 horas	90,26	54,27	73,80	59,63	72,86	79,79	2,77	7,34
Descongelado en BTS	102,86	84,58	89,97	76,45	89,49	83,72	2,71	8,52
Descongelado en MRA	100,11	88,32	92,18	84,38	92,27	89,80	2,27	8,88

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	46,38	32,14	39,25	60,71	74,83	77,88	1,54	6,28
4 horas	49,79	32,75	41,87	60,89	74,39	79,08	1,60	6,61
6 horas	77,00	52,50	62,33	58,50	74,20	73,57	2,38	6,35
Descongelado en BTS	103,84	86,69	93,21	78,58	88,24	86,94	2,49	9,08
Descongelado en MRA	105,99	89,53	94,64	80,70	91,06	87,29	2,62	9,31

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	41,5	19,0	39,4	52,8	2,1	45,1
4 horas	42,9	9,6	47,4	57,2	6,4	36,4
6 horas	51,9	34,9	13,2	54,1	12,6	33,3
Descongelado en BTS	78,4	7,4	14,2	83,8	4,7	11,5
Descongelado en MRA	91,3	2,2	6,5	84,8	6,2	9,0

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,54	4,07	29,84	23,11	2,10	0,70	0,35	0,92
4 horas	8,43	4,27	30,36	23,29	1,98	0,70	0,33	0,93
6 horas	8,48	4,10	30,42	23,65	2,07	0,68	0,35	0,90
Descongelado	8,34	4,15	29,01	22,95	2,01	0,69	0,34	0,94

Macho: G5223

Raza: Large White

Fecha: 13/12/2005

Congelación: 5

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 240 Volumen (ml): 303 Mot. Subjetiva (%): 90 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 90 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 1 G.C.P. (%): 0 G.C.D. (%): 9

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	92,50	99,50	91,96	76,92
4 horas	79,00	96,00	92,81	97,09
6 horas	81,75	94,50	78,57	89,87
Descongelado en BTS	58,25	71,50	57,82	65,85
Descongelado en MRA	36,25	72,00	64,74	68,69

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida.

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	57,09	33,40	47,68	55,95	70,27	78,40	1,87	6,20
4 horas	58,04	32,12	47,18	52,82	65,76	78,53	2,04	5,66
6 horas	64,73	41,45	50,91	55,64	73,98	71,43	2,16	7,53
Descongelado en BTS	97,53	78,52	84,89	73,06	86,88	81,98	2,61	8,65
Descongelado en MRA	102,95	85,73	90,57	79,07	90,69	85,28	2,60	9,48

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	48,10	32,94	41,59	62,22	74,06	81,23	1,56	6,09
4 horas	31,01	20,79	25,74	57,67	74,56	74,12	1,06	6,24
6 horas	86,24	60,95	72,27	64,94	79,07	79,26	2,70	5,45
Descongelado en BTS	107,44	91,43	96,47	83,44	92,80	88,75	2,60	9,37
Descongelado en MRA	102,06	85,97	91,33	79,08	89,55	86,03	2,44	9,11

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	42,9	15,0	42,1	56,5	5,8	37,7
4 horas	37,6	17,4	45,0	50,0	1,4	48,6
6 horas	52,4	11,9	35,7	63,0	17,3	19,7
Descongelado en BTS	73,8	7,6	18,6	88,4	6,8	4,8
Descongelado en MRA	87,4	4,6	7,9	82,9	4,6	12,6

ANÁLISIS MORFOMETRICO

	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,61	4,10	30,21	23,95	2,10	0,66	0,35	0,92
4 horas	8,54	4,04	29,52	23,33	2,12	0,68	0,36	0,92
6 horas	8,58	4,03	29,48	23,27	2,13	0,68	0,36	0,92
Descongelado	8,40	4,12	28,91	23,02	2,04	0,69	0,34	0,94

Macho:G6328

Raza: Large White

Fecha: 11/01/2006

Congelación: 1

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 306 Volumen (ml): 194 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 3
 Formas normales (%): 99 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 1 G.C.P. (%): 0 G.C.D. (%): 0

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	88,75	94,50	89,58	88,20
4 horas	81,00	94,50	94,48	97,78
6 horas	80,75	93,50	84,62	96,24
Descongelado en BTS	67,75	75,50	40,74	67,19
Descongelado en MRA	44,25	60,00	55,59	73,04

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	54,75	32,86	45,11	57,47	70,50	79,61	1,85	7,55
4 horas	77,58	37,76	61,39	48,23	60,35	78,42	2,67	8,06
6 horas	121,56	62,62	98,83	53,47	64,65	81,60	3,50	5,87
Descongelado en BTS	67,57	47,21	51,62	62,90	85,68	71,37	2,34	8,57
Descongelado en MRA	77,98	58,71	63,82	70,37	87,11	78,52	2,36	8,25

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	51,39	33,59	43,85	64,63	76,37	83,37	1,66	7,68
4 horas	54,69	26,55	42,13	49,39	63,38	76,14	2,02	7,55
6 horas	111,11	74,35	94,37	68,33	78,79	85,13	3,55	4,38
Descongelado en BTS	86,47	69,34	75,02	77,83	89,86	85,19	2,45	8,06
Descongelado en MRA	79,92	61,78	67,05	72,35	87,98	80,39	2,36	8,50

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	49,5	13,3	37,1	60,7	8,9	30,4
4 horas	35,3	37,5	27,2	37,2	14,2	48,6
6 horas	36,6	62,4	1,1	67,9	28,6	3,6
Descongelado en BTS	63,3	6,7	30,0	85,0	5,9	9,1
Descongelado en MRA	74,3	4,6	21,1	74,2	6,8	19,0

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,31	4,05	28,70	22,40	2,05	0,72	0,34	0,92
4 horas	8,38	4,06	28,90	22,57	2,07	0,71	0,35	0,92
6 horas	8,34	4,08	28,80	22,62	2,05	0,71	0,34	0,93
Descongelado	8,04	4,07	27,51	22,07	1,98	0,71	0,33	0,93

Macho: G6328

Raza: Large White

Fecha: 20/01/2006

Congelación: 2

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 375 Volumen (ml): 150 Mot. Subjetiva (%): 85 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 87 A. de Cabeza (%): 1 A. de Cola (%): 5 G.C.P. (%): 1 G.C.D. (%): 6

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	84,00	98,50	91,36	90,08
4 horas	82,50	96,00	89,19	89,29
6 horas	81,75	92,00	81,77	90,53
Descongelado en BTS	54,00	78,00	39,32	63,84
Descongelado en MRA	25,00	64,50	58,62	70,89

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	53,21	33,70	44,44	60,57	74,63	78,77	1,67	7,71
4 horas	54,49	36,65	47,29	66,28	76,52	85,12	1,68	7,67
6 horas	84,10	43,71	65,89	49,38	64,44	74,52	2,63	7,45
Descongelado en BTS	72,15	47,95	54,62	62,50	85,55	71,86	2,51	8,37
Descongelado en MRA	97,46	77,32	83,00	76,80	90,65	83,74	2,72	8,92

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	48,58	31,99	41,53	64,42	75,77	83,62	1,59	7,75
4 horas	61,72	34,36	51,01	57,53	68,65	82,04	2,05	8,01
6 horas	95,65	50,11	79,21	49,12	60,93	78,50	2,80	6,28
Descongelado en BTS	99,10	78,98	85,68	77,09	89,55	84,84	2,71	8,68
Descongelado en MRA	102,46	80,21	87,66	75,88	89,17	83,79	2,86	8,63

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	53,9	9,8	36,3	64,6	7,2	28,2
4 horas	60,8	9,2	30,0	58,0	18,8	23,2
6 horas	38,6	38,6	22,8	37,4	47,0	15,7
Descongelado en BTS	60,5	8,8	30,7	79,9	10,0	10,0
Descongelado en MRA	83,0	7,9	9,2	81,7	9,2	9,2

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,41	4,10	29,38	22,80	2,06	0,71	0,34	0,92
4 horas	8,42	4,05	28,93	22,56	2,08	0,71	0,35	0,93
6 horas	8,35	4,10	28,95	22,55	2,04	0,72	0,34	0,93
Descongelado	8,01	4,09	27,74	21,98	1,96	0,72	0,32	0,93

Macho: G6328

Raza: Large White

Fecha: 25/01/2006

Congelación: 3

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 318 Volumen (ml): 166 Mot. Subjetiva (%): 85 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 92 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 1 G.C.P. (%): 0 G.C.D. (%): 7

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	82,00	96,50	90,38	90,63
4 horas	87,25	94,00	94,92	90,50
6 horas	82,25	92,50	90,06	89,20
Descongelado en BTS	62,00	75,50	50,97	68,64
Descongelado en MRA	32,50	63,00	46,09	50,14

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	59,41	36,93	50,54	58,98	71,16	81,28	1,81	7,25
4 horas	67,79	38,91	55,52	55,50	68,69	79,19	2,26	7,92
6 horas	75,56	36,77	58,36	43,24	60,29	69,50	2,49	6,24
Descongelado en BTS	85,83	59,77	68,91	65,10	84,36	76,07	2,73	8,54
Descongelado en MRA	85,66	69,35	73,42	78,05	91,85	83,94	2,42	9,52

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	54,25	40,21	48,31	73,07	81,89	88,11	1,59	7,82
4 horas	59,52	36,27	49,48	60,73	73,27	81,80	1,96	7,52
6 horas	58,94	29,05	44,53	41,70	60,17	66,34	2,14	5,38
Descongelado en BTS	85,98	66,94	73,44	74,14	87,94	82,69	2,41	8,43
Descongelado en MRA	82,59	68,48	72,45	78,85	91,21	85,34	2,15	9,05

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	53,8	13,3	32,9	76,1	8,3	15,6
4 horas	47,5	20,1	32,4	54,8	12,7	32,5
6 horas	30,6	32,4	36,9	23,6	20,2	56,2
Descongelado en BTS	61,3	13,3	25,3	74,7	9,7	15,7
Descongelado en MRA	83,7	6,5	9,8	86,1	2,3	11,7

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,46	4,12	29,72	22,86	2,06	0,71	0,35	0,92
4 horas	8,40	4,05	28,93	22,68	2,08	0,71	0,35	0,92
6 horas	8,35	4,04	28,49	22,62	2,07	0,70	0,35	0,93
Descongelado	8,05	4,10	27,96	22,14	1,97	0,72	0,33	0,93

Macho: G6328

Raza: Large White

Fecha: 30/01/2006

Congelación: 4

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 290 Volumen (ml): 200 Mot. Subjetiva (%): 75 Cal. Mov.: 3
 Formas normales (%): 97 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 0 G.C.P. (%): 0 G.C.D. (%): 3

