

Influencia del tiempo de almacenamiento postmortem del epidídimo, del medio de dilución y de la técnica de selección espermática en fecundación in vitro, en la calidad del semen de toro de Lidia

INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO POSTMORTEM DEL EPIDÍDIMO, DEL MEDIO DE DILUCIÓN Y DE LA TÉCNICA DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA EN FECUNDACIÓN IN VITRO, EN LA CALIDAD DEL SEMEN DE TORO DE LIDIA

Roberto Adrián Guijarro Castro
León, 2011



Universidad de León
Departamento de Sanidad Animal

Guijarro Castro, Roberto Adrián

Influencia del tiempo de almacenamiento postmortem del epidídimo, del medio de dilución y de la técnica de selección espermática en fecundación in vitro, en la calidad el semen de toro de lidia [Recurso electrónico] / Roberto Adrian Guijarro Castro ; [Maite Carbajo Rueda y Lina Fernández Celadilla, directoras]. – [León : Universidad de León, Área de Publicaciones, 2012]

1 disco compacto (CD-ROM) : il., fot., gráf., tablas ; 12 cm. + 1 folleto. – (Tesis doctorales / Universidad de León ; 20120001)

Tesis-Universidad de León. Facultad de Veterinaria. Departamento de Sanidad Animal. Área de Sanidad Animal y Ostetricia, 2011. – Bibliogr. – Texto en español con resúmenes en español e inglés. -- Texto e imágenes. -- Fecha de defensa, 16 de diciembre de 2011. – Documento en formato PDF. – El folleto contiene un índice de la tesis

ISBN 978-84-9773-600-8

1. Universidad de León-Tesis y disertaciones académicas-2011. 2. Toro de lidia. 3. Fecundación in Vitro. 4. Espermatogénesis. I. Universidad de León. Área de Publicaciones. II. Carbajo Rueda, María Teresa. III. Fernández Celadilla, Lina. IV. Título

591.3(043.2)

636.272.046.8.09(460)(043.2):611.013.1

611.013.1: 636.272.046.8.09(460)(043.2)

Tesis defendida con fecha 16/12/2011

TRIBUNAL:

Fernández Álvarez, José Gabriel, (presidente)

García Díez, Carmen, (secretario)

De La Varga Rodríguez, Santiago, (vocal)

González Urdiales, Raúl, (vocal)

Gil Huerta, Lydia, (vocal)

© Universidad de León

I.S.B.N. 978-84-9773-600-8

Depósito Legal: LE-0155-2012

“**L**os diferentes componentes que integran el diseño de la portada, resultan de una exquisita combinación del color de fondo rojo/burdeos, como la muleta, que dibuja con gran sutileza el detalle del bordado del traje del torero, memorando de esta manera al toro de Lidia.

Además incorpora imágenes del epidídimo, de espermatozoides y de tres mecanismos de reloj, proyectando, estos últimos, los tres tiempos de conservación del esperma epididimal realizados en este trabajo”



UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

Influencia del tiempo de almacenamiento
postmortem del epidídimo, del medio de
dilución y de la técnica de selección
espermática en fecundación *in vitro*, en la
calidad del semen de Toro de Lidia

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

Roberto Adrián Guijarro Castro

León, 2011

El presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido financiado por la Junta de Castilla-León, dentro del Convenio firmado con la Universidad de León para el desarrollo de un Programa de Fecundación *in vitro* en ganado vacuno.



UNIVERSIDAD DE LEÓN

**AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN
(Art. 8º 1 del R.D. 778/98)**

Las Dras. Dña. Maite Carbajo Rueda y Dña. Lina Fernández Celadilla, como Directoras de la Tesis Doctoral titulada **“Influencia del tiempo de almacenamiento *postmortem* del epidídimo, del medio de dilución y de la técnica de selección espermática en fecundación *in vitro*, en la calidad del semen de Toro de Lidia”** realizada por D. Roberto Adrián Guijarro Castro en el Departamento de Sanidad Animal, autorizan su presentación a trámite, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmamos, para dar cumplimiento al art. 8º 1 del R.D. 778/98, en León a 26 de octubre de 2011.

Fdo.: Maite Carbajo Rueda
Celadilla

Lina Fernández



UNIVERSIDAD DE LEÓN

**CONFORMIDAD DEL DEPARTAMENTO
(Art. 8º 2 del R.D. 778/98)**

El Departamento de Patología Animal-Sanidad Animal en su reunión celebrada el día 3 de Noviembre de 2011 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada **“Influencia del tiempo de almacenamiento *postmortem* del epidídimo, del medio de dilución y de la técnica de selección espermática en fecundación *in vitro*, en la calidad del semen de Toro de Lidia”**, dirigida por las Dras. Dña. Maite Carbajo Rueda y Dña. Lina Fernández Celadilla y elaborada por D. Roberto Adrián Guijarro Castro.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 8º 2 del R.D. 778/98, en León a 3 de Noviembre de 2011.

El Secretario

Vº Bº

El Director del Departamento

Fdo.: Juan Miguel Fregeneda Grandes

Fdo.: Dr. D. César B. Gutiérrez Martín

Agradecimientos

Agradezco la colaboración y el apoyo desinteresado de todas aquellas personas que de una manera u otra han participado en el desarrollo de este trabajo y me han acompañado en estos últimos años.

Muy especialmente quiero agradecer a mis directoras de Tesis, Dra. Maite Carbajo Rueda y Dra. Lina Fernández Celadilla, por la confianza depositada en mí desde el primer momento, por compartir sus conocimientos, dedicación, atención, paciencia y todo el tiempo dedicado al trabajo desarrollado a lo largo de este período.

A todos los miembros directivos de la Universidad Católica de Salta y en especial a los de la Facultad de Ciencias Veterinarias, por todo su apoyo y confianza brindado durante estos años de permanencia en el exterior.

A mis amigos del doctorado y compañeros de fatigas en el laboratorio, la Dra. Jenny Álvarez y el Dr. Adelino Katchikualula, sin los cuales no habría podido realizar muchos de los estudios aquí presentados, gracias por su predisposición al trabajo y acompañarme en todo momento apoyándome y animándome para seguir adelante.

A todos los compañeros de Reproducción, especialmente a David, Rocío, Humberto y Silvanini, Manuel, María, Julio, Pancho, Raúl, Sergio y Marco. También a todos mis amigos Gonzalo, Cata, Taio, Dais, Fernando, Paco, Bettit, Daphne, Carmen, Zé, Ricardo y la familia colombiana Hugo, Rubi y Emilie Portilla, algunos ya doctores, a quienes conocí en la Universidad de León, me enriquecieron con su cultura y siento una profunda admiración y amistad.

A Carlos y Carolina, compañeros del SERIDA de Somió-Gijón, por su colaboración desinteresada y por los gratos momentos compartidos en Gijón y en León.

Al Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), en especial a Juan José García, Daniel Bartolomé y Raquel Posado por facilitarnos la tarea de recogida de muestras para el desarrollo de este trabajo.

A Carmen y Ara, por su apoyo moral en las mañanas de café, animándome a terminar la Tesis Doctoral.

A los Servicios Veterinarios del Matadero Municipal de León y al personal que allí trabaja, por facilitarnos la labor de recogida del material biológico. Especialmente a Bernardino, Oscar de Dios, Yolanda, Javier y Blanca.

Al Dr. Fernando de la Fuente, por aplicar sus conocimientos de estadística en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Al Departamento de Sanidad Animal, a mi tutor Marcelino Álvarez y especialmente a Gloria por brindarnos su apoyo y trabajo incondicional.

Al Servicio de Microscopía Electrónica (Antonio, Paulino y Silvia), por su colaboración y disposición durante el desarrollo del trabajo experimental.

A los servicios Conserjería, Mantenimiento y Limpieza (Elena, Begoña, María, Rosa, Isa, Maribel y Alberto), por su simpatía y los buenos momentos compartidos.

A Patri por su tiempo, su amistad, y su importante labor cuidando y organizando el laboratorio.

A todos mis amigos, por su amistad y comprensión.

A mi familia, a mis padres, Olga y Gustavo, a mis hermanos Alicia, Alejandro, Gabriel, Alejandra y Lorena, por su apoyo y confianza incondicional, su cariño y su paciencia. A mis encantadores sobrinos, Alicia, Cruz, Sol, Gero, Lola, Tomás, Francisca, Baltazar y Malena, por regalarme todo su afecto y cariño. Por todo ese tiempo dedicados al teléfono y al skype.

Y finalmente quiero agradecer en este trabajo a Sonia, por aguantarme y animarme en mis buenos y malos momentos, por quererme, por estar siempre ahí, incondicionalmente. También a su familia por acogerme como uno más, gracias por todo.

GRACIAS

A Liliana,
te fuiste estando lejos
...nunca te voy a olvidar...

ÍNDICE GENERAL

Pág.

Índice de Tablas	XXII
-------------------------------	-------------

Índice de Figuras	XXI
--------------------------------	------------

Abreviaturas	XXV
---------------------------	------------

1. Introducción	1
------------------------------	----------

2. Revisión Bibliográfica	5
--	----------

2.1. El toro de Lidia y su importancia	7
---	----------

2.1.1. Agrupación navarra	9
---------------------------------	---

2.1.2. Agrupación castellana	9
------------------------------------	---

2.1.3. Agrupación andaluza	10
----------------------------------	----

2.2. Aparato reproductor del macho	14
---	-----------

2.2.1. Anatomofisiología testicular del toro	14
--	----

2.2.2. El epidídimo	19
---------------------------	----

2.2.2.1. Anatomía del epidídimo	19
---------------------------------------	----

2.2.2.2. Función epididimal	19
-----------------------------------	----

2.2.3. El espermatozoide.....	22
-------------------------------	----

2.3. Tiempo de conservación	26
--	-----------

2.4. Refrigeración, congelación y el empleo de diluyentes seminales	31
--	-----------

2.5. Valoración de la calidad seminal	36
--	-----------

2.5.1. Valoración macroscópica de la calidad seminal.....	37
---	----

2.5.1.1. Volumen	37
------------------------	----

2.5.1.2. Aspecto o consistencia.....	37
--------------------------------------	----

2.5.1.3. Color	38
----------------------	----

2.5.2. Valoración microscópica de la calidad seminal	38
--	----

2.5.2.1. Movilidad espermática	39
--------------------------------------	----

2.5.2.1.1. Movilidad masal	39
----------------------------------	----

2.5.2.1.2. Movilidad individual	40
2.5.2.2. Concentración espermática.....	42
2.5.2.3. Integridad de la membrana espermática	44
2.5.2.4. Morfología y viabilidad espermática.....	46
2.5.2.5. Integridad del acrosoma	48
2.5.2.6. Evaluación de la integridad del ADN.....	49
2.6. Fecundación <i>in vitro</i>	50
2.6.1. Producción de embriones <i>in vitro</i>	52
2.6.1.1. Obtención y selección de los complejos <i>cumulus</i> -ovocito	52
2.6.1.2. Maduración de los complejos <i>cumulus</i> -ovocito	55
2.6.1.3. Selección, preparación espermática y fecundación	56
2.6.1.4. Condiciones para el cultivo <i>in vitro</i> de embriones	60
3. Objetivos	65
4. Material y Métodos	69
4.1. Manipulación del epidídimo y análisis seminal.....	71
4.1.1. Recogida de epidídimos y transporte	71
4.1.2. Obtención y criopreservación de los espermatozoides del epidídimo	71
4.1.3. Evaluación espermática	73
4.2. Fecundación <i>in vitro</i>	77
4.2.3. Obtención, selección y maduración de los CCOs.....	77
4.2.3. Selección espermática y fecundación.....	78
4.2.3. Cultivo de embriones.....	82
4.3. Diseño Experimental.....	83
4.4. Estudio estadístico.....	87
5. Resultados.....	89
5.1. Calidad del semen de toro de lidia recogido <i>postmortem</i> de epidídimo	91
5.1.1. Experimento 1.- influencia del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo en los parámetros de calidad seminal	91
5.1.1.1. Volumen y concentración espermática.....	91
5.1.1.2. Movilidad espermática	91
5.1.1.2.1. Movilidad individual y progresiva	91
5.1.1.2.2. Parámetros cinéticos espermáticos	92
5.1.1.3. Morfología.....	92

5.1.1.4. Integridad de la membrana plasmática	94
5.1.1.4.1. Prueba de endósmosis celular.....	94
5.1.1.4.2. Combinación de fluorocromos (IP/PNA).....	94
5.1.1.5. Integridad de la membrana acrosómica.....	95
5.1.1.5.1. BL-1 con glutaraldehído tamponado al 2%	95
5.1.2. EXPERIMENTO 2.- Efecto del medio de dilución del semen epididimario, en la precongelación y descongelación, en relación al tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo en los parámetros de calidad seminal	95
5.1.2.1. Precongelación.....	95
5.1.2.1.1. Movilidad espermática	95
5.1.2.1.1.1. Movilidad individual y progresiva	95
5.1.2.1.1.2. Parámetros cinéticos espermáticos	97
5.1.2.1.2. Morfología.....	98
5.1.2.1.3. Integridad de la membrana plasmática	102
5.1.2.1.3.1. Prueba de endósmosis celular.....	102
5.1.2.1.3.2. Combinación de fluorocromos (IP/PNA).....	103
5.1.2.1.4. Integridad de la membrana acrosómica.....	105
5.1.2.1.4.1. BL-1 con glutaraldehído tamponado al 2 %	105
5.1.2.2. Descongelación.....	106
5.1.2.2.1. Movilidad espermática	106
5.1.2.2.1.1. Movilidad individual y progresiva	106
5.1.2.2.1.2. Parámetros cinéticos espermáticos	108
5.1.2.2.2. Morfología.....	110
5.1.2.2.3. Integridad de la membrana plasmática	112
5.1.2.2.3.1. Prueba de endósmosis celular.....	112
5.1.2.2.3.2. Combinación de fluorocromos (IP/PNA).....	113
5.1.2.2.4. Integridad de la membrana acrosómica.....	115
5.1.2.2.4.1. BL-1 tamponado con glutaraldehído al 2 %	115
5.1.3. EXPERIMENTO 3.- Efecto del método de selección espermática en las características de calidad del semen epididimario, en relación al tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo y al medio de dilución espermática.....	116
5.1.3.1. Concentración espermática.....	116
5.1.3.2. “Swim-up”	117

5.1.3.2.1. Movilidad	117
5.1.3.2.1.1. Movilidad individual y progresiva	117
5.1.3.2.1.2. Parámetros cinéticos espermáticos	118
5.1.3.2.2. Morfología	121
5.1.3.2.3. Integridad de la membrana plasmática	123
5.1.3.2.3.1. Prueba de endósmosis celular.....	123
5.1.3.2.3.2. Combinación de fluorocromos (IP/PNA).....	124
5.1.3.2.4. Integridad de la membrana acrosómica.....	126
5.1.3.2.4.1. BL-1 tamponado con glutaraldehído al 2 %	126
5.1.3.2.5. Prueba <i>in vitro</i> de división embrionaria	127
5.1.3.3. Gradiente de densidad	128
5.1.3.3.1. Concentración espermática.....	128
5.1.3.3.2. Movilidad	128
5.1.3.3.2.1. Movilidad individual y progresiva	128
5.1.3.3.2.2. Parámetros cinéticos espermáticos	129
5.1.3.3.3. Morfología	133
5.1.3.3.4. Integridad de la membrana plasmática	135
5.1.3.3.4.1. Prueba de endósmosis celular.....	135
5.1.3.3.4.2. Combinación de fluorocromos (IP/PNA).....	135
5.1.3.3.5. Integridad de la membrana acrosómica.....	137
5.1.3.3.5.1. BL-1 tamponado con glutaraldehído al 2 %	137
5.1.3.3.6. Prueba <i>in vitro</i> de división embrionaria	138
5.1.3.4. Contraste entre los métodos de selección espermática, para cada diluyente, en las características de calidad del semen epididimario en relación al tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo	138
5.1.3.4.1. Movilidad	138
5.1.3.4.1.1. Movilidad individual y progresiva	138
5.1.3.4.1.2. Parámetros cinéticos espermáticos	139
5.1.3.4.2. Morfología	141
5.1.3.4.3. Integridad de la membrana plasmática y acrosómica: prueba de endósmosis celular, BL-1 tamponado con glutaraldehído al 2 % y combinación de fluorocromos (IP/PNA).....	141
5.1.3.4.4. Prueba <i>in vitro</i> de división embrionaria	143

6. Discusión	145
6.1. Influencia del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo y del diluyente espermático, en el proceso de congelación-descongelación, sobre los parámetros de calidad seminal	147
6.2. Efecto del método de selección espermática en las características de calidad del semen epididimario, en relación al tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo y al medio de dilución	161
6.2.1. Influencia del método de selección espermática, en relación al tiempo de almacenamiento <i>postmortem</i> y al medio de dilución, sobre la división embrionaria <i>in vitro</i>	165
7. Conclusiones	169
8. Bibliografía	173
9. Resumen	199

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Tipos de complejos cumulus-ovocito atendiendo a sus características morfológicas	54
Tabla 4.1. Composición del BL-1.....	77
Tabla 4.2. Composición del medio de maduración.....	78
Tabla 4.3. Composición básica del medio utilizado para la selección de los espermatozoides por la técnica de "swim-up" (medio STL)	79
Tabla 4.4. Composición básica de los medios utilizados para la fecundación (MF, medio Fert-TALP).....	81
Tabla 4.5. Composición del medio SOFaaci.....	82
Tabla 4.6. Pruebas empleadas para la valoración de la calidad seminal.	87
Tabla 5.1. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante la precongelación, en la movilidad individual y progresiva de los espermatozoides.....	97
Tabla 5.2. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante la precongelación, en los diferentes parámetros cinéticos de calidad seminal.	100
Tabla 5.3. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante la precongelación, en las características de morfología espermática	102
Tabla 5.4. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante la precongelación, en la integridad de la membrana plasmática y acrosomal.	103
Tabla 5.5. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante el proceso de congelación-descongelación, en la movilidad espermática individual y progresiva.	107
Tabla 5.6. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante el proceso de congelación-descongelación, en los diferentes parámetros cinéticos de calidad seminal.	110
Tabla 5.7. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante el proceso de congelación-descongelación, en las características de morfología espermática.	112

Tabla 5.8. Efecto del medio de dilución (Bioxccl® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante el proceso de congelación-descongelación, en la integridad de la membrana plasmática y acrosomal.....	115
Tabla 5.9. Efecto del medio de dilución (Bioxccl® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante el proceso de selección espermática por “swim-up”, en la concentración espermática.....	116
Tabla 5.10. Efecto del medio de dilución (Bioxccl® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante el proceso de selección espermática por “swim-up”, en la movilidad espermática individual y progresiva.....	118
Tabla 5.11. Efecto del medio de dilución (Bioxccl® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante el proceso de selección espermática por “swim-up”, en los parámetros cinéticos de calidad seminal.	121
Tabla 5.12. Efecto del medio de dilución (Bioxccl® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante el proceso de selección espermática por “swim-up”, en las características de morfología espermática.	124
Tabla 5.13. Efecto del medio de dilución (Bioxccl® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante el proceso de selección espermática por “swim-up”, en la integridad de la membrana plasmática y acrosomal.....	126
Tabla 5.14. Efecto del medio de dilución (Bioxccl® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante el proceso de selección espermática mediante “swim-up”, en el porcentaje de división embrionaria al día 3 postinseminación	127
Tabla 5.15. Efecto del medio de dilución (Bioxccl® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante el proceso de selección espermática por gradientes de densidad, en la movilidad espermática individual y progresiva	128
Tabla 5.16. Efecto del medio de dilución (Bioxccl® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante el proceso de selección espermática por gradientes de densidad, en los parámetros cinéticos de calidad seminal.....	130
Tabla 5.17. Efecto del medio de dilución (Bioxccl® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante el proceso de selección espermática por gradientes de densidad, en las características de morfología espermática.....	134
Tabla 5.18. Efecto del medio de dilución (Bioxccl® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante el proceso de selección espermática por gradientes de densidad, en la integridad de la membrana plasmática y acrosomal.	137

Tabla 5.19. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante el proceso de selección espermática mediante gradientes de densidad, en el porcentaje de división embrionaria al día 3 postinseminación.	138
Tabla 5.20. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante el proceso de selección espermática bien por "swimp-up" o bien por gradientes de densidad, en la movilidad espermática individual y progresiva.	139
Tabla 5.21. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante el proceso de selección espermática bien por "swimp-up" o bien por gradientes de densidad, en parámetros cinéticos de calidad seminal.	140
Tabla 5.22. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante el proceso de selección espermática bien por "swimp-up" o bien por gradientes de densidad, en las características de morfología espermática.	142
Tabla 5.23. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante el proceso de selección espermática bien por "swimp-up" o bien por gradientes de densidad, en la integridad de la membrana plasmática y acrosomal.	143
Tabla 5.24. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, durante el proceso de selección espermática ("swim-up" o gradientes de densidad), en el porcentaje de división embrionaria al día 3 postinseminación.	144

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura nº 2.1. Agrupaciones iniciales de la ganadería de lidia y de sus estirpes asociadas	8
Figura nº 2.2. Toro de Estirpe Navarra de la ganadería Da Alba Reta Guembre y de Miguel Reta	9
Figura nº 2.3. Toro de Estirpe Castellana o Morucha	10
Figura nº 2.4. Representación de un ejemplar de Estirpe Jijona	10
Figura nº 2.5. Toro de Estirpe Cabrera	11
Figura nº 2.6. Toro de Estirpe Vazqueña	11
Figura nº 2.7. Toro de Estirpe Vistahermosa	12
Figura nº 2.8. Toro Estirpe Gallardo.....	13
Figura nº 2.9. Esquema del testículo y epidídimo	15
Figura nº 2.10. Diagrama de las estructuras del testículo y epidídimo.....	16
Figura nº 2.11. Esquema del epitelio seminífero.....	17
Figura nº 2.12. Morfología del espermatozoide	23
Figura nº 4.1. Método de coloración de una muestra de semen usando eosina-nigrosina	75
Figura nº 4.2. Esquema de "swim-up" para la selección espermática.....	80
Figura nº 4.3. Esquema de gradientes de densidad (BoviPURE®) para la selección espermática.	81
Figura nº 5.1. Influencia del tiempo de almacenamiento de los espermatozoides de epidídimo, desde el sacrificio del animal hasta el procesado del semen, en los porcentajes de movilidad individual y progresiva.	91
Figura nº 5.2. Influencia del tiempo de almacenamiento de los espermatozoides en el epidídimo, desde el sacrificio del animal hasta el procesado del semen, en los parámetros cinéticos, evaluados con el sistema CASA.	93
Figura nº 5.3. Influencia del tiempo de almacenamiento de los espermatozoides, desde el sacrificio del animal hasta el procesado del semen, en las características de morfología.....	94

Figura nº 5.4. Influencia del tiempo de almacenamiento de los espermatozoides, desde el sacrificio del animal hasta el procesado del semen, en la viabilidad e integridad del acrosoma evaluados mediante citometría de flujo.	95
Figura nº 5.5. Influencia del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen, en el porcentaje de movilidad individual y progresiva durante la precongelación.	96
Figura nº 5.6. Influencia del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, durante la precongelación, en los parámetros cinéticos, evaluados con el sistema CASA.	99
Figura nº 5.7. Influencia del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, durante la precongelación, en las características de morfología.	101
Figura nº 5.8. Influencia del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, durante la precongelación, en la viabilidad e integridad del acrosoma evaluados mediante citometría de flujo.	103
Figura nº 5.9. Influencia del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, durante el proceso de congelación-descongelación, en el porcentaje de movilidad individual y progresiva.	106
Figura nº 5.10. Influencia del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, durante el proceso de congelación-descongelación, en los parámetros cinéticos, evaluados con el sistema CASA.	109
Figura nº 5.11. Influencia del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, durante el proceso de congelación-descongelación, en la morfología espermática.	111
Figura nº 5.12. Influencia del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, durante el proceso de congelación-descongelación, en la viabilidad e integridad del acrosoma evaluados mediante citometría de flujo.	114
Figura nº 5.13. Influencia del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, en los porcentajes de movilidad individual y progresiva, empleando la técnica "swim-up" como método de selección espermática.	117
Figura nº 5.14. Influencia del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, en los	

parámetros cinéticos evaluados con el sistema CASA, empleando la técnica "swim-up" como método de selección espermática.	120
Figura nº 5.15. Influencia del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, en las características de morfología espermática, empleando la técnica "swim-up" como método de selección espermática.	123
Figura nº 5.16. Influencia del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, sobre el porcentaje de viabilidad e integridad del acrosoma evaluados mediante citometría de flujo, empleando la técnica "swim-up" como método de selección espermática.	126
Figura nº 5.17. Influencia del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, sobre el porcentaje de movilidad individual y progresiva, empleando la técnica de gradientes de densidad como método de selección espermática.	129
Figura nº 5.18. Influencia del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, sobre los parámetros cinéticos evaluados con el sistema CASA, empleando la técnica de gradientes de densidad como método de selección espermática.	131
Figura nº 5.19. Influencia del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, en las características de morfología espermáticas, empleando la técnica de gradientes de densidad como método de selección espermática.	133
Figura nº 5.20. Influencia del tiempo de conservación <i>postmortem</i> del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, en la viabilidad e integridad del acrosoma evaluados mediante citometría de flujo, empleando la técnica de gradientes de densidad como método de selección espermática.	136

ABREVIATURAS

%: Porcentaje.

µg: Microgramo.

µl: Microlitro.

µm: Micrómetro.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AE : Adhesinas espermáticas.

ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide.

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero.

ATP: Adenosín Trifosfato.

BCF: frecuencia de batido del flagelo.

BME: Aminoácidos esenciales.

BRL: Línea celular comercial procedentes de hígado de rata "búfalo".

BSA: Albúmina Sérica Bovina./ **BSA-faf**: Albúmina Sérica Bovina libre de ácidos grasos.

BSP: Proteínas del plasma seminal.

Bx: Bioxcell®.

By: Biladyl®.

C: % de espermatozoides con alteración en la cabeza.

C: Alteraciones en la cabeza del espermatozoide.

CA: California.

Ca²⁺: Ión de Calcio.

CASA: Computer-assisted semen analysis (Análisis computarizado de semen).

CCO: Complejo *cumulus*-ovocito. / **CCOs**: Complejos *cumulus*-ovocito.

CO: % de espermatozoides con alteración en la cola.

CO: Alteraciones en cola del espermatozoide.

CO₂: Dióxido de carbono.

col.: Colaboradores.

COMET assay: Single Cell Electrophoresis Assay.

CS: % de espermatozoides con cabeza suelta.

CS: Cabezas espermáticas sueltas.

DIV: % Embriones de 2 o más células, obtenidos en día 3, con relación al total de cigotos puestos en cultivo.

D: Descongelado (muestra espermática descongelada -30 segundos en un baño María a 37 °C-).

D-Bx: Muestra diluida con Bioxcell®, congelada en nitrógeno líquido y descongelada a 37 °C durante 30 segundos.

D-By: Muestra diluida con Biladyl®, congelada en nitrógeno líquido y descongelada a 37 °C durante 30 segundos.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

D-R0: Muestra sin refrigeración *postmortem* congelada-descongelada.

D-R0Bx: Muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos inmediatamente después del sacrificio del animal, diluida con Bioxcell®.

D-R0By: Muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos inmediatamente después del sacrificio del animal, diluida con Biladyl®.

D-R24: Muestra con 24 horas de refrigeración *postmortem* congelada-descongelada.

D-R24Bx: Muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 24 horas a temperatura de refrigeración, diluida con Bioxcell®.

D-R24By: Muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 24 horas a temperatura de refrigeración, diluida con Biladyl®.

D-R48: Muestra con 48 horas de refrigeración *postmortem* congelada-descongelada.

D-R48Bx: Muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 48 horas a temperatura de refrigeración, diluida con Bioxcell®.

D-R48By: Muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 48 horas a temperatura de refrigeración, diluida con Biladyl®.

EN: Eosina-nigrosina

et al.: y otros.

etc.: Etcétera.

FCS: Suero Fetal Bovino.

FICT: Isocianato de Fluoresceína.

FIV: Fecundación *in vitro*.

FSH: Hormona Folículo Estimulante.

g: Fuerza centrífuga relativa (unidad de gravedad).

G: Gauge (unidad de anchura de la aguja).

GD: Gradiente de densidad.

GD-Bx: Muestra de semen descongelada, diluida con Bioxcell® y seleccionada mediante gradientes de densidad.

GD-By: Muestra de semen descongelada, diluida con Biladyl® y seleccionada mediante gradientes de densidad.

GD-R0: Muestra sin refrigeración *postmortem* seleccionada mediante gradiente de densidad.

GD-R0Bx: Muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos inmediatamente después del sacrificio del animal, diluida con Bioxcell® y seleccionada mediante gradiente de densidad.

GD-R0By: Muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos inmediatamente después del sacrificio del animal, diluida con Biladyl® y seleccionada mediante gradiente de densidad.

GD-R24: Muestra con 24 horas de refrigeración *postmortem* seleccionada mediante gradiente de densidad.

GD-R24Bx: Muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 24 horas a temperatura de refrigeración, diluida con Bioxcell® y seleccionada mediante gradiente de densidad.

GD-R24By: Muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 24 horas a temperatura de refrigeración, diluida Biladyl® y seleccionada mediante gradiente de densidad.

GD-R48: Muestra con 48 horas de refrigeración *postmortem* seleccionada mediante gradiente de densidad.

GD-R48Bx: Muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 48 horas a temperatura de refrigeración, diluida con Bioxcell® y seleccionada mediante gradiente de densidad.

GD-R48By: Muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 48 horas a temperatura de refrigeración, diluida con Biladyl® y seleccionada mediante gradiente de densidad.

GL: % de espermatozoides con acrosomas normales.

GP: % de espermatozoides con presencia de gota proximal.

GP: Espermatozoides con gota citoplasmática proximal.

gr: Gramo.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

HEPES: [N-(2-hidroxietil) piperazina- N_ - (2-ácido) etanosulfónico].

HIV: Human immunodeficiency virus (Virus de la inmunodeficiencia humana).

HOS: % de espermatozoides vivos evaluados mediante HOST.

HOST: Test de endósmosis.

HTF: Human Tubal Fluid (Fluido tubárico humano).

Hz: Herzios.

I: Inicial (mezcla de la suspensión original de espermatozoides de ambos epidídimos).

IA: Inseminación Artificial.

ICSI: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

IP-/PNA-: Espermatozoides vivos con acrosomas normales.

IP-/PNA+: Espermatozoides vivos con acrosomas alterados.

IP: Ioduro de Propidio.

IP+/PNA-: Espermatozoides muertos con acrosoma normal.

IP+PNA+: Espermatozoides muertos con acrosoma alterado.

I-R0: Muestra inicial, recién extraída del epidídimo, sin refrigeración *postmortem* y sin adición de diluyente.

I-R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem* y sin adición de diluyente, recién extraída del epidídimo.

I-R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem* y sin adición de diluyente, recién extraída del epidídimo.

kg: Kilogramo.

l: Litro

LDL: Lipoproteínas de baja densidad.

LH: Hormona Luteinizante.

LIN: Índice de linealidad.

MC: medio de cultivo.

MCI: Masa Celular Interna.

MEM: Aminoácidos no esenciales.

MF: Medio de fecundación.

mg: Miligramo.

MI: Movilidad individual determinada mediante el sistema CASA.

min: Minutos.

MIV: Maduración *in vitro*.

ml: Mililitro.

MM: Medio de mantenimiento.

mm: Milímetro.

mM: MiliMolar.

MO: Movilidad individual observada al microscopio de contraste de fases.

mOsm: Miliosmoles.

MP: Movilidad progresiva determinada mediante el sistema CASA.

N: % de espermatozoides normales.

N: Espermatozoides con morfología normal.

n°: Número.

NT: *In situ* Nick Translation.

O₂: Oxígeno.

°C: Grados centígrados.

OPU: Ovum Pick Up (Punción Transvaginal guiada por ecografía).

ORT: Osmotic Resistance Test (Test de resistencia osmótica).

P: Precongelado (muestra del semen diluido, una vez estabilizado a 5 °C -en el momento de envasarlo-).

p: Probabilidad.

pág: Página.

PBS: Fosfato Buffer-Salino.

P-Bx: Muestras diluidas con Bioxcell® y completada la rampa de refrigeración.

P-By: Muestras diluidas con Biladyl® y completada la rampa de refrigeración.

pH: Potencial de hidrógeno.

PI: % de espermatozoides con alteración en la pieza intermedia.

PI: Alteraciones en pieza intermedia del espermatozoide.

PNA: Aglutinina de Arachis hipogea.

PNA-FITC: PNA conjugado con isotiocianato de fluoresceína.

P-R0: Muestras sin refrigeración *postmortem* y completada la rampa de refrigeración.

P-R0Bx: Muestras sin refrigeración *postmortem*, diluidas con Bioxcell® y completada la rampa de refrigeración.

P-R0By: Muestras sin refrigeración *postmortem*, diluidas con Biladyl® y completada la rampa de refrigeración.

P-R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem* y completada la rampa de refrigeración.

P-R24Bx: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*, diluidas con Bioxcell® y completada la rampa de refrigeración.

P-R24By: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*, diluidas con Biladyl® y completada la rampa de refrigeración.

P-R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem* y completada la rampa de refrigeración.

P-R48Bx: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*, diluidas con Bioxcell® y completada la rampa de refrigeración.

P-R48By: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*, diluidas con Biladyl® y completada la rampa de refrigeración.

r.p.m.: Revoluciones por minuto.

r: Coeficiente de correlación.

R0: Muestras sin refrigeración *postmortem*.

R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*.

R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*.

RD: Real Decreto.

RNA: Ribonucleic acid (ácido ribonucleico).

RNA_m: RNA mensajero.

ROS: Reactive oxygen species (Especies reactivas del oxígeno).

sg: Segundo.

SCD: Test de dispersión de la cromatina.

SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay (Determinación de la Estructura de la Cromatina Espermática).

SOF: Fluido Oviductal Sintético.

SOF_{aa}: SOF sin BSA, con aminoácidos.

SOF_{aaci}: SOF sin BSA, con citrato sódico y mioinositol.

Spz: Espermatozoides.

STL: Medio Tyrode modificado, utilizado para la separación de los espermatozoides mediante "swim-up".

STR: Índice de rectitud.

Sw -R0: Muestras sin refrigeración *postmortem* seleccionada mediante "swim-up".

Sw: "Swim-up".

Sw-Bx: muestra de semen descongelada, diluida con Bioxcell® y seleccionada mediante "swim-up".

Sw-By: muestra de semen descongelada, diluida con Biladyl® y seleccionada mediante "swim-up".

Sw-R0Bx: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos inmediatamente después del sacrificio del animal, diluida con Bioxcell® y seleccionada mediante "swim-up".

Sw-R0By: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos inmediatamente después del sacrificio del animal, diluida con Biladyl® y seleccionada mediante "swim-up".

Sw-R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem* seleccionada mediante "swim-up".

Sw-R24Bx: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 24 horas a temperatura de refrigeración, diluida con Bioxcell® y seleccionada mediante "swim-up".

Sw-R24By: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 24 horas a temperatura de refrigeración, diluida con Biladyl® y seleccionada mediante "swim-up".

Sw-R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem* seleccionada mediante "swim-up".

Sw-R48Bx: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 48 horas a temperatura de refrigeración, diluida con Bioxcell® y seleccionada mediante "swim-up".

Sw-R48By: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 48 horas a temperatura de refrigeración, diluida con Biladyl® y seleccionada mediante "swim-up".

TALP: Medio Tyrode modificado para fecundación.

TCM-199: Tissue Culture Medium-199 (Medio de cultivo de tejidos 199).

TE: Trofoectodermo.

TNR: Tasa de no retorno.

TUNEL: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated Nick End Labeling.

UI: Unidades internacionales.

USA: Estados Unidos de Norteamérica.

v/v: Volumen/volumen.

VAP: Velocidad media del espermatozoide.

VCL: Velocidad circular o curvilínea del espermatozoide.

VERO: Línea celular comercial que procede del hígado de mono.

VHC: Virus de la Hepatitis C.

VSL: Velocidad rectilínea del espermatozoide.

WOB: Índice de oscilación de la cabeza del espermatozoide.

ZP: Zona pelúcida.

1. Introducción

El toro de Lida es un animal emblemático en España, siendo un gran atractivo turístico que genera riqueza para diferentes pueblos y ciudades. Las diferentes razas de su misma especie fueron seleccionadas, en general, hacia la mansedumbre y una mayor producción (carne, leche, lana o fibra), a la vez, sobre su fertilidad, descartando a los animales que no se reproducen. Esta selección, es muy diferente a la del toro de Lidia, ya que desde su origen el hombre dirigió sus caracteres hacia el desarrollo de un animal bravo, desarrollando un temperamento agresivo, propenso a la acometida, para el desarrollo de la lidia.

Actualmente algunos encastes de esta especie ya han desaparecido, otros se encuentran en peligro de extinción y la mayoría de las castas que quedan presentan un alto grado de endogamia, que en algunos casos se manifiesta clínicamente, los cuales terminan por ser descartados para la lidia. Teniendo en cuenta que esta situación puede agravarse en el futuro, resulta fundamental conservar el material genético de los ejemplares con el fin de mantener y recuperar la variabilidad, evitando así consecuencias mayores.

Una de las formas más simples y eficaces para recuperar el material genético en esta especie, es obtenerlo del epidídimo de los animales sacrificados en la lidia y en los mataderos, en el caso de los machos, y de los ovarios en el caso de las hembras, siendo este material económico y de fácil acceso para el propósito de esta tarea.

Los epidídimos se deberían transportar a un centro especializado para su procesamiento, siendo necesario estandarizar la temperatura a la cual se debería enviar la muestra. Por lo tanto, es de suma importancia conocer cómo influye el tiempo transcurrido desde el sacrificio del animal hasta el procesamiento del semen. En España podemos considerar que 48 horas es tiempo suficiente para que las muestras lleguen por correo, o cualquier otro medio, desde un punto cualquiera hasta otro dentro del país.