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	87,25	94,00	91,18	92,55
4 horas	79,50	95,50	96,14	93,96
6 horas	77,00	97,00	82,78	90,57
Descongelado en BTS	61,75	71,50	53,02	79,71
Descongelado en MRA	23,75	63,50	58,88	73,65

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	60,11	33,96	51,37	55,28	66,63	81,55	1,89	6,77
4 horas	46,48	27,88	37,58	56,03	70,92	76,64	1,69	6,74
6 horas	70,08	35,82	57,49	47,04	61,92	74,55	2,40	5,25
Descongelado en BTS	85,50	53,58	64,15	58,77	81,24	71,09	2,95	8,25
Descongelado en MRA	107,05	82,60	89,44	74,81	89,75	82,26	3,01	8,70

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	45,94	27,52	37,64	58,35	72,30	78,83	1,66	7,21
4 horas	86,61	43,49	70,63	51,15	61,97	81,65	2,74	6,23
6 horas	98,82	47,91	76,92	46,40	60,75	73,78	3,19	6,80
Descongelado en BTS	113,76	90,06	96,77	77,33	90,89	84,05	3,07	9,42
Descongelado en MRA	117,35	95,11	101,25	79,52	92,20	85,31	3,10	9,34

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	40,2	23,0	36,9	51,2	6,0	42,9
4 horas	42,4	6,1	51,5	37,8	37,8	24,4
6 horas	28,6	30,5	41,0	29,2	52,2	18,6
Descongelado en BTS	53,0	18,7	28,4	83,2	10,1	6,7
Descongelado en MRA	79,6	12,6	7,8	85,1	10,1	4,8

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,27	4,10	29,05	22,69	2,02	0,71	0,34	0,92
4 horas	8,32	4,12	28,90	22,80	2,02	0,70	0,34	0,93
6 horas	8,33	4,08	28,72	22,49	2,04	0,71	0,34	0,93
Descongelado	8,05	4,16	27,84	22,29	1,94	0,70	0,32	0,94

Macho: G6328

Raza: Large White

Fecha: 08/02/2006

Congelación: 5

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración ($10^6/ml$): 350 Volumen (ml): 213 Mot. Subjetiva (%): 85 Cal. Mov.: 3
 Formas normales (%): 97 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 1 G.C.P. (%): 0 G.C.D. (%): 2

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	86,25	97,50	94,29	93,44
4 horas	82,75	96,00	93,75	96,91
6 horas	82,00	91,50	91,22	94,98
Descongelado en BTS	65,50	75,50	58,75	76,86
Descongelado en MRA	33,25	62,50	63,16	70,48

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL ($\mu m/s$)	VSL ($\mu m/s$)	VAP ($\mu m/s$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
0 horas	72,66	37,98	60,84	51,72	63,29	80,57	2,29	6,81
4 horas	84,19	40,62	67,61	49,70	61,81	79,40	2,74	7,25
6 horas	64,94	34,52	48,53	44,26	63,79	65,74	2,16	5,09
Descongelado en BTS	92,08	65,95	71,23	67,88	89,20	74,67	3,07	8,81
Descongelado en MRA	97,63	74,90	81,25	75,29	89,90	82,64	2,87	9,44

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL ($\mu m/s$)	VSL ($\mu m/s$)	VAP ($\mu m/s$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
0 horas	52,49	34,72	45,88	64,09	74,60	84,61	1,63	6,97
4 horas	53,58	30,83	44,28	56,93	70,07	80,05	1,86	7,36
6 horas	107,35	54,07	89,21	50,93	61,10	81,42	3,19	5,68
Descongelado en BTS	107,08	81,76	88,62	74,67	90,02	81,65	3,17	10,06
Descongelado en MRA	101,63	80,53	86,20	76,86	90,74	83,48	2,83	9,34

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	40,8	27,7	31,5	59,0	9,0	32,1
4 horas	39,0	39,8	21,2	48,0	11,9	40,1
6 horas	28,1	18,8	53,1	38,2	51,8	10,0
Descongelado en BTS	72,2	8,0	19,9	80,0	12,0	8,0
Descongelado en MRA	82,1	11,4	6,5	84,0	6,5	9,5

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (μm)	Anchura (μm)	Área (μm^2)	Perímetro (μm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,31	4,10	29,31	22,84	2,03	0,71	0,34	0,91
4 horas	8,34	4,10	29,02	22,66	2,04	0,71	0,34	0,93
6 horas	8,33	4,12	29,03	22,83	2,03	0,70	0,34	0,93
Descongelado	8,12	4,10	27,95	22,03	1,98	0,72	0,33	0,93

Macho: T475

Raza: Large White

Fecha: 02/12/2005

Congelación: 1

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración ($10^6/ml$): 283 Volumen (ml): 139 Mot. Subjetiva (%): 75 Cal. Mov.: 3
 Formas normales (%): 92 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 5 G.C.P. (%): 0 G.C.D. (%): 3

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	92,00	98,50	94,95	96,79
4 horas	87,50	95,50	97,52	95,29
6 horas	84,25	91,00	75,88	87,41
Descongelado en BTS	58,75	67,50	64,76	77,33
Descongelado en MRA	31,00	63,00	76,15	76,69

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL ($\mu m/s$)	VSL ($\mu m/s$)	VAP ($\mu m/s$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
0 horas	51,07	27,71	40,88	50,04	63,91	75,51	1,78	6,36
4 horas	67,09	27,44	50,90	40,59	53,76	74,44	2,51	6,10
6 horas	48,17	18,22	31,12	35,34	57,36	60,23	2,07	5,37
Descongelado en BTS	112,10	77,18	86,05	67,84	87,41	76,16	3,81	8,18
Descongelado en MRA	124,04	102,42	109,54	81,26	91,97	87,30	3,07	8,92

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL ($\mu m/s$)	VSL ($\mu m/s$)	VAP ($\mu m/s$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
0 horas	57,01	37,59	48,83	63,48	75,94	81,78	1,79	6,55
4 horas	54,43	31,78	44,34	54,45	67,26	78,88	1,96	6,57
6 horas	46,76	24,50	34,27	38,62	60,80	60,98	1,63	5,40
Descongelado en BTS	118,59	96,82	103,68	80,11	91,53	86,50	3,03	8,76
Descongelado en MRA	114,30	91,26	98,26	77,84	90,30	84,83	3,03	8,54

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	38,6	11,4	50,0	60,3	8,4	31,3
4 horas	18,8	29,0	52,2	42,6	12,8	44,7
6 horas	10,4	24,0	65,6	16,0	14,7	69,3
Descongelado en BTS	63,5	26,1	10,3	79,4	13,9	6,7
Descongelado en MRA	87,2	9,0	3,9	90,0	6,8	3,2

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (μm)	Anchura (μm)	Área (μm^2)	Perímetro (μm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,55	4,13	30,04	23,19	2,07	0,70	0,35	0,92
4 horas	8,58	4,15	30,22	23,13	2,07	0,71	0,35	0,92
6 horas	8,62	4,18	30,49	23,34	2,07	0,70	0,35	0,93
Descongelado	8,34	4,22	29,22	22,84	1,98	0,70	0,33	0,95

Macho: T475

Raza: Large White

Fecha: 16/12/2005

Congelación: 2

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 302 Volumen (ml): 115 Mot. Subjetiva (%): 85 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 92 A. de Cabeza (%): 2 A. de Cola (%): 0 G.C.P. (%): 2 G.C.D. (%): 4

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	93,00	97,00	93,18	95,77
4 horas	83,50	95,00	92,55	94,48
6 horas	79,75	88,50	84,08	96,45
Descongelado en BTS	58,00	70,50	51,34	67,81
Descongelado en MRA	35,00	66,50	61,06	66,30

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	38,29	23,57	31,05	54,29	70,61	74,62	1,43	6,45
4 horas	68,92	31,57	55,01	47,20	58,72	78,17	2,49	6,77
6 horas	98,93	41,15	72,02	41,49	57,51	70,80	3,42	5,77
Descongelado en BTS	100,41	65,86	74,69	62,05	83,28	72,47	3,44	8,23
Descongelado en MRA	109,78	88,18	94,61	77,40	89,22	84,74	2,94	9,15

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	51,49	34,13	43,97	63,10	74,01	83,53	1,70	7,15
4 horas	50,77	24,36	41,29	50,40	62,59	79,41	1,82	7,48
6 horas	92,85	58,78	74,09	59,75	75,58	76,36	3,04	5,85
Descongelado en BTS	106,93	86,37	93,08	77,37	89,49	84,89	2,72	8,49
Descongelado en MRA	115,40	99,31	103,72	83,67	93,30	88,38	2,71	9,33

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	35,7	5,0	59,3	55,5	7,3	37,2
4 horas	37,6	30,8	31,6	36,1	14,8	49,2
6 horas	20,0	58,9	21,1	58,1	25,8	16,1
Descongelado en BTS	60,1	21,0	18,8	80,1	9,0	10,9
Descongelado en MRA	80,7	12,7	6,6	93,3	4,8	1,9

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,34	4,02	28,36	22,27	2,08	0,72	0,35	0,93
4 horas	8,50	4,09	29,66	23,25	2,08	0,69	0,35	0,92
6 horas	8,58	4,11	30,13	23,32	2,09	0,70	0,35	0,92
Descongelado	8,33	4,12	28,62	22,70	2,02	0,70	0,34	0,94

Macho: T475

Raza: Large White

Fecha: 22/12/2005

Congelación: 3

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 236 Volumen (ml): 164 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 87 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 5 G.C.P. (%): 2 G.C.D. (%): 6

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	86,25	96,00	92,31	95,26
4 horas	84,50	94,00	92,16	93,25
6 horas	83,00	94,50	89,26	87,16
Descongelado en BTS	62,50	74,00	46,55	75,48
Descongelado en MRA	27,50	67,00	55,80	68,21

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	47,92	25,81	36,73	48,46	65,06	71,72	1,82	6,35
4 horas	67,57	26,18	49,69	37,87	50,62	71,82	2,56	7,28
6 horas	78,73	44,05	64,52	49,75	63,89	73,35	2,39	6,10
Descongelado en BTS	103,78	76,32	83,79	68,75	86,82	77,58	3,28	6,82
Descongelado en MRA	108,85	93,27	98,08	82,84	92,40	88,55	2,60	9,03

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	51,88	34,91	43,77	60,26	74,24	78,44	1,69	6,47
4 horas	49,51	25,29	39,59	51,04	64,98	77,05	1,82	7,35
6 horas	58,58	30,30	43,66	41,51	63,53	63,31	2,11	6,13
Descongelado en BTS	111,75	88,52	97,97	76,96	88,19	86,23	3,04	7,79
Descongelado en MRA	122,91	101,32	107,83	81,70	92,44	87,33	3,13	8,85

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	35,6	8,9	55,5	52,4	6,5	41,2
4 horas	18,1	30,1	51,8	35,5	14,0	50,4
6 horas	36,8	27,6	35,5	26,1	17,4	56,5
Descongelado en BTS	68,3	15,1	16,5	82,7	12,1	5,1
Descongelado en MRA	89,0	4,5	6,5	85,8	13,0	1,2

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,53	4,14	30,16	23,07	2,06	0,71	0,35	0,92
4 horas	8,54	4,10	29,66	23,00	2,08	0,70	0,35	0,93
6 horas	8,04	4,11	27,92	22,37	1,96	0,70	0,32	0,93
Descongelado	8,36	4,19	29,11	22,64	2,00	0,71	0,33	0,95

Valoración mediante imágenes digitales del semen descongelado de verraco.