Diferentes estudios realizados en varias especies han concluido que el esperma epididimal refrigerado conserva mejor su calidad espermática a lo largo del tiempo que las muestras mantenidas a temperatura ambiente (Garde *et al.*, 1995; Friedmann *et al.*, 2000; Foote, 2000; Sankai *et al.*, 2001; Yu and Leibo, 2002; Kaabi, 2003). Además, conservar el epidídimo dentro del escroto junto a su testículo homólogo, resultó ser una técnica tan eficaz como otros métodos más complicados (Martínez-Pastor *et al.*, 2005a).

Evaluar qué diluyente debemos emplear con estas muestras es fundamental, ya que si bien fueron probados muchos extensores con esperma de eyaculado en el toro, con esperma epididimal, en el toro de Lidia, resulta importante establecerlo. Los diluyentes con base de yema de huevo tienen una comprobada efectividad, pero debido a que en su constitución se incorporan componentes de origen animal, su empleo se ve limitado, sobre todo para exportación, además de representar un producto sin una adecuada estandarización. Los diluyentes con lecitina de soja son productos normalizados, de fácil elaboración y con buenos resultados en la conservación del esperma eyaculado; por lo tanto, resultaría interesante conocer su comportamiento con el esperma epididimal.

El esperma epididimal es un recurso limitado de material genético, por lo que su uso debería estar explotado al máximo para lograr un mejor aprovechamiento del mismo. Para ello, el empleo de la fecundación *in vitro* (FIV) es una técnica que garantiza una mayor productividad que la inseminación artificial. La FIV consiste en fecundar artificialmente, en un laboratorio, ovocitos maduros con espermatozoides capacitados y, en las condiciones adecuadas, continuar el desarrollo de los embriones resultantes de dicha fecundación.

Uno de los puntos clave dentro de la FIV es la selección espermática, siendo este el procedimiento mediante el cual los espermatozoides más aptos son separados del resto -espermatozoides de peor calidad, diluyente y otros detritos celulares-, preparándolos para fecundar a los ovocitos. Los métodos de selección más usados en la actualidad son, el “swim up” y el gradiente de densidad. Ambos presentan diferentes fundamentos, el primero representa un procedimiento en el cual el espermatozoide, colocado bajo una columna de medio, asciende dentro de ella por su propia movilidad. En el método de gradiente de densidad, el espermatozoide móvil atraviesa el gradiente ayudado por una fuerza centrífuga.

El método de selección espermática que resultaría más adecuado para la preparación del esperma en Fecundación *in vitro*, ha sido objeto de estudio en varias especies con esperma de eyaculado, pero no existen trabajos realizados con esperma epididimal de toro de Lidia. Sería fundamental conocer el comportamiento de éste en ambos procedimientos y la capacidad de fecundación en condiciones *in vitro*.

2. Revisión Bibliográfica

2.1. EL TORO DE LIDIA Y SU IMPORTANCIA

Para comprender la situación genética actual del toro de Lidia, y la importancia socio-cultural y económica que tiene este animal en España, iniciamos este trabajo con una breve reseña de su origen e historia.

El toro de Lidia fue seleccionado por el hombre en los últimos tres siglos con el único fin de ser utilizado en espectáculos taurinos. La selección se realizó siguiendo unas determinadas características que fueron variando a lo largo de los siglos. Al contrario que la mayoría de las razas de ganado doméstico, en este animal ha primado conservar las características físicas y temperamentales del bovino salvaje, que lo hicieran más propenso a las acometidas. Este carácter psicológico se denomina **bravura**, y por ello se le conoce como “toro bravo”, siendo esta característica primordial para el desarrollo de la lidia. Todo este proceso selectivo ha atendido fundamental, y casi exclusivamente, a conseguir exaltar este patrimonio, fijarlo genéticamente y crear un arquetipo de comportamiento.

Por este tipo de conservación fenotípica y temperamental, la gran mayoría de los especialistas consideran que es el descendiente más directo del “Uro”, el antepasado de todas las razas bovinas actuales, que se extinguió en Europa en la Edad Media, lo que convierte su material genético en una joya preciosa, que cuidar y preservar.

Este animal está muy ligado a las raíces culturales de España, simbolizando lo que se conoce como “fiesta popular”, inculcada fuertemente en las raíces artísticas, desde su impronta en las pinturas rupestres hasta las tendencias más modernas de la cultura española, representado en dibujos, grabados, pinturas, esculturas y recreado en la literatura.

Se podría hasta pensar, que ha influido en las características paisajísticas, al necesitar grandes extensiones para su cría, contribuyendo a la economía hispana con el desarrollo de ferias de ganado, corridas y una gran cantidad de fiestas que se desenvuelven alrededor de este animal, atrayendo gente de diferentes ciudades y países, desarrollando así, el turismo y el crecimiento de muchos pueblos y ciudades.

Su selección comenzó en los siglos XV y XVI, en tiempo de los Reyes Católicos, en la proximidad de la corte (Valladolid). En el siglo XVII aparecieron las primeras ganaderías de toro bravo en las que se criaba el toro buscando potenciar unas

características que definirían lo que se conocen como castas (García-Llamazares, 2008). Se denomina casta al conjunto de características genéticas de una ganadería que, en circunstancias de homocigosis, equivale a línea pura. Por lo tanto, no sería correcto hablar de castas cuando nos referimos a las castas originarias en la filogénesis del toro actual, y para Cruz Sagredo (1998) sería más adecuado definirlo como estirpes.

En el siglo XVIII el espectáculo taurino cobraría auge, con ganaderías orientadas claramente para su producción con fines comerciales, efectuándose una fuerte selección y crianza del toro de Lidia, en la que el ganadero realizaba un seguimiento de los animales a través de los libros de cada explotación, apareciendo numerosas ganaderías que darían lugar a las consideradas como estirpes fundacionales, origen de la actual ganadería brava.

La población originaria se asentaba en tres de los hábitats del territorio peninsular: Depresión del Ebro, ambas submesetas y Extremadura y en la depresión del Guadalquivir. Esta localización geofísica dio lugar a lo largo de los años a la diferenciación de tres agrupaciones y, dentro de éstas, distintas Estirpes, coincidiendo ya con la destacada intervención del factor humano (Figura nº 2.1; Cruz Sagredo, 1998).

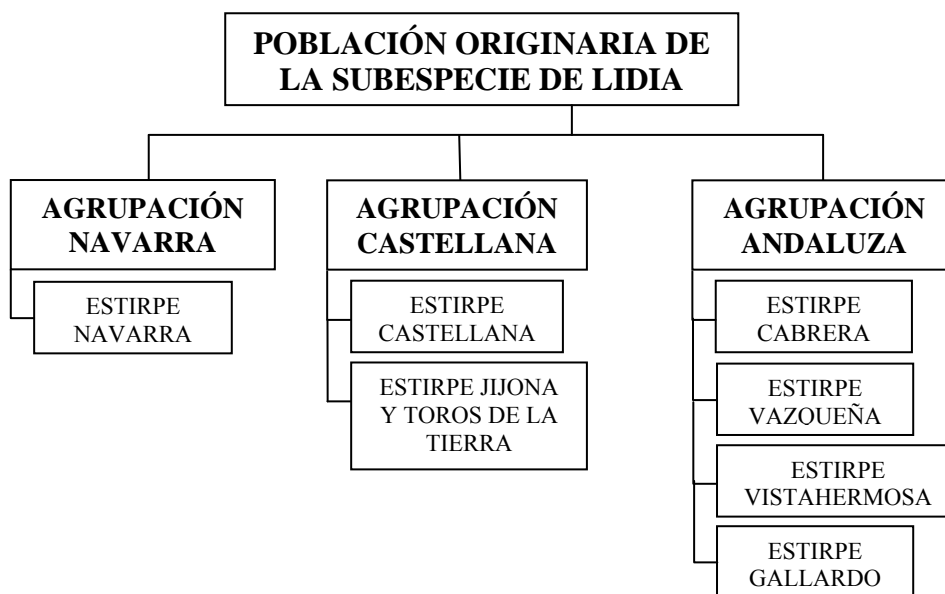


Figura nº 2.1. Agrupaciones iniciales de la ganadería de lidia y de sus estirpes asociadas (Cruz Sagredo, 1998).

A continuación detallaremos cada una de las estirpes según Cruz Sagredo (1998), completando la información con algunos datos de García-Llamazares (2008).

2.1.1. AGRUPACIÓN NAVARRA

Estirpe Navarra: Fundada a finales del siglo XVII por Don Francisco Gündulain -de Tudela- y Don Joaquín Zaldueño -de Caparros-. Eran toros de sierra, de pequeño tamaño pero con temperamento basto; con una portentosa acometividad y bravura –por lo que su lidia siempre fue difícil-; con un pelaje, de color castaño, retinto, colorado y negro. Aún perviven algunos ejemplares de la Estirpe Navarra de la rama Carriquiri (Figura nº 2.2).

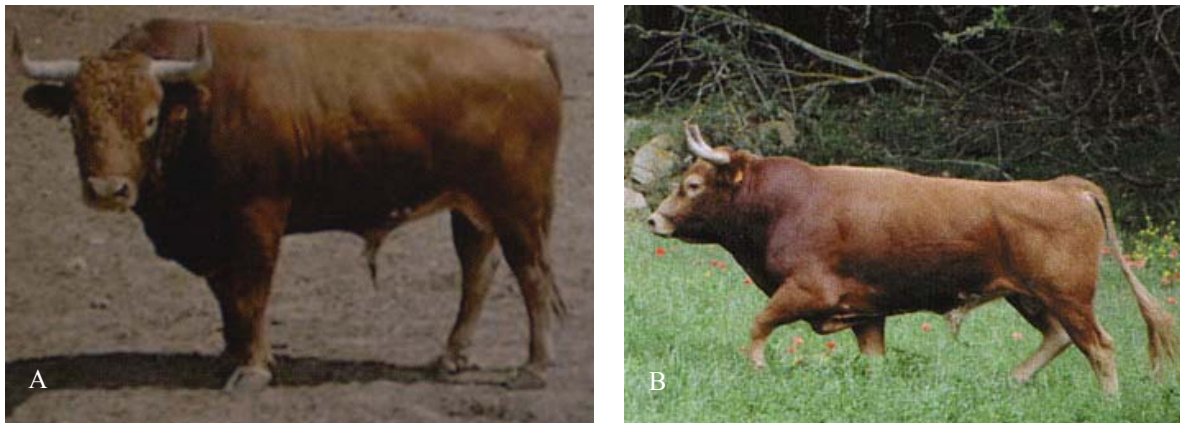


Figura nº 2.2. Toro de Estirpe Navarra de la ganadería Da Alba Reta Guembre y de Miguel Reta (A: García-Llamazares, 2008; B: Reta de Casta Navarra, 2009).

2.1.2. AGRUPACIÓN CASTELLANA

Estirpe Castellana o Morucha: Oriunda de Valladolid, conocidos también como compasquitos, por pastar donde se venera la Virgen de Compasco. Eran animales de gran tamaño, con predominio del tercio anterior, con una gran encorvadura; de cabeza descarnada y estrecha, cornivueltos; con capas negras, cárdenas, listones y bragados. Ya no quedan ejemplares de esta estirpe (Figura nº 2.3).

Estirpe Jijona y toros de la Tierra: La Estirpe Jijona es oriunda de Ciudad Real y Madrid. Los toros de la Tierra proceden de la estirpe Jijona y su área geográfica se sitúa en la cuenca del río Jarama. Fundadas a principios del siglo XVII por D. José Sánchez Jijón, la Estirpe Jijona, y por D. José Rodríguez, la Estirpe de toros de la Tierra. Se distinguen por ser animales de bastante alzada, bien encornados, de buena conformación y de agradable presencia. Se caracterizó por la gran cantidad de ejemplares colorados; lo que explica que

actualmente al toro con este tipo de pelaje se le denomine “Jjonés”. Esta estirpe se extinguió entre 1936 y 1939 (Figura nº 2.4).



Figura nº 2.3. Toro de Estirpe Castellana o Morucha. Óleo sobre papel (Pablo Moreno Alcolado, Bitácora de un corredor de encierros, 2009).

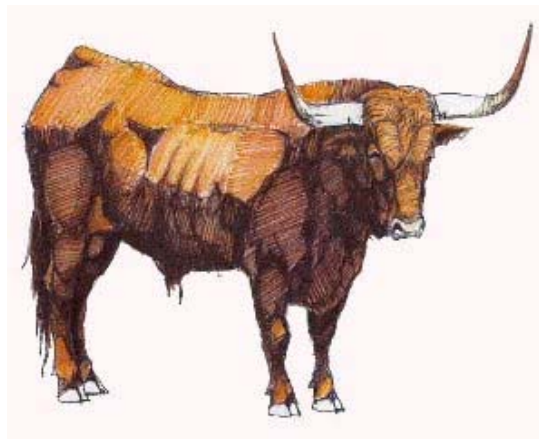


Figura nº 2.4. Representación de un ejemplar de Estirpe Jijona (Facundo Clemente, Centro etnográfico y bibliográfico virtual del toro de Lidia, 2009).

2.1.3. AGRUPACIÓN ANDALUZA

Estirpe Cabrera: Originada en Andalucía (Utrera, Sevilla) a mediados del siglo XVIII. Fundada por D. Rafael José Cabrera y posteriormente vendida a Juan Miura, dio origen a la ganadería más legendaria de la historia: los Miura. Reconocidos por su gran variedad de capas, alzada y bravura (Figura nº 2.5).

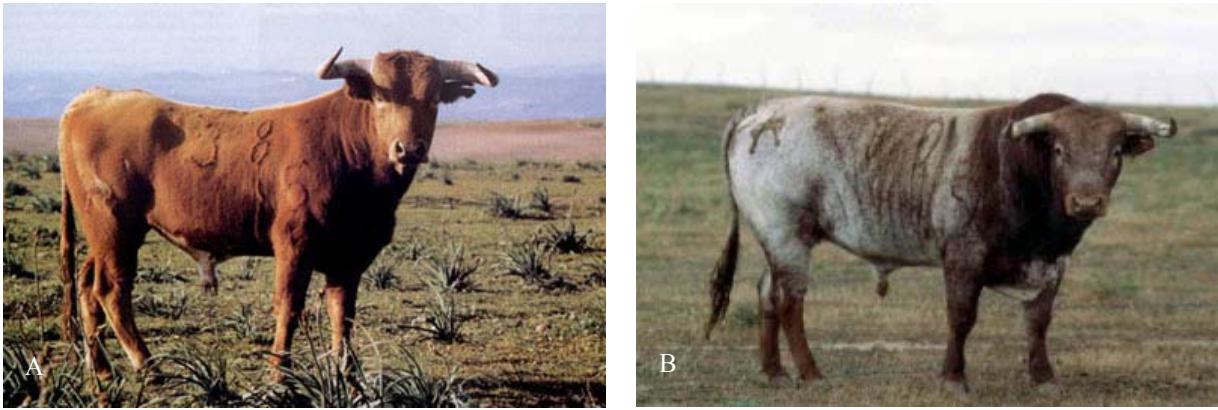


Figura nº 2.5. Toro de Estirpe Cabrera (A: Inter-toros.com, 2009; B: A Porta Gayola: Información Taurina, 2010).

Estirpe Vazqueña: Procedente de Sevilla (Utrera) y del mismo origen que la Estirpe Cabrera. Fue fundada por D. Gregorio Vázquez, incorporándose a finales del siglo XVIII reses de la Estirpe Vistahermosa. Luego fue adquirida por el rey Fernando VII y después por el Duque de Veragua, en cuyas manos cobró gran fama y prestigio. Las reses originarias eran muy bravas, de gran tamaño y peso, de lidia muy laboriosa; con predominio de capas acastañadas, coloradas y berrendas en negro y colorado (Figura nº 2.6).



Figura nº 2.6. Toro de Estirpe Vazqueña (A: A Porta Gayola: Información Taurina, 2010; B: Inter-toros.com, 2009).

Estirpe Vistahermosa: Natural de Sevilla (Utrera) y formada con reses de los Hermanos Rivas y otras de origen desconocido que, seguramente, procedían de diezmos. En 1774, el Conde de Vistahermosa adquirió esta ganadería y fue en sus manos donde cobró su auge. Es de talla mediana, de constitución robusta, de cabeza pequeña, cola y patas finas. Su conjunto es armonioso y

extremadamente bello. En el pelaje abunda el negro, el cárdeno y el castaño. Su comportamiento se corresponde con un patrón de bravura continuada, pronta y repetitiva. Está considerada como el prototipo del toro de Lidia por su conformación y noble comportamiento. Constituye la base de la actual ganadería del toro de Lidia a nivel mundial (Figura nº 2.7).

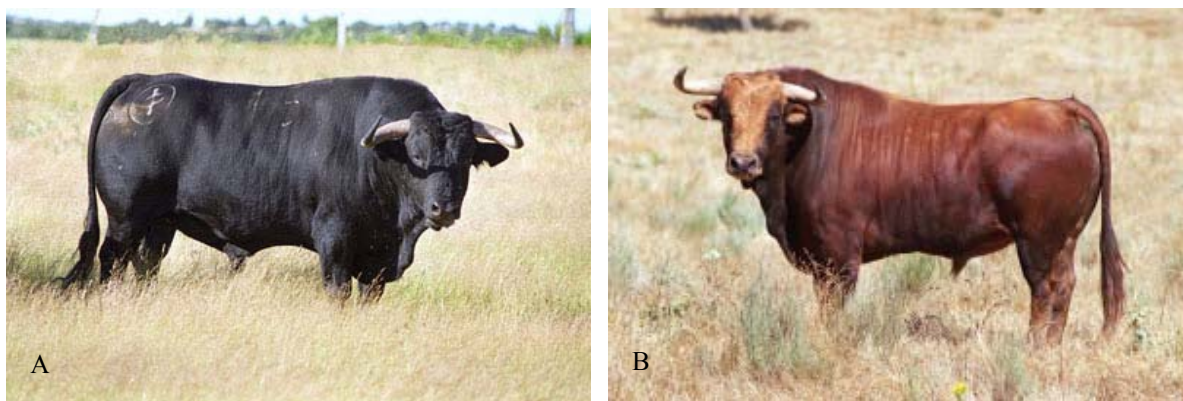


Figura nº 2.7. Toro de Estirpe Vistahermosa (A: Inter-toros.com, 2009; B: A Porta Gayola: Información Taurina, 2010).

Estirpe Gallardo: Fundada a mediados del siglo XVIII. Posee el mismo origen que la Estirpe Cabrera, creada por Francisco Gallardo y hermanos en el Puerto de Santa María, Cádiz. Se caracterizan por ser toros altos, largos, bien musculados y constituidos; de extremidades largas y robustas; de encornaduras desarrolladas y de capas muy variadas. Dotados de una gran fortaleza y resistencia. No subsisten ejemplares puros, quedando algunas cruces, en el encaste de Pablo Romero, de capas cárdenas y negras (Figura nº 2.8).

Si tenemos en cuenta que la mayoría de los toros que se lidian, en la actualidad, provienen de una sola Estirpe (Vistahermosa); que las ganaderías de lidia son, en general, de pequeño tamaño, disponiendo tan sólo de 4 o 5 machos para la reproducción y, además, que cada ganadería cuida celosamente su genética evitando la diseminación de genes con cruzamientos abiertos, podemos comprender por qué en la actualidad existe endogamia en esta raza, y es frecuente encontrar, por este motivo, que en algunas ganaderías aparezcan, con carácter hereditario, displasias o distrofias varias, que descalifican a los individuos que, las padecen, para la lidia (Cruz Sagredo, 1998). Se

realizaron, y se siguen produciendo en la actualidad, cruzamientos cerrados dentro de una misma casta, seleccionando metódicamente hacia un carácter único: *la bravura*.

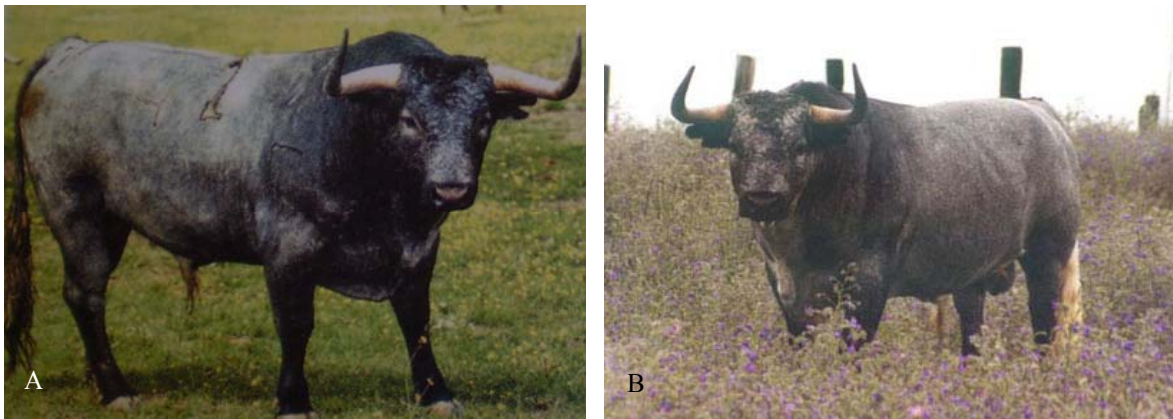


Figura nº 2.8. Toro Estirpe Gallardo (A: García-Llamazares, 2008; B: Inter-toros.com, 2009).

Algunos de los encastes de la actualidad están en peligro de extinción. Se encuentran recogidos en el RD 60/2001, de 26 de enero, sobre prototipo racial de la raza bovina de lidia en su artículo 3º, “Prototipo racial por encastes” (García-Llamazares, 2008).

Los efectos pueden ser nefastos en el futuro, por lo que resulta imprescindible conservar su material genético para salvaguardar la variabilidad, y recuperarla de una forma rápida y efectiva. Además, al recuperar el material genético de ejemplares sacrificados en la lidia, se ampliaría el potencial de selección de animales para dicho fin, pudiendo recuperar el material genético de aquellos que hayan destacado satisfactoriamente y emplearlo para la reproducción, mejorando así, la calidad y supervivencia de las ganaderías de lidia.

Uno de los métodos más rápidos y eficaces para recobrar el material genético de animales ya fallecidos, es la obtención de espermatozoides epididimales en el caso de los machos, y ovocitos de los ovarios en el caso de las hembras.

Así, el espermatozoides epididimal del toro de Lidia adquiere suma importancia, tanto para preservar la variabilidad como para el desarrollo económico de estas ganaderías, permitiendo la utilización de animales superiores para la lidia.

Por tanto, es fundamental conocer la anatomía del epidídimo y las características de su espermatozoides, evaluar el tiempo del que disponemos para su

manipulación y determinar el diluyente a emplear, teniendo en cuenta su valor y la recuperación de un número limitado de dosis. La fecundación *in vitro* (FIV) se muestra como una de las estrategias posibles a considerar, siendo el apartado de selección y preparación espermática uno de los desafíos a la hora de elegir el método más adecuado.

En este trabajo desarrollaremos estos puntos conflictivos para tratar de estandarizar el proceso.

2.2. APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO

Los órganos genitales masculinos están representados por los testículos como glándulas sexuales; los conductos eferentes, los epidídimos y los conductos deferentes como vías de conducción intra y extratesticulares, las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales o de Cowper como glándulas sexuales accesorias; el pene como órgano de la cópula y la uretra como conducto urogenital.

2.2.1. ANATOMOFISIOLOGÍA TESTICULAR DEL TORO

El testículo es el órgano encargado de realizar dos funciones de gran importancia en el proceso reproductivo: la síntesis y secreción de hormonas sexuales (estereoidogénesis), llevada a cabo en el tejido conjuntivo intersticial; y la producción de espermatozoides (espermatogénesis), originada en el interior de los túbulos seminíferos.

Los testículos están contenidos en una bolsa de piel especializada denominada escroto (Sisson, 1975), siendo su función la de proteger y soportar a los testículos, así como la de regular la temperatura interna de las gónadas mediante la contracción involuntaria del músculo dartos, que recubre el escroto interna y basalmente (Salisbury *et al.*, 1978).

En el bovino, los testículos se encuentran ubicados en la región inguinal, en posición vertical, presentando una forma oval bastante alargada. Desde el punto de vista anatómico y teniendo en cuenta su íntima relación con el epidídimo, se reconocen en el testículo las siguientes zonas: polo dorsal, (coincidente con la cabeza del epidídimo); polo ventral (correspondiente con la cola del epidídimo); borde epididimario (medio-caudal en el toro) y borde libre o craneal (Figura nº 2.9).

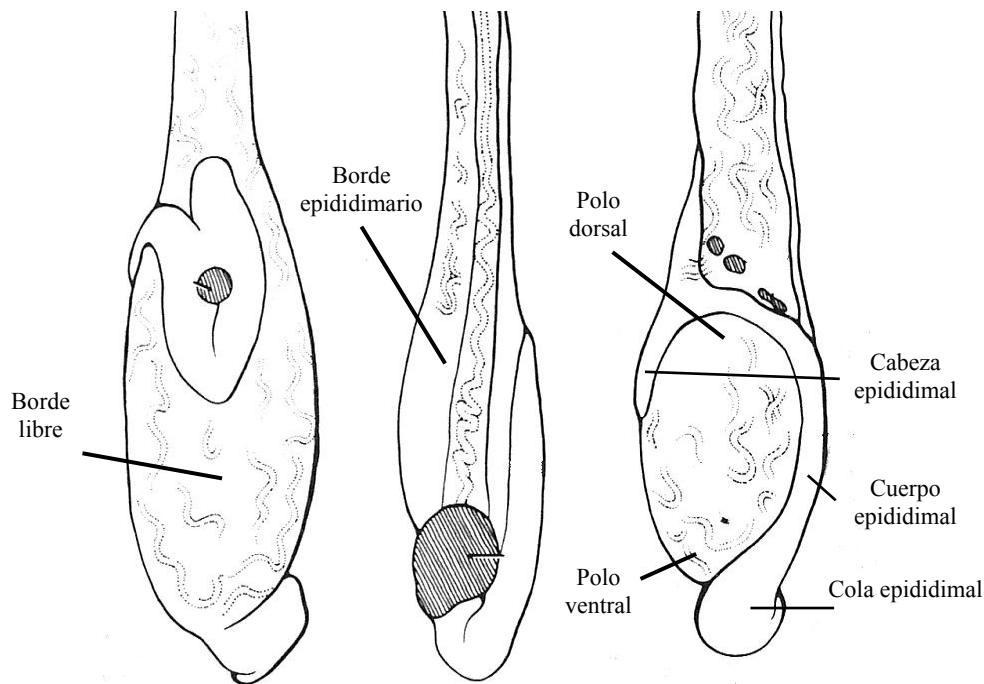


Figura nº 2.9. Esquema del testículo y epidídimo (bovino joven) (Trejo *et al.*, 2005).

El tamaño del testículo depende de la edad, la raza y del desarrollo corporal. En un toro adulto pesa alrededor de 250-300 g (Ashdown and Hafez, 1996); y ambos testículos alrededor de 500 g, aproximadamente el 0,09% de peso vivo del animal (Salisbury *et al.*, 1978).

La superficie testicular se encuentra recubierta por una fina lámina de peritoneo visceral, llamada túnica vaginal propia o *túnica vaginalis*. Por debajo de ésta, se extiende una capa fibrosa de tejido conectivo denso e irregular denominada túnica albugínea (Figura nº 2.10), la cual envuelve todo el parénquima testicular (Wrobel and Dellmann, 1993). La turgencia testicular que se aprecia a la palpación, se debe en parte a fibras de la musculatura lisa que, en escasa cantidad, aparecen dentro del tejido fibroso de la túnica albugínea, y que contribuyen en el proceso de transporte de los espermatozoides dentro del testículo.

Una parte de la túnica albugínea se hunde hacia el centro del parénquima testicular formando una cinta de tejido conjuntivo esponjoso llamado mediastino testicular, desde el cual emergen trabéculas que se encuentran con la túnica albugínea formando los tabiques que dividen el testículo en lóbulos, que en el caso del toro no están totalmente formados (Figura nº 2.10). Los tabiques testiculares también contienen

algunas fibras de musculatura lisa que responden a la acción de la oxitocina aumentando las contracciones espontáneas.

Cada lóbulo testicular contiene dos o tres túbulos seminíferos contorneados que se anastomosan hacia el centro, tornándose rectos y comunicándose con la *rete testis* (Sisson, 1975). De la *rete testis* salen los llamados vasos eferentes que convergen en la porción dorsal de mediastino para luego llegar a la cabeza del epidídimo (Salisbury *et al.*, 1978) (Figura n° 2.10).

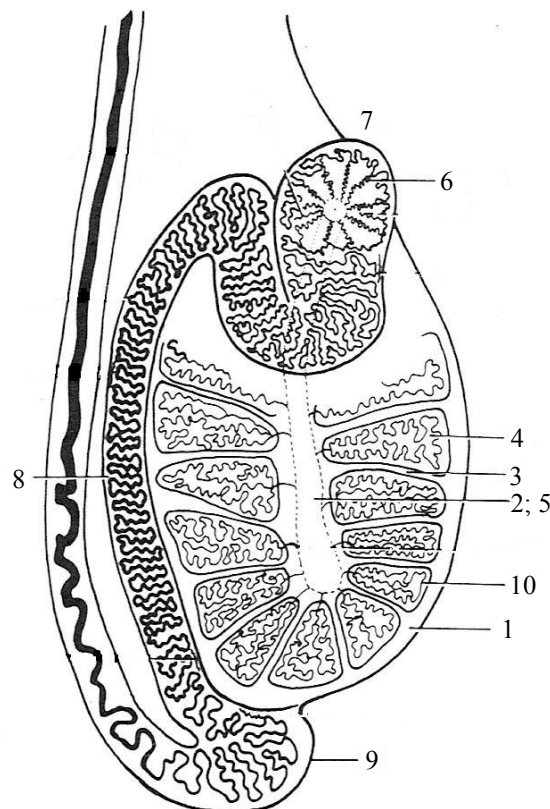


Figura n° 2.10. Diagrama de las estructuras del testículo y epidídimo (1. Túnica albugínea; 2. Mediastino testicular; 3. Tabiques testiculares; 4. Lóbulo testicular; 5. rete testi; 6. Conductillos eferentes del testículo; 7. Cabeza del epidídimo; 8. Cuerpo del epidídimo; 9. Cola del epidídimo; 10. Túbulos seminíferos) (Trejo *et al.*, 2005)

En un corte transversal del túbulo seminífero pueden observarse desde la pared hacia la luz del túbulo, una membrana basal rodeada de células mioideas, que actúa como barrera hemato-testicular; las células de sostén o células de Sertoli y las células germinales en sus distintos estadios, contenidas entre los citoplasmas de las anteriores, ubicándose las espermátidas con sus colas hacia la luz del túbulo (Figura n° 2.11).

Así, el epitelio seminífero que reviste los túbulos seminíferos, está compuesto de dos tipos de células: las células de Sertoli y las células germinales en desarrollo. Estas últimas experimentan una serie continua de divisiones celulares y cambios, que comienzan en la periferia y avanzan hacia la luz del túbulo. Las células madres llamadas espermatogonias, se dividen varias veces antes de formar espermatocitos. A continuación, éstos experimentan una meiosis que reduce su contenido de ADN a la mitad del que tienen las células somáticas. Esta serie de divisiones celulares, incluyendo la proliferación de los espermatogonios y las divisiones meióticas, se conocen como *espermatocitogénesis*. Las células haploides que resultan de este proceso son las *espermatidas*, las cuales pasan por una serie de cambios estructurales y de desarrollo para formar los espermatozoides, denominándose a estos cambios metamórficos *espermioogénesis* (Garner and Hafez, 1996).

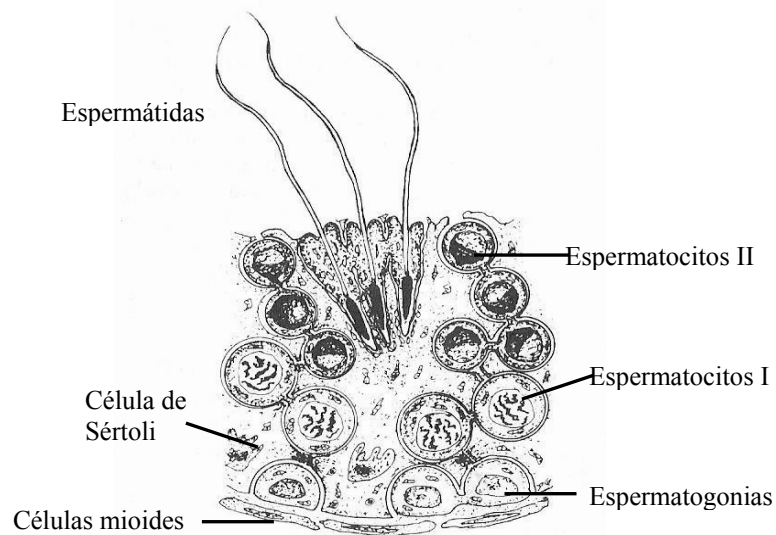


Figura nº 2.11. Esquema del epitelio seminífero (Garner and Hafez, 1996).

Las células germinales están organizadas en series de asociaciones o estados bien definidos. La secuencia organizada de estos estados se llama ciclo del epitelio seminífero, el cual varía según la especie, de aproximadamente 8,3 días en el verraco hasta 16 días en el hombre. Se requieren de 4 a casi 5,5 ciclos del epitelio seminífero para el desarrollo de la *espermatogénesis* y, en el caso del toro, donde el ciclo dura 13,5 días, por lo que la *espermatogénesis* completa en dicho animal tiene una duración aproximada de 61 días (Garner and Hafez, 1996).

Las **células de Sertoli** se encuentran reposando sobre la membrana basal de los túbulos seminíferos y constituyen el armazón de los mismos, manteniéndose en contacto entre ellas por fuertes y especializados complejos de unión, que se localizan en la porción basal de las células y evitan que los diferentes estratos celulares penetren en la luz del túbulo seminífero, a menos que lo hagan a través del citoplasma de las células. Éstas células especializadas responden a la FSH regulando el número de espermatogonias que entran en el proceso de división celular (Griswold, 1993) y funciones como la nutrición, el aislamiento de la circulación general impidiendo el paso de macromoléculas, como las inmunoglobulinas (barrera hemato-testicular), y proporcionando el apoyo estructural a las células germinales para estimular 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.

En contacto con la superficie basal de las células de Sertoli y rodeando los túbulos seminíferos, se encuentran las **células peritubulares**. Éstas poseen dos funciones principales. Una de ellas es ayudar a transportar los espermatozoides testiculares inmóviles hacia la *rete testis* y al epidídimo, ya que poseen elementos contráctiles (actina, miosina y fibronectina) y, la otra función, no menos importante, es la del intercambio de señales entre el intersticio y las células de los túbulos seminíferos (Hedger and Meinhardt, 2003).

La producción de hormonas (esteroideas y no esteroideas), está a cargo de las **células de Leydig**, las cuales se encuentran ubicadas en el estroma del tejido conectivo del testículo. Las hormonas más destacadas son la testosterona y la dihidrotestosterona, las cuales son necesarias para la diferenciación sexual, la producción de gametos y el mantenimiento de la homeostasis del macho.

Las espermátidas son liberadas dentro del lumen de los túbulos seminíferos por extrusión de las células de Sertoli, mientras que su transporte está determinado por una serie de acciones: secreción activa de las células de Sertoli y la *rete testis*, contracción de los elementos dentro de la cápsula testicular, contracción de la capa de células mioideas de los tubos seminíferos y movimiento ciliar del epitelio de los conductos eferentes hasta llegar al epidídimo (Amann and Schanbacher, 1983).

2.2.2. EL EPIDÍDIMO

2.2.2.1. ANATOMÍA DEL EPIDÍDIMO

El epidídimo es un túbulo elongado y tortuoso, con una longitud de 30-35 metros en el toro. Está recubierto por un saco de tejido conectivo, que es la extensión de la túnica albugínea (Salisbury *et al.*, 1978).

Anatómicamente consta de 3 partes bien definidas: cabeza, cuerpo y cola (Sisson, 1975) (Figura nº 2.10). La cabeza es la parte de mayor tamaño, recorre el polo dorsal del testículo y desciende en forma de asa unos 2,5-3 cm de la superficie dorso-lateral del mismo. El cuerpo se extiende hacia el polo distal del testículo, como una banda de 1 cm de ancho, y se une íntimamente a la cara caudo-medial del mismo. La cola del epidídimo tiene forma cónica y se une estrechamente, por su base mayor, al polo distal del testículo.

Las circunvoluciones del epidídimo van disminuyendo, en amplitud, progresivamente desde la cabeza al cuerpo, en el cual se aprecia una constricción delgada de la túnica albugínea. Pero a nivel de la cola aumenta el diámetro del túbulo y el tamaño de las vueltas (Salisbury *et al.*, 1978).

2.2.2.2. FUNCIÓN EPIDIDIMAL

Las funciones principales del epidídimo son el transporte, la maduración y el almacenamiento de los espermatozoides.

Cuando los espermatozoides salen del testículo son inmaduros, ya que carecen de movilidad, son incapaces de fecundar al ovocito y todavía contienen un pequeño glóbulo de citoplasma o gota citoplasmática, ubicada alrededor de la pieza intermedia, en su extremo proximal.

La composición del fluido de la luz del túbulo y el metabolismo espermático epididimal, es muy diferente al de los espermatozoides eyaculados. El medio ambiente epididimal presenta una baja concentración de O₂, que disminuye el metabolismo de los espermatozoides, inhibidores metabólicos y una mínima concentración de sustratos para el metabolismo.

El tránsito del espermatozoide por los conductos eferentes y el epidídimo se halla asociado con una serie de cambios que incluyen:

- Maduración espermática:
 - Adquisición de la capacidad de movilidad progresiva;
 - La condensación final del núcleo y modificaciones en la formación típica del acrosoma;
 - Formación de puentes disulfuro en las estructuras proteicas;
 - Alteración en la naturaleza de la membrana plasmática;
 - Migración de la gota citoplasmática proximal a una posición distal de la pieza intermedia del espermatozoide;
- La reabsorción, fagocitosis y liquefacción de espermatozoides deficientes.
- La absorción del líquido de los túbulos seminíferos y la *rete testis* (concentración del semen).
- El almacenamiento de espermatozoides.