Macho: T475

Raza: Large White

Fecha: 28/12/2005

Congelación: 4

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 266 Volumen (ml): 172 Mot. Subjetiva (%): 85 Cal. Mov.: 5
 Formas normales (%): 88 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 2 G.C.P. (%): 5 G.C.D. (%): 5

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	86,25	97,00	93,62	97,12
4 horas	84,25	96,50	94,49	98,88
6 horas	80,50	94,00	60,00	92,20
Descongelado en BTS	63,25	71,50	47,02	74,78
Descongelado en MRA	30,25	64,50	56,83	62,99

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	61,25	36,24	51,88	57,85	68,75	81,70	2,00	6,96
4 horas	71,13	27,13	53,62	39,23	52,36	73,92	2,63	7,09
6 horas	37,23	13,60	23,90	33,90	59,98	55,77	1,61	6,29
Descongelado en BTS	98,95	68,66	77,57	66,25	85,26	76,42	3,31	7,42
Descongelado en MRA	109,24	93,70	99,41	83,58	92,13	89,81	2,59	9,05

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	43,11	27,46	35,54	57,47	72,21	77,03	1,56	6,58
4 horas	54,82	30,14	44,10	52,66	66,19	78,28	1,85	7,27
6 horas	58,06	25,74	40,72	38,48	59,15	62,02	2,18	5,44
Descongelado en BTS	102,63	84,91	90,96	79,56	90,65	86,61	2,61	8,41
Descongelado en MRA	118,40	101,13	107,13	83,34	92,12	89,56	2,73	8,86

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	47,4	14,7	37,9	48,4	3,8	47,8
4 horas	20,0	37,6	42,4	40,2	12,6	47,2
6 horas	8,7	13,0	78,3	23,3	23,3	53,4
Descongelado en BTS	62,8	20,4	16,8	83,8	6,7	9,5
Descongelado en MRA	87,8	7,1	5,1	88,6	7,8	3,6

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,51	4,13	30,00	23,24	2,07	0,70	0,35	0,92
4 horas	8,56	4,11	30,10	23,17	2,08	0,70	0,35	0,92
6 horas	8,60	4,20	30,44	23,31	2,05	0,70	0,34	0,93
Descongelado	8,30	4,19	28,95	22,60	1,98	0,71	0,33	0,94

Macho: T475

Raza: Large White

Fecha: 03/01/2006

Congelación: 5

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 214 Volumen (ml): 123 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 94 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 3 G.C.P. (%): 0 G.C.D. (%): 3

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	85,75	95,50	93,08	93,39
4 horas	86,25	96,00	95,33	93,75
6 horas	86,00	93,00	79,69	95,28
Descongelado en BTS	54,75	75,50	50,68	76,97
Descongelado en MRA	29,50	71,50	65,91	68,44

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	48,35	31,85	41,36	62,00	74,69	80,69	1,58	7,00
4 horas	78,95	35,99	61,78	46,39	57,57	78,32	2,83	6,75
6 horas	70,13	26,32	49,62	35,45	53,16	65,63	2,45	5,74
Descongelado en BTS	99,09	68,79	79,85	65,61	82,62	77,82	3,26	7,43
Descongelado en MRA	115,65	96,74	102,70	80,22	90,73	86,89	2,88	8,57

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	54,06	37,92	47,24	66,03	77,98	82,51	1,57	6,78
4 horas	59,73	29,75	49,79	50,81	61,03	81,41	1,94	7,76
6 horas	64,60	31,77	47,50	42,06	61,26	64,93	2,25	4,91
Descongelado en BTS	112,57	93,67	100,69	81,38	91,06	88,52	2,79	8,19
Descongelado en MRA	108,44	91,49	97,37	81,09	91,12	88,04	2,74	8,17

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	57,4	6,9	35,6	62,1	9,5	28,4
4 horas	25,7	38,9	35,4	37,5	19,2	43,3
6 horas	14,5	39,1	46,4	26,7	21,5	51,9
Descongelado en BTS	57,5	23,1	19,4	86,8	7,4	5,8
Descongelado en MRA	84,8	8,8	6,4	88,9	4,3	6,8

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,58	4,16	30,12	23,18	2,06	0,70	0,35	0,93
4 horas	8,63	4,17	30,62	23,33	2,07	0,71	0,35	0,92
6 horas	8,54	4,09	29,71	23,29	2,09	0,69	0,35	0,92
Descongelado	8,33	4,08	28,49	22,53	2,04	0,71	0,34	0,94

Macho: L69

Raza: Landrace

Fecha: 14/09/2005

Congelación: 1

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 192 Volumen (ml): 227 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 3
 Formas normales (%): 82 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 4 G.C.P. (%): 2 G.C.D. (%): 12

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	87,25	95,50	91,03	88,11
4 horas	73,50	96,00	89,60	82,95
6 horas	77,50	88,50	38,93	66,67
Descongelado en BTS	39,75	60,00	36,94	80,63
Descongelado en MRA	27,00	62,50	55,99	54,43

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	49,67	33,95	40,54	66,46	81,43	79,41	1,74	6,45
4 horas	56,45	33,47	44,82	56,39	74,45	74,14	1,98	7,01
6 horas	49,73	25,37	33,78	42,02	68,74	58,10	2,06	5,58
Descongelado en BTS	82,39	60,59	66,58	66,14	85,51	74,90	2,42	9,57
Descongelado en MRA	118,44	102,40	106,79	82,37	92,27	87,83	2,62	10,03

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	45,55	32,36	37,16	65,02	81,26	77,57	1,52	6,04
4 horas	52,41	38,04	43,30	69,92	83,89	81,38	1,72	6,77
6 horas	91,46	65,64	75,88	67,37	82,36	79,16	2,88	6,65
Descongelado en BTS	103,92	88,71	92,95	82,24	92,81	87,49	2,55	9,79
Descongelado en MRA	121,35	101,50	106,79	79,69	91,67	85,04	2,83	9,99

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	65,9	4,8	29,3	56,0	2,4	41,6
4 horas	41,9	11,4	46,7	71,6	4,2	24,2
6 horas	22,9	10,4	66,7	70,5	11,5	17,9
Descongelado en BTS	64,5	8,6	26,9	86,6	5,2	8,2
Descongelado en MRA	90,0	3,3	6,7	84,7	6,6	8,8

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,69	4,08	29,95	23,03	2,13	0,71	0,36	0,93
4 horas	8,74	4,12	30,27	23,26	2,13	0,70	0,36	0,93
6 horas	8,75	4,15	30,41	23,19	2,11	0,71	0,36	0,94
Descongelado	8,47	4,00	28,78	22,69	2,12	0,70	0,36	0,93

Macho: L69

Raza: Landrace

Fecha: 27/09/2005

Congelación: 2

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 128 Volumen (ml): 250 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 3
 Formas normales (%): 84 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 2 G.C.P. (%): 3 G.C.D. (%): 11

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	86,75	96,50	91,29	87,96
4 horas	81,25	96,50	91,54	91,93
6 horas	72,50	83,00	62,59	81,87
Descongelado en BTS	53,00	70,00	59,86	68,64
Descongelado en MRA	21,50	68,00	67,23	67,50

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	39,33	25,63	33,06	63,54	75,44	82,52	2,08	4,52
4 horas	46,34	24,50	37,22	52,55	65,34	79,07	2,53	4,53
6 horas	56,82	32,18	47,10	52,38	67,34	75,51	2,77	3,26
Descongelado en BTS	88,61	66,84	73,58	71,79	88,94	79,61	2,53	8,72
Descongelado en MRA	109,83	94,45	99,47	82,06	91,45	87,92	2,45	9,19

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	37,96	26,85	32,28	68,02	79,82	83,53	1,94	4,00
4 horas	39,61	25,07	33,91	61,07	71,14	83,74	1,99	4,47
6 horas	71,50	44,53	60,99	60,40	70,97	83,41	3,20	3,16
Descongelado en BTS	112,56	94,09	100,57	81,47	91,73	87,97	2,69	8,89
Descongelado en MRA	114,33	95,27	101,15	79,02	90,88	85,26	2,59	9,19

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	57,1	2,3	40,6	63,3	1,3	35,4
4 horas	42,1	11,2	46,7	54,4	3,3	42,3
6 horas	43,8	22,5	33,8	53,3	27,9	18,9
Descongelado en BTS	77,4	9,0	13,5	86,8	7,9	5,3
Descongelado en MRA	85,4	5,8	8,9	77,3	11,0	11,7

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,77	3,98	29,84	23,78	2,20	0,66	0,38	0,92
4 horas	8,79	3,97	29,52	23,35	2,21	0,68	0,38	0,93
6 horas	8,71	4,05	29,70	23,28	2,15	0,69	0,36	0,93
Descongelado	8,52	4,05	28,91	22,93	2,11	0,69	0,36	0,94

Macho: L69

Raza: Landrace

Fecha: 07/10/2005

Congelación: 3

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 156 Volumen (ml): 274 Mot. Subjetiva (%): 75 Cal. Mov.: 3
 Formas normales (%): 85 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 2 G.C.P. (%): 6 G.C.D. (%): 7

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	85,50	98,50	76,64	91,57
4 horas	85,00	95,00	88,59	98,17
6 horas	68,75	89,50	68,67	71,43
Descongelado en BTS	44,50	63,00	57,88	76,63
Descongelado en MRA	22,00	70,50	57,92	71,57

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	28,62	18,81	23,33	62,12	76,87	78,82	1,70	4,32
4 horas	44,10	22,21	36,21	50,08	61,47	80,30	2,40	4,60
6 horas	41,62	18,80	32,66	39,10	53,81	70,17	2,33	3,25
Descongelado en BTS	94,35	76,09	81,91	73,15	87,59	81,34	2,59	8,48
Descongelado en MRA	119,53	105,34	109,92	84,92	92,82	90,05	2,49	8,75

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	41,06	27,70	35,46	66,68	77,07	85,30	2,14	4,32
4 horas	49,23	30,39	41,52	62,18	72,58	84,44	2,59	4,46
6 horas	64,38	37,95	53,08	53,32	67,26	76,55	3,22	3,55
Descongelado en BTS	125,09	105,28	112,92	83,06	91,63	89,77	2,96	8,52
Descongelado en MRA	120,50	104,12	109,43	83,75	92,78	89,02	2,70	8,59

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	52,7	0	47,3	64,0	5,8	30,2
4 horas	35,9	8,6	55,5	59,0	6,8	34,1
6 horas	27,0	16,2	56,8	44,0	22,4	33,6
Descongelado en BTS	75,2	3,4	21,5	88,5	10,3	1,1
Descongelado en MRA	90,1	3,5	6,4	87,2	6,4	6,4

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,67	4,03	29,51	23,07	2,15	0,70	0,37	0,93
4 horas	8,79	3,96	29,45	23,30	2,22	0,68	0,38	0,93
6 horas	8,77	4,00	29,41	23,40	2,19	0,68	0,37	0,94
Descongelado	8,62	3,98	28,86	23,08	2,17	0,68	0,37	0,93

Macho: L69

Raza: Landrace

Fecha: 19/10/2005

Congelación: 4

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración ($10^6/ml$): 159 Volumen (ml): 315 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 81 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 2 G.C.P. (%): 6 G.C.D. (%): 11

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	77,50	97,00	94,77	95,24
4 horas	78,75	80,50	89,16	94,69
6 horas	55,50	93,50	62,26	82,29
Descongelado en BTS	44,00	62,50	45,15	66,56
Descongelado en MRA	23,75	62,00	65,64	72,65

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL ($\mu m/s$)	VSL ($\mu m/s$)	VAP ($\mu m/s$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
0 horas	38,61	21,94	30,49	55,06	69,35	77,28	2,29	4,12
4 horas	46,16	21,95	36,96	48,14	59,36	79,24	2,63	4,15
6 horas	38,85	20,91	30,29	49,32	64,07	73,24	2,23	4,01
Descongelado en BTS	71,65	53,64	57,37	64,77	85,47	72,65	2,31	8,98
Descongelado en MRA	120,67	108,18	111,76	87,54	95,28	91,17	2,52	10,23

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL ($\mu m/s$)	VSL ($\mu m/s$)	VAP ($\mu m/s$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
0 horas	44,14	31,03	38,33	66,23	76,78	84,03	2,13	4,07
4 horas	41,08	24,31	35,14	59,51	69,57	84,58	2,14	4,39
6 horas	73,14	47,42	64,81	63,34	71,96	86,84	3,16	3,75
Descongelado en BTS	112,30	91,55	96,86	79,35	92,30	84,62	2,88	9,88
Descongelado en MRA	121,94	105,93	110,49	85,72	94,57	89,97	2,66	9,41

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	44,0	3,2	52,8	64,2	3,7	32,1
4 horas	29,9	11,8	58,3	52,9	7,1	40,0
6 horas	33,3	4,5	62,1	65,0	24,4	10,6
Descongelado en BTS	66,7	0,8	32,6	80,7	11,4	8,0
Descongelado en MRA	93,3	2,6	4,2	92,3	5,7	1,9

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (μm)	Anchura (μm)	Área (μm^2)	Perímetro (μm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,69	4,08	29,89	23,44	2,13	0,68	0,36	0,93
4 horas	8,69	4,07	29,64	23,33	2,14	0,68	0,36	0,94
6 horas	8,77	4,04	29,44	23,24	2,18	0,68	0,37	0,95
Descongelado	8,59	3,98	28,70	22,66	2,16	0,70	0,37	0,94

Macho: L69

Raza: Landrace

Fecha: 28/10/2005

Congelación: 5

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 172 Volumen (ml): 196 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 3
 Formas normales (%): 81 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 3 G.C.P. (%): 3 G.C.D. (%): 13

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	88,00	96,50	79,78	90,96
4 horas	74,50	94,50	95,60	92,54
6 horas	63,25	84,00	60,71	83,96
Descongelado en BTS	47,25	63,50	56,68	70,54
Descongelado en MRA	26,25	67,00	61,15	69,53

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	36,01	24,08	30,61	61,42	73,40	80,72	1,85	4,22
4 horas	49,80	26,87	40,98	52,36	63,29	80,75	2,65	4,01
6 horas	56,20	36,17	49,07	61,21	71,61	83,00	2,49	4,62
Descongelado en BTS	91,51	72,98	79,44	72,36	87,15	81,22	2,45	8,51
Descongelado en MRA	110,41	99,43	102,34	87,70	95,12	91,24	2,33	10,10

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	35,26	23,65	28,67	60,45	75,57	77,02	1,99	3,67
4 horas	47,00	29,88	40,28	63,11	73,56	84,64	2,34	4,38
6 horas	53,70	38,28	46,18	64,82	77,98	80,09	2,44	3,39
Descongelado en BTS	109,33	96,62	101,01	85,37	93,15	90,61	2,27	8,91
Descongelado en MRA	124,59	110,17	113,82	87,35	95,86	90,71	2,74	10,38

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	54,9	1,8	43,4	48,0	1,0	51,0
4 horas	38,4	10,7	50,9	59,3	6,5	34,2
6 horas	55,3	13,2	31,6	66,7	6,2	27,1
Descongelado en BTS	73,3	4,7	22,0	90,2	2,4	7,3
Descongelado en MRA	94,6	2,0	3,4	94,9	2,9	2,8

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,80	4,02	29,75	23,07	2,19	0,70	0,37	0,93
4 horas	8,83	3,98	29,69	23,34	2,22	0,68	0,38	0,93
6 horas	8,75	4,03	29,52	23,23	2,18	0,69	0,37	0,94
Descongelado	8,58	4,01	29,00	23,17	2,15	0,68	0,36	0,93

Macho: L437

Raza: Landrace

Fecha: 04/01/2006

Congelación: 1

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración ($10^6/ml$): 116 Volumen (ml): 148 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 3
 Formas normales (%): 83 A. de Cabeza (%): 1 A. de Cola (%): 2 G.C.P. (%): 8 G.C.D. (%): 6

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	81,00	95,00	90,81	86,17
4 horas	76,75	92,50	94,66	92,40
6 horas	74,50	89,50	85,00	91,36
Descongelado en BTS	29,50	54,50	40,74	52,32
Descongelado en MRA	16,50	64,50	29,15	42,23

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL ($\mu m/s$)	VSL ($\mu m/s$)	VAP ($\mu m/s$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
0 horas	52,72	31,52	42,10	51,27	67,97	72,46	1,85	6,31
4 horas	67,87	39,86	56,60	58,87	70,93	81,80	2,18	6,50
6 horas	65,91	30,98	49,45	40,84	58,53	66,86	2,30	6,58
Descongelado en BTS	88,73	71,47	75,24	75,43	91,03	81,25	2,43	9,94
Descongelado en MRA	85,21	66,69	72,34	69,63	85,07	78,88	2,23	9,19

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL ($\mu m/s$)	VSL ($\mu m/s$)	VAP ($\mu m/s$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
0 horas	56,80	42,16	50,55	68,33	79,50	83,33	1,67	5,43
4 horas	51,92	32,14	43,98	60,19	73,93	80,05	1,67	6,46
6 horas	52,35	31,71	41,56	47,60	68,91	66,08	1,80	5,01
Descongelado en BTS	105,38	89,56	94,73	80,89	91,46	87,12	2,54	10,12
Descongelado en MRA	96,03	79,53	83,38	75,92	89,72	82,40	2,51	9,03

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	36,6	9,0	54,5	64,3	6,2	29,5
4 horas	53,7	18,5	27,8	46,9	12,5	40,6
6 horas	23,3	28,2	48,5	34,1	10,2	55,7
Descongelado en BTS	82,1	3,8	14,2	87,1	3,5	9,4
Descongelado en MRA	70,6	4,4	25,0	78,1	3,5	18,4

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (μm)	Anchura (μm)	Área (μm^2)	Perímetro (μm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,50	4,21	29,77	22,79	2,02	0,72	0,34	0,94
4 horas	8,49	4,14	29,46	22,84	2,06	0,71	0,35	0,94
6 horas	8,36	4,18	29,27	22,64	2,00	0,72	0,33	0,94
Descongelado	8,11	4,15	28,06	22,44	1,96	0,70	0,32	0,94

Macho: L437

Raza: Landrace

Fecha: 10/01/2006

Congelación: 2

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 201 Volumen (ml): 224 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 89 A. de Cabeza (%): 1 A. de Cola (%): 1 G.C.P. (%): 3 G.C.D. (%): 6

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	87,00	97,50	97,66	94,85
4 horas	81,00	96,00	97,06	95,13
6 horas	81,25	87,50	86,67	89,50
Descongelado en BTS	38,25	66,00	53,13	59,52
Descongelado en MRA	22,00	48,00	39,34	53,82

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	64,96	33,73	51,71	49,98	63,35	77,19	2,26	5,39
4 horas	78,73	48,51	63,37	57,05	71,35	76,91	2,81	5,83
6 horas	59,12	27,64	43,27	35,47	57,83	59,11	1,95	5,71
Descongelado en BTS	93,02	72,19	75,74	72,23	90,46	77,90	2,83	10,29
Descongelado en MRA	99,45	81,45	85,51	77,07	90,73	83,15	2,61	8,91

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	54,19	34,84	45,46	60,70	73,04	80,25	1,89	5,82
4 horas	58,15	34,77	47,98	55,75	68,04	80,02	1,90	6,21
6 horas	44,31	18,02	29,09	32,84	55,96	56,53	1,91	4,73
Descongelado en BTS	113,67	96,65	101,00	81,26	92,43	86,50	2,66	9,90
Descongelado en MRA	112,51	94,67	99,36	80,37	91,98	85,74	2,62	9,36

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	32,7	22,8	44,6	53,3	10,5	36,2
4 horas	43,8	24,1	32,1	44,5	12,8	42,7
6 horas	19,0	19,0	62,0	13,4	11,8	74,8
Descongelado en BTS	80,5	4,1	15,4	86,2	6,5	7,3
Descongelado en MRA	82,1	7,6	10,4	85,6	4,8	9,6