El desarrollo de la capacidad fecundante se asocia con cambios en varios aspectos de la integridad funcional de los espermatozoides (Garner and Hafez, 1996):

- Desarrollo del potencial para la movilidad progresiva sostenida;
- Modificación de los patrones metabólicos y el estado estructural de los orgánulos de la cola;
- Cambios en la cromatina nuclear;
- Cambios en la naturaleza de la superficie de la membrana plasmática;
- Movimiento y pérdida de la inclusión citoplasmática;
- Modificación, en algunas especies, de la forma del acrosoma.

Los cambios funcionales más importantes ocurren entre los conductos eferentes y la cabeza del epidídimo. El espermatozoide extraído de la cabeza del epidídimo no es capaz de fecundar ovocitos, mientras que sí tiene esta competencia el semen obtenido de la cola del epidídimo.

No se aprecian cambios morfológicos obvios en la cola del espermatozoide durante su tránsito por el epidídimo, excepto variaciones con relación a la posición de la gota citoplasmática. Por el contrario, los espermatozoides sufren transformaciones constantes en la membrana plasmática, concretamente en las glicoproteínas y lípidos de membrana durante su desplazamiento a través del epidídimo. Estos cambios confieren estabilidad a la membrana potencialmente inestable, aumentando la capacidad de los espermatozoides para fecundar a los ovocitos. La captura de las glicoproteínas secretadas por el epitelio del epidídimo, permite al espermatozoide unirse a la zona pelúcida (Harper, 1993; Nolan and Hammerstedt, 1997).

En la cabeza del epidídimo, los espermatozoides solo muestran un lento movimiento de desplazamiento circular que, cuando alcanza la cola del epidídimo, se transforma en vigoroso, unidireccional y progresivo, con rotación longitudinal de la cabeza. También se ha sugerido que la adquisición de la movilidad está más relacionada con la edad de los espermatozoides que con los cambios en la composición del microambiente de cada una de las regiones del epidídimo (Harper, 1993).

Se desconoce cuál es el mecanismo que permite mantener el estado de hiperosmolaridad, dado que el epitelio del epidídimo es permeable al agua y el flujo de fluidos es lento. Sin embargo, se ha observado que la glicerilfosfatidilcolina y la carnitina, compuestos orgánicos característicos del fluido epididimal, son responsables del 30% de la osmolaridad. Otros componentes son las cefalinas y los fosfatos (Harper, 1993).

En el fluido epididimario son secretadas diversas proteínas, cuya naturaleza varía en función de la especie y de la región del epidídimo. Esta actividad secretora depende de la testosterona y de la 5- α -dihidrotestosterona. Estas proteínas son las responsables de los cambios en la membrana y de los patrones de movimiento de los espermatozoides: actuando como moléculas transportadoras de compuestos liposolubles; participando en la remodelación y protección de la membrana del espermatozoide; aumentan los sitios de unión que permitan la adhesión de nuevos componentes; inducen el movimiento progresivo del espermatozoide; evitan la aglutinación de las células espermáticas inmaduras e incrementan su capacidad fecundante tanto *in vitro* como *in vivo* (Cooper, 1998).

Los espermatozoides 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 anexas (Garner and Hafez, 1996). La mayor parte de los espermatozoides almacenados y no eyaculados se eliminan gradualmente por excreción en la orina. Aquellos que no se eliminan en la orina experimentan un envejecimiento gradual, primero pierden su capacidad fecundante, luego su movilidad y, por último, degeneran y mueren.

2.2.3. EL ESPERMATOZOIDE

En el espermatozoide distinguimos fundamentalmente dos partes, la cabeza y la cola (Figura nº 2.12).

La **cabeza**, de los espermatozoides de mamíferos, presenta formas y tamaños muy variados. Su característica principal es el núcleo aplanado y la cromatina, altamente compactada, formada por ADN y protaminas espermáticas, conteniendo un número haploide de material genético (Garner and Hafez, 1996).

El extremo anterior del núcleo espermático está cubierto por el acrosoma, una vesícula intracelular, membranosa y aplanada. Este orgánulo se forma durante la espermatogénesis, a partir del complejo de Golgi de las espermátidas, y posee una doble capa, la membrana acrosomal interna y la membrana acrosomal externa (próxima a la cara interna de la membrana plasmática). Durante la reacción acrosómica, la membrana acrosomal y la membrana plasmática se fusionan liberando al exterior el contenido acrosomal, constituido mayoritariamente por enzimas hidrolíticas, siendo las principales la acrosina y la hialuronidasa.

La **cola** del espermatozoide está formada por el cuello y los segmentos medio, principal y caudal.

El *cuello o segmento conector*, une la cabeza con la cola del espermatozoide y está formado por el capítulo, las columnas estriadas, la placa basal (formada por nueve fibras gruesas que continúan por la mayor parte de la cola) y el anillo posterior.

A continuación del cuello, y extendiéndose hasta el anillo citoplasmático, se sitúa el *segmento medio o pieza intermedia*. Desde dentro hacia fuera está compuesto por: el axonema, típica estructura de “9+2”, denominada así al estar compuesto por una pareja de microtúbulos centrales rodeados por nueve pares de microtúbulos periféricos;

9 fibras gruesas o densas externas. Las mitocondrias generan la energía necesaria para la movilidad de la célula. Éstas cubren estos elementos por debajo de la membrana plasmática y se disponen helicoidalmente formando la vaina o cubierta mitocondrial. Al final de la vaina se forma el anillo citoplasmático o *annulus*, siendo el punto de unión entre la pieza intermedia y la principal (Garner and Hafez, 1996).

El *segmento o pieza principal* se extiende casi hasta el final de la cola, formado por el axonema y las fibras densas, en número de 7.

El citoesqueleto, en espermatozoides de mamíferos, está constituido por un cilindro hueco, 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 (Garner and Hafez, 1996).

El *segmento o pieza terminal* es la última porción de la cola del espermatozoide, formada solo por axonema cubierto por la membrana plasmática.

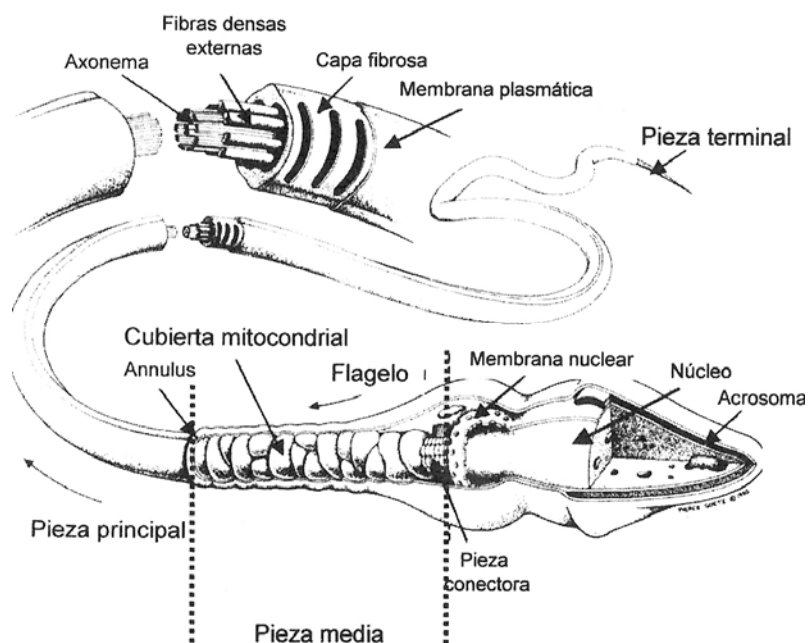


Figura nº 2.12. Morfología del espermatozoide. En este diagrama se representan la cabeza y las tres regiones del flagelo y sus características. El axonema ocupa la porción más interna del flagelo en toda su longitud. La pieza media se caracteriza por la presencia de las mitocondrias. La pieza principal del flagelo no está cubierta por mitocondrias y la pieza terminal no tiene la cubierta fibrosa externa (Trejo *et al.*, 2005).

Existen importantes diferencias en las características fisiológicas de los espermatozoides de eyaculado frente a los de epidídimo, sobre todo en las propiedades de la membrana celular del espermatozoide que afectan a la supervivencia después de la refrigeración y congelación (Martínez-Pastor *et al.*, 2006). Además, los espermatozoides epididimales no han sido expuestos a las complejas secreciones de las glándulas sexuales accesorias, que alteran la sensibilidad y la resistencia a la congelación de los espermatozoides eyaculados (Yu *et al.*, 2002).

Durante el tránsito epididimal, los espermatozoides de mamíferos, adquieren la capacidad de movimiento y de fecundación. Cuando alcanzan la cola del epidídimo se mantienen en un estado de quiescencia esperando la eyaculación, conservando la energía adquirida para el proceso de fecundación (Mann and Lutwak-Mann, 1981; Zaneveld and Chatteron, 1982). En este estado de quiescencia, los espermatozoides de bovino son inmóviles y metabólicamente inactivos (Cascieri *et al.*, 1976).

Los espermatozoides que son almacenados *in vitro* en este estado, a la misma temperatura por periodos relativamente largos, retienen su capacidad para moverse y fecundar (Jones and Murdoch, 1996). Esto se debe a que el ambiente en la cola del epidídimo favorece, por mayor tiempo, la supervivencia de los espermatozoides.

La cola del epidídimo se caracteriza por tener bajo pH (Acott and Carr, 1984; Carr *et al.*, 1985) y presión hiperosmótica (Liu and Foote, 1998). Además, los espermatozoides se encuentran almacenados en altas concentraciones (Cascieri *et al.*, 1976; Amann *et al.*, 1976) y con baja tensión de oxígeno (Free *et al.*, 1976).

El epidídimo proporciona un alto número de espermatozoides viables y plenamente competentes para lograr una fecundación normal, con el consiguiente desarrollo embrionario y fetal. Se ha demostrado que el espermatozoide epididimal ya posee sitios de unión para las proteínas de la zona pelúcida (Harkema *et al.*, 2004).

Está bien documentado que el plasma seminal contiene factores de decapitación, las adhesinas espermáticas (AE), que pueden unirse reversiblemente a los espermatozoides e inhibir su capacitación. Las AE son moléculas que recubren el espermatozoide y estabilizan la membrana plasmática del acrosoma. La mayoría de las AE son secretadas por las glándulas sexuales accesorias, pero algunas son de origen epididimal (Bergeron *et al.*, 2005).

Durante el paso de los espermatozoides por la cabeza y el cuerpo del epidídimo, su membrana plasmática se recubre con glucoproteínas, que representan una protección adicional frente al plasma espermático. Esta cubierta protectora está compuesta por esperminas, que actúan como factores decapacitantes. Precisamente, la eliminación de esta cubierta, especialmente en la región del acrosoma, es una parte importante del fenómeno de capacitación para que queden expuestos los receptores que han de interactuar con los del ovocito (Yanagimachi, 1989).

Durante la maduración en el epidídimo y durante la eyaculación, el espermatozoide adsorbería en la superficie factores decapacitantes y proteínas que fijarían la heparina (McNutt *et al.*, 1992). En el tracto reproductivo femenino, los aminoglicanos del tipo de la heparina se unirían a esas proteínas adsorbidas provocando la pérdida de los factores decapacitantes y modulando la función espermática, preparándolo para su interacción con el ovocito (Parrish *et al.*, 1989; Miller and Ax, 1990).

En la mayoría de las especies, los espermatozoides son incapaces de penetrar inmediatamente en el ovocito. Durante el tiempo que se encuentran en el útero y en los oviductos, desarrollan su capacidad para fecundar. Los cambios bioquímicos y fisiológicos que ocurren en la capacitación les permitirá adquirir mayor movilidad para alcanzar el ovocito, desarrollar la competencia para expresar la reacción acrosómica, tener la capacidad para encontrar la zona pelúcida y la membrana vitelina a través de la adquisición de los receptores proteicos adecuados, exponiendo los mismos al ovocito en el momento oportuno y, por último, conseguir la capacidad para fusionarse con el oolema y ser incorporado al interior del ovocito.

Tras la capacitación, los cambios que se producen en los patrones de movimiento del espermatozoide se caracterizan por hiperactividad, batido asimétrico del flagelo, sustitución del movimiento progresivo por movimientos circulares y frecuentes cambios de dirección (Tateno and Mikamo, 1987). Esta hiperactividad supone ciertas ventajas de cara a la fecundación (Demott and Suárez, 1992).

La reacción acrosómica es otro factor esencial para que el espermatozoide pueda penetrar en el ovocito, ya que debido a ella se produce la liberación de las enzimas de los orgánulos de los espermatozoides, que son las responsables de que éstos puedan atravesar las membranas protectoras del ovocito, especialmente la zona

pelúcida. Implica fusiones múltiples entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática (Szöllösi and Hunter, 1978). El calcio se considera un factor esencial en el desencadenamiento de la reacción acrosómica en el espermatozoide bovino (Ruknudin, 1989; Kim and Babcock, 1991; Kim *et al.*, 2002).

Los espermatozoides del epidídimo, al no poseer contacto con el plasma seminal, no se verán afectados por la actividad autodestructiva de éste, ofreciendo importantes beneficios para la fecundación *in vitro* (FIV) y la congelación.

2.3. TIEMPO DE CONSERVACIÓN

El semen fresco diluido *in vitro*, permanece viable por un periodo limitado de tiempo. A pesar del desarrollo de numerosos diluyentes (Vishwanath and Shannon, 2000) la vida fértil del espermatozoide se mantiene solo durante 3-5 días cuando se almacena en un medio líquido inmerso en un ambiente de altas diluciones y a temperatura ambiente (Vishwanath and Shannon, 1997). En cambio, el límite de supervivencia se extiende, cuando son almacenados en la cola de su epidídimo (Setchell *et al.*, 1993).

Numerosas investigaciones se realizaron con el fin de estudiar las condiciones de almacenamiento del espermatozoide epididimal. Sankai *y col.* (2001) intentaron preservar la calidad de los espermatozoides epididimarios y encontraron que, manteniendo los testículos y epidídimos dentro de la bolsa escrotal, era un método tan eficaz como otros más complicados. Así Martínez-Pastor *y col.* (2005a) observaron que los testículos y epidídimos mantenidos dentro del escroto era técnica suficiente para proteger la cola epididimaria de la desecación, evitando complicaciones en la obtención de la muestra en el campo.

Fernández-Santos *y col.* (2009) demostraron que el espermatozoide almacenado en un estado diluido fue de menor calidad que los espermatozoides almacenados en el epidídimo de ciervo. Sin embargo, la adición de vitamina C (0,8 mM) al medio de almacenamiento fue tan eficaz como el mantenimiento de los espermatozoides en el epidídimo. Este hecho puede ser debido a que los espermatozoides epididimales están equipados con mecanismos enzimáticos (glutación peroxidasa, glutación reductasa, superóxido dismutasa) que pueden eliminar H₂O₂ y otros ROS potencialmente peligrosos. Asimismo se discute la presencia de la catalasa (Tramer *et al.*, 1998).

Aunque como ya hemos comentado, el epidídimo proporciona un excelente ambiente para el almacenamiento de los espermatozoides en un estado de quiescencia, Goovaerts y *col.* (2006), detectaron la presencia de un alto porcentaje de espermatozoides inmóviles (38,2% frente a 5,5%), lo cual puede atribuirse a la inactividad metabólica de los espermatozoides en la cola del epidídimo.

La viabilidad de las células germinales se ve afectada por el tiempo que transcurre desde la muerte del animal y por la temperatura de mantenimiento antes de la recolección de los gametos (Friedmann *et al.*, 2000; Kaabi, 2003).

Cuando un animal muere y su cuerpo se mantiene a temperatura ambiente, los espermatozoides comienzan a degenerar en el testículo y en el tracto genital masculino (Hishinuma *et al.*, 2003). Sin embargo, muchos estudios han demostrado que los espermatozoides recuperados a partir de muestras *postmortem*, incluso muchas horas después de la muerte del animal, aún conservan su función (Songsasen *et al.*, 1998; An *et al.*, 1999; Kishikawa *et al.*, 1999; Sankai *et al.*, 2001; Yu and Leibo, 2002; Soler *et al.*, 2003; citados en Soler *et al.*, 2005). De esta manera, los espermatozoides almacenados, dentro de esta estructura, guardan su movilidad y capacidad fecundante (Young, 1931; Paufler and Foote, 1968; citados en Fernández-Santos *et al.*, 2009). La disminución de la calidad del esperma debido al tiempo de conservación *postmortem*, no solo se debe al envejecimiento de los espermatozoides, sino también a los procesos inherentes a la descomposición del tejido después de la muerte, mostrando degeneración de los túbulos epididimales y cambios histológicos -picnosis del contenido de las células epiteliales hacia la luz de los túbulos, seguido aparentemente por la disrupción del epitelio unas horas más tarde- como a las 18 horas *postmortem* (Songsasen *et al.*, 1998; Hishinuma *et al.*, 2003).

Martínez-Pastor y *col.* (2005a) registraron, en epidídimos de cérvidos, un aumento de la osmolalidad después de varios días *postmortem*, reflejando así los cambios histológicos descritos por otros autores, y coincidiendo con el estudio anterior (Hishinuma *et al.*, 2003), siendo estos cambios más evidentes entre los días 4 y 7. El aumento del pH no es tan manifiesto como el aumento de la osmolalidad, ya que el cambio solo fue significativo cuando habían transcurrido muchos días después de la muerte. Esto podría indicar una buena capacidad de recuperación del sistema buffer en el interior de los túbulos (Martínez-Pastor *et al.*, 2005a). Además, estos mismos autores comprobaron la existencia de una correlación positiva entre el pH y el tiempo de

conservación. Considerando que, tanto la osmolaridad, como el pH de los medios que rodean a los espermatozoides, tienen un gran efecto sobre la movilidad y el metabolismo de los mismos (Gatti *et al.*, 1993), produciéndose una pérdida de la capacidad de almacenamiento epididimal a medida que transcurre el tiempo.

La recuperación inmediata *postmortem* y la criopreservación de los espermatozoides no siempre es posible en el campo, de ahí surge el interés de poder almacenarlo durante cierto tiempo. Según Garde y col. (1998), en un estudio realizado en ciervos, se pueden recuperar espermatozoides viables del epidídimo y mantenerlos a temperatura ambiente (aproximadamente a 20 °C) hasta 24 horas después de la castración del animal. En otros trabajos y en otra especie como el muflón (Garde *et al.*, 1995), se demostró que los espermatozoides recogidos 40 horas *postmortem*, fueron capaces de fecundar ovocitos *in vivo*.

Cuando el esperma de morueco se almacenó a temperatura ambiente durante 0, 3, 6, 9, 12 y 24 horas (Aguado *et al.*, 1994), las muestras de mejor calidad, tanto antes como después de la congelación, se obtuvieron en las 3 primeras horas *postmortem*. En condiciones similares, Garde y col. (1994b) no encontraron variaciones significativas en la fertilidad de las muestras de semen de epidídimo de morueco procesadas en las primeras 24 horas *postmortem*, notando una marcada disminución en la viabilidad de los espermatozoides durante periodos más largos de conservación.

En algunos trabajos se comprobó que la disminución en la calidad de las muestras, mantenidas a temperatura ambiente durante unas horas (6 a 15 horas) era baja (Garde *et al.*, 1994a; Songsasen *et al.*, 1998; Sankai *et al.*, 2001), e incluso la fecundidad fue similar a medio plazo (24 y 48 h), tanto si los testículos fueron refrigerados, o mantenidos a temperatura ambiente (Kaabi, 2003). En ratones, se obtuvieron espermatozoides móviles después de 24 horas *postmortem* de almacenamiento a temperatura ambiente (Christian *et al.*, 1993), resultados que coinciden con los obtenidos por otros autores (Kishikawa *et al.*, 1999; Garde *et al.*, 1994c) que, en condiciones similares de almacenamiento encontraron que los espermatozoides epididimales, eran capaces de penetrar en los ovocitos o incluso producir descendencia viva (Songsasen *et al.*, 1998). Sin embargo, en el esperma del ratón, la refrigeración fue beneficiosa cuando el procesado se realizó en un plazo más largo (4 días) (Shankai *et al.*, 2001). Por el contrario, para el esperma epididimal

equino, el transporte a temperatura ambiente durante 24 horas, no resultó ser adecuado para la conservación y la recuperación óptima de espermatozoides (Neild *et al.*, 2006).

Se han realizado muchas investigaciones para evaluar la calidad y la alteración *postmortem* del esperma en el epidídimo de varios animales: en el ratón (An *et al.*, 1999; Kishikawa *et al.*, 1999; Songsasen *et al.*, 1998; Sankai *et al.*, 2001), en el cerdo (Kikuchi *et al.*, 1998), en el perro (Yu and Leibo, 2002), en algunas especies silvestres de África (Lambrechts *et al.*, 1999; Friedmann *et al.*, 2000; Lubbe *et al.*, 2000; Killian *et al.*, 2000), en muflones (Garde *et al.*, 1995), en el ciervo ibérico (Garde *et al.*, 1998; Soler *et al.*, 2003), en morueco (Kaabi, 2003) y en el toro (Foote, 2000). En general, estos trabajos concluyen en que hay un deterioro de la calidad del esperma con el avance del tiempo *postmortem*, sobre todo en las primeras horas, y que la refrigeración del epidídimo, en temperaturas próximas a los 5 °C, es la mejor estrategia para reducir este daño. Existen diferencias entre especies, que podrían ser debido a la heterogénea resistencia al choque por frío de los espermatozoides. El efecto beneficioso de la refrigeración, sobre varios parámetros de calidad del esperma, especialmente en la movilidad, podría explicarse por la reducción de la tasa metabólica de las células del esperma cuando están refrigeradas (Salamon and Maxwell, 2000), permitiendo obtener muestras de mejor calidad espermática que las almacenadas a temperatura ambiente.

Los factores que afectan a la supervivencia de los espermatozoides en el epidídimo refrigerado, no están claros en la actualidad pero, se sabe que la cola del epidídimo proporciona un excelente ambiente para el almacenamiento del esperma en un estado de reposo. Es posible que este ambiente aumente la supervivencia de los espermatozoides, incluso en condiciones *postmortem*.

El almacenamiento refrigerado del epidídimo, junto al testículo homólogo, podría disminuir el metabolismo y mantener la viabilidad de los espermatozoides, permitiendo su transporte al laboratorio para una adecuada manipulación y criopreservación. Sin embargo, la refrigeración seguida de la congelación puede poner en peligro el potencial fecundante de los espermatozoides (Martins *et al.*, 2009).

Un estudio en ciervo rojo, realizado por Soler y *col.* (2005), mostró cómo el almacenamiento de los epidídimos en frío, por tiempos prolongados, influyó en las características al descongelarlo. Estos autores demostraron que, tras refrigerar los epidídimos por 12, 24, 48, 72 y 96 horas, la movilidad no disminuyó significativamente,

pero cuando las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y después descongeladas, la movilidad cayó, en las muestras almacenadas durante 72 y 96 horas.

Rath y Niemann (1997) observaron la buena congelabilidad del esperma de verraco obtenido de la cola del epidídimo, encontrando un alto porcentaje (72,2 %) de espermatozoides móviles a la descongelación. Un año más tarde, Kikuchi y *col.* (1998) mostraron que en la misma especie, después de la descongelación, la movilidad de los espermatozoides epididimales almacenados durante 1, 2 o 3 días a 4 °C, no fue diferente a la del grupo control. Esto también fue probado en equinos, demostrando ser un método útil de reserva genética en esta especie (Bruemmer *et al.*, 2002). Aunque la razón de la supervivencia de los espermatozoides en el epidídimo refrigerado aún no está clara, podría deberse a que éste contendría un factor de protección contra golpes de frío aún desconocido. Por otra parte, podría haber diferencias entre los individuos de la misma especie y la resistencia al shock térmico causado por la refrigeración de los espermatozoides, haciendo que el esperma de un macho pueda soportar esas variaciones de temperatura, mientras que el esperma de otro no (Holt, 2000).

En otros estudios, realizados anteriormente, se había comprobado la fecundidad, después de la inseminación artificial, tanto con esperma eyaculado como epididimal del mismo toro. En 1968, Igboeli y Foote (citado en Goovaerts *et al.*, 2006) recuperaron el esperma de la cola del epidídimo de cuatro toros, que se habían almacenado a 5 °C, durante 60 horas para inseminar 100 vacas. La media de la tasa de no retorno (TNR) para el esperma epididimal fue del 69%, y la media de la TNR para el esperma eyaculado, de estos mismos toros, fue del 75%.

Como ya hemos mencionado, muchos son los trabajos que han investigado el efecto del tiempo de almacenamiento en el esperma epididimal en diferentes especies -perros (Yu and Leibo, 2002), ovejas (Kaabi, 2003), cerdos (Kikuchi *et al.*, 1998), ciervo rojo (Soler *et al.*, 2003; 2005) y búfalo africano (Friedmann *et al.*, 2000)- y otros que probaron diferentes protocolos de congelación para el esperma epididimal -caballos (Bruemmer *et al.*, 2002), cerdos (Kikuchi *et al.*, 1998) y búfalo africano (Gerber *et al.*, 2001; Herold *et al.*, 2003)-.

De forma general, el diseño experimental utilizado fue la separación de ambas colas de los epidídimos, empleando una cola epididimal como control para la otra. Sin embargo, en estudios recientes Goovaerts y *col.* (2006) en el toro, coincidiendo con

trabajos anteriores (Garde *et al.*, 1998) en el ciervo rojo, observaron diferencias significativas en la calidad del esperma entre los epidídimos del mismo individuo. Se comprobó que, la calidad del esperma de ambas colas epididimales del mismo toro, o del mismo ciervo, no es totalmente comparable, excepto para los parámetros de linealidad y del porcentaje de espermatozoides vivos. Por lo tanto, para la realización de nuestro trabajo, decidimos utilizar la mezcla del esperma de ambos epidídimos del mismo toro para un mismo grupo.

El conocimiento de las características de los espermatozoides, durante el almacenamiento prolongado a 5 °C, es de importancia crítica, a fin de mantener las muestras de semen en condiciones óptimas. Estos hallazgos serían especialmente interesantes para el trabajo de campo, cuando no es posible la congelación inmediata de las muestras. Así cuando un macho valioso muera y no sea posible la congelación inmediata de los espermatozoides, los testículos podrían ser refrigerados, y los espermatozoides recogidos y congelados, incluso varios días después, empleando posteriormente las muestras descongeladas para la producción de descendencia viva, aprovechando el uso de las biotecnologías desarrolladas en la actualidad.

2.4. REFRIGERACIÓN, CONGELACIÓN Y EL EMPLEO DE DILUYENTES SEMINALES

Varios compartimentos estructurales y bioquímicos del esperma (acrosoma, núcleo, mitocondria, axonema, membrana plasmática) pueden sufrir cambios durante el proceso de congelación-descongelación. La membrana plasmática es una estructura dinámica que no sólo regula los intercambios extracelulares sino también el proceso de fecundación (Flesch and Gadella, 2000). Las mitocondrias de los espermatozoides continuamente producen ATP y proporcionan energía para el movimiento durante la inseminación (Evenson *et al.*, 1982), siendo un factor clave para resistir la congelación y la posterior descongelación.

En el proceso de crioconservación se deben considerar cuatro puntos importantes: la refrigeración, la congelación, la descongelación y la adición de crioprotectores.

Durante la congelación los espermatozoides son muy sensibles al descenso rápido de la temperatura desde 25 a 5 °C (Watson, 1981), experimentando lo que se conoce como choque por frío, que provoca una alteración en la integridad de la

membrana citoplasmática y pérdida de la permeabilidad selectiva (Ortman and Rodríguez-Martínez, 1994), liberación de enzimas (Harrison and White, 1972) y de lípidos intracelulares (Darin-Bennett *et al.*, 1973; Pickett and Komarek, 1967). Produce también una redistribución de los iones (Quinn and White, 1966), cambios en la membrana del acrosoma (Jones and Martin, 1973) y de las mitocondrias (Watson, 1995), lo que conlleva una pérdida de movilidad y disminución del metabolismo.

Otro punto crítico de la congelación de espermatozoides, es prevenir la formación letal de cristales de hielo intracelulares y reducir los daños de membrana durante y después de la congelación. Cuando las células se congelan, se encuentran sometidas a tensiones derivadas de la interacción entre el agua y los solutos, ocasionados por la cristalización del hielo. La exposición del espermatozoides fresco a la hiperosmolaridad del diluyente, causa un flujo de salida intracelular de agua, disminución del tamaño celular y, potencialmente, una afluencia de iones (Mazur, 1984). Los resultados de la descongelación es una reversión de estos efectos, con la consiguiente entrada de agua que puede ocasionar la ruptura de la membrana.

El descubrimiento de las propiedades crioprotectoras del glicerol (Polge *et al.*, 1949) ha permitido la congelación de los espermatozoides. Se sabe que el glicerol es un crioprotector permeable capaz de atravesar la membrana plasmática, pero la base de sus propiedades crioprotectoras aún no está clara.

Aunque también se han estudiado otras posibles sustancias crioprotectoras (por ejemplo, dimetilsulfóxido -DMSO-, propanodiol), se sigue manteniendo al glicerol como el crioprotector de elección para los espermatozoides de todas las especies.

Asimismo, desde que Philips y Lardy (1940), informaron que la yema de huevo es beneficiosa para la conservación de los espermatozoides, se ha incluido regularmente en la mayoría de los protocolos para la criopreservación del semen de animales domésticos, así como en muchas especies exóticas. Se ha demostrado que la yema de huevo puede ayudar en la resistencia contra el choque por frío y mejorar la fecundidad del espermatozoides (Bogart and Mayer, 1950; Wall and Foote, 1999; Manjunath *et al.*, 2002; Bergeron *et al.*, 2004).

La yema de huevo se usa generalmente a una concentración del 20% (v/v), pero estudios de laboratorio han revelado que esta concentración es difícil de estandarizar, e interfiere, además, con ensayos bioquímicos y con investigaciones

metabólicas. En este sentido, Moussa *y col.* (2002), sugirieron que la yema de huevo puede contener algunos potentes elementos deletéreos que reducen la movilidad del semen y otras investigaciones (Pace and Graham, 1974; Watson and Martin, 1975) señalan que existen sustancias en la misma que inhibirían la respiración de los espermatozoides o que reducirían su movilidad, lo que determinó la necesidad de reemplazar toda la yema de huevo por su fracción crioprotectora, algo que podría conseguirse a través de la eliminación de algunos componentes por centrifugación (Wall and Foote, 1999).

Demianowicz y Strezek (1996), separaron la yema de huevo en dos lipoproteínas, de baja (LDL) y de alta densidad (HDL), observando que las LDL proporcionaban una mejor protección a los espermatozoides de verraco en comparación con la yema de huevo entera, mientras que las HDL disminuían significativamente la movilidad del espermatozoide en comparación con la yema de huevo entera, debido a los gránulos contenidos en ellas. Sin embargo, el aumento de la concentración de las LDL por encima del 10% en el diluyente provocó una disminución del rendimiento de los espermatozoides después de la congelación-descongelación (Moussa *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2010). Se considera que este efecto podría deberse a que el aumento de la concentración de LDL condujo a la agregación de los gránulos, aunque otra posibilidad podría ser que daría lugar, también, a la agregación de HDL. De lo señalado parece deducirse que los gránulos y las HDL tienen efectos negativos sobre la viabilidad espermática, confirmado en estudios realizados con espermatozoide bovino (Pace and Graham, 1974; Therien *et al.*, 1999).

Otros experimentos han demostrado que las LDL, extraídas de la yema de huevo, son las responsables del efecto crioprotector durante el proceso de congelación-descongelación del espermatozoide de burro (Trimeche *et al.*, 1997), de toro (Moussa *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2010), de la trucha arco iris y de la dorada (Cabrita *et al.*, 2005), de jabalí (Johnson *et al.*, 2000) y de perro (Varela Junior *et al.*, 2009). Las LDL se componen aproximadamente de un 87% de lípidos y un 12% de proteínas. Presentan forma esférica con un diámetro medio de unos 35 nm (Anton *et al.*, 2003). Su estructura se basa en un núcleo de triglicéridos, rodeado por una capa de proteínas y fosfolípidos. Durante la congelación-descongelación, las LDL se rompen y los fosfolípidos son liberados al medio, pudiendo formar una película protectora en la superficie de la membrana de los espermatozoides (Quinn *et al.*, 1980; Cookson *et al.*, 1984).

Durante el proceso de congelación-descongelación, se ven afectadas la organización de los lípidos y la composición química de la membrana plasmática del espermatozoide (Amann and Pickett, 1987). Las LDL además de su acción protectora, directa o indirectamente, reducen las modificaciones en la membrana del espermatozoide (Pace and Graham, 1974; Manjunath *et al.*, 2002; Moussa *et al.*, 2002; Bergeron *et al.*, 2004). Graham y Foote (1987) y Bergeron *y col.* (2004), sugirieron que las LDL podrían adherirse a las membranas celulares durante el proceso de congelación-descongelación y preservar, así, la integridad de la membrana de los espermatozoides. Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual las LDL ayudarían a la protección de los espermatozoides durante dicho proceso, no se ha establecido claramente. Manjunath *y col.* (2002), propusieron que el principal mecanismo de protección sería por el secuestro de las proteínas del plasma seminal (BSP-A1/A2, BSP-A3 y la BSP-30-kDa). Prevenir la unión de las BSP a los espermatozoides y el eflujo de lípidos de la membrana plasmática de los espermatozoides determinó un aumento de la movilidad espermática en la muestra de diluyente que contenía las LDL. Bergeron *y col.* (2004) apuntaron que esto podría ocurrir de dos maneras:

- En primer lugar, la asociación de LDL (fracción de lipoproteínas de baja densidad) con las proteínas del plasma seminal protegerían a los espermatozoides evitando su unión con las BSP e impidiendo que dañen la membrana plasmática removiendo los lípidos.
- En segundo lugar, los lípidos de la LDL podrían asociarse con la membrana de los espermatozoides y preservar su integridad durante la congelación.

La LDL tiene una capacidad muy alta para unirse con las BSP, siendo la unión rápida, específica y estable, incluso después del proceso de congelación-descongelación del semen. Se demostró que el semen preparado con el diluyente que contenía yema de huevo, y sometido a congelación y posterior descongelación, contenía casi un 80% menos de BSP que los eyaculados frescos (Nauc and Manjunath, 2000). La LDL de la yema de huevo es el único componente que se une específicamente a las proteínas del plasma seminal y, el secuestro de éstas, podría representar el principal mecanismo de protección de la yema de huevo (Manjunath *et al.*, 2002). Por lo tanto, las LDL podrían ofrecer protección a los espermatozoides mediante la reducción del efecto nocivo de las proteínas del plasma seminal sobre la membrana de los espermatozoides.

El uso de las LDL podría aumentar la resistencia de los espermatozoides de toro al choque por frío y mejorar la calidad de los espermatozoides, durante el proceso de congelación-descongelación, en comparación con el medio elaborado con yema de huevo completa (Hu *et al.*, 2010).

Se han obtenido mejores resultados en términos de movilidad, características de movimiento, actividad mitocondrial, integridad acrosomal, integridad de membrana y características del ADN, cuando el semen se congeló con diluyentes que contenían un 8% y un 9% de LDL en comparación con medios que presentaban un 20% de yema de huevo, determinándose que el 8% (v/v) sería la concentración óptima de LDL (Hu *et al.*, 2010).

Sin embargo, en los últimos años se han publicado numerosos argumentos en contra de la utilización de la yema de huevo o de la leche:

- La gran variabilidad en su composición haría difícil analizar los efectos beneficiosos de uno de sus compuestos, en particular, en la criopreservación de espermatozoides.
- La yema de huevo y la leche implican un riesgo de contaminación microbiana, con la consiguiente producción de endotoxinas, capaces de dañar la capacidad fecundante de los espermatozoides (Bousseau *et al.*, 1998).
- Los productos animales pueden contener hormonas esteroideas y sus precursores (Hartmann *et al.*, 1998), que además de la falta de normalización de la calidad, podrían causar una disminución de la capacidad fecundante del esperma.
- La mayoría de los países temen al riesgo de introducir enfermedades exóticas a través del transporte de productos que contengan componentes de origen animal (Thibier and Guerin, 2000), prefiriendo sustancias bien definidas, libres de agentes patógenos y sin un origen animal.

Por ello, la aparición de nuevos medios de congelación constituidos a base de lipoproteínas de semilla de soja, como el Bioxcell[®], entre muchos otros, se presentan como una alternativa importante e interesante a considerar.

En toros, el uso de un diluyente definido, sin yema de huevo, determinó en el semen descongelado parámetros similares de calidad e iguales tasas de fertilidad que los observados en diluyentes con yema de huevo. En un diluyente definido, todos los componentes se añaden como sustancias puras y, por tanto, cada lote contiene exactamente la misma composición. Además, éstos se preparan fácilmente ya que sólo se añade agua destilada a los concentrados comerciales.

El extensor libre de proteínas de origen animal, a base de lecitina de soja, es especialmente adecuado para la inseminación artificial en bovinos, siendo una alternativa viable a los diluyentes tradicionales a base de yema de huevo (Aires *et al.*, 2003).

Es un hecho conocido que el tiempo que los espermatozoides están expuestos al diluyente, antes de la congelación, tiene efectos sobre sus características postdescongelación. En espermatozoides de toros, se ha descrito un aumento significativo de la movilidad postdescongelación cuando se mantuvo un período de equilibrio de 2 horas a 5 °C, al compararlo con otro en el que no se utilizaba el tiempo de equilibrio (Dhami *et al.*, 1992). Sin embargo, se ha demostrado, que los tiempos de exposición más cortos a los diluyentes han incrementado la supervivencia espermática y los porcentajes de movilidad (O'Dell and Hurst, 1956). El tiempo de equilibrio con glicerol, cuando excede las 4 horas, se ha considerado perjudicial para la movilidad espermática postdescongelación (Wiggin and Almquist, 1975).

2.5. VALORACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL

Desde hace años muchos investigadores han buscado el diseño de un análisis ideal, que valore y prediga la fertilidad de una muestra seminal, de forma sencilla y eficaz. Las cualidades que deben tener los espermatozoides fecundantes son: movilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una movilidad hiperactiva, integridad estructural y funcional de la membrana, de las enzimas asociadas con la fecundación, de la capacidad de penetración y de transferencia óptima del material genético (Graham, 1996).