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elípticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,46	4,19	29,93	22,97	2,02	0,71	0,34	0,93
4 horas	8,45	4,17	29,49	22,71	2,03	0,72	0,34	0,94
6 horas	8,53	4,24	30,12	22,89	2,01	0,72	0,34	0,94
Descongelado	8,26	4,16	28,33	22,64	1,99	0,69	0,33	0,95

Macho: L437

Raza: Landrace

Fecha: 17/01/2006

Congelación: 3

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración ($10^6/ml$): 196 Volumen (ml): 240 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 83 A. de Cabeza (%): 1 A. de Cola (%): 3 G.C.P. (%): 2 G.C.D. (%): 12

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	82,25	95,50	90,55	86,89
4 horas	81,25	95,50	95,45	91,79
6 horas	80,00	92,00	91,23	90,84
Descongelado en BTS	36,75	64,00	39,63	53,15
Descongelado en MRA	21,50	62,00	37,36	37,26

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL ($\mu m/s$)	VSL ($\mu m/s$)	VAP ($\mu m/s$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
0 horas	64,53	36,45	53,51	52,15	65,69	77,33	2,15	5,62
4 horas	76,51	40,23	61,19	52,56	65,81	77,94	2,72	5,96
6 horas	88,01	50,38	70,76	53,90	68,20	76,69	2,78	5,98
Descongelado en BTS	88,27	68,72	72,77	73,40	90,68	79,31	2,62	9,73
Descongelado en MRA	93,17	76,49	80,89	73,21	87,20	81,47	2,33	9,35

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL ($\mu m/s$)	VSL ($\mu m/s$)	VAP ($\mu m/s$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
0 horas	50,30	35,38	43,79	64,24	75,96	82,72	1,54	6,05
4 horas	52,90	29,69	43,67	53,21	66,56	78,29	1,68	6,20
6 horas	50,30	26,56	35,40	39,74	61,79	60,84	1,89	5,53
Descongelado en BTS	110,81	93,27	97,96	81,47	93,45	86,16	2,62	10,70
Descongelado en MRA	106,54	87,03	92,99	75,31	87,72	83,74	2,53	9,28

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	37,9	18,9	43,2	60,0	2,7	37,3
4 horas	36,0	36,0	28,1	36,6	12,8	50,6
6 horas	39,8	33,6	26,5	18,8	12,5	68,8
Descongelado en BTS	78,6	6,8	14,6	86,4	6,8	6,8
Descongelado en MRA	74,2	3,1	22,7	78,7	7,5	13,8

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (μm)	Anchura (μm)	Área (μm^2)	Perímetro (μm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,47	4,17	29,52	22,80	2,03	0,71	0,34	0,94
4 horas	8,49	4,14	29,44	22,73	2,05	0,72	0,34	0,94
6 horas	8,47	4,13	29,26	22,83	2,05	0,71	0,34	0,94
Descongelado	8,12	4,13	28,03	22,28	1,97	0,71	0,33	0,94

Macho: L437

Raza: Landrace

Fecha: 24/01/2006

Congelación: 4

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 197 Volumen (ml): 261 Mot. Subjetiva (%): 85 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 83 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 2 G.C.P. (%): 3 G.C.D. (%): 10

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	85,50	99,00	93,57	91,57
4 horas	85,50	92,50	90,98	88,06
6 horas	85,25	93,00	92,07	91,70
Descongelado en BTS	34,50	56,00	36,39	43,84
Descongelado en MRA	21,75	62,50	32,71	44,85

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	54,69	32,86	43,21	53,48	69,89	74,48	1,99	6,30
4 horas	64,60	37,21	53,01	58,56	71,75	79,42	2,29	5,84
6 horas	64,01	34,85	49,05	46,17	64,23	67,51	2,11	5,81
Descongelado en BTS	99,71	73,51	79,51	68,15	87,54	75,32	3,07	9,57
Descongelado en MRA	88,31	70,32	76,63	74,26	87,07	83,53	2,33	8,23

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	46,16	32,33	40,62	63,37	74,47	82,62	1,48	5,54
4 horas	61,08	33,90	52,16	55,89	66,94	82,19	1,88	6,65
6 horas	76,92	51,23	64,43	59,48	74,23	76,88	2,40	5,02
Descongelado en BTS	114,72	91,49	98,47	77,75	90,78	84,25	2,91	9,37
Descongelado en MRA	100,16	80,50	86,32	74,84	88,17	82,77	2,63	9,56

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	41,8	10,0	48,2	52,8	6,5	40,7
4 horas	49,0	21,2	29,8	41,3	22,0	36,7
6 horas	32,8	19,2	48,0	51,6	16,1	32,3
Descongelado en BTS	69,6	9,8	20,6	80,2	12,9	6,9
Descongelado en MRA	76,7	6,9	16,4	78,6	7,1	14,3

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elípticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,45	4,13	29,32	22,71	2,05	0,71	0,34	0,93
4 horas	8,42	4,09	29,05	22,83	2,06	0,70	0,35	0,93
6 horas	8,47	4,14	29,55	23,03	2,05	0,70	0,34	0,93
Descongelado	8,18	4,16	28,38	22,23	1,97	0,72	0,33	0,94

Macho: L437

Raza: Landrace

Fecha: 08/02/2006

Congelación: 5

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 237 Volumen (ml): 179 Mot. Subjetiva (%): 85 Cal. Mov.: 3
 Formas normales (%): 90 A. de Cabeza (%): 1 A. de Cola (%): 1 G.C.P. (%): 2 G.C.D. (%): 6

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	81,75	98,00	95,70	86,86
4 horas	78,00	98,50	91,37	94,39
6 horas	76,00	93,00	88,74	88,34
Descongelado en BTS	36,00	66,50	31,37	63,07
Descongelado en MRA	15,75	61,50	41,45	54,85

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	63,96	36,32	51,57	51,24	66,65	74,87	2,10	5,71
4 horas	68,05	38,36	54,78	51,25	63,79	77,77	2,34	5,06
6 horas	82,90	46,04	68,19	49,82	62,75	76,71	2,56	5,03
Descongelado en BTS	81,83	58,83	65,46	66,20	86,79	74,80	2,59	9,73
Descongelado en MRA	112,15	95,04	100,05	81,47	91,79	87,09	2,71	10,00

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	46,23	32,81	40,45	63,17	76,33	79,95	1,44	5,22
4 horas	52,81	30,78	43,08	54,23	68,04	77,72	1,88	5,93
6 horas	65,65	40,24	52,60	48,87	65,85	69,28	2,19	5,47
Descongelado en BTS	111,15	92,87	98,35	82,14	93,19	87,57	2,64	9,72
Descongelado en MRA	112,89	93,19	98,96	79,07	91,40	85,38	2,68	9,71

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	35,3	20,9	43,9	55,3	5,7	39,0
4 horas	38,1	20,4	41,6	41,0	11,8	47,2
6 horas	32,3	34,2	33,5	35,3	15,7	49,0
Descongelado en BTS	65,3	6,7	28,0	91,4	5,6	3,0
Descongelado en MRA	89,5	3,8	6,7	85,9	4,7	9,4

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,45	4,22	30,05	23,09	2,01	0,71	0,33	0,93
4 horas	8,46	4,19	29,70	22,89	2,02	0,71	0,34	0,94
6 horas	8,38	4,20	29,38	22,87	1,99	0,71	0,33	0,94
Descongelado	8,22	4,12	28,39	22,19	2,00	0,72	0,33	0,94

Macho: R4052

Raza: Landrace

Fecha: 02/12/2005

Congelación: 1

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 347 Volumen (ml): 240 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 3
 Formas normales (%): 85 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 6 G.C.P. (%): 1 G.C.D. (%): 8

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	88,50	99,00	93,22	90,45
4 horas	81,50	95,50	97,49	92,96
6 horas	69,00	88,00	87,32	85,51
Descongelado en BTS	61,75	71,50	71,35	83,42
Descongelado en MRA	42,75	65,00	75,65	71,64

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	56,83	36,04	47,91	59,16	70,90	81,23	1,86	6,07
4 horas	69,37	41,91	56,05	59,05	71,70	81,61	2,61	5,48
6 horas	83,52	52,78	69,90	61,15	73,64	81,33	2,71	5,32
Descongelado en BTS	104,33	70,67	78,97	65,55	86,90	74,24	3,54	8,55
Descongelado en MRA	120,06	92,51	102,82	72,95	85,73	83,17	2,98	9,00

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	60,32	38,64	51,87	61,79	71,84	84,15	2,08	5,58
4 horas	58,74	36,62	47,98	57,13	71,18	78,21	2,03	5,73
6 horas	73,87	43,97	58,37	53,59	68,09	77,56	2,66	5,20
Descongelado en BTS	121,32	92,83	102,03	74,51	88,62	82,75	3,36	9,24
Descongelado en MRA	119,49	93,78	102,79	75,75	88,01	84,65	3,14	9,20

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	51,4	12,7	35,9	50,0	17,6	32,4
4 horas	51,6	19,8	28,6	44,6	11,6	43,8
6 horas	58,8	24,5	16,7	33,3	26,7	40,0
Descongelado en BTS	66,2	19,9	13,9	74,5	18,9	6,5
Descongelado en MRA	75,8	15,8	8,5	79,1	11,2	9,7

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,26	4,30	29,20	22,40	1,92	0,73	0,32	0,96
4 horas	8,30	4,18	28,74	22,29	1,99	0,73	0,33	0,95
6 horas	8,36	4,19	28,87	22,52	2,00	0,71	0,33	0,95
Descongelado	8,12	4,22	28,27	22,62	1,93	0,69	0,32	0,95

Macho: R4052

Raza: Landrace

Fecha: 09/12/2005

Congelación: 2

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 329 Volumen (ml): 243 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 3
 Formas normales (%): 83 A. de Cabeza (%): 2 A. de Cola (%): 1 G.C.P. (%): 1 G.C.D. (%): 13

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	89,00	99,50	86,03	98,35
4 horas	91,00	96,00	97,60	96,46
6 horas	81,25	89,00	91,57	80,30
Descongelado en BTS	63,00	73,00	39,44	75,86
Descongelado en MRA	50,50	63,50	65,82	65,60

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	56,15	33,49	46,78	56,60	70,53	78,33	1,84	7,37
4 horas	69,60	39,31	57,56	57,96	69,91	81,53	2,38	7,81
6 horas	71,83	41,08	57,78	51,07	67,47	72,95	2,35	6,62
Descongelado en BTS	85,22	61,61	67,42	66,23	86,66	74,30	2,72	8,54
Descongelado en MRA	93,45	73,90	79,14	76,04	89,75	83,04	2,59	8,84