Por todo ello, un análisis integral es muy difícil de llevar a cabo, ya que acarrea una enorme complejidad inherente a la función espermática (Amann and Hammerstedt, 1993; Graham, 1996) y esto hace posible que el análisis clásico seminal (movilidad, concentración, viabilidad, morfología y acrosomía) no nos asegure una predicción

correcta de la fecundidad, al no permitir evaluar todas las características funcionales del esperma, pudiendo sobre o subestimar la capacidad fecundante de dicha muestra (Butler and Roberts, 1975; Graham *et al.*, 1980; Pace *et al.*, 1981).

Si a todo esto le sumamos 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 intervienen factores condicionantes de la hembra, la interacción macho-hembra y la injerencia humana en el proceso, hace más difícil el establecimiento de una correcta predicción de la capacidad fecundante (Amann, 1989).

Las técnicas de evaluación seminal, tanto para la utilización en investigación como en la práctica, deben ser precisas, sencillas, rápidas y económicas. Actualmente, con el avance de la informática y su aplicación en la valoración seminal, aumenta la precisión de los resultados -de la cual carecía el análisis convencional al contener un alto grado de subjetividad-, garantizando una mejor correlación con la capacidad fecundante del espermatozoide (Jasko *et al.*, 1992) y más que predecir, solo podemos estimar la fecundidad de una muestra utilizando conjuntamente los datos de varias pruebas que analicen distintos aspectos morfofuncionales de los espermatozoides (Rodríguez-Martínez, 2003). Como resultado del análisis seminal o espermiograma podemos calificar a la muestra como apta o no apta para su uso en inseminación artificial.

2.5.1. VALORACIÓN MACROSCÓPICA DE LA CALIDAD SEMINAL

Es la primera evaluación tras la recogida y en ella determinamos el volumen, el aspecto y el color del material obtenido.

2.5.1.1. VOLUMEN

Estas características del esperma varían según la especie, el estado fisiológico, el individuo, la raza, la edad, el tamaño, el número de saltos, el método de recolección, los factores alimentarios, sanitarios y medio ambientales, haciendo a esta característica variable para la evaluación de la calidad seminal.

La capacidad de producción espermática de un toro está determinada por la medida de la circunferencia escrotal. El toro eyacula de 4 a 10 ml de semen, con 800 a 2000 millones de espermatozoides/ml (Garner and Hafez, 1996).

2.5.1.2. ASPECTO O CONSISTENCIA

El semen debe tener aspecto opaco y relativamente uniforme, indicativo de alta concentración de células espermáticas, siendo las muestras translúcidas las que poseen pocos espermatozoides (Garner and Hafez, 1996).

2.5.1.3. COLOR

El esperma de eyaculado del toro presenta una coloración blanquecina o ligeramente amarillenta y su opacidad se halla en función de la concentración espermática (Barth *et al.*, 2000), aunque también pueden encontrarse pigmentos naturales que dan al semen un color diferente al blanquecino, sin afectar a la calidad espermática.

Atendiendo a estas características macroscópicas, el eyaculado se puede clasificar en:

- **Muy Bueno:** Apariencia granulosa. Se corresponde con eyaculados con una concentración de 750 a 1.000 millones o más de espermatozoides/ml.
- **Bueno:** Semen opaco, lechoso. La concentración de estos eyaculados se encuentra entre 400 y 750 x 10⁶ de espermatozoides/ml.
- **Regular:** Semen con apariencia a leche aguada. Se corresponde con eyaculados con 250 a 400 x 10⁶ de espermatozoides/ml.
- **Malo:** Semen translúcido y acuoso. La concentración de estos eyaculados es menor de 250 x 10⁶ de espermatozoides/ml.

2.5.2. VALORACIÓN MICROSCÓPICA DEL LA CALIDAD SEMINAL

El análisis espermático es extremadamente sensible a cambios en la temperatura, efectos en la dilución, tiempo de análisis, diluyente empleado o a la profundidad de la gota en el análisis, por lo que debemos ser estrictos y realizar este análisis en las condiciones óptimas y estandarizadas. Para evitar las variaciones ocasionadas por el estrés térmico, al momento de evaluar la muestra

microscópicamente, los portaobjetos, sobre los cuales se coloca la muestra, se deben mantener a 37 °C (Barth *et al.*, 2000).

2.5.2.1. MOVILIDAD ESPERMÁTICA

La movilidad ha sido el parámetro más comúnmente utilizado para definir la viabilidad y, por ende, la calidad de una muestra espermática. Su valoración por personas experimentadas resulta una técnica económica y de fácil ejecución (Davis and Siemers, 1995). Sin embargo, la subjetividad del método puede llevar a la obtención de diferentes resultados para una misma muestra analizada (Vázquez *et al.*, 1997a).

Al relacionar la movilidad con la fertilidad, existen grandes discrepancias entre los diferentes autores, observándose correlaciones muy variadas ($r=0,15-0,83$) (Rodríguez-Martínez, 2003). Para aportarle objetividad y repetibilidad al análisis de los parámetros de movilidad, se puede recurrir a los sistemas informatizados.

En la valoración visual subjetiva se pueden determinar dos tipos de movilidades, la masal y la individual.

2.5.2.1.1. MOVILIDAD MASAL

En función de la concentración espermática, el porcentaje de células con movimiento progresivo y la velocidad de movimiento de los espermatozoides, se originan movimientos de flujo y la existencia de “olas” de zoospermios (Barth *et al.*, 2000). Cuando uno de estos factores se encuentra disminuido, las ondas rápidas, en remolinos, que podríamos esperar, son severamente deprimidas o eliminadas.

La evaluación se hace sobre una gota de semen sin diluir de 5 a 10 mm de diámetro, colocada sobre un portaobjetos atemperado a 37 °C y sin cubreobjetos, bajo un campo luminoso y con un aumento de x40-100 observando varios campos microscópicos (Barth, 2000). La valoración de este parámetro es subjetiva según la densidad y velocidad de movimiento de las ondas o remolinos que se forman en la superficie de la gota de semen, se podrían clasificar (Barth, 2000) en:

- Muy Buena:** movimientos en remolinos en ondas vigorosas.
- Buena:** remolinos y ondas más lentas.
- Regular:** sin remolinos, pero con oscilaciones generalizadas.
- Mala:** poca o ninguna movilidad masal.

2.5.2.1.2. MOVILIDAD INDIVIDUAL

Es el resultado de la evaluación del movimiento progresivo de los espermatozoides y de los cambios en su movilidad (Barth *et al.*, 2000). La observación de la movilidad individual y la estimación del porcentaje de células con movimiento progresivo, nos da información de la integridad de la membrana del espermatozoide, así como también de la integridad morfológica de los espermatozoides. Para la observación de la movilidad individual son necesarios porta y cubreobjetos nuevos, perfectamente limpios y atemperados a 37 °C. Este procedimiento se realiza colocando una gota, de 3 a 4 mm de diámetro de semen diluido entre un porta y un cubreobjeto, observándose a una magnificación de x200–500 aumentos, preferentemente bajo contraste de fase. Los resultados de la movilidad individual se expresan en porcentaje o en una escala del 0 (espermatozoides inmóviles) al 5 (espermatozoides con movimiento progresivo muy rápido).

Con el fin de darle objetividad a los parámetros de movilidad, se crearon métodos basados en exposiciones fotográficas múltiples o en video-micrografías. Estos resultaron ser tediosos, largos y costosos, por lo que han sido descartados en la actualidad (Boyers *et al.*, 1989). Luego los sistemas informatizados de digitalización de imágenes revolucionaron el estudio de movilidad espermática, permitiendo realizarlo de manera automatizada y simplificada, con la creación de los sistemas CASA, denominados genéricamente así de sus siglas en inglés (Computer Assited Motility Analysis), lográndose el primer analizador computarizado en 1979 (Dott and Foster, 1979). Este método, además de analizar el movimiento espermático, permite evaluar también la concentración y la morfología.

Los sistemas CASA están compuestos básicamente por un microscopio con contraste de fase conectado a una platina térmica que permite mantener las muestras a 37 °C, una cámara de vídeo de alta resolución conectada a una pantalla de televisión y un software de análisis de imágenes por ordenador. Después de capturar las imágenes, con los espermatozoides en movimiento (previamente diluidos en un medio adecuado) a x100-200 aumentos, la información se guarda hasta su estudio. Una vez analizadas las imágenes, la información obtenida se transfiere a un procesador matemático que fragmenta la movilidad espermática en diversos descriptores de los cuales, en la actualidad, se calculan al menos los siguientes 8 parámetros cinéticos básicos de

movilidad, existiendo otros, derivados de ellos, que se utilizan con menor asiduidad (Blanco, 1998; Quintero-Moreno *et al.*, 2003):

- **Velocidad Curvilínea (VCL)**: Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo ($\mu\text{m/s}$) (Mortimer *et al.*, 1997).
- **Velocidad Rectilínea (VSL)**: Distancia recorrida por el espermatozoide entre el primer punto y el último de su trayectoria, durante el periodo de observación ($\mu\text{m/s}$). 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 *et al.*, 1997).
- **Velocidad media (VAP)**: Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media durante el periodo de observación ($\mu\text{m/s}$).
- **Índice de Linealidad (LIN)**: Relación porcentual entre la VSL y la VCL $[(\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100]$ (%). Indica cuan próxima es la trayectoria circular del espermatozoide a una línea recta, presentando los recorridos circulares un bajo LIN, ya que la trayectoria circular será mucho mayor que el espacio neto ganado y viceversa (Mortimer *et al.*, 1997).
- **Índice de Rectitud (STR)**: Relación porcentual entre la VSL y la VAP $[(\text{VSL}/\text{VAP}) \times 100]$ (%). Indica la proximidad de 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) (Mortimer *et al.*, 1997).
- **Índice de Oscilación (WOB)**: Relación porcentual entre la VAP y la VCL $[(\text{VAP}/\text{VCL}) \times 100]$ (%). 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)**: Desplazamiento efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria, curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media (μm)

(Quintero-Moreno, 2003). Los resultados de ALH se expresan de dos maneras posibles, en función del sistema CASA que estemos utilizando:

- **ALH media:** Promedio del conjunto de valores de ALH calculados en todos los puntos de su trayectoria.
 - **ALH máxima:** Máximo valor de ALH en la trayectoria considerada.
- **Frecuencia de batido (BCF):** Número de veces que la cabeza del espermatozoide cruza la dirección de movimiento; siendo indicativo de la frecuencia de batido del flagelo (Hz) (Mortimer *et al.*, 1997).

La interpretación de los datos cinéticos depende del conocimiento que tengamos de lo que rodea a las condiciones del análisis (Mortimer *et al.*, 1995). Existen factores técnicos y biológicos que pueden afectar a los resultados presentados por el CASA, por lo tanto, es necesario conocer en todo momento las condiciones del análisis.

Entre los principales factores de los que depende el resultado final están la temperatura del semen, el volumen analizado, el tipo de cámara utilizada, el tiempo que oscila entre la recogida y el análisis, la concentración espermática de la muestra, el diluyente utilizado, posibles patologías existentes, el tipo de objetivo utilizado, la iluminación del microscopio y la variabilidad entre diferentes técnicos (Verstegen *et al.*, 2002). También pueden afectar las variaciones originadas por los equipos de captura y análisis de imágenes, como el diseño del software, los parámetros de configuración (para diferenciar un espermatozoide de residuos), el radio de búsqueda, el número de puntos de la trayectoria analizados y la frecuencia de captura, derivadas del equipo óptico y de captura.

2.5.2.2. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

Es un punto muy importante en la contrastación seminal, tanto desde el punto de vista reproductivo como desde el comercial, ya que nos va a permitir conocer el número de dosis que se pueden producir a partir de cada eyaculado.

La concentración puede calcularse por varios métodos a partir de una muestra de semen, siendo usualmente utilizados los hematocitómetros, colorímetros y espectrofotómetros (González-Urdiales *et al.*, 2006), y en menor medida los contadores electrónicos de partículas, el citómetro de flujo y los sistemas basados en el análisis de imagen (Woelders, 1990; González-Urdiales *et al.*, 2006).

Los hematocitómetros o cámaras de recuento celular son los más empleados, siendo las más conocidas las cámaras *Neubauer improved*, *Bürker* o *Makler*. En su superficie presentan grabada una cuadrícula y el área de cada una de sus divisiones es un valor conocido, así como el volumen que encierra. Conociendo también la dilución (con una solución fijadora) 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.

Los espectrofotómetros y colorímetros son métodos indirectos que nos permiten medir, en porcentaje, la cantidad de luz que es capaz de atravesar (transmitancia) o que queda retenida (absorbancia). Esta densidad óptica de la muestra se compara frente a una recta de regresión estándar, patrón previamente validado. Es un método rápido y sencillo en su aplicación, aunque tanto la aglutinación espermática, como el uso de diluyentes turbios (por ejemplo los que tienen una base láctea), pueden interferir en la medición.

El método de citometría de flujo determina el número de partículas por unidad de volumen, aunque tampoco puede garantizar que todas estas partículas sean realmente espermatozoides (Woelders, 1990).

El coeficiente de variación de las cámaras de recuento celular es mayor (12,3 %) que el del espectrofotómetro (2,9 %) y que en la citometría de flujo (2,3 %) lo cual ha llevado a afirmar que estos dos últimos son las técnicas más precisas para el recuento espermático (Paulenz and Hofmo; 1996).

Existen dos métodos con base en la tecnología de análisis de imagen. Por un lado los sistemas CASA tradicionales, que presentan resultados con una baja correlación con los de las cámaras de recuento celular, con diferencias significativas entre ambos métodos (Chan *et al.*, 1990; Iguer-Ouada and Verstegen 2001; Tejerina *et al.*, 2006). Por otra parte, el Nucleocounter[®] es un sistema, recientemente introducido, que combina la tecnología del análisis de imagen con una tinción fluorescente, no presentando diferencias significativas con los resultados de la cámara de recuento celular (Tejerina *et al.*, 2006).

2.5.2.3. INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA

El estado de la membrana espermática marca la integridad morfológica y funcional de la célula cumpliendo un papel clave en la función espermática (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1997).

Ésta es una estructura dinámica que 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. Su integridad no sólo es fundamental para el metabolismo espermático, sino que también lo es para una adecuada capacitación y reacción acrosómica y, por ende, para la fertilidad del macho (Yanagimachi, 1994) constituyendo una fuente de información importante en la evaluación de la fertilidad del mismo (Jeyendran *et al.*, 1984).

Para evaluar la funcionalidad de la membrana espermática se utilizan las pruebas de resistencia osmótica por su simplicidad y su valor predictivo. El espermatozoide del toro, del conejo y del hombre tienen una gran capacidad para captar agua en un medio hiposmótico, siempre y cuando ésta se encuentre íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente (Drevious and Eriksson, 1966; Quintero-Moreno, 2003).

La hinchazón osmótica está asociada con el enrollamiento de la cola del espermatozoide, que se desdobra cuando la célula se devuelve a un medio isosmótico. Dentro de las pruebas desarrolladas a partir de este fenómeno destacan dos: El test de endósmosis celular y el test de resistencia osmótica.

2.5.2.3.1. Prueba de Endósmosis Celular (*Hypoosmotic Swelling Test*, HOST)

Evalúa el hinchamiento y enrollamiento que se produce en el flagelo de las células con una membrana íntegra, en un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, a consecuencia de la entrada y acumulación de agua. Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe de estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. Las células con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentarán cambios en la forma del flagelo (Pérez-Llano *et al.*, 1999). Los valores obtenidos en esta prueba se correlacionan con otros parámetros de calidad seminal, como la movilidad, la viabilidad o la

morfología. Esta prueba se ha aplicado en el semen del hombre (Zaneveld and Jeyendran, 1990), del toro (Correa and Zavos, 1994; Correa *et al.*, 1997), del perro (Kumi-Diaka, 1993), del caballo (Von Buiten *et al.*, 1989) y del cerdo (Vázquez *et al.*, 1997b). Es 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 en porcino, se ha diseñado una variante corta de la prueba que lo reduce a 5 minutos (Pérez-Llano *et al.*, 2001).

Cuando se comparan los resultados de este análisis y los obtenidos en la evaluación estructural del plasmalema, estos se encuentran correlacionados, pero no son coincidentes (Jeyendran *et al.*, 1984; Vázquez *et al.*, 1997b; Pratap *et al.*, 2000). Esto se explicaría considerando que estas dos pruebas evalúan distintos aspectos, pudiendo ocurrir que una membrana estructuralmente íntegra sea incapaz de responder a un estrés hiposmótico, lo que revelaría en definitiva la pérdida de su actividad funcional (Jeyendran *et al.*, 1984).

Por otra parte, el hinchamiento de las células se puede provocar por otras vías distintas al descenso de la osmolaridad del medio que las rodea. Soluciones isosmóticas de solutos polares, como el glicerol, pueden provocar el hinchamiento celular debido a la capacidad de estas sustancias para arrastrar agua cuando atraviesan la membrana celular, alterando así el equilibrio de las presiones osmóticas internas y externas (Hammerstedt *et al.*, 1990). De esta manera, las alteraciones celulares atribuidas al glicerol podrían estar más relacionadas con un shock osmótico que con la toxicidad química (Watson, 1979; Gao *et al.*, 1992). A pesar de todo ello, todavía no se conocen bien los mecanismos moleculares específicos que el espermatozoide utiliza para reaccionar frente a un medio hiposmótico.

2.5.2.3.2. Prueba De Resistencia Osmótica (*Osmotic Resistance Test*, ORT)

Está basada en el porcentaje de espermatozoides que presentan una alteración estructural evidente en el acrosoma tras su incubación, como en la prueba anterior, en un medio hiposmótico (Schilling *et al.*, 1984, 1986; Correa and Zavos, 1994; 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).

Con esta prueba han sido estimadas tanto la capacidad fecundante (Schilling *et al.*, 1986), como la habilidad para la conservación de un eyaculado (Schilling *et al.*, 1984, 1986), permitiendo analizar el potencial reproductivo de los machos. Como para el HOST, se ha desarrollado una variante con un periodo de incubación de solo 5 minutos que facilita su uso en los centros de inseminación artificial (Pérez-Llano *et al.*, 1998).

La microscopía electrónica de transmisión o de barrido también se ha empleado para determinar aspectos de la integridad. Sin embargo, la mayor parte de estas técnicas aportan solo información estructural parcial, y suelen ser tediosas y costosas. Además, los resultados no siempre están correlacionados con la fertilidad del semen, a menos que el daño que presenten los espermatozoides sea muy importante (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2001).

2.5.2.4. MORFOLOGÍA Y VIABILIDAD ESPERMÁTICA

Existe una correlación positiva entre defectos espermáticos e infertilidad, por lo que la evaluación de la morfología espermática es un factor determinante en la capacidad fecundante del semen (Barth, 2000).

Los espermatozoides son translúcidos y virtualmente invisibles al microscopio de luz directa, necesitando el uso de colorantes que provean de un fondo oscuro para visualizarlos (Barth, 2000). Las técnicas de tinción en un solo paso son las más utilizadas, y entre estos colorantes están la tinta china, el rosa bengala y la eosina-nigrosina (EN) siendo esta última la más usada, concediendo al frotis un fondo oscuro con la nigrosina y tiñendo de rosa los espermatozoides muertos o con daños en la membrana, dejando a los vivos y sanos de color blanco; por eso también se le denomina tinción vital. Por lo que se refiere a las tinciones dobles (Giemsa, William y Papanicolau) lo que buscan es visualizar partes específicas del espermatozoide (García-Artiga *et al.*, 1994)

Para la preparación de la extensión con EN se coloca una gota de 5–6 mm de diámetro de la tinción en un extremo de un portaobjetos tibio. A continuación se añade una gota de semen de 3-5 mm de diámetro cerca de la tintura, y se mezclan. Se realiza la extensión con la ayuda de otro portaobjeto limpio y seco. Se deja secar y se evalúa con un objetivo de inmersión de 100x, ya que aumentos menores no permitirían observar la mayoría de los defectos que existen (Barth, 2000). Cuando hay pocas anomalías es

suficiente contar 100 espermatozoides, pero cuando encontramos gran cantidad de ellas es recomendable contar 300 o más (Barth, 2000).

Las tinciones fluorescentes, empleadas actualmente, presentan una mejor precisión cuando estudiamos la integridad de la membrana espermática (Magistrini *et al.*, 1997). Los más usados son el diacetato de carboxifluoresceína y el yoduro de propidio, visualizando los espermatozoides funcionales de color verde frente a los espermatozoides muertos que se observan de color naranja.

Las anomalías pueden ser causa de una espermatogénesis o espermiogénesis defectuosas hereditaria, enfermedades, estrés, reposo sexual prolongado y mal manejo del semen. De todas formas, la mayoría de los machos presentan algunos defectos de conformación (Barth *et al.*, 2000).

Barth *y col.* (2000) señalaron, igualmente, que los espermatozoides morfológicamente anormales son categorizados por la porción de célula afectada y/o el tipo de origen. Las anomalías según este criterio se clasifican en primarias y secundarias. Se consideran anomalías primarias, aquellas que ocurren o tienen su origen durante la espermiogénesis dentro del testículo, mientras que las anomalías secundarias, se originan dentro del epidídimo o en el laboratorio, clasificándose de la siguiente manera:

1) Anomalías primarias:

- Anomalías de la cabeza (cabezas gigantes, pequeñas, periformes, cónicas y estrechas, anormales desprendidas, formas teratóides; Defectos de acrosoma; vacuolas nucleares -defecto cráter/diadema-; Condensación anormal del ADN).
- Anomalías del cuello (unión del cuello fuera del eje -descentrado-, cuello doble, en espiral, deshilachado, granular o hinchado).
- Anomalías de la cola (cola corta -defecto de la cola en muñón-, accesorias o múltiples; pieza media doblada, hinchada, abaxial, incompleta, aplasia segmentaria y defectos de la vaina mitocondrial, gota citoplasmática proximal, defecto Dag)

2) Anomalías secundarias:

- Anomalías de la cabeza (cabezas normales desprendidas).

- Anormalidades de la cola (pieza media distal doblada; pieza principal doblada; gota citoplasmática proximal y distal).
- Otras células (células epiteliales; eritrocitos; formaciones de medusa; células precursoras de esperma; células redondas; glóbulos blancos)

2.5.2.5. INTEGRIDAD DEL ACROSOMA

En un espermatozoide con acrosoma en perfectas condiciones, se pueden distinguir tres regiones claramente diferenciadas en su cabeza: la zona acrosomal, con su borde apical, la zona postacrosomal y, entre ambas, el segmento ecuatorial. El acrosoma posee un rol fundamental en la fecundación, su integridad es fundamental para que el espermatozoide sea capaz de unirse de forma efectiva al ovocito (Yanagimachi, 1994), y así las muestras seminales con alta proporción de acrosomas alterados, o ausentes, tienen baja fertilidad (Woelders, 1990). Sin embargo, es fundamental que el espermatozoide tenga la capacidad de sufrir la reacción acrosómica cuando se encuentre en las proximidades del ovocito, permitiendo la penetración en la zona pelúcida (ZP) (Colenbrander *et al.*, 2003). Por tanto, el estudio de la integridad acrosomal lo podemos enfocar desde dos puntos de vista diferentes, evaluando el porcentaje de espermatozoides que presentan daño en su acrosoma o evaluando la capacidad para sufrir la reacción acrosómica.

Para una mejor visualización del acrosoma podemos usar diferentes técnicas de tinción. Entre éstas tenemos la tinción de Giemsa (Watson, 1975), la eosina fast green (Wells and Awa, 1970), la EN (Bamba, 1988), las dobles y triples tinciones basadas en la combinación de azul tripán con otros colorantes (Talbot and Chacon, 1981) y tinciones comerciales como el Spermac[®] (Oettlé, 1986). Sin embargo, la manera más rápida y simple de determinar el estado del acrosoma, en aquellas especies donde el espermatozoide es lo suficientemente grande como para permitirlo, es fijar la muestra en una solución de glutaraldehído y visualizar seguidamente de forma directa la estructura acrosomal en un microscopio con contraste de fase. Con este sistema distinguimos un borde apical nítido que se corresponde con el acrosoma, así como las posibles alteraciones del mismo.

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. El yoduro de propidio junto con las lectinas, permiten estudiar el proceso de reacción acrosómica. Estas últimas se han utilizado debido a su capacidad de adherirse a las glicoproteínas específicas del acrosoma, permitiendo así un adecuado estudio de su funcionalidad (Cross and Meizel, 1989). Estas técnicas han sido validadas para semen equino (Farlin *et al.*, 1992; Maxwell and Johnson, 1997) y de verraco (Vázquez *et al.*, 1996).

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 (Blach *et al.*, 1988).

2.5.2.6. EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ADN

La función principal del espermatozoide es la del transporte del material genético hasta el ovocito. Si un espermatozoide posee alteraciones en su material genético, aunque sea perfectamente capaz de fecundar, el embrión resultante sufrirá un proceso de apoptosis, cuando se encuentre en estado de 4 a 8 células (Bordignon and Smith, 1999; Graham, 2001; Fatehi *et al.*, 2002). Por lo tanto, el estudio de este parámetro representa un instrumento de gran importancia en la predicción de la fertilidad (Evenson *et al.*, 2002).

La alteración de la cromatina espermática puede ocurrir durante la espermatogénesis (estrés, mutaciones de genes, anomalías cromosómicas, etc.), por una degeneración apoptótica anormal (la apoptosis regula la producción y proliferación de las células germinales y suele traducirse en roturas de la doble cadena de ADN) o por estrés oxidativo (causado por la presencia de alta proporción de especies reactivas del oxígeno) (Evenson *et al.*, 2002).

En la maduración de la cromatina espermática durante el tránsito por el epidídimo, existen diferentes puntos críticos según la especie animal (de cuerpo a cola en la especie ovina y de cabeza a cuerpo en el ciervo rojo y en el perro). A pesar de esto, tanto las muestras procedente de la cola del epidídimo como las de eyaculado, presenta un alto grado de condensación (García-Macías *et al.*, 2006).

Entre las técnicas empleadas para el estudio de las alteraciones en la cromatina espermática destacan el COMET assay (Single Cell Electrophoresis Assay), la técnica TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated Nick End Labeling), el NT

(*In situ* Nick Translation), pero en la actualidad la SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) y la SCD (Sperm Chromatin Dispersión) son dos de las técnicas más empleadas.

La SCSA se basa en las propiedades metacromáticas del naranja de acridina (NA), que emite fluorescencia verde si se une al ADN bicatenario y roja si se une al ADN monocatenario (Evenson *et al.*, 1980; Graham, 2001). Esta técnica ha sido utilizada frecuentemente, 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). Los resultados de esta técnica se correlacionan escasamente con los de otras utilizadas rutinariamente en la determinación de la calidad seminal, por lo que proporciona un criterio extra para la evaluación de la infertilidad. La ventaja fundamental, frente a otras pruebas, es la utilización de la citometría de flujo, cuyo uso permite rapidez en la lectura de muestras (10.000 células por muestra, en aproximadamente dos minutos), automatización y objetividad en la interpretación de los resultados.

La SCD es un método más rápido y sencillo que los anteriores. La técnica consiste en la fijación de las células espermáticas en un gel de agarosa induciéndose la lisis de las proteínas nucleares (Enciso *et al.*, 2006). Esto permite la difusión de los fragmentos de ADN, definiéndose halos de ADN alrededor de la cabeza espermática, cuyo tamaño indica el grado de fragmentación de ADN (halos dispersos de gran tamaño indican alto grado de fragmentación de ADN). Recientemente, y derivado de la aplicación en la especie humana del test SCD, se han desarrollado y aplicado pruebas de determinación de la fragmentación del ADN en cerdo (Sperm-Sus-Halomax, ChromaCell SL) y toro (Sperm-Bos-Halomax, ChromaCell SL), presentando una alta correlación con la fertilidad (García-Macías *et al.*, 2007).

2.6. FECUNDACIÓN *IN VITRO*

La fecundación *in vitro* (FIV) es una técnica de reproducción asistida que en los últimos años ha experimentado grandes e importantes avances. Consiste en fecundar artificialmente, en un laboratorio, ovocitos maduros con espermatozoides capacitados y, en las condiciones adecuadas, continuar el desarrollo de los embriones resultantes.

En veterinaria es una herramienta muy útil para mejorar la producción y preservación de las razas. Representa una práctica de gran importancia en los esquemas de selección genética, ya que a diferencia de la técnica de Inseminación Artificial (IA), permite combinar el factor macho y el factor hembra, aumentando la intensidad de selección y el progreso genético. Es una técnica de gran importancia para evitar la desaparición de especies en peligro de extinción, aumentando la variabilidad genética para la formación de Bancos de Recursos Biológicos, por ejemplo, mejorando la eficiencia del uso de espermatozoides con respecto a la IA. También es una fuente de investigación embriológica, genética, de cultivos celulares, de células madre, de técnicas de congelación, vitrificación, etc. Además, es un paso previo a otras biotecnologías como la inyección espermática intracitoplasmática (ICSI), en la cual se pueden usar espermatozoides muertos, siempre y cuando su ADN no esté dañado. En este sentido, en muestras obtenidas de epidídimos con demasiado tiempo de conservación hasta su colección y procesado, se ha comprobado que ésta es la parte más estable del espermatozoide.

La producción de embriones bovinos *in vitro*, como instrumento de mejora genética, está condicionada por la obtención de ovocitos a partir de hembras de alto valor genético. Para ello, la extracción de los ovocitos se puede realizar tanto *in vivo*, mediante una punción transvaginal guiada por ecografía (OPU, *Ovum Pick Up*), aspirando el líquido folicular que contiene los ovocitos, como también después de la muerte accidental o programada del animal, recuperando lo antes posible sus ovarios para extraerles los ovocitos. Otro punto interesante de la FIV, es que se puede obtener descendencia aún después de la muerte de ambos progenitores.

El trasplante posterior de estos embriones obtenidos *in vitro* a otras hembras, aceleraría la transmisión de caracteres económicamente importantes para lograr una mayor producción y variabilidad genética en las ganaderías. Otra opción factible sería congelar los embriones producidos para utilizarlos en otro momento más oportuno. Así se puede crear un banco de germoplasma de ovocitos, de espermatozoides (de eyaculado o de epidídimo) y de embriones.

2.6.1. PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO*

En un sistema de producción de embriones *in vitro*, se establecen las siguientes etapas:

- Obtención y selección de los complejos *cumulus*-ovocito (CCOs);
- Maduración de los CCOs;
- Selección, preparación espermática y fecundación;
- Cultivo de embriones.

2.6.1.1. OBTENCIÓN Y SELECCIÓN DE LOS COMPLEJOS *CUMULUS*-OVOCITO

La morfología del ovocito y los porcentajes de maduración, penetración y fecundación, así como el desarrollo embrionario posterior, dependen del tamaño de los folículos de procedencia (Tan *et al.*, 1988; Galli and Moor, 1991; Arlotto *et al.*, 1996). Así, se ha demostrado que el tamaño del folículo influye en la extensión, número de capas y aspecto del *cumulus*, pero no en las conexiones intracelulares del *cumulus oophorus*, viabilidad de las células del *cumulus* ni tampoco en el ovocito, presencia y distribución de los lípidos, gránulos corticales, mitocondrias, vesículas de membrana, complejo de Golgi, retículo endoplasmático liso, etc. (Fernández, 2000).

A la hora de establecer el diámetro folicular más adecuado para obtener porcentajes óptimos de desarrollo embrionario, existen diferencias según los autores: De 1 a 8 mm, (Yang *et al.*, 1998), o de 6 a 12 mm (Hendriksen *et al.*, 2000; Iwata *et al.*, 2004; Lequarre *et al.*, 2005). Las desigualdades parecen deberse a los diferentes grados de premaduración (estado en la progresión de la maduración nuclear) de los ovocitos.

En ovarios procedentes de matadero, aunque la disección folicular (Kruip and Dieleman, 1982; McNatty *et al.*, 1984; Staigmiller and Moor, 1984), la maceración (Carolan *et al.*, 1993, 1994) y la digestión (Gordon, 1994; Arlotto *et al.*, 1996) permiten obtener rendimientos muy altos, el método más empleado para la recuperación de los ovocitos es la aspiración del líquido folicular utilizando una aguja unida a una jeringa (Leibfried and First, 1979; Xu and Greve, 1988) o a una bomba de vacío (Hashimoto *et al.*, 1999; Ward *et al.*, 2000). Es un método rápido, factor importante si se persigue la producción de grandes cantidades de embriones. Sin embargo, su principal inconveniente reside en su “reducido rendimiento”, ya que sólo se recuperan ovocitos del 50-60% de los folículos aspirados (Katska, 1984), pero los CCOs obtenidos tienen una alta capacidad de desarrollo.

La obtención de ovocitos a partir de animales vivos por punción transvaginal guiada por ecografía (OPU), fue descrita por Pieterse y *col.* (1988, 1991). La relativa facilidad para la aplicación de dicha técnica en hembras bovinas, así como el número de complejos *cumulus*-ovocito recuperados, su calidad y capacidad de desarrollo, han hecho de ella el método de elección frente a la laparoscopia, que presenta un riesgo mayor de ocasionar daños en vasos sanguíneos y producir hemorragias, dificultando la luteinización posterior (Reichenbach *et al.*, 1994; Santl *et al.*, 1998). Hidalgo (2005), tras la maduración de los ovocitos obtenidos por OPU, fecundados y cultivados *in vitro*, obtuvo blastocistos que fueron trasplantados a receptoras, logrando gestaciones a término.

La evaluación de los complejos *cumulus*-ovocito bovinos, previa a su puesta en maduración *in vitro* (MIV), está basada en sus características morfológicas, lo que supone un elevado grado de subjetividad. En este sentido, algunos autores (Blondin and Sirard, 1994; Vassena *et al.*, 2003) comprobaron que ovocitos morfológicamente idénticos pueden no tener el mismo grado de competencia (capacidad de un ovocito para desarrollarse *in vitro* hasta el estadio de blastocisto).

La morfología del complejo *cumulus*-ovocito ha dado lugar a la definición de diversos criterios de clasificación, basados principalmente en el número de capas de células de la granulosa que rodean al ovocito, su grado de compactación y la homogeneidad del citoplasma del ovocito (Younis *et al.*, 1989; de Loos *et al.*, 1989, 1991; Lohuis, 1995; Leroy *et al.*, 2005). Los complejos rodeados por más de tres capas de células del *cumulus* se desarrollarán a blastocistos expandidos con mayor frecuencia que los de menor número de capas (Blondin and Sirard, 1995). La importancia de las células del *cumulus* se explicaría porque proveen de nutrientes al ovocito durante su crecimiento, contribuyen a la formación de la zona pelúcida y porque, después de la ola preovulatoria de LH, sintetizan una matriz compuesta de proteínas y ácido hialurónico que contribuye a crear un microambiente esencial para la capacitación espermática y la fecundación (Tanghe *et al.*, 2004; Luciano *et al.*, 2005).

La clasificación de los complejos *cumulus*-ovocito realizada por Hazeleger y *col.* (1995), en la cual tiene en cuenta el tamaño del ovocito, puede considerarse como la más completa al incluir nueve categorías para la especie bovina, que se explicarían por

el estado de crecimiento o grado de degeneración de los complejos relacionado directamente con el crecimiento y la atresia folicular (Tabla 2.1).

Según estos autores los mayores porcentajes de blastocistos se alcanzan con las calidades englobadas en los grupos 1, 2 y 3. Sólo los complejos cuyas características corresponden a las del grupo 1, no presentan ningún signo de degeneración. Los complejos *cumulus*-ovocito de los tipos 2 y 3 muestran una ligera atresia (*cumulus* expandido o ausencia del mismo, y con un citoplasma desigual) que se hace más notable en los tipos 4, 6, 7 y 8. Los complejos *cumulus*-ovocito de calidad 5 no habrían alcanzado la competencia citoplasmática para un desarrollo normal *in vitro*, y los del grupo 9 no habrían finalizado su fase de crecimiento y serían incapaces de completar la primera división meiótica.

Tabla 2.1. Tipos de complejos *cumulus*-ovocito atendiendo a sus características morfológicas (Hazeleger *et al.*, 1995).

Grupo	Criterios de Clasificación
1	<i>Cumulus</i> compacto y completo rodeando al ovocito. Citoplasma del ovocito homogéneo, de color marrón claro y con una fina granulación. Diámetro del ovocito >120 μm .
2	<i>Cumulus</i> compacto y completo rodeando al ovocito. Citoplasma del ovocito ligeramente más basto, con un color marrón claro y con una zona periférica oscura. Diámetro del ovocito >120 μm .
3	<i>Cumulus</i> completo comenzando a expandirse en su borde exterior. Citoplasma de color marrón claro pero con numerosas zonas oscuras. Diámetro del ovocito >120 μm .
4	<i>Cumulus</i> expandido irregularmente, con células degeneradas inmersas en una matriz gelatinosa. Diámetro del ovocito >120 μm .
5	Idéntico al Grupo 1, pero tanto el citoplasma como el <i>cumulus</i> presentan un color pálido. Diámetro del ovocito >120 μm .
6	Las células de la corona quedan expuestas. El citoplasma presenta características variables. Diámetro del ovocito >120 μm .
7	<i>Cumulus</i> compacto y completo. El citoplasma del ovocito presenta un color negro homogéneo. Diámetro del ovocito >120 μm .
8	Ovocito desnudo, con la zona pelúcida expuesta. El citoplasma del ovocito presenta características variables. Diámetro del ovocito >120 μm .
9	Similar al Grupo 1, pero el diámetro del ovocito <110 μm .

2.6.1.2. MADURACIÓN DE LOS COMPLEJOS *CUMULUS*-OVOCITO

Los fenómenos celulares que se producen durante la maduración del ovocito requieren una actividad metabólica, caracterizada por algunos fenómenos anabólicos

(síntesis de proteínas, síntesis de ácidos nucleicos, etc.) y por un alto consumo de energía, que se obtiene en la mayoría de los casos del metabolismo anaeróbico de la glucosa a piruvato (glucólisis) y/o del metabolismo oxidativo mitocondrial del piruvato, ácidos grasos y aminoácidos a través de la ruta de los ácidos tricarbónicos (Rieger, 1996).

Existen diversos medios comerciales, más o menos complejos, que se usan para elaborar los medios de maduración. El Tissue Culture Medium-199 (TCM-199), está compuesto por sales, tamponado en bicarbonato y suplementado con piruvato, lactato, aminoácidos y vitaminas (Lu *et al.*, 1987). Algunos autores defendieron su enriquecimiento con sustancias precursoras de la síntesis de glutatión, como cisteína y cisteamina, por su efecto antioxidante (Ali *et al.*, 2003; Donnay *et al.*, 2004).

Además, para la elaboración del medio de maduración se suelen incorporar hormonas (FSH, LH, 17 β -estradiol), que han demostrado favorecer el desarrollo embrionario (Schellander *et al.*, 1990).

La Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH) estimulan la expansión de las células del *cumulus* (Eyestone and Boer, 1993), facilitando la penetración del espermatozoides capacitado y ayudando a la formación de los pronúcleos (Sanbuissho and Threlfall, 1988). Actúan, así mismo, en el ámbito metabólico incrementando la disponibilidad de ATP para cubrir las necesidades energéticas del ovocito (Brackett and Zuelke, 1993).

El papel del 17 β -Estradiol es más discutido. Su adición a un medio que contenga gonadotropinas incrementó el porcentaje de fecundación, división y desarrollo embrionario (Saeki *et al.*, 1990). Sin embargo, en ausencia de gonadotropinas, una alta concentración de estradiol (10 μ g/ml) disminuyó el porcentaje de blastocistos.

También se ha comprobado que la presencia de factores proteicos en el medio de maduración, favoreció dicho proceso e incrementó la capacidad de desarrollo posterior del ovocito (Sanbuissho and Threlfall, 1988; Chanson *et al.*, 2001). Y en este sentido, la suplementación con suero fetal bovino (FCS) proporcionó mejores resultados que con albúmina sérica bovina (BSA) (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1986). El FCS también puede sustituirse por suero de vaca, preferentemente en celo o en proestro (Younis *et al.*, 1989), debido a que durante esos días contiene mayor nivel de

gonadotropinas y sustancias similares a los factores de crecimiento, esenciales para la maduración.

2.6.1.3. SELECCIÓN, PREPARACIÓN ESPERMÁTICA Y FECUNDACIÓN

En la mayoría de las especies, los espermatozoides son incapaces de penetrar inmediatamente en el ovocito. Durante el tiempo en que se encuentran en el útero y en el oviducto desarrollan su capacidad para fecundar, de ahí el nombre de capacitación (Furuya *et al.*, 1992).

En los protocolos de FIV, los espermatozoides deben constituir una población homogénea, con buena movilidad, viabilidad y unas características morfológicas adecuadas que aseguren una elevada capacidad fecundante. Para ello es importante separar los espermatozoides viables del resto del plasma -en caso de esperma de eyaculado- (Parrish, 1991), de células contaminantes -muy importante en las muestras de esperma epididimario, ya que por el método de recuperación espermática arrastra también células del epidídimo-, bacterias, virus, y también del diluyente (Zavos, 1992).

Estudios en humanos comprobaron que los métodos de selección espermática eliminan los virus (HIV-1 y virus de la Hepatitis C -VHC-) a niveles imperceptibles (Hanabusa *et al.*, 2000; Pasquier *et al.*, 2000), atribuyéndoles por este motivo un papel muy importante.

Además, los procedimientos de separación de los espermatozoides son capaces de mejorar significativamente la calidad del esperma, mejorando la movilidad progresiva y la morfología normal.

Los métodos que se han empleado para ello son muy diversos y se basan, bien en principios de migración/sedimentación, o bien de lavado/centrifugación.

Las técnicas más empleadas son:

- “Swim-up”: fundamentada en el principio de migración/sedimentación, en el que los espermatozoides nadan en contra de la gravedad, de forma que aquellos que presentasen movimientos más rápidos y rectilíneos lo harían con mayor eficacia. De esta forma el porcentaje de espermatozoides móviles en la superficie del medio sería mayor que en la muestra de origen.

- Separación por gradiente: utiliza el principio de lavado/centrifugación, basándose en la diferencia de densidad de los espermatozoides según su calidad y

movilidad. La centrifugación durante un tiempo y a unas r.p.m. específicas, en un gradiente discontinuo (45% sobre 90%), permitiría obtener un número óptimo de espermatozoides móviles. La mayoría de los espermatozoides inmóviles quedarían en la interfase de los dos gradientes, mientras que los móviles la atravesarían y se encontrarían como sedimento en el fondo del gradiente (Parrish *et al.*, 1995).

El método de gradiente de densidad, de fácil realización, proporciona un pelotón final con un mayor número de espermatozoides móviles que con el de “swim-up”, entre ellos anormales y muertos, ya que este método no selecciona los espermatozoides (Risopatrón *et al.*, 1996). El “swim-up” consigue una mejor separación de los espermatozoides del plasma seminal, mayor movilidad y capacidad de penetración, obteniendo además un mayor porcentaje de división embrionaria (Parrish *et al.*, 1995; Mehmood *et al.*, 2009). Este método selecciona menor cantidad de espermatozoides, siendo un porcentaje bajo de la población inicial de esperma en bovinos (Parrish *et al.*, 1995; Risopatrón *et al.*, 1996), búfalos (Mehmood *et al.*, 2009) y humanos (Englert *et al.*, 1992).

La tasa de división después de la FIV es el mejor parámetro para expresar la fecundidad y validar la viabilidad espermática (Ward *et al.*, 2003). Se ha demostrado, que espermatozoides bovinos separados por “swim-up” penetran significativamente mayor número de ovocitos, comparado con los seleccionados mediante gradiente de Percoll[®] (Parrish *et al.*, 1995). Esto podría deberse a la movilidad significativamente mayor que se observa en los espermatozoides separados por el primer método (“swim-up”). Sin embargo, los autores informaron que el problema de la baja penetración que presenta el gradiente de Percoll[®], podría superarse aumentando la concentración de 1 millón a 5 millones de espermatozoides/ml.

En la actualidad existen varios estudios que comparan estas dos técnicas de selección espermáticas en eyaculados de diferentes especies animales (Englert *et al.*, 1992; Parrish *et al.*, 1995; Risopatrón *et al.*, 1996; Mehmood *et al.*, 2009), pero nosotros no hemos encontrado trabajos publicados que las enfrenten con esperma de epidídimo. Este estudio sería fundamental para conocer cuál sería el método más adecuado para seleccionar el esperma epididimario bovino y obtener los mejores resultados en protocolos de FIV.

Parrish *y col.* (1995) concluyeron que el desarrollo a mórula/blastocisto es similar para ambas técnicas. En el trabajo realizado en nuestro laboratorio (De la Varga, 2005), la técnica de “swim-up” permitió obtener los porcentajes más altos de división embrionaria ($p < 0,05$) y mejorar significativamente los porcentajes de expansión y eclosión de blastocistos.

Ante el problema de toxicidad que presentaron algunos lotes de Percoll[®], se ha eliminado de las técnicas de reproducción asistida en medicina humana (Chen and Bongso, 1999) y en el resto de las especies. También Mendes *y col.* (2003), obtuvieron que la composición variaba entre diferentes lotes de Percoll[®], pudiendo afectar a los porcentajes de división y de desarrollo embrionario. Esto llevó a los laboratorios a producir nuevos productos, formulados específicamente para la separación y purificación del semen, entre ellos el BoviPure[®] (Nidacon), disponible para su utilización con el esperma de toro.

Estudios anteriores compararon la eficacia de Puresperm[®] -de composición y protocolo similar al del BoviPure[®]- con el gradiente de Percoll[®] (Centola *et al.*, 1998). Por otro lado, Samardzija *y col.* (2006) evaluaron los gradientes BoviPure[®] y el de Percoll[®]. En ambos casos los autores concluyeron que no había ninguna diferencia entre los gradientes estudiados, llegando a la conclusión de que los gradientes de densidad con PureSperm[®] o con BoviPure[®] son tan eficaces como con Percoll[®] para la recuperación de espermatozoides con una buena movilidad, viabilidad e integridad acrosomal.

En relación al escaso número de espermatozoides móviles obtenidos, respecto a la población inicial, por ambos métodos de selección, es necesario considerar los diferentes procesos a los que se somete al esperma. La conservación del esperma tiene un efecto negativo en las funciones de los espermatozoides y en su capacidad de fecundación (Watson *et al.*, 1992). Los espermatozoides congelados-descongelados pueden presentar alteraciones de su membrana debido al proceso de congelación, al almacenamiento y a los procedimientos de descongelación (Graham, 1978; Grondahl, *et al.*, 1994; Correa and Zavos, 1994).

El método de migración-sedimentación selecciona un alto porcentaje de espermatozoides viables, con acrosoma intacto en comparación con el método de lavado-centrifugación (Risopatrón *et al.*, 1996). Esto confirma que la centrifugación de

los gametos es mala para ellos, especialmente en el caso del espermatozoides descongelado (Sánchez *et al.*, 1991).

También se ha demostrado que la disminución de la movilidad y la capacidad de fecundación después del almacenamiento a bajas temperaturas están relacionadas con un daño estructural (Blach *et al.*, 1989; Watson *et al.*, 1992). En los espermatozoides de los mamíferos es muy importante analizar el estado del acrosoma y la morfología de los espermatozoides porque está directamente relacionado con la capacidad de fecundación (Henkel *et al.*, 1993). Únicamente los espermatozoides con membranas intactas podrían llegar a capacitarse, experimentar la reacción acrosómica y fecundar (Yanagimachi, 1989; Watson *et al.*, 1992).

Para reproducir *in vitro* los cambios que se producen en la capacitación *in vivo*, se han utilizado diferentes sustancias como la cafeína (Shioya *et al.*, 1988; Greve and Madison, 1991; Cox *et al.*, 1995; Momozawa and Fukuda, 2003), cafeína junto con la heparina (Niwa and Ohgoda, 1988; Numabe *et al.*, 2001) y el calcio ionóforo A23187 (Aoyagi *et al.*, 1990).

La heparina es un agente capacitante fisiológico que se encuentra en las vías genitales de las hembras después de la ovulación, lo que explica que también se haya utilizado líquido oviductal para inducir *in vitro* estos cambios (First and Parrish, 1987). Ésta se une y desplaza ciertas proteínas de la superficie espermática, estimulando el proceso de capacitación.

El espermatozoides congelado-descongelado, usado frecuentemente en FIV, sufre modificaciones en la membrana durante su procesamiento, lo que hace que necesite menores tiempos de incubación o tratamiento con heparina que el espermatozoides fresco (Parrish *et al.*, 1984; Wheeler and Seidel, 1986).

En una población de espermatozoides sometida a un tratamiento de capacitación se ignora el porcentaje de los que, realmente, son capacitados. Esto conduce a fecundar los ovocitos con un número incomparablemente más elevado de espermatozoides que lo que ocurre *in vivo*, y como consecuencia, el porcentaje de poliespermia es superior (en rumiantes del 10-20% y en porcino del 50%) al observado *in vivo*.

Una de las condiciones esenciales de todo medio de fecundación es que debe permitir la viabilidad tanto del espermatozoides como del ovocito. El medio más utilizado, en

los protocolos de FIV, es un medio Tyrode suplementado con BSA, lactato y piruvato (medio TALP; Lu *et al.*, 1987).

La presencia de células rodeando al ovocito en el momento de la penetración es un hecho diferencial del proceso de fecundación *in vitro*. Las células del *cumulus* interaccionan con el ovocito y/o con el espermatozoide para promover la fecundación (Van Soom *et al.*, 2002). Se comprobó que la eliminación de las células del *cumulus* de ovocitos madurados *in vitro* antes de la fecundación, afectaba negativamente a los porcentajes de división debido posiblemente a la pérdida de algún factor secretado por ellas, como podría ser la progesterona (Fatehi *et al.*, 2002).

Otro factor importante a considerar en los protocolos de FIV, es el período de coincubación de los ovocitos y los espermatozoides. First y Parrish (1987) recomendaron tiempos comprendidos entre 18 a 24 horas para la especie bovina y caprina aunque Dode y *col.* (2002) no obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de penetración cuando los ovocitos se coincubaron 12 o 18 horas. Ward y *col.* (2002) señalaron que 10 horas de coincubación espermatozoides-ovocitos era suficiente para asegurar la máxima producción de blastocistos y Kochhar y *col.* (2003) demostraron que una corta coincubación (6 horas) de los gametos proporcionaba un mayor porcentaje de ovocitos divididos que se desarrollaban a blastocistos, e incluso comprobaron que el sex-ratio quedaba sesgado a favor de los machos debido, posiblemente, a la superioridad de los espermatozoides que portaban el cromosoma Y en el momento de la fecundación *in vitro*. Las discrepancias entre estos trabajos realizados, podrían atribuirse al efecto del toro y a los diferentes procesos empleados en la preparación de los espermatozoides.

Durante la fecundación *in vitro*, bien con espermatozoides frescos o congelados-descongelados, se han estudiado diversas condiciones de coincubación, tales como el volumen del medio de fecundación (Gil *et al.*, 2003), la relación esperma:ovocito (Rath, 1992) y la concentración de espermatozoides a utilizar (Lu and Seidel, 2004).

2.6.1.4. CONDICIONES PARA EL CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIONES

El cultivo de embriones de mamíferos domésticos aún plantea numerosas dificultades, ya que sólo un pequeño número se dividen regularmente hasta el estadio de blastocisto, e incluso esta minoría fracasa en su desarrollo cuando se trasfiere a una

hembra. Así, los intentos de cultivar embriones han enfocado los trabajos hacia el estudio de parámetros biofísicos, selección de medios y de aditivos, y estadio de desarrollo de dichos embriones.

La fusión del ovocito y el espermatozoide en mamíferos da inicio al desarrollo embrionario. Si no se produce la fecundación, el ovocito suele degenerar en torno a las 24 horas después de la ovulación (Sadler, 2001).

En la primera fase, conocida con el nombre de “escisión” (Bazer *et al.*, 1996), tiene lugar una serie de divisiones mitóticas, espaciadas en intervalos de aproximadamente 12 horas que producen un aumento del número de células llamadas blastómeros y cuyo tamaño es cada vez menor (Sadler, 2001). En los mamíferos, estas divisiones tempranas tienen lugar mientras el embrión está en el oviducto donde fue fecundado y se mantiene en el interior de la zona pelúcida (Burdsal, 1999).

En embriones bovinos, producidos *in vitro*, los intervalos de tiempo entre las divisiones son variables y decrecen a medida que avanza el desarrollo embrionario. La primera división tiene lugar entre las 24-30 horas (Neuber *et al.*, 2002) mientras que la tercera se produce en un intervalo de aproximadamente 9-12 horas con relación a la segunda (Holm *et al.*, 1998; Neuber *et al.*, 2002).

Las divisiones celulares que siguen al estadio de dos células son asincrónicas, lo que significa que los blastómeros del embrión en el estadio de 2-células no se dividen al mismo tiempo. Esta asincronía da lugar frecuentemente a la formación de embriones en el estadio de 3-células, y es frecuente observar embriones con un número impar de blastómeros (Burdsal, 1999).

En el embrión de 8-células, los blastómeros sufren una cuarta división embrionaria y se forma el embrión de 16-células, también llamado mórula (Sadler, 2001). En este estadio se diferencian dos tipos celulares distintos, un pequeño grupo de células internas y un gran número de células aplanadas externas, que se han formado por compactación (Burdsal, 1999).

Mientras que en muchos organismos no mamíferos las primeras divisiones embrionarias están controladas por factores maternos (RNAm y proteínas) hasta que el embrión tiene de cientos a miles de células, en embriones bovinos este cambio ocurre en la cuarta división, coincidiendo con un bloqueo del desarrollo *in vitro* (King *et al.*, 1988). Este bloqueo, que al inicio del desarrollo de la tecnología *in vitro* supuso un

obstáculo muy importante para el avance de estas técnicas, se ha superado con el empleo de diferentes sistemas de cultivo, pero en su momento hizo sospechar de la existencia de factores oviductales que ayudarían al desarrollo embrionario temprano y que deberían estar presentes en los medios de cultivo (Eyestone and First, 1986; First and Parrish, 1987).

Entre el estadio de 32 a 64 células se alcanza una fase única en el desarrollo embrionario mamífero, el blastocisto.

La diferenciación del blastocisto se inicia cuando la capa epitelial externa del embrión, que a partir de este momento se llamará trofoblasto o trofoectodermo (TE), comienza a transportar líquido desde el exterior hasta el interior del embrión, lo que produce un gradiente de solutos, por transporte activo de iones (Na^+/K^+ ATPasa), generando una cavidad llena de líquido llamada blastocele. Durante esta cavitación, las células resultantes de la división de las células internas de la mórula permanecen separadas del trofoblasto, asumiendo una posición en la pared interna del blastocele, constituyendo la Masa Celular Interna (MCI).

La MCI dará lugar a células pertenecientes a las tres hojas embrionarias (ectodermo, endodermo y mesodermo) que originarán el embrión, mientras que el trofoectodermo es un tejido diferenciado que contribuirá solo a la formación de estructuras extraembrionarias como la placenta y el corión.

El paso final del desarrollo preimplantacional de mamíferos placentarios, es la eclosión del blastocisto, aproximadamente el día 9 postfecundación. La zona pelúcida ya no es necesaria y el blastocisto empieza a segregar enzimas proteolíticas que la debilitan (Burdal, 1999). Esta actividad enzimática, junto con la presión ejercida por la expansión y contracción del embrión, provocan la ruptura de la zona pelúcida.

La producción de embriones bovinos *in vitro* precisa que tanto los sistemas de cultivo, como sus componentes, estén libres de agentes patógenos que puedan ocasionar enfermedades específicas, a la vez que sean soporte de una elevada producción de los mismos, permitiendo obtener resultados repetitivos (Holm *et al.*, 1999).

Los sistemas de cultivo se dividen esencialmente en dos grandes grupos: aquellos que se sustentan en cocultivos y los que no se realizan con apoyo celular.

Los sistemas de cocultivo se basan en la interacción entre las células somáticas, el medio y los embriones, de forma que el desarrollo embrionario *in vitro* sufre un

empuje fundamental a través de la contribución de dichas células (Mermillod *et al.*, 1993). Estos sistemas con apoyo celular, segregan factores embriotróficos positivos (factores de crecimiento), modificando la concentración de los constituyentes del medio a niveles más apropiados para el desarrollo embrionario (Ward *et al.*, 2000). Además es posible que eliminen sustancias potencialmente peligrosas y dañinas para el embrión (radicales libres, metales pesados) (Avery *et al.*, 1998).

La utilización de cocultivos que empleaban células del tracto reproductivo (células oviductales y del epitelio uterino) permitió, al inicio de la tecnología *in vitro*, superar el bloqueo del desarrollo embrionario en la fase de 8- a 16-células. También se ha comprobado que el desarrollo embrionario es posible en presencia de líneas celulares utilizadas rutinariamente en laboratorios de cultivo celular, como las células BRL (procedentes de hígado de rata búfalo) o las células VERO (obtenidas del epitelio del riñón de mono).

Los sistemas de cultivo de embriones que no se apoyan en cocultivos, se basan en la utilización de medios en cuya composición se han incluido, entre otros, factores embriotróficos como el citrato (Keskinetepe *et al.*, 1995; Holm *et al.*, 1998), el mioinositol (Holm *et al.*, 1998) o factores de crecimiento (Lee and Fukui, 1995; Eckert and Niemann, 1996; Sirisathien *et al.*, 2003). En función de su composición se pueden clasificar en:

- Medios simples: donde se incluye, entre otros, el medio SOF (Synthetic Oviductal Fluid) y el medio HTF (Human Tubal Fluid).
- Medios complejos: diseñados para cultivar células somáticas, como por ejemplo el TCM-199 y el Ham's F10.

Los medios químicos permiten una mayor observación e identificación de los efectos que proporcionan, al propio medio, las diferentes sustancias que a él se pueden añadir. Por el contrario, con la utilización de cocultivos, la interacción entre el medio y las células somáticas enmascara la identidad de los componentes embriotróficos o el ambiente físico (Bavister, 1995).

En 1972, Tervit y *col.* lograron la producción de mórulas y blastocistos en un medio que denominaron SOF y en los años 90 algunos trabajos pusieron de manifiesto que este medio podía soportar el desarrollo embrionario igual (Pinyopummintr, 1990;

Pinyopummintr and Bavister, 1991, 1993) o mejor (Shamsuddin *et al.*, 1994) que los cocultivos celulares.

Comparando el cultivo de embriones en medio SOFaaci con el cocultivo con células VERO, De la Varga (2005) obtuvo un efecto beneficioso sobre el desarrollo embrionario, ya en día 3, con porcentajes similares de división embrionaria y significativamente más altos de embriones de 5- a 8-células y elevó ($p < 0,05$) las tasas de expansión y de eclosión de los blastocistos, empleando SOFaaci en el cultivo.

Thompson *y col.* (1991), observaron que los resultados totales de desarrollo embrionario mejoraban cuando el SOF se complementaba con suero fetal bovino. Este hecho sugirió a los autores mencionados que el suero puede contener factores de crecimiento responsables de este efecto.

El estudio realizado por Holm *y col.* (1999) demostró que, en un medio definido con aminoácidos (SOFaa) sin suero ni BSA, puede producirse desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto, corroborando trabajos anteriores (Eyestone *et al.*, 1985; Lonergan *et al.*, 1994).

Al suero se le ha atribuido un efecto bifásico, primero inhibiendo y luego estimulando el desarrollo embrionario (Bavister *et al.*, 1992; Pinyopummintr and Bavister, 1994). El suero contiene algún factor que bloquea el desarrollo de algunos embriones cuando se incluye, en el medio de cultivo, unas pocas horas antes de la primera división. Pero el suero también parece contener componentes beneficiosos para el desarrollo hasta la fase de blastocisto de los embriones bovinos. Esos componentes deben de estar disponibles antes o inmediatamente después de la fase de 8- a 16-células.

De la Varga (2005) también comprobó un efecto significativo del día de adición de FCS en el cultivo embrionario. La adición de suero a las 18 horas y a las 72 horas postfecundación determina, respectivamente, los resultados más bajos y más altos de desarrollo embrionario temprano en los diferentes estadios. En un estudio realizado por Álvarez (2010), se observó que el uso de FCS a las 72 horas postfecundación incrementó los porcentajes de blastocistos expandidos y de mitosis celular, reduciendo las tasas de apoptosis, pero también incrementó el índice de necrosis.

3. Objetivos

En este contexto y analizando diferentes parámetros de calidad seminal, el presente trabajo plantea los siguientes **objetivos**:

1. Determinar el impacto del tiempo *postmortem* de las muestras epididimales del toro de Lidia.
2. Analizar el efecto del medio de dilución del esperma epididimal, en relación al tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo.
3. Evaluar el efecto del método de selección espermática para FIV con esperma epididimario de toro de Lidia, en relación al tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo y al medio empleado para la dilución y elaboración de dosis congeladas-descongeladas.

4. Material y Métodos

4.1. MANIPULACIÓN DEL EPIDÍDIMO Y ANÁLISIS SEMINAL

4.1.1. RECOGIDA DE EPIDÍDIMOS Y TRANSPORTE

Los testículos de los toros, con sus respectivos escrotos, se recogieron en la plaza unos pocos minutos después del sacrificio. El escroto conteniendo los testículos y los epidídimos se transportó al laboratorio, en bolsas individualizadas e identificadas para cada toro. Se distribuyeron aleatoriamente los toros en tres grupos de diferentes tiempos de conservación. En el grupo control (R0) los epidídimos se procesaron a temperatura ambiente en las 2 horas siguientes a la muerte del animal, en un laboratorio móvil. En los otros dos grupos, las muestras se refrigeraron en una nevera portátil, con 2 congelantes por cada toro, hasta su llegada al laboratorio donde se almacenaron durante 24 (R24) y 48 (R48) horas respectivamente, en una cámara frigorífica a 4 °C, bajo condiciones controladas.

4.1.2. OBTENCIÓN Y CRIOCONSERVACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES DEL EPIDÍDIMO

Los testículos y los epidídimos se disecaron con bisturí, y el cordón espermático se cortó sistemáticamente por encima de la cabeza del epidídimo.

Las colas de los epidídimos se secaron con papel y se procedió a seccionar las venas superficiales con un bisturí, drenándolas, para evitar la contaminación con sangre de la muestra espermática. Los espermatozoides se recuperaron mediante un corte longitudinal, con una hoja de bisturí nº 10, presionando suavemente los canalículos tratando de no dañarlos para evitar la contaminación con células, recolectando rápidamente el semen con el extremo opuesto al filo del mismo. Se completó la recuperación y colección a través de cortes internos, y con presión manual, para obtener la máxima cantidad posible de espermatozoides.

La temperatura de procesamiento del esperma fue diferente para cada uno de los grupos. En el grupo control se trabajó siempre a temperatura ambiente (aproximadamente a 20 °C), y para los grupos 24 y 48 horas la manipulación se realizó en una cámara frigorífica a 5 °C.

El semen recuperado de cada epidídimo, fue colocado en un tubo graduado para registrar el volumen. Después se calculó la concentración espermática, diluyendo la muestra seminal en agua MilliQ para fijar los espermatozoides, contando las células en una cámara Thoma utilizando un microscopio óptico con contraste de fases.

Se tomó una muestra inicial antes de realizar la extensión y se la diluyó con Boviextend[®] (Nidacon), procediéndose con ésta a realizar la evaluación espermática detallada en el punto 4.1.3.

El esperma de ambos epidídimos se dividió en 2 partes, diluyendo una de ellas con Biladyl[®] (Minitube; medio de dilución con yema de huevo) y la otra con Bioxcell[®] (IMV Technologies; medio de dilución sin yema de huevo, con base de lecitina de soja). Se procedió a realizar una dilución 1:1 (a temperatura ambiente o a 5 °C, según el grupo experimental) y, después de calculada la concentración final, se volvió a diluir hasta lograr una concentración final de 200×10^6 espermatozoides/ml.

Para la adición del diluyente a la muestra de esperma epididimario, tanto con Biladyl[®] como con Bioxcell[®], se comprobó que la temperatura de ambas soluciones se correspondieran con la temperatura del semen en cada momento, procediéndose del siguiente modo:

- **Dilución con Biladyl[®]**: este medio se compone de dos alícuotas, la fracción A y la fracción B. Éstas alícuotas se conservaron congeladas, y para su uso se descongelaron en un baño María a 30 °C durante 20 minutos. Después de calculada la concentración, y el volumen a adicionar, se procedió a realizar la predilución con la solución A, agregando el 60% del volumen total de medio a añadir, a la misma temperatura a la que se encontraba el semen. Posteriormente, los tubos que contenían la muestra diluida se introdujeron, junto con el tubo de la solución B, dentro de un vaso con agua a temperatura ambiente o refrigerada, según correspondiera el grupo experimental, colocándolos en una nevera a 5 °C.

Una vez puesta en marcha la rampa de descenso de temperatura del semen, se procedió a su dilución con la solución B, representando el 40% del total de diluyente necesario. Su adición se realizó en tres partes iguales, que se agregaron cada 20 minutos a partir del momento de la predilución. Inmediatamente después de la adición completa de la solución B, se homogeneizó cuidadosamente el semen con el diluyente.

- **Dilución con Bioxcell®**: Como este medio se conserva refrigerado, antes de su utilización con el grupo R0, se atemperó en un baño a 30 °C durante 15 minutos, y transcurrido este tiempo, se mantuvo a 20 °C para alcanzar la temperatura del esperma. Con los grupos R24 y R48, al trabajar en la cámara de frío, la dilución se realizó sin calentamiento previo. Después de conocida la concentración, se precedió a añadir el diluyente, de una sola vez, dejándolo resbalar por las paredes del tubo. La mezcla del diluyente con el semen se homogenizó lentamente y se inició, o se continuó según correspondiera, la rampa de descenso de temperatura.

El semen diluido se colocó en un tubo de centrifuga (Corning®) de 15 ml y se enfrió lentamente a 5 °C, introduciéndolos en un vaso con agua (250 ml) a temperatura ambiente o previamente refrigerado y se colocaron en una nevera a 5 °C.

Para ambos medios, el enfriamiento duró aproximadamente 1 hora, y se dejó durante 2 horas más a esta temperatura para alcanzar el equilibrio.

A continuación, se cargaron en pajuelas de plástico de 0,25 ml, a una concentración total de 50×10^6 células por pajuela. La congelación se realizó con un biocongelador programable (PLANNER KRYO 10 serie II), con una rampa de enfriamiento de -20 °C/min hasta -100 °C. Seguidamente se sumergieron en nitrógeno líquido, donde se almacenaron hasta su uso.

4.1.3. EVALUACIÓN ESPERMÁTICA

Las muestras epididimales fueron evaluadas en cuatro momentos diferentes:

- **Inicial (I)**: mezcla de la suspensión original de esperma de ambos epidídimos.
- **Precongelado (P)**: muestra del semen diluido, una vez estabilizado a 5 °C (en el momento de envasarlo).
- **Descongelado (D)**: muestra espermática descongelada (30 segundos en un baño María a 37 °C).
- **Postselección *in vitro***: muestra espermática después de la selección, bien por el método de gradiente de densidad (GD) o bien por el método de “swim-up” (Sw).

Se establecieron las características de los espermatozoides mediante la determinación de la movilidad, morfología, integridad de membrana, integridad del acrosoma y capacidad fecundante *in vitro*.

4.1.3.1. MOVILIDAD ESPERMÁTICA

La movilidad individual se evaluó subjetivamente por microscopía de contraste de fases (10x), después de diluir la muestra espermática con una solución isotónica de Boviextend[®], atemperado a 37 °C.

Además de la evaluación subjetiva o convencional del semen, las mismas muestras se sometieron a un análisis automatizado, asistido por ordenador, como describen diferentes autores (Marco-Jiménez *et al.*, 2005; Malo *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2008) para la evaluación objetiva de la movilidad. Una muestra de 5 µl diluido a una concentración de 50×10^6 espermatozoides/ml (200 células por campo aproximadamente) se introdujo en una cámara Makler a 37 °C y la movilidad se observó en un microscopio óptico de contraste de fases a 10x (SCA, Microptic, Barcelona). Se digitalizaron y guardaron cinco campos microscópicos escogidos al azar.

Se analizaron los siguientes parámetros: porcentaje de espermatozoides móviles (movilidad individual; % MI), porcentaje de espermatozoides que se desplazaban linealmente (movilidad progresiva; % MP), velocidad curvilínea (µm/s; VCL), velocidad rectilínea (µm/s; VSL), velocidad media (µm/s; VAP), índice de linealidad (% LIN), índice de rectitud (% STR), índice de oscilación de la cabeza (% WOB), amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (µm; ALH) y frecuencia de batido del flagelo (Hz; BCF).

4.1.3.2. MORFOLOGÍA

La morfología espermática se evaluó mediante la tinción convencional de Eosina-Nigrosina (EN; Figura nº 4.1).

La tinción de EN se preparó como describen Tamuli y Watson (1994), realizando un frotis sobre un portaobjeto atemperado a 37 °C, colocando al lado 10 µl de la tinción y 5-10 µl (inversamente a la concentración) de semen, y mezclando ambas gotas con la punta de la pipeta. A continuación, con la ayuda de otro portaobjetos con el borde limpio y seco, se procedió a realizar el frotis. Se secó al aire rápidamente para evitar que el colorante siguiera penetrando en el espermatozoide (Soler *et al.* 2005).

Los frotis de EN se evaluaron, mediante microscopía de campo claro, con un objetivo de 100x bajo aceite de inmersión. Se contaron al menos 200 espermatozoides

en cada una de las muestras, Los resultados se expresaron como porcentaje y se clasificaron en:

1. Espermatozoides normales
2. Espermatozoides anormales:
 - Con alteraciones en cabeza (C),
 - Cabezas sueltas (CS),
 - Alteraciones en pieza intermedia (PI),
 - Alteraciones en cola (CO) y,
 - Espermatozoides con gota citoplasmática proximal (GP).

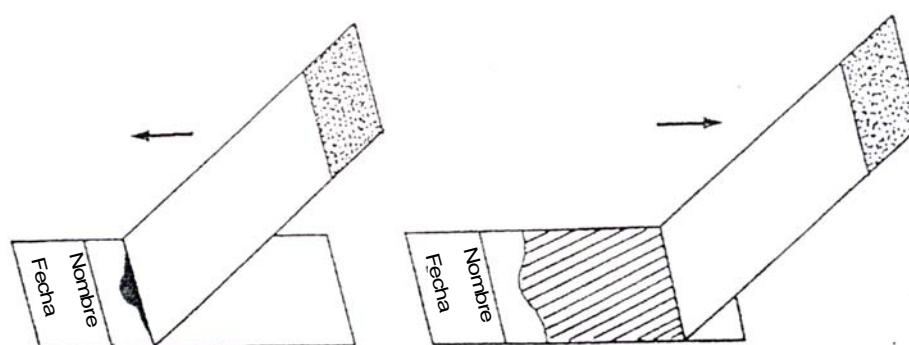


Figura nº 4.1. Método de coloración de una muestra de semen usando eosina-nigrosina (EN) (Barth and Oko, 1989).

4.1.3.3. INTEGRIDAD DE MEMBRANA

La integridad de membrana se evaluó por medio de dos procedimientos diferentes: Prueba de Endósmosis Celular (HOST: Hypoosmotic Swelling Test) y valoración mediante el uso de fluorocromos (IP/PNA).

HOST: Tal como describe Garde y *col.* (1998) para evaluar la integridad de la membrana plasmática mediante esta prueba, se mezclaron 5 μ l de la muestra diluida de espermatozoides en 45 μ l de solución hiposmótica (100 mOsm/kg) de citrato sódico, incubando la mezcla en un baño María a 37 °C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, las muestras se fijaron con 5 μ l de glutaraldehído tamponado al 2%.

Sobre un portaobjetos atemperado, se depositaron 5 μ l de esta solución y, en gota plana, se observó por microscopía de contraste de fases (40x). Se consideraron como espermatozoides con membrana plasmática funcional, aquellos que presentaron la cola enrollada o engrosada -endósmosis (+)- y, negativos al test los que mostraron un

aspecto normal, considerándolos como espermatozoides con daño funcional en su membrana plasmática. El resultado se expresó como % HOST (+).

Valoración mediante el uso de fluorocromos: Con este método se evaluó la integridad de membrana en conjunto con la integridad del acrosoma. Se realizó mediante la combinación de fluorocromos, yoduro de propidio (IP; Sigma[®], P-4170; 488/617) y PNA conjugado con isotiocianato de fluoresceína (PNA-FITC; Sigma[®], L-7381; 488/519).

El IP es una tinción ADN específica que no puede atravesar la membrana intacta y, por tanto, permite la identificación de células viables que no se colorean y las muertas que emiten fluorescencia de color rojo. El PNA-FITC se utilizó para detectar la integridad acrosomal, ya que las células espermáticas con acrosoma intacto no emitirían fluorescencia, y las células espermáticas con daños o reacción acrosomal mostrarían fluorescencia verde.

Las soluciones madre de IP (1 mg de IP en 1 ml de PBS) y las de PNA-FITC (0,2 mg PNA-FITC en 1 ml de PBS) se conservaron congeladas, por separado, en alícuotas de 50 µl.

El protocolo usado para la preparación de las muestras fue el siguiente: sobre una base de 500 µl de medio Cellwash[®] (Beckman Coulter - Isoton[®] II Ref. 8448011) se añadieron los colorantes: 2,5 µl de PNA-FITC y 2,5 µl de IP. A continuación se suspendió la muestra de semen (la cantidad varió entre 1-10 µl en función de la concentración de la muestra) en la preparación. Seguidamente se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se analizó mediante citometría de flujo.

Se evaluaron 10.000 espermatozoides por cada muestra, guardando los datos en FCS (Flow Cytometry Standard format). El análisis de la citometría de flujo se llevó a cabo usando WinMDI ver. 2.8 (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

El recuento de espermatozoides permitió diferenciar cuatro subpoblaciones de espermatozoides según su patrón de coloración PNA-FITC/IP:

- a) PNA (-)/IP (-): los espermatozoides que no se tiñeron con PNA-FITC ni con IP, se consideraron con membrana plasmática y acrosoma intactos.
- b) PNA (+)/IP (-): los espermatozoides que se tiñeron con PNA-FITC pero no con IP, se consideraron como vivos con daños o reacción en el acrosoma.

c) PNA (-)/IP (+): los espermatozoides que no se tiñeron con PNA-FITC y sí con IP, se consideraron con daño en la membrana pero con acrosomas intactos.

d) PNA (+)/IP (+): los espermatozoides que se tiñeron con ambos colorantes se consideraron con daños tanto en la membrana como en el acrosoma.

4.1.3.4. INTEGRIDAD DEL ACROSOMA:

La integridad del acrosoma se evaluó por dos métodos diferentes. BL-1 (Tabla 4.1) con glutaraldehído tamponado al 2% y, el otro, análisis mediante el uso de fluorocromos (explicado en el punto 4.1.3.3).

Para el primer método se preparó una dilución de 5 µl de esperma y 45 µl de BL-1 con glutaraldehído tamponado al 2%. La lectura se realizó en gota plana (8 µl de esta dilución), y se observaron las anomalías acrosómicas bajo contraste de fases (objetivo 100x de inmersión). Los resultados se expresaron como porcentaje (%) de acrosomas normales.

Tabla 4.1. Composición del BL-1

SALES	CONCENTRACIÓN	REFERENCIA
Glucosa	1,45 g	Sigma [®] , G-6152
Tri-Na Citrato	0,5 g	Merck [®] , 6448
NaHCO ₃	0,1 g	Sigma [®] , S-4019

4.1.3.5. CAPACIDAD DE FECUNDACIÓN *IN VITRO* (FIV):

Se valoró, *in vitro*, el porcentaje de división en el día 3 postinseminación, obtenido con espermatozoides epididimarios congelados-descongelados, siguiendo el procedimiento que se describe a continuación.

4.2. FECUNDACIÓN *IN VITRO*

4.2.1. OBTENCIÓN, SELECCIÓN Y MADURACIÓN DE LOS CCOs

Se utilizaron ovarios de vacas sacrificadas en el Matadero Municipal de León, que se trasladaron al laboratorio sumergidos en una solución fisiológica estéril de NaCl (9 mg/ml; Sigma[®], S-5886) atemperado a 30 °C, con estreptomicina (2,5 µg/ml; Sigma[®], S-6501) y penicilina (100 UI/ml; Sigma[®], PEN-NA).