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	59,52	37,47	49,35	57,93	71,15	79,32	1,97	5,77
4 horas	49,45	26,82	39,39	52,77	67,11	76,92	1,80	6,84
6 horas	62,66	40,99	50,48	55,21	74,46	70,47	1,99	5,58
Descongelado en BTS	106,56	79,78	88,03	73,53	88,26	81,80	3,01	9,68
Descongelado en MRA	93,38	72,12	77,78	72,49	88,41	80,03	2,55	9,18

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	45,4	11,1	43,5	49,3	12,1	38,6
4 horas	53,5	21,5	25,0	36,8	8,3	54,9
6 horas	42,3	22,5	35,2	49,3	11,9	38,8
Descongelado en BTS	69,2	7,5	23,3	75,5	16,8	7,7
Descongelado en MRA	80,7	6,9	12,4	70,6	11,2	18,2

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,23	4,21	28,53	22,12	1,96	0,73	0,32	0,95
4 horas	8,55	4,13	30,35	23,28	2,07	0,70	0,35	0,92
6 horas	8,18	4,19	29,40	22,75	1,95	0,71	0,32	0,92
Descongelado	7,97	4,24	27,78	21,81	1,88	0,73	0,30	0,96

Macho: R4052

Raza: Landrace

Fecha: 13/12/2005

Congelación: 3

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 235 Volumen (ml): 307 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 90 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 4 G.C.P. (%): 1 G.C.D. (%): 5

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	84,50	98,50	94,88	91,72
4 horas	78,75	94,00	91,28	94,66
6 horas	85,50	94,50	95,09	87,43
Descongelado en BTS	67,50	81,50	68,35	79,95
Descongelado en MRA	74,00	39,50	63,76	66,77

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	55,26	31,51	44,91	54,31	69,02	76,97	1,98	6,94
4 horas	60,40	37,45	51,69	62,55	74,55	82,97	1,95	7,62
6 horas	96,01	54,01	78,25	55,24	68,07	79,35	3,12	5,77
Descongelado en BTS	93,04	67,06	76,55	69,41	86,15	79,67	2,89	8,24
Descongelado en MRA	102,23	84,92	90,31	78,54	90,16	85,22	2,52	9,42

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	55,30	39,08	49,69	68,59	77,87	86,87	1,66	7,05
4 horas	42,24	28,28	36,53	61,23	74,92	79,23	1,38	6,99
6 horas	54,91	29,02	42,98	44,14	62,03	67,81	1,98	4,85
Descongelado en BTS	111,59	89,23	96,95	78,01	90,08	85,51	2,86	9,18
Descongelado en MRA	100,80	79,92	86,98	74,31	87,05	82,98	2,70	8,93

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	42,8	12,7	44,6	67,4	6,2	26,4
4 horas	58,1	14,5	27,4	48,3	5,9	45,8
6 horas	43,0	41,6	15,4	30,2	18,1	51,7
Descongelado en BTS	72,9	12,5	14,6	83,3	10,6	6,1
Descongelado en MRA	83,0	5,3	11,7	76,4	9,1	14,6

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,32	4,19	28,95	22,65	1,99	0,71	0,33	0,94
4 horas	8,35	4,12	28,43	22,45	2,03	0,71	0,34	0,95
6 horas	8,27	4,18	28,69	22,51	1,98	0,71	0,33	0,95
Descongelado	8,04	4,23	27,91	22,11	1,91	0,72	0,31	0,96

Macho: R4052

Raza: Landrace

Fecha: 20/12/2005

Congelación: 4

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración ($10^6/ml$): 416 Volumen (ml): 130 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 89 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 2 G.C.P. (%): 2 G.C.D. (%): 7

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	91,00	98,50	91,28	91,73
4 horas	85,75	94,50	89,16	98,37
6 horas	81,50	94,00	90,45	93,72
Descongelado en BTS	70,50	82,50	69,25	82,59
Descongelado en MRA	55,00	71,50	70,55	85,46

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL ($\mu m/s$)	VSL ($\mu m/s$)	VAP ($\mu m/s$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
0 horas	53,78	35,82	45,51	63,04	76,16	80,93	1,76	5,91
4 horas	66,08	41,26	56,69	63,02	72,86	85,18	2,22	6,42
6 horas	68,91	41,80	55,98	55,97	70,92	76,49	2,51	5,45
Descongelado en BTS	104,79	75,62	83,57	68,98	87,42	77,50	3,43	8,83
Descongelado en MRA	126,87	104,45	110,38	80,66	92,38	85,97	3,06	9,58

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL ($\mu m/s$)	VSL ($\mu m/s$)	VAP ($\mu m/s$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
0 horas	55,73	37,94	49,74	68,72	77,19	88,17	1,73	6,15
4 horas	45,72	32,09	39,89	70,66	80,73	86,31	1,58	5,95
6 horas	47,70	32,22	38,96	53,09	69,17	72,30	1,72	4,60
Descongelado en BTS	124,30	96,58	104,56	75,81	89,91	83,02	3,37	9,28
Descongelado en MRA	125,65	104,63	110,80	81,42	92,51	87,04	3,03	9,41

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	58,9	8,0	33,0	67,3	13,3	19,5
4 horas	56,1	17,9	26,0	66,9	7,2	25,9
6 horas	42,9	24,8	32,4	42,2	6,0	51,8
Descongelado en BTS	69,6	17,6	12,7	79,0	15,4	5,6
Descongelado en MRA	85,0	10,4	4,6	87,2	9,1	3,7

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (μm)	Anchura (μm)	Área (μm^2)	Perímetro (μm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,30	4,21	28,79	22,61	1,98	0,71	0,33	0,95
4 horas	8,19	4,16	28,18	22,18	1,97	0,72	0,33	0,95
6 horas	8,20	4,22	28,47	22,32	1,95	0,72	0,32	0,95
Descongelado	8,00	4,23	28,01	21,93	1,89	0,73	0,31	0,95

Macho: R4052

Raza: Landrace

Fecha: 27/12/2005

Congelación: 5

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 309 Volumen (ml): 246 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 3
 Formas normales (%): 80 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 10 G.C.P. (%): 2 G.C.D. (%): 8

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	92,50	98,50	94,97	95,90
4 horas	85,50	93,00	96,08	97,86
6 horas	81,25	93,50	92,70	87,29
Descongelado en BTS	66,75	80,00	53,96	84,52
Descongelado en MRA	39,50	67,50	58,45	65,34

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	67,17	38,95	56,88	58,36	69,29	83,34	2,29	5,77
4 horas	94,36	48,53	79,12	52,45	62,38	82,66	2,90	5,83
6 horas	83,30	44,39	66,63	49,46	64,76	74,63	2,84	6,53
Descongelado en BTS	89,99	65,35	71,61	68,55	87,51	76,72	2,73	8,50
Descongelado en MRA	107,28	83,06	90,02	74,09	88,04	81,87	2,98	9,75

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	55,34	38,56	48,41	68,41	77,90	86,14	1,72	6,37
4 horas	63,41	40,79	54,23	61,93	71,73	84,93	2,17	5,07
6 horas	56,08	30,58	44,19	44,85	62,59	68,88	2,00	5,37
Descongelado en BTS	120,02	92,00	101,11	75,53	89,18	83,76	3,17	9,62
Descongelado en MRA	104,85	82,88	88,63	75,17	89,12	82,02	2,88	9,01

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	45,3	24,2	30,5	67,7	10,6	21,7
4 horas	33,3	45,5	21,1	57,7	12,1	30,2
6 horas	37,1	37,1	25,8	30,5	17,2	52,3
Descongelado en BTS	72,1	9,7	18,2	79,3	16,6	4,1
Descongelado en MRA	76,5	13,1	10,5	78,4	9,6	12,1

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,23	4,19	28,88	22,93	1,96	0,69	0,32	0,94
4 horas	8,21	4,19	28,64	22,31	1,96	0,72	0,32	0,94
6 horas	8,24	4,21	28,64	22,31	1,96	0,72	0,32	0,95
Descongelado	7,94	4,18	27,41	21,90	1,90	0,72	0,31	0,95

Macho: R3846

Raza: Landrace

Fecha: 22/12/2005

Congelación: 1

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 308 Volumen (ml): 278 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 90 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 0 G.C.P. (%): 2 G.C.D. (%): 8

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	83,50	98,50	95,77	96,83
4 horas	87,00	95,50	93,47	97,62
6 horas	85,75	95,00	80,88	87,04
Descongelado en BTS	56,00	67,50	50,46	72,28
Descongelado en MRA	40,25	72,50	65,23	62,29

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	50,06	29,23	41,42	53,57	66,18	79,53	1,71	6,94
4 horas	68,96	36,20	55,79	53,07	65,31	79,00	2,35	6,66
6 horas	48,44	25,40	36,77	36,85	57,66	60,01	1,64	5,75
Descongelado en BTS	102,10	76,06	82,63	71,66	89,45	79,16	3,04	9,37
Descongelado en MRA	106,79	88,53	96,09	78,39	88,83	86,52	2,44	8,58

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	43,17	27,99	37,02	59,22	71,82	80,91	1,40	6,80
4 horas	42,94	23,37	34,47	50,86	63,70	78,03	1,61	6,58
6 horas	44,81	21,36	29,68	37,42	63,58	56,14	1,83	4,84
Descongelado en BTS	112,10	90,91	97,38	78,59	90,87	85,27	2,84	9,00
Descongelado en MRA	110,93	91,06	97,80	78,38	89,96	85,67	2,69	8,42

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	40,9	6,1	53,0	45,8	4,2	50,0
4 horas	36,6	25,2	38,2	31,7	4,9	63,4
6 horas	20,8	13,9	65,3	16,0	14,0	70,0
Descongelado en BTS	75,5	10,6	13,9	82,6	9,4	8,0
Descongelado en MRA	80,2	8,4	11,5	81,4	9,6	9,0

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,13	4,12	28,39	22,27	1,98	0,72	0,33	0,93
4 horas	8,11	4,09	28,04	22,22	1,99	0,71	0,33	0,93
6 horas	8,07	4,12	28,06	22,24	1,96	0,71	0,32	0,93
Descongelado	7,88	4,13	27,15	21,70	1,91	0,73	0,31	0,94

Macho: R3846

Raza: Landrace

Fecha: 28/12/2005

Congelación: 2

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 286 Volumen (ml): 244 Mot. Subjetiva (%): 85 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 86 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 1 G.C.P. (%): 2 G.C.D. (%): 11