Los complejos *cumulus*-ovocito (CCOs) se obtuvieron por punción y aspiración de los folículos ováricos de 2 a 8 mm de diámetro. Hasta finalizar la punción de todos los ovarios, el líquido folicular se depositó en un tubo de centrifuga de 50 ml con 2 ml de medio TCM-199 Hepes con 1% de heparina.

Completada la aspiración de todos los folículos, el líquido folicular mezclado con el medio de punción se aclaró varias veces con un medio de lavado, TCM-199 Hepes con un 10% Suero Fetal Bovino, atemperado a 37 °C, y se pasó a través de un filtro (Em Con[®]; Eurofomento Pecuario, Madrid).

A continuación se realizó una búsqueda de los CCOs, eliminando los que presentaban un citoplasma poco homogéneo y aquellos cuyo *cumulus* tenían menos de tres capas de células de la granulosa y/o éste era incompleto.

La maduración se realizó en placas de 4 pocillos (Nunclon[®], Ref. 176740), cada uno con 500 µl de medio de maduración (Tabla 4.2), equilibradas al menos dos horas antes en un incubador (Heraeus BB6060), a 39 °C, 5 % de CO₂ y humedad a saturación.

Se colocaron hasta un máximo de 50 CCOs por pocillo, durante 22-24 horas en la estufa de cultivo.

Tabla 4.2. Composición del medio de maduración

SALES	CONCENTRACIÓN	REFERENCIA
TCM-199-NaHCO ₃	25 mM	Gibco [®] , 31150
FSH	1 µg/ml	Sigma [®] , F-2293
LH	5 µg/ml	Sigma [®] , L-5269
17 β-Estradiol	1 µg/ml	Sigma [®] , E-8875
Cisteamina (2-mercapto-Ethylamina)	100 µmolar	Sigma [®] , M-9768

FSH: Hormona Folículo Estimulante.
LH: Hormona Luteinizante.

4.2.2. SELECCIÓN ESPERMÁTICA Y FECUNDACIÓN

Se utilizaron dosis descongeladas de esperma epididimario de toro de Lidia. Se evaluó su movilidad y se procedió a realizar la selección espermática correspondiente, “swim-up” o gradiente de densidad.

4.2.2.1. "SWIM UP"

Se depositó 1 ml de medio Sperm-TALP (STL; Parrish *et al.*, 1988; Tabla 4.3) en un criotubo (Nalgene[®], ref. 5000-0020) que se equilibró, al menos, dos horas en estufa a 39 °C, 5 % de CO₂ y humedad a saturación. Una vez descongeladas las pajuelas, se depositaron 180 µl de semen en el fondo de cada tubo, evitando en todo momento formar reflujos. Se incubó una hora para que los espermatozoides vivos y móviles ascendieran hacia la parte más superficial de la columna de medio.

Transcurrido este tiempo, se recogió el sobrenadante (800 µl/criotubo) y se centrifugó, en un tubo cónico, a 200 g durante 10 min. Tras la centrifugación se eliminó el sobrenadante dejando un volumen ≤ 100 µl (Figura nº 4.1).

Tabla 4.3. Composición básica del medio utilizado para la selección de los espermatozoides por la técnica de "swim-up" (medio STL).

SALES	CONCENTRACIÓN	REFERENCIA
NaCl	114 mM	Sigma [®] , S-5886
KCl	3,22 mM	Sigma [®] , P-9541
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,30 mM	Merck [®] , 6346
NaHCO ₃	25 mM	Sigma [®] , S-4019
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,04 mM	Merck [®] , 2382
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,49 mM	Merck [®] , 5833
Rojo fenol	10 mg/l	Merck [®] , 7241
Gentamicina	5 ml/ml	Gibco [®] , 043-05710
Na-Piruvato	1,05 mM	Sigma [®] , P-4562
Na-lactato	36 mM	Sigma [®] , L-4263
Hepes	10 mM	Gibco [®] , 15710-031
BSA-faf	6 gr/l	Sigma [®] , A-6003

BSA-faf: Albúmina Sérica Bovina libre de ácidos grasos.

Se ajusta el pH a 7,2.

Se esteriliza con filtros MILLEX GV[®].

Antes de su utilización se vuelve a filtrar.

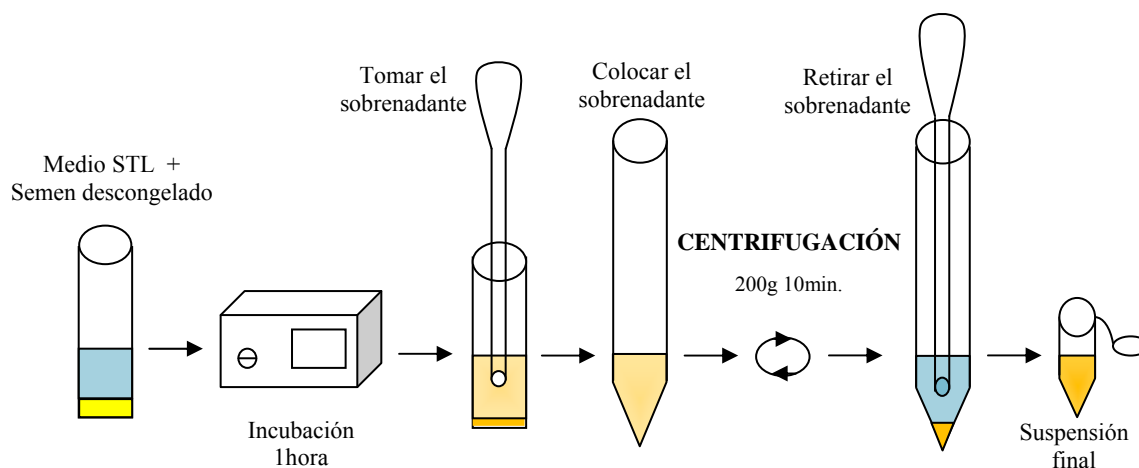


Figura nº 4.2. Esquema de "swim-up" para la selección espermática, descrito por Parrish *y col.* (1986).

4.2.2.2. GRADIENTE DE DENSIDAD (BOVIPURE®)

Utilizando una pipeta estéril, se transfirió 1 ml de BoviPure Bottom Layer® (Nidacon) a un tubo cónico de centrifuga. Con otra pipeta estéril se colocó cuidadosamente 1 ml de BoviPure Top Layer® (Nidacon) sobre el BoviPure Bottom Layer®, con precaución de no romper la interfase. A continuación se depositó el esperma de epidídimo descongelado sobre el gradiente, prestando el mismo cuidado de no romper la interfase, quedando suspendido sobre el BoviPure Top Layer®.

Se centrifugó durante 20 min a 300 g, a temperatura ambiente. Cuidadosamente se eliminó el gradiente con una pipeta estéril dejando solo el pelotón de espermatozoides en el fondo del tubo. Éste se resuspendió con 5 ml de BoviWash® (Nidacon) y se procedió a una segunda centrifugación durante 10 min a 500 g. A continuación se retiró cuidadosamente el sobrenadante, dejando solo el pelotón en el fondo del tubo (Figura nº 4.2).

En ambos métodos, después de la selección espermática, se calculó la concentración del pelotón de espermatozoides con una cámara Thoma, en una dilución 1:10. La fecundación se realizó a una concentración de 1×10^6 espermatozoides/ml de medio de fecundación.

El resto, no utilizado en la fecundación, se empleó para hacer todas las pruebas de valoración seminal mencionadas en el apartado 4.1.3.

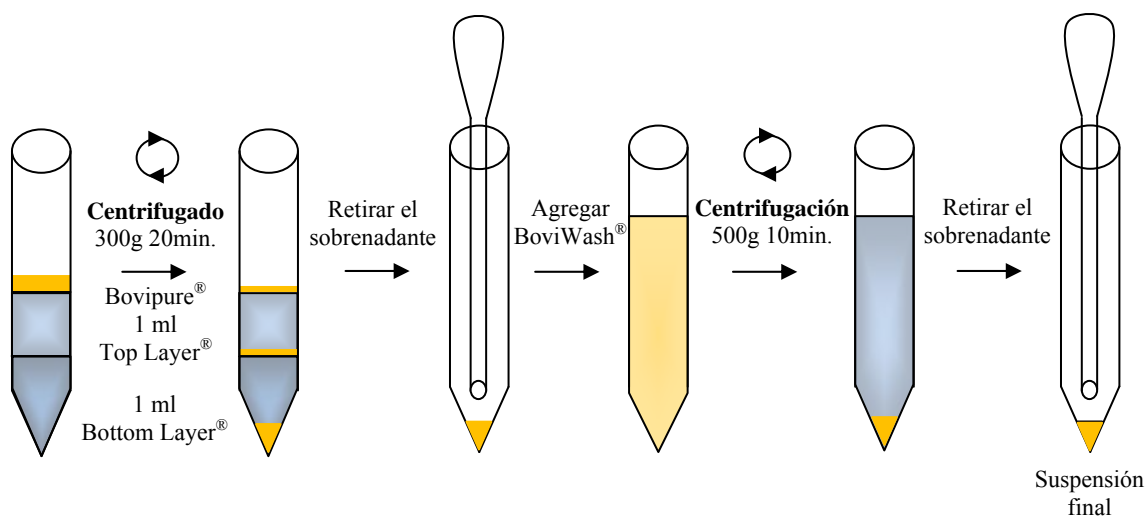


Figura nº 4.3. Esquema de gradiente de densidad (BoviPURE®) para la selección espermática.

Una vez seleccionado el espermatozoides, la fecundación se realizó en placas multipocillos, conteniendo cada pocillo 500 µl de medio de fecundación (MF; Fert-TALP; Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Composición básica de los medios utilizados para la fecundación (MF, medio Fert-TALP).

SALES	CONCENTRACIÓN	REFERENCIA
NaCl	114 Mm	Sigma®, S-5886
KCl	3,22 Mm	Sigma®, P-9541
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,30 mM	Merck®, 6346
NaHCO ₃	25 mM	Sigma®, S-4019
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,04 mM	Merck®, 2382
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,49 mM	Merck®, 5833
Rojo fenol	10 mg/l	Merck®, 7241
Gentamicina	5 ml/ml	Gibco®, 043-05710
Na-Piruvato	1,05 mM	Sigma®, P-4562
Na-lactato	36 mM	Sigma®, L-4263
Heparina	10 µg/ml	Calbiochem®, 375095
BSA-faf	6 gr/l	Sigma®, A-6003

BSA-faf: Albúmina Sérica Bovina libre de ácidos grasos.

Se colocaron 50 CCOs por pocillo, a la espera de los espermatozoides del grupo experimental correspondiente.

La muestra espermática se depositó suavemente en el pocillo que contenía los ovocitos maduros y los gametos se coincubaron durante 18 horas.

Seguidamente se procedió a retirar las células del *cumulus* y los espermatozoides sobrantes mediante una agitación por vórtex, con una velocidad media de 1.500 r.p.m. durante 3 min.

4.2.3. CULTIVO DE EMBRIONES

Como medio de cultivo se utilizó un medio sintético semidefinido SOFaaci (MC; Holm *et al.*, 1999; Tabla 4.5) y se llevó a cabo en condiciones controladas a 39 °C, 5 % de CO₂ y humedad a saturación. Los presuntos cigotos, en número ≤ 25 , se colocaron en microgotas de 50 μ l de MC cubiertas de aceite mineral NidOil™ (Nidacon®, ET-H301-LF/01).

A las 72 horas de la puesta en cultivo se realizó la valoración de los embriones divididos.

Tabla 4.5. Composición del medio SOFaaci (Holm *et al.*, 1999)

SALES	CONCENTRACIÓN	REFERENCIA
NaCl	107,70 mM	Sigma®, S-5886
KCl	7,16 mM	Sigma®, P-9541
KH ₂ PO ₄	1,19 mM	Merck®, 4873
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,78 mM	Merck®, 2382
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,51 mM	Merck®, 5886
NaHCO ₃	25 mM	Sigma®, S-4019
Rojo Fenol	10 mg/l	Merck®, 7241
Na-Lactato	5,35 mM	Sigma®, L-4263
Piruvato	7,27 mM	Sigma®, P-4562
Glutamina	0,20 mM	Sigma®, G-1517
aa-esenciales (BME)	30 ml/l	Sigma®, B-6766
aa-no esenciales (MEM)	10 ml/l	Sigma®, M-7145
Tri-Na Citrato	0,34 mM	Merck®, 6448
Mioinositol	2,77 mM	Sigma®, I-7508

4.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

4.3.1. EXPERIMENTO 1.- Influencia del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo sobre los parámetros de calidad seminal

Para la realización de este trabajo, se procesaron 48 epidídimos provenientes de 24 toros de diferentes ganaderías de Castilla y León, asignándoles aleatoriamente a 3 grupos, de 8 toros cada uno, correspondientes a diferentes tiempos de conservación, 0, 24 y 48 horas (grupos R0, R24 y R48 respectivamente). Después de la muerte del animal fueron transportados al laboratorio:

- En el grupo control (R0), a temperatura ambiente, para realizar la extracción del esperma epididimario, como máximo, en las 2 horas siguientes al sacrificio de los animales.
- En los grupos R24 y R48, los genitales se transportaron refrigerados en una nevera portátil con 2 congelantes por cada toro, y en el laboratorio se depositaron en una cámara frigorífica en condiciones controladas, a 4 °C.

Una vez obtenido el esperma de los epidídimos, y antes de realizar la dilución correspondiente, se tomó una muestra que se denominó Inicial (**I**) y que correspondió a una mezcla de semen de ambos epidídimos del mismo toro. Esta muestra pura, que según el grupo de conservación de los epidídimos, 0, 24, o 48 horas, se identificó respectivamente como Inicial R0 (**I-R0**), Inicial R24 (**I-R24**) e Inicial R48 (**I-R48**), se colocó en un baño María, a 37 °C y se diluyó en un extensor comercial (Boviextend[®]) a la misma temperatura. A partir de aquí se obtuvieron varias alícuotas que se utilizaron en las diferentes pruebas de valoración de la calidad espermática (Tabla 4.6).

4.3.2. EXPERIMENTO 2.- Efecto del medio de dilución del semen epididimario, en relación al tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, sobre los parámetros de calidad seminal, evaluados en la precongelación y en la descongelación

Después de tomar la muestra inicial, el resto de la mezcla de semen de ambos epidídimos se dividió en dos partes iguales, para diluir cada una de ellas con Bilady1[®] o con Bioxcell[®].

Como indicamos en el apartado 4.1.2, el espermatozoides epididimario, así diluido, se mantuvo tres horas a 4 °C, para lograr el descenso de la temperatura y el equilibrio de la suspensión. Alcanzada esa temperatura se tomó la segunda muestra denominada Precongelado (**P**), justo antes del envasado de las pajuelas y su consiguiente congelación. Así se obtuvieron los siguientes grupos objeto de análisis en este trabajo:

P-R0Bx: muestra de semen, obtenida de los epidídimos inmediatamente después del sacrificio del animal (R0), diluida con Bioxcell[®] (Bx) y completada la rampa de refrigeración.

P-R0By: muestra de semen, obtenida de los epidídimos inmediatamente después del sacrificio del animal (R0), diluida con Biladyl[®] (By) y completada la rampa de refrigeración.

P-R24Bx: muestra de semen, obtenida de los epidídimos conservados 24 horas a temperatura de refrigeración (R24), diluida con Bioxcell[®] (Bx) y completada la rampa de refrigeración.

P-R24By: muestra de semen, obtenida de los epidídimos conservados 24 horas a temperatura de refrigeración (R24), diluida con Biladyl[®] (By) y completada la rampa de refrigeración.

P-R48Bx: muestra de semen, obtenida de los epidídimos conservados 48 horas a temperatura de refrigeración (R48), diluida con Bioxcell[®] (Bx) y completada la rampa de refrigeración.

P-R48By: muestra de semen, obtenida de los epidídimos conservados 48 horas a temperatura de refrigeración (R48), diluida con Biladyl[®] (By) y completada la rampa de refrigeración.

En estas muestras se analizó la calidad seminal utilizando las mismas pruebas que se emplearon en las muestras iniciales, a excepción de la concentración (Tabla 4.6).

Después de la congelación, en nitrógeno líquido, y mantenerlas almacenadas al menos durante 3 meses, se realizó la primera Descongelación (**D**). Para evaluar la calidad espermática en semen descongelado, se utilizaron 12 pajuelas de cada toro y cada diluyente, y se realizaron las mismas pruebas que en las muestras precongeladas (Tabla 4.6). En este caso los grupos objeto de estudio fueron:

D-R0Bx: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos inmediatamente después del sacrificio del animal (R0), diluida con Bioxcell[®] (Bx).

D-R0By: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos inmediatamente después del sacrificio del animal (R0), diluida con Biladyl[®] (By).

D-R24Bx: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 24 horas a temperatura de refrigeración (R24), diluida con Bioxcell[®] (Bx).

D-R24By: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 24 horas a temperatura de refrigeración (R24), diluida con Biladyl[®] (By).

D-R48Bx: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 48 horas a temperatura de refrigeración (R48), diluida con Bioxcell[®] (Bx).

D-R48By: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 48 horas a temperatura de refrigeración (R48), diluida con Biladyl[®] (By).

4.3.3. EXPERIMENTO 3.- Efecto del método de selección espermática sobre las características de calidad del semen epididimario en relación al tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo y al medio de dilución espermática

Las dosis espermáticas obtenidas en los diferentes grupos, atendiendo al tiempo de conservación de los epidídimos y al diluyente utilizado para la congelación de las mismas, se emplearon en pruebas de Fecundación *in vitro* (FIV), al objeto de evaluar que método de selección espermática, “swim up” (**Sw**) o gradiente de densidad (**GD**), podría proporcionar los espermatozoides con mejores características para conseguir los porcentajes más elevados de división y de desarrollo embrionario.

Se realizaron seis réplicas para cada diluyente y para cada toro y, después de ejecutar la selección espermática y calculada la concentración de espermatozoides/ml

obtenida, se empleó el volumen necesario para la fecundación de los ovocitos madurados *in vitro*. El resto se utilizó para evaluar la calidad del espermatozoides postselección (Tabla 4.6). Así se obtuvieron los siguientes grupos objeto de análisis en este trabajo:

Sw-R0Bx: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos inmediatamente después del sacrificio del animal (R0), diluida con Bioxcell[®] (Bx) y seleccionada mediante “swim up”.

Sw-R0By: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos inmediatamente después del sacrificio del animal (R0), diluida con Biladyl[®] (By) y seleccionada mediante “swim up”.

GD-R0Bx: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos inmediatamente después del sacrificio del animal (R0), diluida con Bioxcell[®] (Bx) y seleccionada mediante gradiente de densidad.

GD-R0By: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos inmediatamente después del sacrificio del animal (R0), diluida con Biladyl[®] (By) y seleccionada mediante gradiente de densidad.

Sw-R24Bx: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 24 horas a temperatura de refrigeración (R24), diluida con Bioxcell[®] (Bx) y seleccionada mediante “swim up”.

Sw-R24By: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 24 horas a temperatura de refrigeración (R24), diluida con Biladyl[®] (By) y seleccionada mediante “swim up”.

GD-R24Bx: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 24 horas a temperatura de refrigeración (R24), diluida con Bioxcell[®] (Bx) y seleccionada mediante gradiente de densidad.

GD-R24By: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 24 horas a temperatura de refrigeración (R24), diluida Biladyl[®] (By) y seleccionada mediante gradiente de densidad.

Sw-R48Bx: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 48 horas a temperatura de refrigeración (R48), diluida con Bioxcell[®] (Bx) y seleccionada mediante “swim up”.

Sw-R48By: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 48 horas a temperatura de refrigeración (R48), diluida con Biladyl® (By) y seleccionada mediante “swim up”.

GD-R48Bx: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 48 horas a temperatura de refrigeración (R48), diluida con Bioxcell® (Bx) y seleccionada mediante gradiente de densidad.

GD-R48By: muestra de semen descongelada, obtenida de los epidídimos conservados 48 horas a temperatura de refrigeración (R48), diluida con Biladyl® (By) y seleccionada mediante gradiente de densidad.

En todos los grupos, se valoró en el día 3 postinseminación, el porcentaje de embriones de más de 2 células (porcentaje de división, % Div) obtenidos mediante FIV.

Tabla 4.6. Pruebas empleadas para la valoración de la calidad seminal.

PRUEBA	TÉCNICA EMPLEADA
Concentración*	- Cámara Thoma
Movilidad	- Microscopio de contraste de fases - Sistema CASA
Morfología	- Eosina-Nigrosina
Viabilidad	- HOST - IP
Integridad de la membrana acrosómica	- BI-1 con glutaraldehído tamponado al 2% - PNA
División <i>in vitro</i> **	- % de división al día 3

* Evaluación no realizada en las muestras precongeladas y descongeladas.

** Evaluación realizada únicamente para las muestras seleccionadas mediante “swim up” y gradiente de densidad.

4.4. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Para el estudio de los resultados, obtenidos en este trabajo, se utilizó el programa estadístico SASTM. Se realizó un análisis de varianza siguiendo el procedimiento GLM (General Linear Model), siendo los factores de variación:

- Tiempo de almacenamiento *postmortem* de los epidídimos: R0, grupo control en el que el espermatozoides epididimario se obtuvo en las 2 horas siguientes al sacrificio de los animales; R24 y R48, grupos en los que, una vez

sacrificado el animal, los testículos con sus respectivos epidídimos se mantuvo refrigerados a 4 °C, durante 24 y 48 horas respectivamente.

- Diluyente: se han analizado dos medios de dilución espermática, Bioxcell[®] (Bx) y Biladyl[®] (By).
- Momento del proceso de congelación-descongelación: después de la refrigeración a la que se someten antes de la congelación (P), y una vez descongeladas (D).
- Método de selección espermática: se han evaluado dos métodos de selección espermática, en las muestras descongeladas, “swim-up” (Sw) y gradiente de densidad (GD).

Cuando los factores mostraron efectos significativos ($p < 0,05$) en los diferentes grupos experimentales, sus valores se estudiaron mediante el test de Bonferroni para comparación de medias.

5. Resultados

5.1. CALIDAD DEL SEMEN DE TORO DE LIDIA RECOGIDO *POSTMORTEM* DEL EPIDÍDIMO

5.1.1. EXPERIMENTO 1.- Influencia del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo en los parámetros de calidad seminal

5.1.1.1. VOLUMEN Y CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

El tiempo de conservación de los epidídimos durante 24 (grupo I-R24) o 48 horas (grupo I-R48) no modificó, significativamente ($p > 0,05$), ni el volumen ni la concentración espermática (0,67 ml y $6.278,75 \times 10^6$ vs 0,99 ml y $5.307,38 \times 10^6$ spz/ml, respectivamente) de las muestras recogidas, al compararlas con las del grupo I-R0 (1,09 ml y $4.843,50 \times 10^6$ spz/ml).

5.1.1.2. MOVILIDAD ESPERMÁTICA

5.1.1.2.1. MOVILIDAD INDIVIDUAL Y PROGRESIVA

El tiempo de conservación espermática afectó a la movilidad individual y progresiva, tanto en la evaluación subjetiva (microscopio de contraste de fases), como en la evaluación objetiva (sistema CASA), siendo los grupos I-R0 e I-R24 superiores ($p < 0,05$) al I-R48 (Figura n° 5.1).

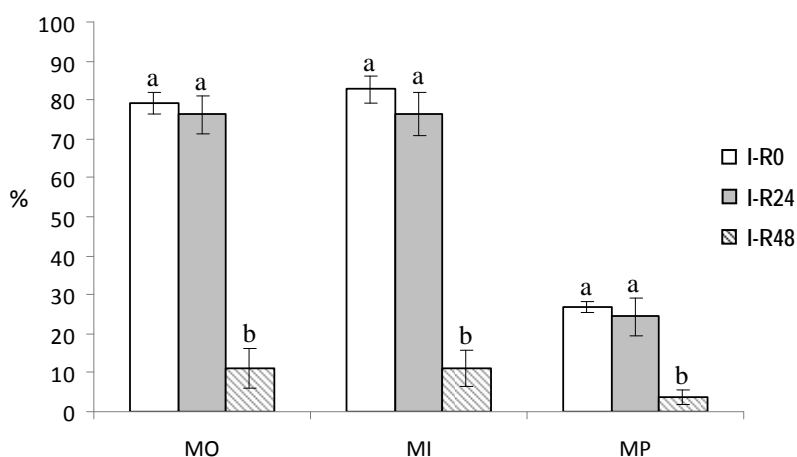


Figura n° 5.1. Influencia del tiempo de almacenamiento de los espermatozoides de epidídimo, desde el sacrificio del animal hasta el procesado del semen, en los porcentajes de movilidad individual y progresiva. MO: % de movilidad individual, evaluada en el microscopio de contraste de fases; MI: % de movilidad individual y MP: % de movilidad progresiva, evaluadas con el sistema CASA. Los datos se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS \pm ES. Letras distintas indican diferencias significativas (a, b: $p < 0,05$).

5.1.1.2.2. PARÁMETROS CINÉTICOS ESPERMÁTICOS

Cuando se evaluaron los diferentes tiempos de conservación, la velocidad media (VAP), la velocidad curvilínea (VCL) y la velocidad rectilínea (VSL), estudiadas con el sistema CASA, no experimentaron diferencias estadísticas en los grupos I-R0 e I-R24, disminuyendo significativamente ($p < 0,05$) los valores de todos ellos en el grupo I-R48 (Figura nº 5.2 A).

Al analizar los índices de linealidad (LIN) y de oscilación de la cabeza (WOB), los grupos I-R0 e I-R24 registraron valores significativamente más elevados ($p < 0,05$) que los obtenidos en el grupo I-R48, no encontrando diferencias ($p > 0,05$) para la rectitud de la trayectoria (STR) (Figura nº 5.2 B).

Respecto a la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH), el tiempo de conservación disminuyó ($p < 0,05$) este valor en el grupo I-R48, respecto a los otros grupos experimentales, sin que se apreciaran diferencias ($p > 0,05$) entre los grupos I-R0 e I-R24 (Figura nº 5.2 C).

5.1.1.3. MORFOLOGÍA

El porcentaje de espermatozoides normales disminuyó significativamente ($p < 0,05$) a medida que aumentó el tiempo de conservación de los testículos (I-R0 > I-R24 > I-R48).

Para el grupo I-R48 las anomalías predominantes ($p < 0,05$) fueron las alteraciones en la cabeza, la presencia de cabezas sueltas y los daños en la pieza intermedia.

Además este grupo presentó mayor porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática proximal y, aunque esta diferencia no fue significativa ($p > 0,05$) al relacionarlo con el grupo I-R24, sí lo fue con el grupo I-R0.

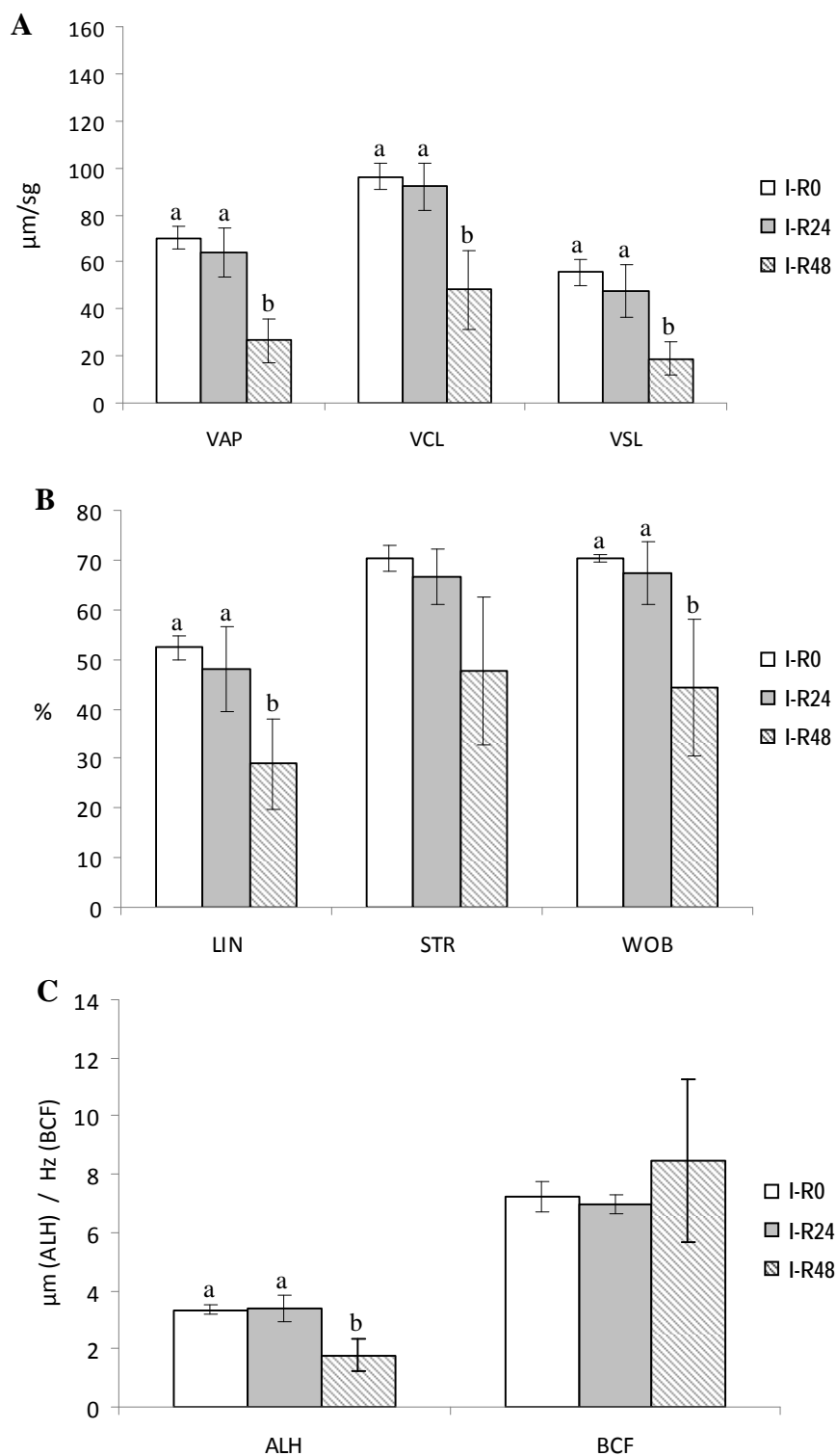


Figura nº 5.2. Influencia del tiempo de almacenamiento de los espermatozoides en el epidídimo, desde el sacrificio del animal hasta el procesado del semen, en los parámetros cinéticos, evaluados con el sistema CASA. **A.** VAP: velocidad media; VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad rectilínea. **B.** LIN: índice de linealidad; STR: índice de rectitud; WOB: índice de oscilación de la cabeza. **C.** ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide; BCF: frecuencia de batido del flagelo. Los datos se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Letras distintas indican diferencias significativas (a, b; $p < 0,05$).

Las alteraciones en la cola aparecieron reflejadas con valores más elevados ($p < 0,05$), en aquellos grupos que se sometieron a un mayor tiempo de conservación *postmortem* (Figura nº 5.3).

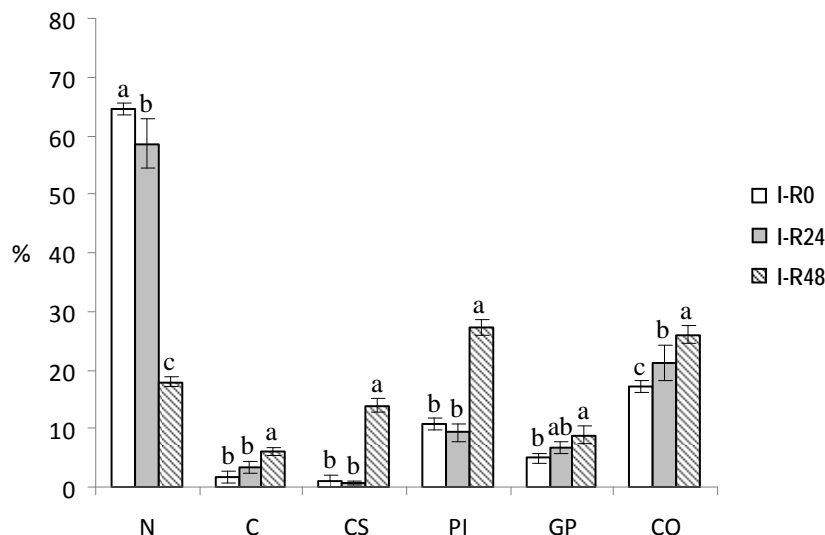


Figura nº 5.3. Influencia del tiempo de almacenamiento de los espermatozoides, desde el sacrificio del animal hasta el procesado del semen, en las características de morfología. N: % de espermatozoides normales; C: % de espermatozoides con alteración en la cabeza; CS: % de espermatozoides con cabeza suelta; PI: % de espermatozoides con alteración en la pieza intermedia; GP: % de espermatozoides con presencia de gota proximal; CO: % de espermatozoides con alteración en la cola. Los datos se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS \pm ES. Letras distintas indican diferencias significativas (a, b, c: $p < 0,05$).

5.1.1.4. INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

5.1.1.4.1. PRUEBA DE ENDÓSMOSIS CELULAR

La respuesta a esta prueba se manifestó con una disminución en la viabilidad inversamente proporcional al tiempo de almacenamiento (I-R0: $91,16 \pm 2,53$ %; I-R24: $78,32 \pm 2,53$ %; I-R48: $70,79 \pm 2,53$ %), observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos I-R48 e I-R0.

5.1.1.4.2. COMBINACIÓN DE FLUOROCROMOS (IP/PNA)

Al analizar, en conjunto, la funcionalidad de las membranas plasmática y acrosomal (IP-/PNA-), no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los distintos grupos experimentales.

Se apreció un porcentaje de espermatozoides muertos con acrosomas funcionales (IP+/PNA-), y vivos con alteración acrosomal (IP-/PNA+), significativamente más elevado ($p < 0,05$) en el grupo I-R48 que en el I-R0 (Figura nº 5.4).

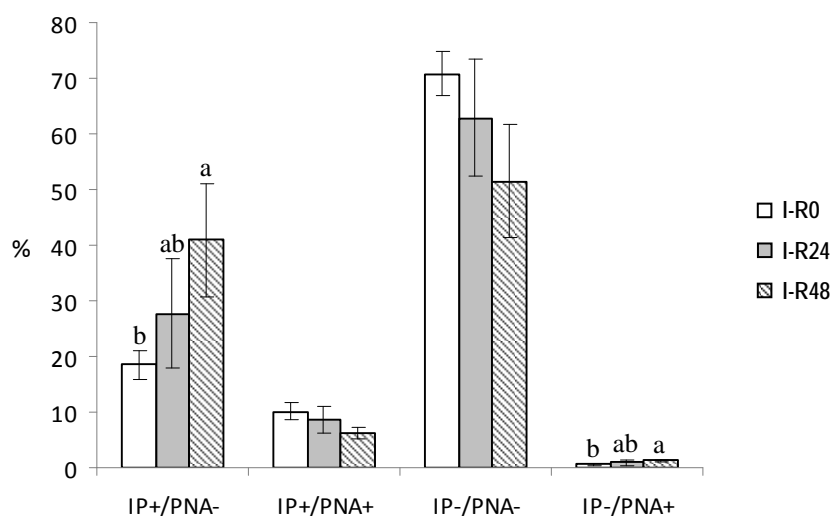


Figura n° 5.4. Influencia del tiempo de almacenamiento de los espermatozoides, desde el sacrificio del animal hasta el procesado del semen, en la viabilidad e integridad del acrosoma evaluados mediante citometría de flujo. IP: yoduro de propidio; PNA-FITC: PNA conjugado con isotiocianato de fluoresceína. IP+/PNA-: % de espermatozoides muertos con acrosomas normales; IP+PNA+: % de espermatozoides muertos con acrosomas alterados; IP-/PNA-: % de espermatozoides vivos con acrosomas normales; IP-/PNA+: % de espermatozoides vivos con acrosomas alterados. Los datos se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Letras distintas indican diferencias significativas (a, b: $p < 0,05$).

5.1.1.5. INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA ACROSÓMICA

5.1.1.5.1. BL-1 CON GLUTARALDEHÍDO TAMPONADO AL 2%

El porcentaje de espermatozoides con acrosomas alterados fue mayor ($p < 0,05$) en el grupo I-R48 ($38,50 \pm 1,96$ %), al compararlo con los grupos I-R0 ($77 \pm 1,96$ %) e I-R24 ($68,13 \pm 1,96$ %), sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre estos últimos.

5.1.2. EXPERIMENTO 2.- Efecto del medio de dilución del semen epididimario, en la precongelación y descongelación, en relación al tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo en los parámetros de calidad seminal

5.1.2.1. PRECONGELACIÓN

5.1.2.1.1. MOVILIDAD ESPERMÁTICA

5.1.2.1.1.1. MOVILIDAD INDIVIDUAL Y PROGRESIVA

Para los dos diluyentes empleados en este estudio (Bioxcell® o Biladyl®), se comprobó que la movilidad individual (MO y MI) (Figura n° 5.5) se redujo a medida

que aumentó el tiempo de conservación de las muestras. El grupo P-R48 fue el más afectado en ambos parámetros.

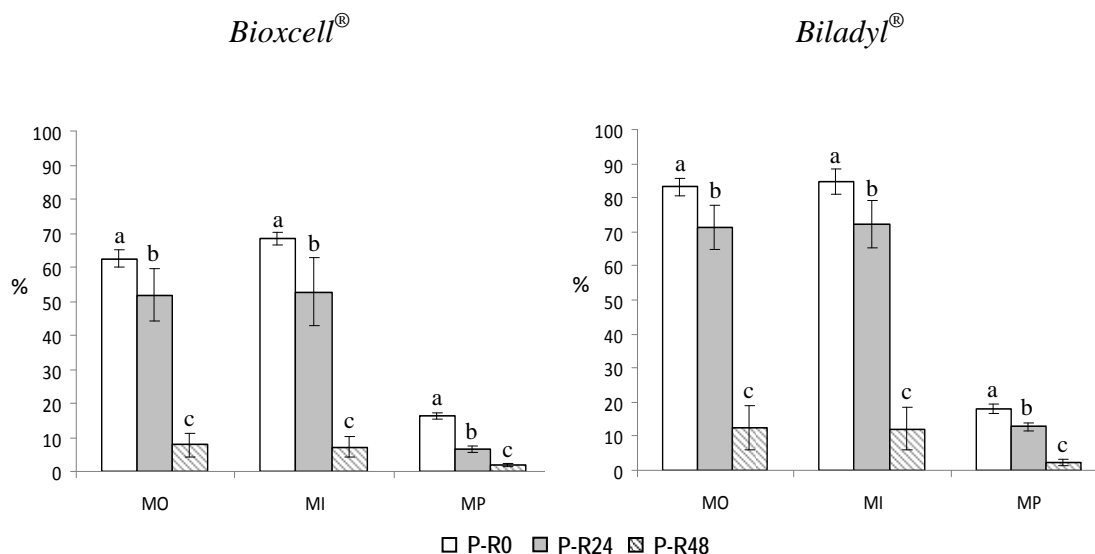


Figura n° 5.5. Influencia del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen, en el porcentaje de movilidad individual y progresiva durante la pre congelación. MO: % de movilidad individual, evaluada en el microscopio de contraste de fases; MI: % de movilidad individual y MP: % de movilidad progresiva, evaluadas con el sistema CASA. Los datos se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Letras distintas indican diferencias significativas (a, b, c: $p < 0,05$).

Al estudiar la influencia de ambos diluyentes, en la pre congelación, se observó que las muestras diluidas con Biladyl®, respecto a las que se diluyeron con Bioxcell®, presentaron registros significativamente superiores ($p < 0,05$) para los parámetros analizados en los tiempos P-R0 y P-R24, a excepción del porcentaje de movilidad progresiva (MP) del grupo P-R0, en el que no aparecieron diferencias significativas ($p > 0,05$) (Tabla 5.1).

Al contrastar estos parámetros con los de las muestras iniciales (I) (Tabla 5.1), no se encontraron diferencias ($p > 0,05$) en la movilidad individual (MO y MI) en el grupo P-R48 de ambos diluyentes, ni en los grupos P-R0By y P-R24By, pero sí observamos una disminución significativa ($p < 0,05$) cuando el diluyente empleado fue Bioxcell®. Asimismo, la MP disminuyó significativamente ($p < 0,05$) en el grupo P-R0 y P-R24, aunque en este último grupo el diluyente a base de yema de huevo fue mejor protector.

Tabla 5.1. Efecto del medio de dilución (Bioxccl® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante la pre congelación, en la movilidad individual y progresiva de los espermatozoides.

	MO	MI	MP
I-R0	79,15±2,32 a	82,67±2,52 a	26,81±1,33 a
P-R0Bx	62,50±2,32 b	68,37±2,52 b	16,34±1,33 b
P-R0By	83,12±2,32 a	84,82±2,52 a	18,11±1,33 b
I-R24	76,25±2,32 a	76,42±2,52 a	24,34±1,33 a
P-R24Bx	51,71±2,32 b	52,76±2,52 b	6,71±1,33 c
P-R24By	71,25±2,32 a	72,27±2,52 a	12,86±1,33 b
I-R48	11,25±2,32	11,03±2,52	3,74±1,33
P-R48Bx	7,68±2,32	7,12±2,52	1,87±1,33
P-R48By	12,62±2,32	12,17±2,52	2,38±1,33

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Para cada tiempo de conservación de los epidídimos, índices distintos, en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b,c: p<0,05).

MO: % de movilidad individual evaluada en el microscopio de contraste de fases; **MI:** % de movilidad individual y **MP:** % de movilidad progresiva, evaluadas con el sistema CASA.

I-R0: Muestra inicial, recién extraída del epidídimo, sin refrigeración *postmortem* y sin adición de diluyente.

P-R0Bx: Muestras sin refrigeración *postmortem*, diluidas con Bioxccl® y completada la rampa de refrigeración.

P-R0By: Muestras sin refrigeración *postmortem*, diluidas con Biladyl® y completada la rampa de refrigeración.

I-R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem* y sin adición de diluyente, recién extraídas del epidídimo.

P-R24Bx: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*, diluidas con Bioxccl® y completada la rampa de refrigeración.

P-R24By: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*, diluidas con Biladyl® y completada la rampa de refrigeración.

I-R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem* y sin adición de diluyente, recién extraídas del epidídimo.

P-R48Bx: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*, diluidas con Bioxccl® y completada la rampa de refrigeración.

P-R48By: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*, diluidas con Biladyl® y completada la rampa de refrigeración.

5.1.2.1.1.2. PARÁMETROS CINÉTICOS ESPERMÁTICOS

Al evaluar, con el sistema CASA, las velocidades promedio (VAP), curvilínea (VCL) y lineal (VSL), se observó una disminución significativa (p<0,05) en estos tres parámetros, para ambos diluyentes, en los grupos P-R48 con respecto a los otros dos grupos en estudio (P-R0 y P-R24), sin que existieran diferencias (p>0,05) entre estos últimos (Figura n° 5.6 A).

Para el índice STR (rectitud), los valores en el grupo P-R48Bx fueron más bajos (p<0,05) al compararlos con el grupo P-R0Bx. Para el resto de los grupos, en ambos diluyentes, no se observaron diferencias significativas (p>0,05) entre los índices STR, LIN (linealidad) y WOB (oscilación de la cabeza) (Figura n° 5.6 B).

Al considerar, en los grupos P-R48Bx y P-R48By, el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) se comprobó una disminución significativa ($p < 0,05$) respecto a los otros tiempos de conservación (P-R0 y P-R24, respectivamente), mientras que para la frecuencia de batido del flagelo (BCF) solo se apreciaron, estas mismas diferencias ($p < 0,05$), en los grupos diluidos con Bioxcell® (Figura nº 5.6 C).

Cuando se compararon ambos diluyentes (Tabla 5.2) se comprobó que, en general, no existían diferencias ($p > 0,05$) entre estos, a excepción de los parámetros VCL, ALH y WOB del grupo P-R0By, donde se incrementaron los dos primeros y disminuyó el último. En el grupo P-R48, el índice de oscilación de la cabeza (WOB) fue mayor ($p > 0,05$) en las muestras diluidas con Bioxcell®, de la misma forma que la frecuencia de batido del flagelo (BCF) lo fue cuando se utilizó el Biladyl®.

Al contrastar estos parámetros cinéticos con los iniciales (I) (Tabla 5.2), se observó que las muestras de los grupos P-R0 disminuyeron significativamente ($p < 0,05$), a excepción de la ALH, que en el grupo diluido con Biladyl®, alcanzó un valor más elevado ($p < 0,05$) que el que mostraron tanto las muestras iniciales (I-R0) como las diluidas con Bioxcell®. Asimismo los grupos P-R24 presentaron un menor valor ($p < 0,05$), excepto para la ALH y la BCF, en los que no se observaron diferencias estadísticas. En el grupo P-R48, únicamente aparecieron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la VCL para grupo diluido con Bioxcell®, y en la BCF para ambos diluyentes, al compararlas con las muestras iniciales.

5.1.2.1.2. MORFOLOGÍA

Cuando se evaluó la morfología mediante la tinción de Eosina-Nigrosina se observó, para ambos diluyentes, una disminución significativa ($p < 0,05$), proporcional al tiempo de conservación, en el porcentaje de células normales en las muestras de los grupos P-R24 y P-R48 en relación al grupo P-R0 (Figura nº 5.7).

Las alteraciones en la cabeza, la presencia de cabezas sueltas y los daños en la pieza intermedia, presentaron porcentajes más elevados ($p < 0,05$) en los grupos P-R48 que en los grupos P-R0 y P-R24, de ambos diluyentes.

Las anomalías de cola no mostraron diferencias estadísticas ($p > 0,05$) entre los grupos P-R24 y P-R48, independientemente del diluyente utilizado, pero con porcentajes significativamente superiores ($p < 0,05$) a los reseñados para el grupo P-R0 (Figura nº 5.7).

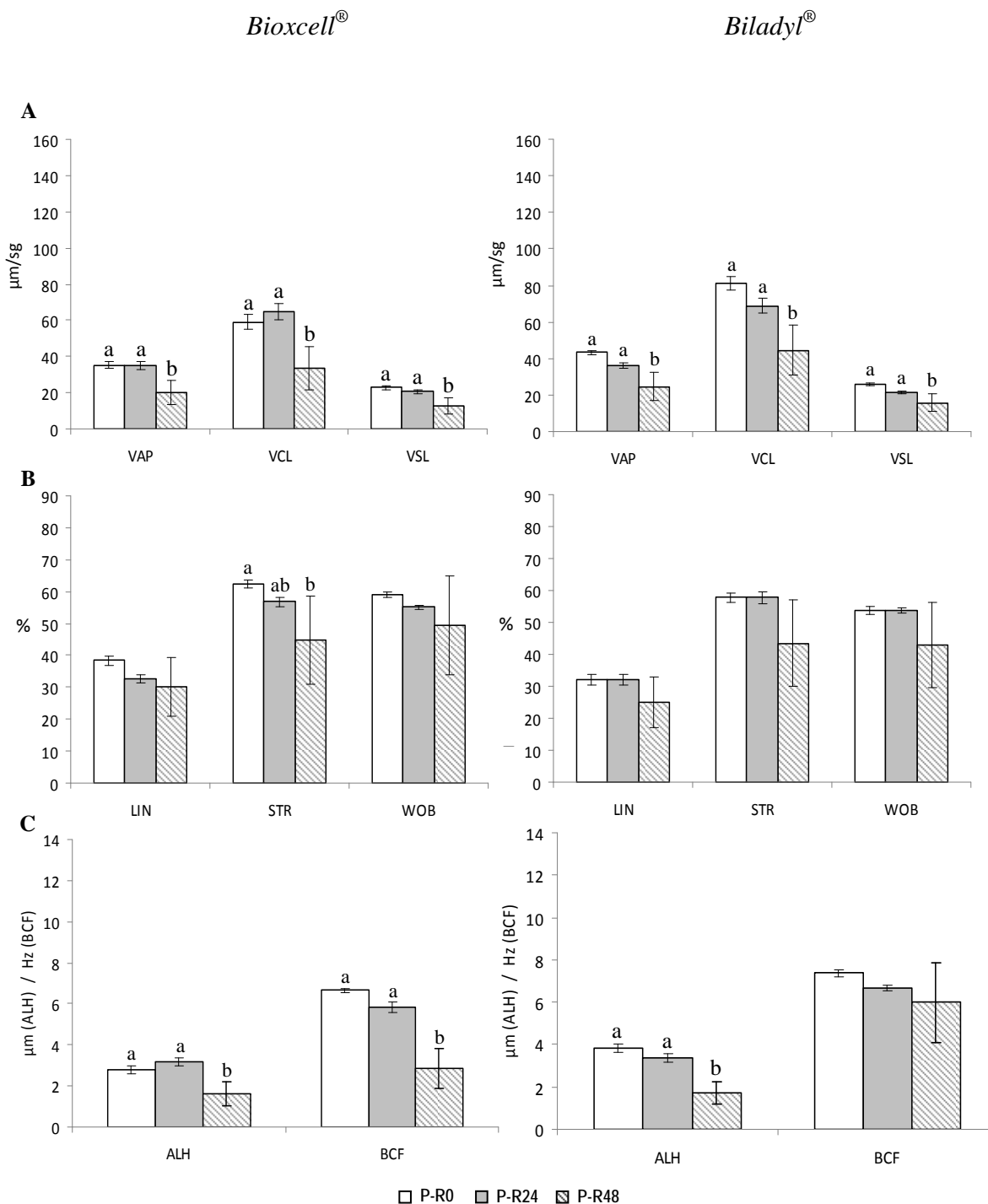


Figura nº 5.6. Influencia del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, durante la pre congelación, en los parámetros cinéticos, evaluados con el sistema CASA. **A.** VAP: velocidad media; VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad rectilínea. **B.** LIN: índice de linealidad; STR: índice de rectitud; WOB: índice de oscilación de la cabeza. **C.** ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide; BCF: frecuencia de batido del flagelo. Los datos se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Letras distintas indican diferencias significativas (a, b; p<0,05).

Tabla 5.2. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante la pre congelación, en los diferentes parámetros cinéticos de calidad seminal.

	VAP	VCL	VSL	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
I-R0	70,10±3,01 a	96,35±3,92 a	55,52±3,24 a	52,33±2,20 a	70,34±1,92 a	70,16±1,79 a	3,34±0,13 b	7,21±0,48
P-R0Bx	35,12±3,01 b	59,03±3,92 c	22,81±3,24 b	38,34±2,20 b	62,44±1,92 b	59,20±1,79 b	2,78±0,13 c	6,66±0,48
P-R0By	43,15±3,01 b	80,95±3,92 b	25,80±3,24 b	32,08±2,20 b	57,71±1,92 b	53,64±1,79 c	3,81±0,13 a	7,37±0,48
I-R24	64,10±3,01 a	91,94±3,92 a	47,43±3,24 a	48,06±2,20 a	66,64±1,92 a	67,30±1,79 a	3,38±0,13	6,99±0,48
P-R24Bx	34,92±3,01 b	64,76±3,92 b	20,57±3,24 b	32,45±2,20 b	56,82±1,92 b	55,09±1,79 b	3,38±0,13	5,81±0,48
P-R24By	36,12±3,01 b	68,85±3,92 b	21,37±3,24 b	32,09±2,20 b	57,71±1,92 b	53,57±1,79 b	3,38±0,13	6,66±0,48
I-R48	26,57±3,01	48,08±3,92 a	18,96±3,24	28,90±2,20	47,62±1,92	44,31±1,79 a,b	1,78±0,13	8,49±0,48 a
P-R48Bx	19,99±3,01	33,73±3,92 b	12,57±3,24	30,15±2,20	44,66±1,92	49,39±1,79 a	1,62±0,13	2,86±0,48 c
P-R48By	24,47±3,01	44,51±3,92 a,b	15,63±3,24	24,94±2,20	43,37±1,92	42,89±1,79 b	1,70±0,13	6,00±0,48 b

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Para cada tiempo de conservación de los epidídimos, índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b,c: p<0,05).

VAP: velocidad media; **VCL:** velocidad curvilínea; **VSL:** velocidad rectilínea; **LIN:** índice de linealidad; **STR:** índice de rectitud; **WOB:** índice de oscilación de la cabeza; **ALH:** amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide; **BCF:** frecuencia de batido del flagelo.

I-R0: Muestras sin refrigeración *postmortem* y sin adición de diluyente, recién extraídas del epidídimo.

P-R0Bx: Muestras sin refrigeración *postmortem*, diluidas con Bioxcell® y completada la rampa de refrigeración.

P-R0By: Muestras sin refrigeración *postmortem*, diluidas con Biladyl® y completada la rampa de refrigeración.

I-R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem* y sin adición de diluyente, recién extraídas del epidídimo.

P-R24Bx: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*, diluidas con Bioxcell® y completada la rampa de refrigeración.

P-R24By: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*, diluidas con Biladyl® y completada la rampa de refrigeración.

I-R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem* y sin adición de diluyente, recién extraídas del epidídimo.

P-R48Bx: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*, diluidas con Bioxcell® y completada la rampa de refrigeración.

P-R48By: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*, diluidas con Biladyl® y completada la rampa de refrigeración.

Al contrastar la influencia de los diluyentes sobre la morfología del semen en las muestras pre congeladas (P) y de éstas sobre las muestras iniciales (I) (Tabla 5.3), se encontró que:

En general, no existieron diferencias significativas en los diferentes parámetros morfológicos estudiados, para ningún grupo, entre ambos diluyentes. La única excepción correspondió a los grupos P-R24, en los que el número de alteraciones de cabeza fue superior (p<0,05) en las muestras diluidas con Biladyl®.

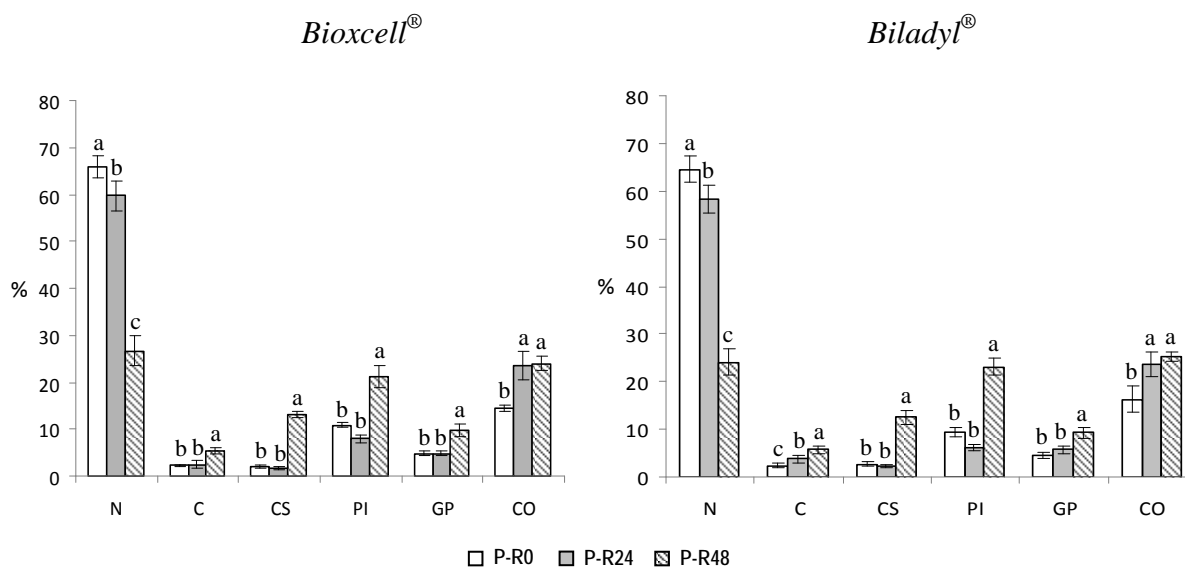


Figura n° 5.7. Influencia del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, durante la pre congelación, en las características de morfología. N: % de espermatozoides normales; C: % de espermatozoides con alteración en la cabeza; CS: % de espermatozoides con cabeza suelta; PI: % de espermatozoides con alteración en la pieza intermedia; GP: % de espermatozoides con presencia de gota proximal; CO: % de espermatozoides con alteración en la cola. Los datos se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Letras distintas indican diferencias significativas (a, b, c: $p < 0,05$).

En las muestras correspondientes a los grupos P-R0, y en ambos diluyentes, se observó un porcentaje similar de espermatozoides normales y con alteraciones de cabeza, pieza intermedia, cola y presencia de gota citoplasmática, al compararlas con el grupo I-R0. Solo se aparecieron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el grupo P-R0By, que mostró valores más elevados de cabeza suelta.

En los grupos P-R24 (Bx y By), los porcentajes de espermatozoides normales, con presencia de cabeza suelta, con anomalías de cola y de cabeza, fueron semejantes al grupo I-R24. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en las alteraciones de la pieza intermedia entre los grupos P-R24By e I-R24, y en la presencia de gota citoplasmática entre los grupos P-R24Bx e I-R24.

Al analizar las muestras de los grupos P-R48, se puso de manifiesto que los porcentajes de espermatozoides normales mostraron valores significativamente ($p < 0,05$) más altos que las muestras iniciales (I-R48), tanto en el grupo diluido con Bioxcell® (P-R48Bx) como en el diluido con Biladyl® (P-R48By), sin diferencias estadísticas entre ellos. De igual forma en estos dos últimos grupos, respecto al grupo I-R48, se apreció una disminución significativa ($p < 0,05$) en los porcentajes de anomalías de la pieza intermedia, sin que existieran diferencias estadísticas ($p > 0,05$) entre ellos.

Los valores obtenidos para las alteraciones de cabeza, de cabeza suelta, presencia de gota citoplasmática y las anomalías de cola, no mostraron diferencias estadísticas ($p>0,05$) entre ninguno de los grupos de 48 horas.

Tabla 5.3. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante la precongelación, en las características de morfología espermática.

	N	C	CS	PI	GP	CO
I-R0	64,50±1,76	1,72±0,44	1,06±0,55 b	10,72±0,89	4,88±0,64	17,03±1,46
P-R0Bx	65,88±1,76	2,19±0,44	1,91±0,55 a,b	10,84±0,89	4,75±0,64	14,41±1,46
P-R0By	64,50±1,76	2,38±0,44	2,75±0,55 a	9,47±0,89	4,50±0,64	16,34±1,46
I-R24	58,63±1,76	3,42±0,44 a,b	0,67±0,55	9,31±0,89 a	6,75±0,64 a	21,13±1,46
P-R24Bx	59,75±1,76	2,41±0,44 b	1,00±0,55	7,94±0,89 a,b	4,75±0,64 b	23,50±1,46
P-R24By	58,38±1,76	3,79±0,44 a	2,17±0,55	6,19±0,89 b	5,75±0,64 a,b	23,63±1,46
I-R48	17,95±1,76 b	6,04±0,44	13,92±0,55	27,38±0,89 a	8,88±0,64	25,93±1,46
P-R48Bx	26,50±1,76 a	5,38±0,44	13,13±0,55	21,08±0,89 b	9,75±0,64	23,89±1,46
P-R48By	24,13±1,76 a	5,69±0,44	12,50±0,55	23,14±0,89 b	9,25±0,64	25,24±1,46

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Para cada tiempo de conservación de los epidídimos, índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b: $p<0,05$).

N: % de espermatozoides normales; **C:** % de espermatozoides con alteración en la cabeza; **CS:** % de espermatozoides con cabeza suelta; **PI:** % de espermatozoides con alteración en la pieza intermedia; **GP:** % de espermatozoides con presencia de gota proximal; **CO:** % de espermatozoides con alteración en la cola.

I-R0: Muestras sin refrigeración *postmortem* y sin adición de diluyente, recién extraídas del epidídimo.

P-R0Bx: Muestras sin refrigeración *postmortem*, diluidas con Bioxcell® y completada la rampa de refrigeración.

P-R0By: Muestras sin refrigeración *postmortem*, diluidas con Biladyl® y completada la rampa de refrigeración.

I-R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem* y sin adición de diluyente, recién extraídas del epidídimo.

P-R24Bx: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*, diluidas con Bioxcell® y completada la rampa de refrigeración.

P-R24By: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*, diluidas con Biladyl® y completada la rampa de refrigeración.

I-R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem* y sin adición de diluyente, recién extraídas del epidídimo.

P-R48Bx: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*, diluidas con Bioxcell® y completada la rampa de refrigeración.

P-R48By: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*, diluidas con Biladyl® y completada la rampa de refrigeración.

5.1.2.1.3. INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

5.1.2.1.3.1. PRUEBA DE ENDÓSMOSIS CELULAR

Al evaluar la integridad de la membrana plasmática durante la precongelación, para ambos diluyentes, la viabilidad disminuyó ($p<0,05$) a medida que aumentó el tiempo de conservación de los testículos (P-R0Bx: 92,50±2,53 % vs P-R24Bx: 83,50±2,53 % vs P-R48Bx: 70,89±2,53 %; P-R0By: 91,16±2,53 % vs

P-R24By: $82,94 \pm 2,53$ % vs P-R48By: $77,74 \pm 2,53$ %), pero sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre diluyentes, ni entre las muestras iniciales y las muestras precongeladas diluidas tanto con Bioxcell[®] como con Biladyl[®] (Tabla 5.4).

5.1.2.1.3.2. COMBINACIÓN DE FLUOROCROMOS (IP/PNA)

Cuando se realizó el estudio conjunto de la viabilidad y la funcionalidad del acrosoma en función del tiempo de almacenamiento *postmortem* (Figura n° 5.8) se encontró, en las muestras diluidas con Bioxcell[®], un menor porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática y acrosomal funcionales (IP-/PNA-) en el grupo P-R48, con significación ($p < 0,05$) respecto a los grupos P-R0 y P-R24, sin que ambos mostraran diferencias estadísticas ($p > 0,05$) entre ellos.

De igual forma, con este mismo diluyente, la proporción de espermatozoides muertos con acrosoma íntegro (IP+/PNA-) se incrementó ($p < 0,05$) al aumentar el tiempo de conservación. Por el contrario, el diluyente Biladyl[®], no tuvo ningún efecto sobre los parámetros señalados, independientemente del tiempo de conservación.

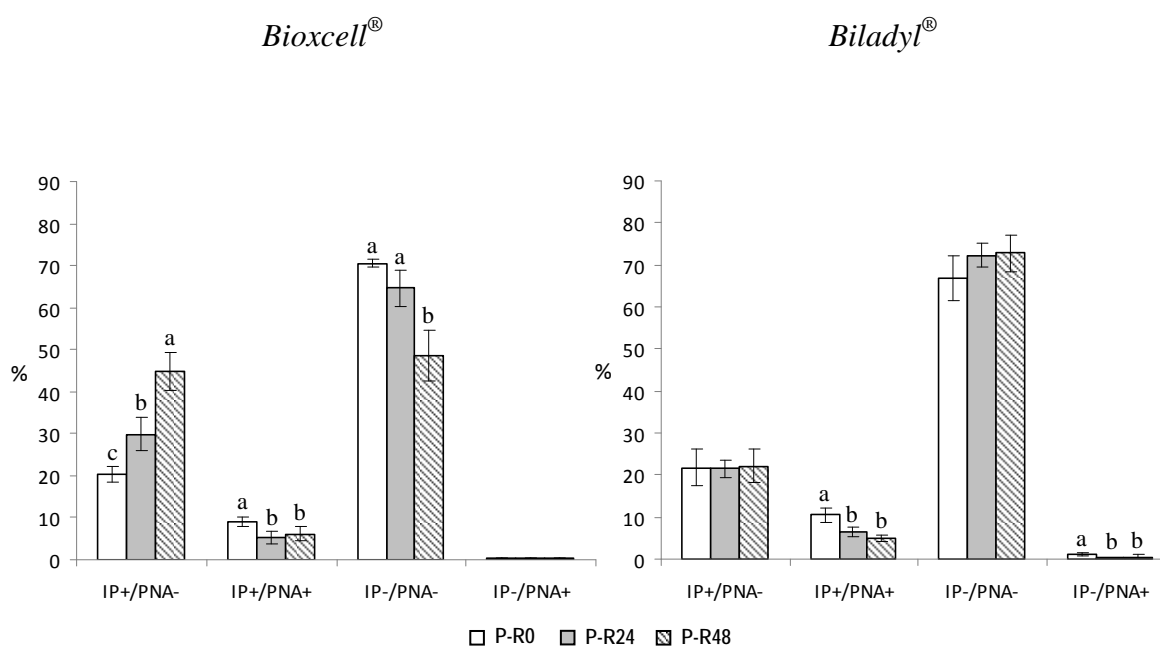


Figura n° 5.8. Influencia del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell[®] o Biladyl[®]) del semen epididimario, durante la precongelación, en la viabilidad e integridad del acrosoma evaluados mediante citometría de flujo. IP: yoduro de propidio; PNA-FITC: PNA conjugado con isotiocianato de fluoresceína. IP+/PNA-: % de espermatozoides muertos con acrosomas normales; IP+/PNA+: % de espermatozoides muertos con acrosomas alterados; IP-/PNA-: % de espermatozoides vivos con acrosomas normales; IP-/PNA+: % de espermatozoides vivos con acrosomas alterados. Los datos se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS \pm ES. Letras distintas indican diferencias significativas (a, b, c: $p < 0,05$).

Tabla 5.4. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante la pre congelación, en la integridad de la membrana plasmática y acrosomal.

	HOS+	IP+/PNA-	IP+/PNA+	IP-/PNA-	IP-/PNA+	GL
I-R0	91,16±2,53	18,45±4,07	10,15±1,22	70,85±4,65	0,56±0,18 a,b	77,00±1,96 a
P-R0Bx	92,50±2,53	20,21±4,07	8,97±1,22	70,55±4,65	0,26±0,18 b	73,50±1,96 a,b
P-R0By	91,16±2,53	21,72±4,07	10,44±1,22	66,83±4,65	1,05±0,18 a	71,03±1,96 b
I-R24	78,32±2,53	27,75±4,07	8,48±1,22	62,90±4,65	0,87±0,18 a	68,13±1,96 a
P-R24Bx	83,50±2,53	29,84±4,07	5,32±1,22	64,62±4,65	0,24±0,18 b	48,53±1,96 c
P-R24By	82,94±2,53	21,46±4,07	6,40±1,22	72,20±4,65	0,25±0,18 b	59,42±1,96 b
I-R48	70,79±2,53	40,89±4,07 a	6,27±1,22	51,52±4,65 b	1,32±0,18 a	38,50±1,96 a
P-R48Bx	70,89±2,53	44,78±4,07 a	6,21±1,22	48,67±4,65 b	0,34±0,18 b	26,88±1,96 b
P-R48By	77,74±2,53	22,15±4,07 b	4,95±1,22	72,81±4,65 a	0,52±0,18 b	32,00±1,96 b

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Para cada tiempo de conservación de los epidídimos, índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b,c: $p<0,05$).

GL: % de espermatozoides con acrosomas normales; **HOS+:** % de espermatozoides vivos; **IP+/PNA-:** % espermatozoides muertos con acrosomas normales; **IP+PNA+:** % de espermatozoides muertos con acrosomas alterados; **IP-/PNA-:** % de espermatozoides vivos con acrosomas normales; **IP-/PNA+:** % de espermatozoides vivos con acrosomas alterados.

I-R0: Muestras sin refrigeración *postmortem* y sin adición de diluyente, recién extraídas del epidídimo.

P-R0Bx: Muestras sin refrigeración *postmortem*, diluidas con Bioxcell® y completada la rampa de refrigeración.

P-R0By: Muestras sin refrigeración *postmortem*, diluidas con Biladyl® y completada la rampa de refrigeración.

I-R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem* y sin adición de diluyente, recién extraídas del epidídimo.

P-R24Bx: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*, diluidas con Bioxcell® y completada la rampa de refrigeración.

P-R24By: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*, diluidas con Biladyl® y completada la rampa de refrigeración.

I-R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem* y sin adición de diluyente, recién extraídas del epidídimo.

P-R48Bx: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*, diluidas con Bioxcell® y completada la rampa de refrigeración.

P-R48By: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*, diluidas con Biladyl® y completada la rampa de refrigeración.

Con los dos diluyentes utilizados, el mayor porcentaje ($p<0,05$) de espermatozoides muertos con acrosomas alterados (IP+/PNA+) apareció en el grupo P-R0. Además, en este grupo y con el diluyente Biladyl®, se observó un aumento ($p<0,05$) de espermatozoides vivos con acrosomas dañados (IP-/PNA+), aunque por los valores obtenidos podríamos considerar que estos datos son despreciables.

Al estudiar el efecto del diluyente (Tabla 5.4), no se encontraron diferencias entre los mismos para los grupos P-R0 y P-R24, excepto en las muestras de espermatozoides vivos con acrosomas dañados (IP-/PNA+) del grupo P-R0, donde esta alteración alcanzó una mayor proporción ($p<0,05$) en las muestras diluidas con Biladyl®

en relación al otro diluyente. Tras la utilización de Bioxcell[®] en las muestras mantenidas 48 horas, se observó un mayor porcentaje ($p < 0,05$) de espermatozoides muertos y una menor proporción de espermatozoides vivos, ambos con acrosomas funcionales (IP+/PNA- y IP-/PNA- respectivamente), en relación a las muestras del mismo grupo pero diluidas con Biladyl[®].

Solo, al comparar estos valores con los obtenidos en las muestras iniciales (I) (Tabla 5.4), observamos que el grupo P-R48By, respecto a los grupos I-R48 presentó valores significativamente ($p < 0,05$) más bajos de espermatozoides muertos con acrosomas funcionales (IP+/PNA-) y más elevados de espermatozoides vivos con acrosomas funcionales (IP-/PNA-). Además, los grupos diluidos con Bioxcell[®] o con Biladyl[®], independientemente del tiempo de conservación *postmortem* de los testículos, mostraron porcentajes significativamente más bajos ($p < 0,05$) de espermatozoides vivos con acrosomas alterados (IP-/PNA+), excepto el grupo P-R0By, cuyos valores fueron similares ($p > 0,05$) a los del grupo I-R0.

5.1.2.1.4. INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA ACROSÓMICA

5.1.2.1.4.1. BL-1 CON GLUTARALDEHÍDO TAMPONADO AL 2 %

El porcentaje de acrosomas íntegros, fijando los espermatozoides con BL-1+Glutaraldehído tamponado al 2 %, disminuyó significativamente ($p < 0,05$) a medida que aumentó el tiempo de conservación *postmortem* de los testículos, mostrando los valores más bajos los grupos P-R48 (P-R0Bx: $73,50 \pm 1,96$ % vs P-R24Bx: $48,53 \pm 1,96$ % vs P-R48Bx: $26,88 \pm 1,96$ %; P-R0By: $71,03 \pm 1,96$ % vs P-R24By: $59,42 \pm 1,96$ % vs P-R48By: $32,00 \pm 1,96$ %).

El diluyente Biladyl[®] demostró ser más eficaz que el Bioxcell[®] en los grupos que fueron sometidos a conservación *postmortem* durante 24 y 48 horas, observando incrementos significativos ($p < 0,05$) en el grupo P-R24 (Tabla nº 5.4).

Al comparar los datos obtenidos con las muestras iniciales (I), se han encontrado valores significativamente ($p < 0,05$) más bajos en las muestras precongeladas (P), independientemente del diluyente utilizado. La única excepción se refirió al grupo P-R0Bx, donde no se apreciaron diferencias estadísticas ($p > 0,05$) (Tabla 5.4).

5.1.2.2. DESCONGELACIÓN

5.1.2.2.1. MOVILIDAD ESPERMÁTICA

5.1.2.2.1.1. MOVILIDAD INDIVIDUAL Y PROGRESIVA

Al analizar la movilidad espermática en el momento de la descongelación, se comprobó que los porcentajes de movilidad individual (MO y MI) y de movilidad progresiva (MP) se redujeron significativamente ($p < 0,05$), y de forma directamente proporcional al tiempo de almacenamiento *postmortem* de los testículos (Figura nº 5.9).

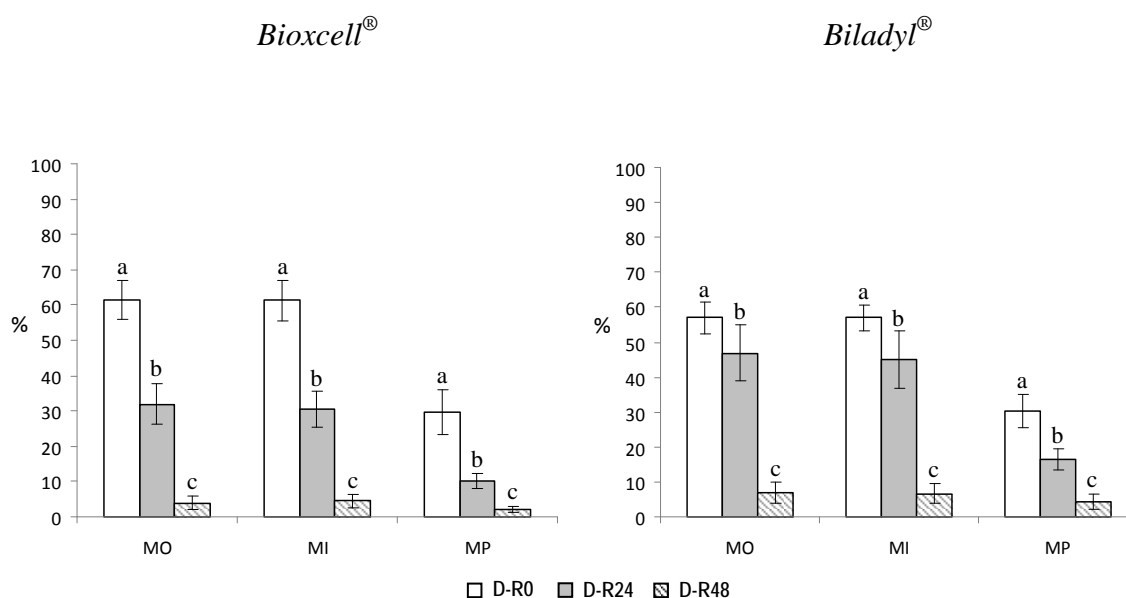


Figura nº 5.9. Influencia del tiempo de conservación *postmortem* del epididimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, durante el proceso de congelación-descongelación, en el porcentaje de movilidad individual y progresiva. MO: % de movilidad individual, evaluada en el microscopio de contraste de fases; MI: % de movilidad individual y MP: % de movilidad progresiva, evaluadas con el sistema CASA. Los datos se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Letras distintas indican diferencias significativas (a, b, c: $p < 0,05$).

Los resultados obtenidos, al comparar ambos diluyentes (Tabla 5.5), pusieron de manifiesto que el diluyente Bioxcell® incrementó ($p < 0,05$) los parámetros MO y MI en el grupo D-R0 en relación al diluyente Biladyl®, mientras que en el grupo D-R24, el comportamiento de ambos diluyentes fue el inverso. En la MP se observaron datos significativamente superiores ($p < 0,05$) para los grupos D-R24By y D-R48By, comparados con sus homólogos del otro diluyente.

Tabla 5.5. Efecto del medio de dilución (Bioxccl[®] o Biladyl[®]), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante el proceso de congelación-descongelación, en la movilidad espermática individual y progresiva.

	MO	MI	MP
P-R0Bx	62,50±2,32 b	68,37±2,52 b	16,34±1,33 b
P-R0By	83,12±2,32 a	84,82±2,52 a	18,11±1,33 b
D-R0Bx	61,06±0,96 b	61,32±0,92 c	29,69±0,86 a
D-R0By	56,97±0,96 c	57,01±0,92 d	30,27±0,86 a
P-R24Bx	51,71±2,32 b	52,76±2,52 b	6,71±1,33 c
P-R24By	71,25±2,32 a	72,27±2,52 a	12,86±1,33 b
D-R24Bx	31,97±0,96 c	30,66±0,92 d	10,09±0,86 b
D-R24By	46,87±0,96 b	45,00±0,92 c	16,33±0,86 a
P-R48Bx	7,68±2,32 a,b	7,12±2,52 a,b	1,87±1,33 a,b
P-R48By	12,62±2,32 a	12,17±2,52 a	2,38±1,33 a,b
D-R48Bx	5,00±0,96 b	4,60±0,92 b	2,22±0,86 b
D-R48By	6,85±0,94 b	6,64±0,90 b	4,29±0,79 a

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Para cada tiempo de conservación de los epidídimos, índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b,c,d: p<0,05).