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	84,25	98,00	96,04	96,19
4 horas	81,50	94,50	91,53	95,53
6 horas	83,00	95,00	93,70	88,52
Descongelado en BTS	55,50	61,50	51,05	65,94
Descongelado en MRA	29,50	50,50	57,14	63,47

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	49,61	30,86	39,92	54,77	70,61	75,40	1,74	6,74
4 horas	59,81	33,40	47,27	54,19	69,69	76,88	2,02	7,53
6 horas	94,02	57,82	78,40	57,72	71,11	78,86	2,71	6,92
Descongelado en BTS	95,57	73,43	78,36	71,70	89,82	78,55	2,88	8,90
Descongelado en MRA	106,58	88,31	94,74	77,87	88,93	85,78	2,57	8,47

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	42,52	29,25	35,90	61,90	76,02	78,67	1,46	6,59
4 horas	45,77	27,75	37,51	56,80	70,58	79,15	1,60	7,09
6 horas	57,88	36,80	48,71	52,04	68,50	72,43	1,83	5,55
Descongelado en BTS	106,97	86,34	92,57	75,71	89,18	83,15	2,61	9,10
Descongelado en MRA	104,13	86,56	92,44	78,40	89,73	85,43	2,53	8,76

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	39,6	5,6	54,9	54,5	2,1	43,4
4 horas	38,6	15,2	46,2	45,7	5,5	48,8
6 horas	47,7	33,7	18,6	39,0	11,7	49,4
Descongelado en BTS	73,8	8,5	17,7	76,7	10,2	13,1
Descongelado en MRA	80,6	6,3	13,1	80,8	7,3	11,9

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,18	4,17	29,06	22,35	1,96	0,73	0,32	0,92
4 horas	8,08	4,08	28,22	22,27	1,98	0,72	0,33	0,92
6 horas	8,21	4,17	28,85	22,46	1,97	0,72	0,33	0,93
Descongelado	7,90	4,12	27,21	21,86	1,92	0,72	0,31	0,94

Macho: R3846

Raza: Landrace

Fecha: 03/01/2006

Congelación: 3

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 253 Volumen (ml): 286 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 89 A. de Cabeza (%): 1 A. de Cola (%): 2 G.C.P. (%): 4 G.C.D. (%): 4

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	83,50	96,50	91,28	85,05
4 horas	81,00	96,00	96,32	98,03
6 horas	84,75	93,50	87,38	92,04
Descongelado en BTS	53,00	63,00	53,11	78,41
Descongelado en MRA	29,00	68,50	57,14	45,86

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	49,26	31,10	41,56	58,91	71,57	80,36	1,62	6,98
4 horas	74,75	38,33	59,42	51,67	65,74	77,81	2,49	7,74
6 horas	91,83	54,63	75,61	54,15	67,73	76,38	2,82	6,06
Descongelado en BTS	101,47	73,24	80,83	69,30	87,50	78,01	3,24	9,29
Descongelado en MRA	112,46	95,29	100,94	81,89	92,04	87,93	2,63	9,07

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	33,57	23,31	29,26	62,73	74,78	81,86	1,11	7,17
4 horas	45,42	24,53	37,54	51,47	62,38	81,26	1,59	6,55
6 horas	60,81	35,13	47,39	49,03	66,98	70,05	2,14	5,32
Descongelado en BTS	116,74	95,53	102,83	80,30	91,14	87,19	2,95	9,14
Descongelado en MRA	112,07	93,13	98,43	80,05	91,55	86,29	2,73	8,94

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	50,0	9,4	40,6	56,5	0	43,5
4 horas	31,2	32,1	36,7	37,8	7,4	54,7
6 horas	40,3	34,5	25,2	34,6	18,5	46,9
Descongelado en BTS	72,6	14,8	12,6	86,8	9,5	3,7
Descongelado en MRA	85,1	7,1	7,7	86,8	4,9	8,3

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,17	4,13	28,61	22,47	1,98	0,71	0,33	0,93
4 horas	8,12	4,11	28,56	22,36	1,98	0,72	0,33	0,92
6 horas	8,16	4,11	28,35	22,48	1,99	0,71	0,33	0,93
Descongelado	7,89	4,08	26,86	21,92	1,93	0,70	0,32	0,94

Macho: R3846

Raza: Landrace

Fecha: 10/01/2006

Congelación: 4

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 347 Volumen (ml): 212 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 83 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 0 G.C.P. (%): 2 G.C.D. (%): 15

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	85,00	94,50	84,00	93,71
4 horas	81,00	97,00	90,34	91,22
6 horas	77,50	91,50	90,07	91,61
Descongelado en BTS	49,75	70,00	54,93	70,80
Descongelado en MRA	27,25	64,00	65,77	64,24

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	51,08	28,87	41,87	54,51	68,58	76,91	1,68	6,52
4 horas	80,93	43,99	68,24	53,53	63,92	81,94	2,53	5,90
6 horas	78,25	43,16	62,72	47,10	62,40	71,43	2,51	6,31
Descongelado en BTS	94,54	69,89	79,11	70,84	85,53	81,20	2,69	7,94
Descongelado en MRA	118,87	98,62	104,39	79,62	91,62	85,63	3,01	9,15

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	32,32	21,13	26,56	57,30	72,19	76,32	1,18	6,18
4 horas	42,28	24,60	34,29	52,98	67,20	76,45	1,47	7,06
6 horas	52,72	28,52	41,06	40,98	57,79	66,88	1,86	5,90
Descongelado en BTS	104,17	83,59	91,28	78,80	89,65	86,81	2,56	7,92
Descongelado en MRA	120,87	98,75	106,13	78,81	89,82	86,12	2,91	9,18

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	46,5	13,1	40,4	44,0	0,8	55,2
4 horas	41,4	29,7	28,9	36,1	6,7	57,1
6 horas	35,6	29,7	34,7	23,2	14,6	62,2
Descongelado en BTS	70,8	13,5	15,8	83,7	9,8	6,5
Descongelado en MRA	83,9	8,3	7,8	80,1	12,2	7,7

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,24	4,14	29,00	22,43	1,99	0,72	0,33	0,92
4 horas	8,18	4,12	28,52	22,33	1,99	0,72	0,33	0,93
6 horas	8,20	4,20	28,96	22,56	1,96	0,72	0,32	0,93
Descongelado	7,84	4,06	26,65	21,70	1,93	0,71	0,32	0,94

Macho: R3846

Raza: Landrace

Fecha: 17/01/2006

Congelación: 5

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 294 Volumen (ml): 222 Mot. Subjetiva (%): 85 Cal. Mov.: 5
 Formas normales (%): 83 A. de Cabeza (%): 1 A. de Cola (%): 2 G.C.P. (%): 6 G.C.D. (%): 8

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	80,25	95,50	91,19	82,81
4 horas	83,75	95,00	92,57	95,05
6 horas	86,00	91,00	80,85	90,85
Descongelado en BTS	52,00	64,00	33,86	65,23
Descongelado en MRA	34,25	65,50	54,61	56,75

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	46,32	24,91	38,26	50,54	63,68	77,28	1,55	6,84
4 horas	64,55	33,77	51,90	51,59	64,99	77,49	2,18	7,98
6 horas	89,23	54,47	75,24	55,43	68,46	77,80	2,50	7,54
Descongelado en BTS	84,50	60,24	65,97	67,06	87,43	74,49	2,75	8,50
Descongelado en MRA	96,25	82,29	47,08	45,97	51,14	87,70	2,23	9,48

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	38,25	24,41	32,51	62,70	73,34	84,03	1,17	6,91
4 horas	43,78	25,25	35,97	52,32	64,50	79,32	1,61	6,75
6 horas	56,38	25,79	42,53	36,55	55,99	62,91	1,97	5,44
Descongelado en BTS	97,78	80,47	85,71	77,13	89,85	84,14	2,50	8,82
Descongelado en MRA	99,95	85,33	89,75	81,22	92,43	86,62	2,38	9,62

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	37,6	8,3	54,1	52,7	5,4	41,9
4 horas	37,1	25,0	37,9	36,6	5,2	58,2
6 horas	45,5	29,1	25,5	17,6	22,1	60,3
Descongelado en BTS	71,1	10,5	18,4	80,7	6,4	12,9
Descongelado en MRA	46,6	2,7	50,7	86,3	3,9	9,9

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,20	4,14	28,68	22,43	1,98	0,72	0,33	0,93
4 horas	8,21	4,08	27,95	22,26	2,01	0,71	0,34	0,94
6 horas	8,18	4,07	28,24	22,38	2,01	0,71	0,34	0,93
Descongelado	7,86	4,06	26,79	21,57	1,94	0,72	0,32	0,94

Valoración mediante imágenes digitales del semen descongelado de verraco.

Macho: R5487

Raza: Landrace

Fecha: 11/11/2005

Congelación: 1

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 325 Volumen (ml): 135 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 86 A. de Cabeza (%): 1 A. de Cola (%): 0 G.C.P. (%): 3 G.C.D. (%): 10

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	89,50	99,50	93,27	97,99
4 horas	79,75	97,50	97,88	97,77
6 horas	73,00	93,00	68,75	93,09
Descongelado en BTS	69,50	82,50	71,82	74,53
Descongelado en MRA	51,00	70,50	52,78	67,43

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	52,19	26,79	39,94	46,24	61,87	72,89	1,94	6,16
4 horas	63,85	31,52	47,02	48,05	63,97	72,66	2,44	6,56
6 horas	59,20	22,55	39,23	38,35	58,23	63,90	2,40	5,86
Descongelado en BTS	90,14	65,65	71,65	70,08	87,56	78,27	2,92	8,29
Descongelado en MRA	109,96	90,70	97,15	80,20	90,78	87,08	2,63	9,05

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	47,64	28,13	38,17	55,22	69,22	77,02	1,74	6,28
4 horas	38,60	23,02	30,19	56,44	71,71	76,17	1,58	5,93
6 horas	50,06	25,02	35,45	45,10	65,93	65,54	2,09	4,45
Descongelado en BTS	93,61	71,97	80,56	75,36	88,02	84,69	2,50	8,05
Descongelado en MRA	107,35	88,96	94,78	81,03	91,31	87,94	2,61	9,02

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	31,8	8,6	59,7	42,9	9,4	47,6
4 horas	31,1	23,0	45,9	43,4	4,0	52,6
6 horas	22,2	23,8	54,0	31,0	14,0	55,0
Descongelado en BTS	75,3	10,2	14,5	82,5	9,7	7,8
Descongelado en MRA	87,4	6,3	6,3	87,9	6,7	5,5

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,32	4,37	30,75	23,14	1,91	0,72	0,31	0,93
4 horas	8,37	4,36	30,54	23,05	1,92	0,72	0,31	0,94
6 horas	8,30	4,39	30,35	22,92	1,89	0,73	0,31	0,94
Descongelado	8,05	4,34	28,98	22,52	1,86	0,72	0,30	0,95

Macho: R5487

Raza: Landrace

Fecha: 18/11/2005

Congelación: 2

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración ($10^6/ml$): 308 Volumen (ml): 171 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 77 A. de Cabeza (%): 2 A. de Cola (%): 0 G.C.P. (%): 0 G.C.D. (%): 21

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	92,00	100,00	91,45	93,42
4 horas	81,50	97,50	95,11	95,92
6 horas	80,75	90,50	86,36	61,96
Descongelado en BTS	70,75	83,50	45,21	70,45
Descongelado en MRA	49,00	71,00	68,22	64,24

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL ($\mu m/s$)	VSL ($\mu m/s$)	VAP ($\mu m/s$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
0 horas	47,49	27,22	37,55	53,63	69,61	74,58	1,59	7,31
4 horas	61,71	31,01	45,76	49,15	66,68	71,70	2,35	7,03
6 horas	91,85	48,32	75,28	55,01	66,44	81,80	2,89	6,07
Descongelado en BTS	100,25	75,45	85,77	72,69	86,08	83,31	2,84	8,12
Descongelado en MRA	105,04	87,95	94,55	80,14	90,04	87,80	2,48	9,66

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL ($\mu m/s$)	VSL ($\mu m/s$)	VAP ($\mu m/s$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
0 horas	46,66	32,74	38,32	63,42	78,66	77,55	1,58	6,63
4 horas	73,96	46,81	61,54	60,05	73,37	79,93	2,32	6,11
6 horas	36,29	28,04	30,74	72,69	86,23	82,35	1,18	6,94
Descongelado en BTS	100,10	77,67	86,95	75,62	87,38	85,40	2,52	8,37
Descongelado en MRA	110,45	93,59	99,71	81,63	91,08	88,21	2,40	8,96

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	44,2	9,5	46,3	59,5	0,9	39,6
4 horas	34,9	22,3	42,9	51,1	23,0	25,9
6 horas	48,8	45,2	6,0	67,0	1,1	31,8
Descongelado en BTS	74,4	14,0	11,6	77,5	13,5	9,0
Descongelado en MRA	82,3	7,3	10,4	84,9	7,5	7,5

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (μm)	Anchura (μm)	Área (μm^2)	Perímetro (μm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,35	4,34	30,66	22,94	1,93	0,73	0,32	0,93
4 horas	8,33	4,30	29,98	22,91	1,94	0,72	0,32	0,94
6 horas	8,32	4,35	30,28	23,11	1,92	0,71	0,31	0,94
Descongelado	8,09	4,37	29,55	22,59	1,85	0,73	0,30	0,94

Macho: R5487

Raza: Landrace

Fecha: 30/11/2005

Congelación: 3

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 309 Volumen (ml): 143 Mot. Subjetiva (%): 85 Cal. Mov.: 3
 Formas normales (%): 89 A. de Cabeza (%): 1 A. de Cola (%): 3 G.C.P. (%): 0 G.C.D. (%): 7

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	84,75	97,50	91,02	90,60
4 horas	81,00	96,50	90,27	93,46
6 horas	80,50	95,00	87,43	88,46
Descongelado en BTS	71,00	82,50	56,35	79,88
Descongelado en MRA	47,75	78,00	71,04	72,54

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	49,82	31,43	41,83	59,30	71,99	80,36	1,67	6,23
4 horas	77,23	41,29	64,86	55,13	64,97	82,81	2,36	7,03
6 horas	71,82	35,82	55,83	45,15	61,71	70,35	2,44	6,10
Descongelado en BTS	102,36	81,77	90,21	77,14	88,26	86,06	2,72	8,07
Descongelado en MRA	110,18	95,44	101,05	83,77	91,79	90,07	2,50	9,27

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	51,94	36,59	45,55	67,61	77,87	85,14	1,69	6,09
4 horas	57,38	39,16	48,87	63,29	75,39	81,39	1,74	6,15
6 horas	51,46	25,33	38,67	40,66	56,87	66,79	1,89	4,69
Descongelado en BTS	108,12	89,36	97,58	81,26	90,33	89,00	2,56	8,45
Descongelado en MRA	110,35	95,57	101,26	83,47	92,03	89,72	2,41	8,96

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	43,1	13,0	43,9	48,6	4,6	46,8
4 horas	53,6	16,7	29,8	53,9	1,7	44,3
6 horas	21,3	26,6	52,1	30,0	10,0	60,0
Descongelado en BTS	80,4	11,1	8,5	83,7	10,8	5,4
Descongelado en MRA	90,0	5,0	5,0	88,7	4,6	6,7

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elípticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,35	4,41	31,00	23,10	1,89	0,73	0,31	0,93
4 horas	8,30	4,41	30,62	22,90	1,88	0,73	0,31	0,94
6 horas	8,24	4,38	29,98	23,02	1,88	0,71	0,31	0,95
Descongelado	8,06	4,38	29,42	22,59	1,84	0,72	0,30	0,94

Macho: R5487

Raza: Landrace

Fecha: 16/12/2005

Congelación: 4

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 200 Volumen (ml): 146 Mot. Subjetiva (%): 80 Cal. Mov.: 3
 Formas normales (%): 89 A. de Cabeza (%): 0 A. de Cola (%): 0 G.C.P. (%): 4 G.C.D. (%): 7

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	88,50	98,00	83,33	90,72
4 horas	85,75	94,00	84,56	93,40
6 horas	74,25	89,50	91,94	93,10
Descongelado en BTS	58,50	72,50	62,02	80,88
Descongelado en MRA	52,75	76,00	74,59	72,27

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	52,98	32,44	44,55	55,51	70,05	76,80	1,73	6,77
4 horas	64,44	38,11	53,41	59,41	71,21	82,18	2,08	6,43
6 horas	58,31	26,72	43,02	39,96	59,05	65,06	2,10	5,47
Descongelado en BTS	94,66	76,45	84,23	77,14	87,90	86,28	2,55	7,33
Descongelado en MRA	106,68	91,72	97,32	83,26	91,71	89,78	2,47	9,19

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	36,30	23,77	30,19	58,09	72,42	76,56	1,28	6,40
4 horas	41,80	29,06	34,85	60,84	75,25	77,55	1,40	6,93
6 horas	46,56	23,44	34,96	44,73	65,73	65,21	1,73	4,90
Descongelado en BTS	116,48	100,65	106,97	85,47	92,88	91,54	2,61	9,17
Descongelado en MRA	109,76	93,36	99,71	82,66	91,43	89,24	2,58	9,62

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	47,6	10,2	42,2	67,2	5,5	27,3
4 horas	50,5	28,0	21,5	57,8	8,9	33,3
6 horas	33,3	25,5	41,1	27,6	13,8	58,6
Descongelado en BTS	82,1	7,1	10,7	90,2	7,8	2,0
Descongelado en MRA	89,4	5,8	4,8	87,3	8,0	4,7

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,25	4,34	30,18	22,72	1,90	0,73	0,31	0,93
4 horas	8,27	4,34	30,18	22,75	1,91	0,73	0,31	0,93
6 horas	8,20	4,39	30,19	22,75	1,87	0,73	0,30	0,94
Descongelado	8,14	4,42	30,08	22,64	1,84	0,74	0,30	0,94

Macho: R5487

Raza: Landrace

Fecha: 27/12/2005

Congelación: 5

ANÁLISIS CONVENCIONAL

Concentración (10⁶/ml): 342 Volumen (ml): 133 Mot. Subjetiva (%): 90 Cal. Mov.: 4
 Formas normales (%): 85 A. de Cabeza (%): 1 A. de Cola (%): 3 G.C.P. (%): 5 G.C.D. (%): 6

VALORACIÓN DE LA VITALIDAD, LA INTEGRIDAD ACROSÓMICA Y EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA MEDIDA CON EL EQUIPO CASA

Tiempo	Vitalidad (%)	Integridad Acrosómica (%)	Motilidad (%)	Motilidad + Caf. (%)
0 horas	94,25	99,00	95,61	98,28
4 horas	86,00	97,50	96,91	95,34
6 horas	80,50	94,00	87,20	94,49
Descongelado en BTS	67,75	79,50	50,00	74,27
Descongelado en MRA	48,50	69,00	59,15	61,61

VALORACIÓN CINÉTICA MEDIANTE EL SISTEMA CASA

Análisis sin cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	71,24	45,71	61,35	65,99	75,74	85,49	2,14	6,71
4 horas	55,29	39,12	48,55	67,56	77,87	85,46	1,85	6,40
6 horas	77,00	46,92	63,69	60,07	72,16	80,82	2,57	6,39
Descongelado en BTS	92,45	70,67	77,52	73,07	88,37	81,30	2,76	8,57
Descongelado en MRA	100,71	81,81	87,48	78,62	90,29	85,42	2,66	9,29

Análisis con cafeína añadida

Tiempo.	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
0 horas	39,68	28,09	34,88	62,95	74,70	81,09	1,25	6,61
4 horas	45,83	29,83	39,45	63,33	73,33	84,48	1,61	5,77
6 horas	73,75	49,20	61,76	60,18	73,38	78,72	2,40	5,05
Descongelado en BTS	103,57	85,69	90,80	80,88	92,60	86,52	2,64	9,66
Descongelado en MRA	106,42	89,29	94,31	82,02	92,73	87,47	2,47	9,43

ANÁLISIS SUBPOBLACIONAL

Tiempo.	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	SP1 + Caf (%)	SP2 + Caf (%)	SP3 + Caf (%)
0 horas	64,0	16,5	19,4	52,4	3,9	43,7
4 horas	67,5	7,0	25,4	55,1	7,3	37,6
6 horas	57,6	22,4	20,0	52,6	19,0	28,4
Descongelado en BTS	77,4	9,0	13,5	86,5	7,4	6,0
Descongelado en MRA	83,8	8,7	7,5	90,1	5,6	4,3

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Tiempo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Área (µm ²)	Perímetro (µm)	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad
0 horas	8,27	4,42	30,96	22,88	1,87	0,74	0,30	0,93
4 horas	8,26	4,39	30,46	22,74	1,88	0,74	0,31	0,94
6 horas	8,31	4,34	30,19	22,91	1,92	0,72	0,31	0,94
Descongelado	7,98	4,38	29,30	22,10	1,82	0,75	0,29	0,94