MO: % de movilidad individual evaluada en el microscopio de contraste de fases; **MI:** % de movilidad individual y **MP:** % de movilidad progresiva, evaluadas con el sistema CASA.

R0: Muestras sin refrigeración *postmortem*.

R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*.

R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*.

P-Bx: Muestras diluidas con Bioxccl[®] y completada la rampa de refrigeración.

D-Bx: Muestras diluidas con Bioxccl[®], congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

P-By: Muestras diluidas con Biladyl[®] y completada la rampa de refrigeración.

D-By: Muestras diluidas con Biladyl[®], congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

Al analizar los resultados obtenidos durante el proceso de congelación-descongelación (D) con los de precongelado (P) (Tabla 5.5), en los diferentes grupos de conservación (D-R0, D-R24 y D-R48), para los diluyentes (Bioxccl[®] y Biladyl[®]), se observó que el proceso de congelación-descongelación provocó una disminución de la movilidad individual (MO y MI), en todos los tiempos de conservación *postmortem* de los epidídimos, siendo significativa (p<0,05) para los tiempos R0 y R24 de ambos diluyentes y para el grupo D-R48By. Por el contrario, la movilidad progresiva (MP) aumentó en las muestras descongeladas, independientemente del diluyente utilizado. Este incremento se comprobó para todos los tiempos de conservación *postmortem* de los testículos, pero de la misma forma solo fue significativo (p<0,05) para los grupos R0 y R24 de ambos diluyentes.

5.1.2.2.1.2. PARÁMETROS CINÉTICOS ESPERMÁTICOS

El estudio de los parámetros cinéticos, como característica de calidad seminal, puso de manifiesto que la descongelación de las muestras provocó, en general, un descenso significativo ($p < 0,05$) de dichos parámetros a medida que aumentó el tiempo de conservación *postmortem* de los testículos, e independientemente del diluyente utilizado (Bioxcell® o Biladyl®). Solo el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), en ambos diluyentes, no registró diferencias estadísticas ($p > 0,05$) entre los grupos D-R0 y D-R24, pero sí entre estos y el D-R48 (Figura nº 5.10 A, B y C).

Cuando se evaluó el efecto del diluyente (Tabla 5.6) se observó que los valores más altos se obtuvieron cuando las muestras fueron diluidas con Bioxcell®, a excepción de la amplitud del desplazamiento de la cabeza (ALH) y de la frecuencia de batido del flagelo (BCF) en el grupo D-R0, de la frecuencia de batido en el D-R24 y de los índices de rectitud (STR) y de oscilación de la cabeza (WOB) en el D-R48, en los cuales no encontramos diferencias significativas ($p > 0,05$).

Al contrastar los resultados obtenidos tras la descongelación (D) con los datos de precongelado (P) (Tabla 5.6) se observó que, en general, con ambos diluyentes los resultados del D-R0 eran superiores ($p < 0,05$) a las muestras precongeladas, excepto en la ALH, del grupo Biladyl®, donde no se evidenciaron diferencias estadísticas ($p > 0,05$).

Se apreciaron resultados similares con el diluyente Bioxcell®, con valores más elevados ($p < 0,05$) para las muestras descongeladas en relación a las precongeladas, en los grupos R24 y R48, excepto para los índices de linealidad (LIN), de rectitud (STR) y de frecuencia de batido de flagelo (BCF) de este segundo grupo, donde no se encontraron diferencias significativas.

Tampoco se encontró significación estadística ($p > 0,05$) en la mayoría de los parámetros cinéticos para el diluyente Biladyl®, en los grupos D-R24 y D-R48, a excepción del índice de rectitud (STR) en el grupo D-R24 que fue superior ($p < 0,05$) al señalado para las muestras precongeladas.

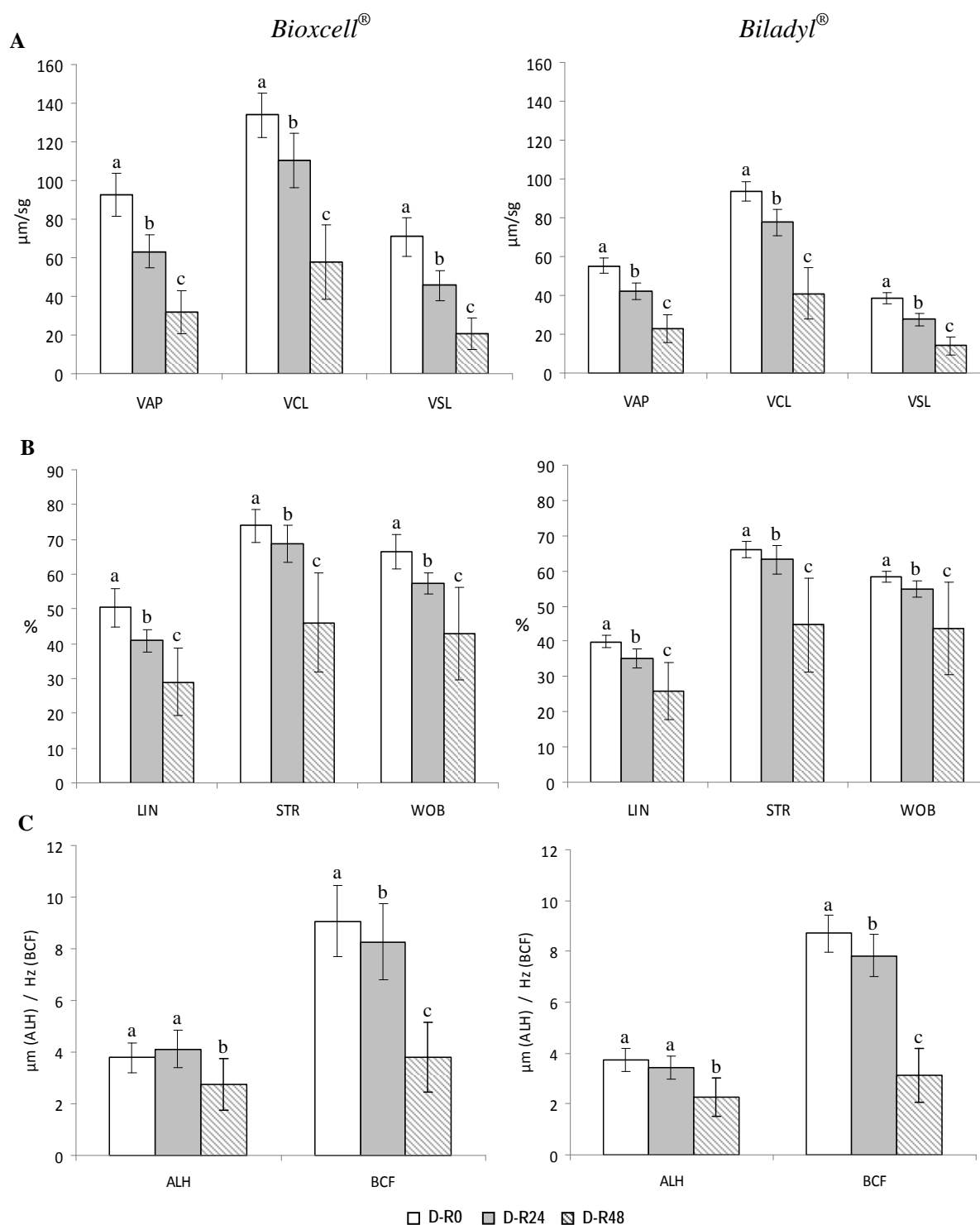


Figura nº 5.10. Influencia del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, durante el proceso de congelación-descongelación, en los parámetros cinéticos, evaluados con el sistema CASA. **A.** VAP: velocidad media; VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad rectilínea. **B.** LIN: índice de linealidad; STR: índice de rectitud; WOB: índice de oscilación de la cabeza. **C.** ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide; BCF: frecuencia de batido del flagelo. Los datos se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Letras distintas indican diferencias significativas (a, b: $p < 0,05$).

Tabla 5.6. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante el proceso de congelación-descongelación, en los diferentes parámetros cinéticos de calidad seminal.

	VAP	VCL	VSL	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
P-R0Bx	35,12±3,01 d	59,03±3,92 d	22,81±3,24 c	38,34±2,20 b	62,44±1,92 b,c	59,20±1,79 b,c	2,78±0,13 b	6,66±0,48 b
P-R0By	43,15±3,01 c	80,95±3,92 c	25,80±3,24 c	32,08±2,20 c	57,71±1,92 c	53,64±1,79 c	3,81±0,13 a	7,37±0,48 b
D-R0Bx	92,51±1,52 a	133,83±2,17 a	70,97±1,30 a	50,35±0,85 a	73,90±1,01 a	66,40±0,81 a	3,78±0,14 a	9,06±0,23 a
D-R0By	55,21±1,52 b	93,75±2,17 b	38,37±1,30 b	39,96±0,85 b	66,15±1,01 b	58,34±0,81 b	3,73±0,14 a	8,70±0,23 a
P-R24Bx	34,92±3,01 b	64,76±3,92 c	20,57±3,24 c	32,45±2,20 b	56,82±1,92 c	55,09±1,79 b,c	3,38±0,13 b	5,81±0,48 c
P-R24By	36,12±3,01 b	68,85±3,92 b,c	21,37±3,24 b,c	32,09±2,20 b	57,71±1,92 c	53,57±1,79 b,c	3,38±0,13 a,b	6,66±0,48 b,c
D-R24Bx	63,08±1,52 a	110,33±2,17 a	45,77±1,30 a	40,88±0,85 a	68,70±1,01 a	57,44±0,81 a,c	4,10±0,14 a	8,27±0,23 a
D-R24By	42,02±1,52 b	77,57±2,17 b	27,60±1,30 b	35,06±0,85 b	63,19±1,01 b	54,69±0,81 b	3,44±0,14 b	7,83±0,23 a,b
P-R48Bx	19,99±3,01 b	33,73±3,92 b	12,57±3,24 b	30,15±2,20 a,b	44,66±1,92 a	49,39±1,79 a	1,62±0,13 b	2,86±0,48 b,c
P-R48By	24,47±3,01 b	44,51±3,92 b	15,63±3,24 a,b	24,94±2,20 a,b	43,37±1,92 a	42,89±1,79 b	1,70±0,13 b	6,00±0,48 a
D-R48Bx	32,01±1,52 a	58,05±2,17 a	20,71±1,30 a	28,91±0,85 a	46,13±1,01 a	42,86±0,81 b	2,74±0,14 a	3,81±0,23 b
D-R48By	22,78±1,43 b	40,89±1,96 b	14,18±1,22 b	25,96±0,83 b	44,75±0,97 a	43,60±0,84 b	2,25±0,13 b	3,14±0,20 c

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Para cada tiempo de conservación de los epidídimos, índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b,c,d: p<0,05).

VAP: velocidad media; **VCL:** velocidad curvilínea; **VSL:** velocidad rectilínea; **LIN:** índice de linealidad; **STR:** índice de rectitud; **WOB:** índice de oscilación de la cabeza; **ALH:** amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide; **BCF:** frecuencia de batido del flagelo.

R0: Muestras sin refrigeración *postmortem*.

R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*.

R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*.

P-Bx: Muestras diluidas con Bioxcell® y completada la rampa de refrigeración.

D-Bx: Muestras diluidas con Bioxcell®, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

P-By: Muestras diluidas con Biladyl® y completada la rampa de refrigeración.

D-By®: Muestras diluidas con Biladyl®, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

5.1.2.2.2. MORFOLOGÍA

Después de la descongelación, e independientemente del diluyente empleado (Bioxcell® o Biladyl®), se comprobó que a medida que aumentó el tiempo de conservación *postmortem* de los testículos, disminuyó de forma significativa (p<0,05) el porcentaje de espermatozoides normales y aumentó, también con significación estadística (p<0,05), el porcentaje de formas anormales (Figura n° 5.11).

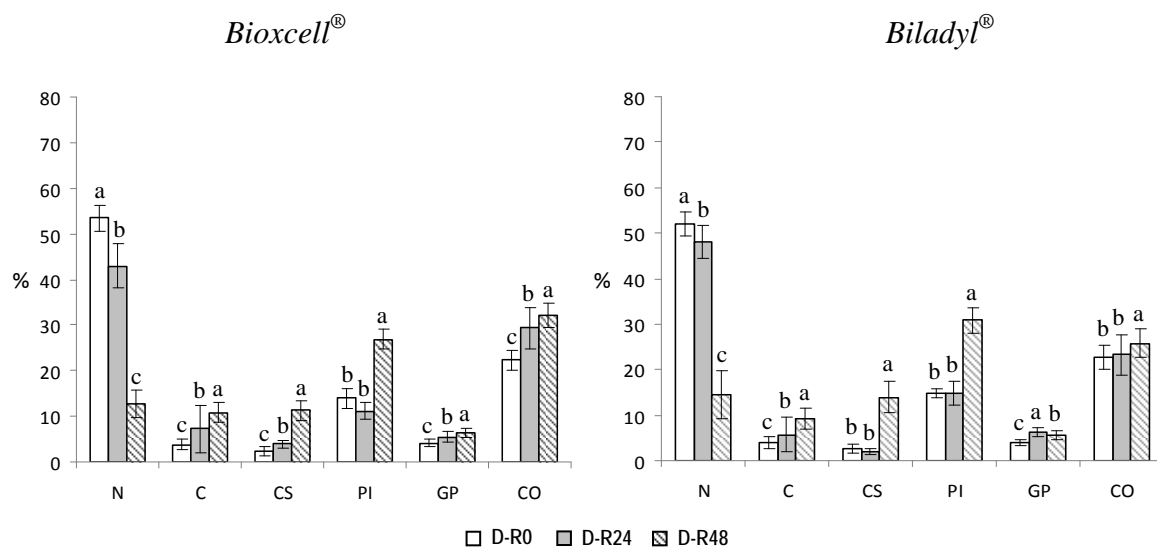


Figura nº 5.11. Influencia del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, durante el proceso de congelación-descongelación, en la morfología espermática. N: % de espermatozoides normales; C: % de espermatozoides con alteración en la cabeza; CS: % de espermatozoides con cabeza suelta; PI: % de espermatozoides con alteración en la pieza intermedia; GP: % de espermatozoides con presencia de gota proximal; CO: % de espermatozoides con alteración en la cola. Los datos se expresan como valores MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Letras distintas indican diferencias significativas (a, b, c: $p < 0,05$).

Al comparar los diluyentes (Bioxcell® vs Biladyl®) (Tabla 5.7), se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) de espermatozoides normales, para los grupos con 24 horas de conservación *postmortem* (R24) diluidos con Biladyl®, a la vez que disminuyeron ($p < 0,05$) las anomalías de cabeza, cola y presencia de cabezas sueltas y aumentaron las alteraciones de pieza intermedia y de gota citoplasmática proximal. En el grupo D-R48Bx se detectó una mayor incidencia ($p < 0,05$) de las alteraciones de cabeza, cola y gota proximal, siendo menores ($p < 0,05$) las anomalías de pieza intermedia y la presencia de cabezas sueltas.

Como cabría esperar, el efecto de la congelación-descongelación (Tabla 5.7) dio lugar a una disminución ($p < 0,05$) del porcentaje de espermatozoides normales para ambos diluyentes (Bioxcell® o Biladyl®) y en todos los tiempos de conservación, a excepción del grupo R24 donde no se encontraron diferencias estadísticas. De igual forma, las anomalías espermáticas se incrementaron significativamente ($p < 0,05$), para algunos de los parámetros, tras la descongelación. Así en el grupo D-R0 y para ambos diluyentes, las alteraciones de cola y de pieza intermedia (ésta también en el D-R24) fueron más abundantes mientras que en el grupo D-R24Bx aumentaron las anomalías de cabeza, cola y presencia de cabeza suelta. En el grupo D-R48 aparecieron mayores porcentajes de alteraciones de cabeza y pieza intermedia y menor presencia de gota

proximal, para ambos diluyentes, incrementando solo las de cola para el grupo D-R48Bx.

Tabla 5.7. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante el proceso de congelación-descongelación, en las características de morfología espermática.

	N	C	CS	PI	GP	CO
P-R0Bx	65,88±1,76 a	2,19±0,44	1,91±0,55	10,84±0,89 b	4,75±0,64	14,41±1,46 b
P-R0By	64,50±1,76 a	2,38±0,44	2,75±0,55	9,47±0,89 b	4,50±0,64	16,34±1,46 b
D-R0Bx	53,52±0,83 b	3,77±0,54	2,29±0,35	13,90±0,47 a	4,16±0,23	22,31±0,77 a
D-R0By	51,90±0,83 b	4,01±0,54	2,63±0,35	14,70±0,47 a	4,01±0,23	22,72±0,77 a
P-R24Bx	59,75±1,76 a,b	2,41±0,44 c	1,00±0,55 b	7,94±0,89 c	4,75±0,64 b	23,50±1,46 b
P-R24By	58,38±1,76 a,b	3,79±0,44 b,c	2,17±0,55 a,b	6,19±0,89 c	5,75±0,64 a,b	23,63±1,46 b
D-R24Bx	42,91±0,83 b	7,25±0,54 a	3,87±0,35 a	11,16±0,47 b	5,50±0,23 b	29,31±0,77 a
D-R24By	48,10±0,83 a	5,70±0,54 b	1,87±0,35 b	14,75±0,47 a	6,21±0,23 a	23,33±0,77 c
P-R48Bx	28,50±1,76 a	5,38±0,440 c	11,25±0,55 b	21,08±0,89 c	9,75±0,64 a	23,89±1,46 b
P-R48By	24,13±1,76 a	5,69±0,440 c	12,50±0,55 a,b	23,14±0,89 c	9,25±0,64 a	25,24±1,46 b
D-R48Bx	12,68±0,83 b	10,76±0,54 a	11,27±0,35 b	26,89±0,47 b	6,34±0,23 b	32,04±0,77 a
D-R48By	14,52±0,77 b	9,28±0,54 b	13,96±0,37 a	30,78±0,61 a	5,66±0,23 c	25,76±0,83 b

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Para cada tiempo de conservación de los epidídimos, índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b,c: p<0,05).

N: % de espermatozoides normales; **C:** % de espermatozoides con alteración en la cabeza; **CS:** % de espermatozoides con cabeza suelta; **PI:** % de espermatozoides con alteración en la pieza intermedia; **GP:** % de espermatozoides con presencia de gota proximal; **CO:** % de espermatozoides con alteración en la cola.

R0: Muestras sin refrigeración *postmortem*.

R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*.

R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*.

P-Bx: Muestras diluidas con Bioxcell® y completada la rampa de refrigeración.

D-Bx: Muestras diluidas con Bioxcell®, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

P-By: Muestras diluidas con Biladyl® y completada la rampa de refrigeración.

D-By: Muestras diluidas con Biladyl®, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

5.1.2.2.3. INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

5.1.2.2.3.1. PRUEBA DE ENDÓSMOSIS CELULAR

La viabilidad espermática, durante el proceso de congelación-descongelación en las muestras diluidas con Bioxcell®, experimentó un descenso (p<0,05) del porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra, a medida que aumentó el tiempo de conservación *postmortem* de los epidídimos (D-R0Bx: 68,18±1,08 % vs D-R24Bx: 52,97±1,08 % vs D-R48Bx: 36,52±1,08 %). Similar comportamiento se observó en los grupos diluidos con Biladyl® y aunque no presentaron diferencias

estadísticas ($p > 0,05$) los grupos D-R24 ($56,81 \pm 1,08$ %) y D-R48 entre sí ($54,63 \pm 1,08$ %), sí las mostraron con el grupo D-R0 ($62,96 \pm 1,08$ %).

De los diluyentes estudiados, el Bioxcell[®] obtuvo una mayor proporción ($p < 0,05$) de espermatozoides vivos en el grupo sin conservación *postmortem* (D-R0), mientras que en los grupos refrigerados durante 24 (D-R24) y 48 (D-R48) horas fue con el diluyente a base de yema de huevo con él que se consiguió un mayor ($p < 0,05$) porcentaje de espermatozoides vivos (Tabla 5.8).

El proceso de congelación-descongelación (D) de las muestras seminales, disminuyó ($p < 0,05$) el porcentaje de espermatozoides con integridad de membrana (HOS+: espermatozoides vivos), al contrastarlo con las muestras precongeladas (P) (Tabla 5.8), e independientemente del diluyente utilizado (Bioxcell[®] o Biladyl[®]).

5.1.2.2.3.2. COMBINACIÓN DE FLUOROCROMOS (IP/PNA)

Tras el análisis, mediante combinación de fluorocromos, se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) en la proporción de espermatozoides vivos con acrosomas funcionales (IP-/PNA-), a medida que aumentó el tiempo de conservación de los epidídimos (en las muestras diluidas con Bioxcell[®] y con Biladyl[®]), y de espermatozoides vivos con acrosomas alterados (IP-/PNA+), en las muestras diluidas con Bioxcell[®]. Y, de forma recíproca, e independientemente del diluyente empleado, a medida que se incrementó el tiempo de conservación de los epidídimos, aumentó el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosomas normales (IP+PNA-), con diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tres grupos para Bioxcell[®], mientras que para Biladyl[®] solo el grupo D-R48 presentó diferencias con respecto a los otros dos (Figura n° 5.12).

Al estudiar el efecto del diluyente en el proceso de congelación-descongelación (Tabla 5.8), se observó que las muestras diluidas con Biladyl[®] presentaron los mayores ($p < 0,05$) porcentajes de espermatozoides muertos con acrosoma funcional (IP+/PNA-) en el grupo D-R0 y de espermatozoides vivos con acrosoma alterado (IP-/PNA-) en los grupos D-R24 y D-R48. Por su parte, las muestras diluidas con Bioxcell[®] dieron lugar a los porcentajes más elevados ($p < 0,05$) de espermatozoides muertos con acrosoma normal (IP+/PNA-) en las muestras sometidas a refrigeración durante 24 y 48 horas, de espermatozoides muertos con acrosoma alterado (IP+/PNA+) en el grupo D-R48 y de espermatozoides vivos con acrosoma alterado (IP-/PNA+) en los grupos D-R0 y D-R24.

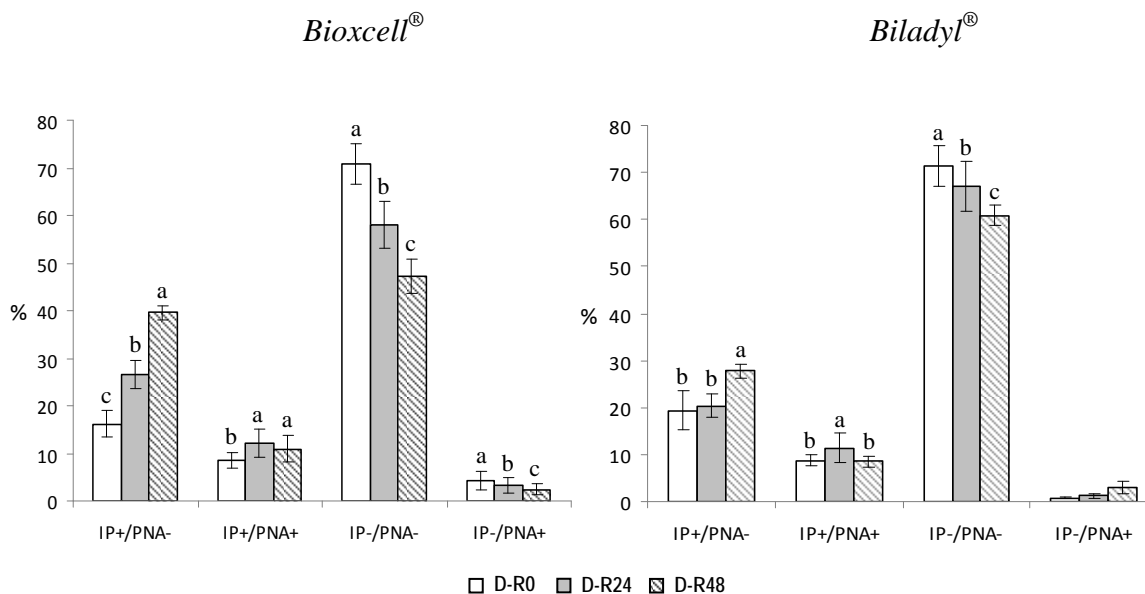


Figura nº 5.12. Influencia del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, durante el proceso de congelación-descongelación, en la viabilidad e integridad del acrosoma evaluados mediante citometría de flujo. IP: yoduro de propidio; PNA-FITC: PNA conjugado con isotiocianato de fluoresceína. IP+/PNA-: % de espermatozoides muertos con acrosomas normales; IP+/PNA+: % de espermatozoides muertos con acrosomas alterados; IP-/PNA-: % de espermatozoides vivos con acrosomas normales; IP-/PNA+: % de espermatozoides vivos con acrosomas alterados. Los datos se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Letras distintas indican diferencias significativas (a, b, c: $p < 0,05$).

Cuando se analizó el efecto de la congelación-descongelación (D), y se comparó con las muestras precongeladas (P) (Tabla 5.8), el porcentaje más elevado ($p < 0,05$) de espermatozoides vivos con acrosomas dañados (IP-/PNA+), apareció en los grupos diluidos con Bioxcell® y en el grupo D-R48 diluido con Biladyl®. En el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosomas íntegros (IP-/PNA-), no se observaron diferencias ($p > 0,05$) ni para las muestras de los epidídimos manipulados inmediatamente después del sacrificio del animal (R0), ni en las procedentes de epidídimos conservados 48 horas (R48), con una disminución significativa ($p < 0,05$), en los grupos D-R24, para ambos diluyentes.

Los grupos refrigerados durante 24 y 48 horas (R24 y R48 respectivamente) *postmortem*, independientemente del diluyente empleado, presentaron una mayor proporción ($p < 0,05$) de espermatozoides muertos con acrosoma alterado (IP+/PNA+) después de la descongelación. La proporción de espermatozoides muertos con acrosoma funcional (IP+/PNA-) fue mayor ($p < 0,05$) después de la descongelación, en los grupos diluidos con Bioxcell®, aumentando ($p < 0,05$) el porcentaje también en el grupos D-R48Bx.

Tabla 5.8. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante el proceso de congelación-descongelación, en la integridad de la membrana plasmática y acrosomal.

	HOS+	IP+/PNA-	IP+/PNA+	IP-/PNA-	IP-/PNA+	GL
P-R0Bx	92,50±2,53 a	20,21±4,07 a	8,97±1,22	70,55±4,65	0,26±0,18 b	73,50±1,96 a
P-R0By	91,16±2,53 a	21,72±4,07 a	10,44±1,22	66,83±4,65	1,05±0,18 b	71,03±1,96 a
D-R0Bx	68,18±1,08 b	16,20±0,71 b	8,53±0,47	70,92±1,02	4,33±0,55 a	45,51±1,16 c
D-R0By	62,96±1,08 c	19,37±0,71 a	8,68±0,47	71,22±1,02	0,71±0,55 b	53,07±1,16 b
P-R24Bx	83,50±2,53 a	29,84±4,07 a	5,32±1,22 b	64,62±4,65 b	0,24±0,18 b	48,53±1,96 b,c
P-R24By	82,94±2,53 a	21,46±4,07 c	6,40±1,22 b	72,20±4,65 a	0,25±0,18 b	59,42±1,96 a
D-R24Bx	52,97±1,08 c	26,52±0,71 b	12,20±0,47 a	57,99±1,02 c	3,24±0,55 a	48,89±1,16 b
D-R24By	56,81±1,08 b	20,32±0,71 c	11,44±0,47 a	67,03±1,02 b	1,25±0,55 b	54,00±1,16 a,c
P-R48Bx	70,89±2,53 b	44,78±4,07 a	6,21±1,22 b,c	48,67±4,65 b	0,34±0,18 b	26,88±1,96 b
P-R48By	77,74±2,53 a	22,15±4,07 c	4,95±1,22 c	72,81±4,65 a	0,52±0,18 b	32,00±1,96 a,b
D-R48Bx	36,52±1,08 d	39,51±0,71 b	10,95±0,47 a	47,10±1,02 b	2,44±0,55 a	9,30±1,16 c
D-R48By	54,63±0,89 c	27,71±0,71 c	8,50±0,41 b	70,84±0,93 a	2,95±0,32 a	28,31±1,17 a

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Para cada tiempo de conservación de los epidídimos, índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b,c,d: p<0,05).

GL: % de espermatozoides con acrosomas normales; **HOS+:** % de espermatozoides vivos; **IP+/PNA-:** % de espermatozoides muertos con acrosomas normales; **IP+PNA+:** % de espermatozoides muertos con acrosomas alterados; **IP-/PNA-:** % de espermatozoides vivos con acrosomas normales; **IP-/PNA+:** % de espermatozoides vivos con acrosomas alterados.

R0: Muestras sin refrigeración *postmortem*.

R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*.

R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*.

P-Bx: Muestras diluidas con Bioxcell® y completada la rampa de refrigeración.

D-Bx: Muestras diluidas con Bioxcell®, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

P-By: Muestras diluidas con Biladyl® y completada la rampa de refrigeración.

D-By: Muestras diluidas con Biladyl®, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

5.1.2.2.4. INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA ACROSÓMICA

5.1.2.2.4.1. BL-1 TAMPONADO CON GLUTARALDEHÍDO AL 2 %

Al evaluar la integridad del acrosoma se observó que el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma íntegro disminuyó significativamente (p<0,05) en el grupo D-R48 de ambos diluyentes con respecto al resto de los grupos en estudio (D-R0Bx: 45,51±1,16 % vs D-R24Bx: 48,89±1,16 % vs D-R48Bx: 9,30±1,16 %; D-R0By: 53,07±1,16 % vs D-R24By: 54,00±1,16 % vs D-R48By: 28,31±1,16 %).

Al contrastar ambos diluyentes, los grupos diluidos con Biladyl® mostraron la mayor proporción de acrosomas normales (Tabla 5.8).

Tras la comparación entre las muestras descongeladas y las precongeladas, se apreció una disminución ($p < 0,05$) del porcentaje de acrosomas íntegros en los grupos D-R0, para ambos diluyentes (Bioxcell® o Biladyl®), mientras que cuando los epidídimos se conservaron 24 horas, no aparecieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras precongeladas y la descongeladas. Después de 48 horas de conservación *postmortem*, solo las muestras diluidas con Bioxcell® (D-R48Bx) presentaron un menor ($p < 0,05$) porcentaje de acrosomas íntegros (Tabla 5.8).

5.1.3. EXPERIMENTO 3.- Efecto del método de selección espermática en las características de calidad del semen epididimario, en relación al tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo y al medio de dilución espermática

5.1.3.1. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

Este parámetro, independientemente del método empleado para la selección espermática, disminuyó ($p < 0,05$) a medida que aumentó el tiempo de conservación de los epidídimos. Se obtuvieron valores más elevados ($p < 0,05$) cuando se utilizó el gradiente de densidad (GD) como método de selección, frente al “swim-up”. Con ambas técnicas de selección, se consiguieron los valores más altos de concentración espermática con el diluyente Biladyl® frente al Bioxcell®, aunque para el método “swim-up” del grupo R48 estas diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$) (Tabla 5.9)

Tabla 5.9. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante los procesos de selección espermática, “swim-up” o gradiente de densidad, en la concentración espermática.

[x10 ⁶ /ml]	Sw-Bx	Sw-By	GD-Bx	GD-By
R0	9,98±1,88 d,1	16,08±1,41 c,1	44,92±2,90 b,1	48,94±3,11 a,1
R24	6,95±2,34 d,2	12,86±2,91 c,2	29,65±7,05 b,2	39,37±6,06 a,2
R48	1,44±0,56 c,3	2,13±0,69 c,3	6,90±2,32 b,3	9,97±2,43 a,3

Los valores se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Números distintos en la misma columna e índices distintos en la misma fila, indican diferencias significativas (1,2,3: $p < 0,05$; a,b,c,d: $p < 0,05$).

R0: Muestras sin refrigeración *postmortem*.

R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*.

R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*.

Sw-Bx: Muestras de semen descongelada, diluida con Bioxcell® y seleccionadas mediante “swim-up”.

Sw-By: Muestras de semen descongelada, diluida con Biladyl® y seleccionadas mediante “swim-up”.

GD-Bx: Muestras de semen descongelada, diluida con Bioxcell® y seleccionadas mediante gradiente de densidad.

GD-By: Muestras de semen descongelada, diluida con Biladyl® y seleccionadas mediante gradiente de densidad.

5.1.3.2. “SWIM-UP”

5.1.3.2.1. MOVILIDAD

5.1.3.2.1.1. MOVILIDAD INDIVIDUAL Y PROGRESIVA

En las muestras seleccionadas mediante “swim-up”, tanto la movilidad individual (MO y MI) como la progresiva (MP), decreció significativamente ($p < 0,05$) a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento de los epidídimos, e independientemente del diluyente utilizado (Figura nº 5.13). Los valores más altos de MO, MI y MP se obtuvieron cuando se utilizó Biladyl® para las muestras sin conservación *postmortem* (R0) o refrigeradas durante 24 horas (R24), mientras que la movilidad progresiva, presentó porcentajes similares ($p > 0,05$) con los dos diluyentes en los grupos Sw-R24 y Sw-R48 (Tabla 5.10).

Al estudiar el efecto de la selección mediante “swim-up” (Sw), sobre el esperma descongelado (D) (Tabla 5.10), se comprobó un incremento de la movilidad, tanto individual como progresiva, independientemente del tiempo de conservación de los epidídimos y del diluyente utilizado para congelar las muestras.

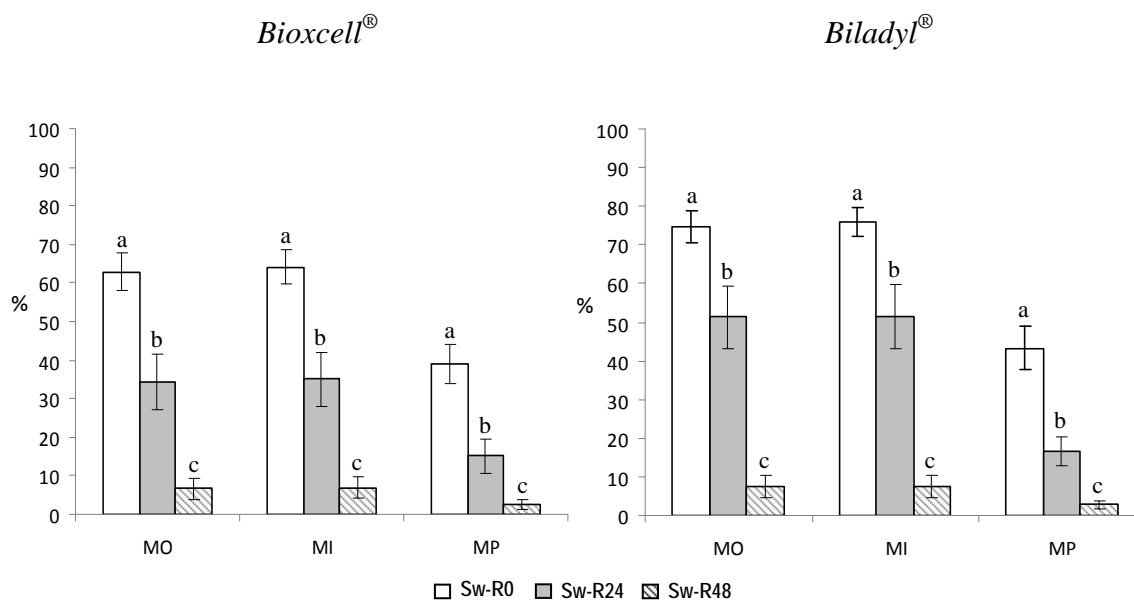


Figura nº 5.13. Influencia del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, en los porcentajes de movilidad individual y progresiva, empleando la técnica “swim-up” como método de selección espermática. MO: % de movilidad individual, evaluada en el microscopio de contraste de fases y MI: % de movilidad individual; MP: % de movilidad progresiva, evaluadas con el sistema CASA. Los datos se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Letras distintas indican diferencias significativas (a, b, c: $p < 0,05$).

Tabla 5.10. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante el proceso de selección espermática por "swim-up", en la movilidad espermática individual y progresiva.

	MO	MI	MP
D-R0Bx	61,56±0,96 b	61,32±0,92 c	29,69±0,86 c
D-R0By	56,97±0,96 c	57,01±0,92 d	30,27±0,86 c
Sw-R0Bx	62,91±0,96 b	64,18±0,92 b	39,04±0,86 b
Sw-R0By	74,58±0,96 a	75,78±0,92 a	43,30±0,86 a
D-R24Bx	31,97±0,96 c	30,66±0,92 d	10,09±0,86 b
D-R24By	46,87±0,96 b	45,00±0,92 b	16,33±0,86 a
Sw-R24Bx	34,37±0,96 c	34,98±0,92 c	15,17±0,86 a
Sw-R24By	51,25±0,96 a	51,57±0,92 a	16,74±0,86 a
D-R48Bx	5,00±0,96	4,60±0,92 b	2,22±0,86
D-R48By	6,85±0,94	6,64±0,90 a,b	4,29±0,79
Sw-R48Bx	6,61±0,96	6,86±0,92 a,b	2,51±0,86
Sw-R48By	7,40±0,96	7,45±0,92 a	2,84±0,86

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Para cada tiempo de conservación de los epidídimos, índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b,c,d: $p<0,05$).

MO: % de movilidad individual evaluada en el microscopio de contraste de fases; **MI:** % de movilidad individual y **MP:** % de movilidad progresiva, evaluadas con el sistema CASA.

R0: Muestras sin refrigeración *postmortem*.

R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*.

R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*.

D-Bx: Muestras diluidas con Bioxcell®, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

Sw-Bx: Muestras de semen descongelada, diluida con Bioxcell® y seleccionadas mediante "swim-up".

D-By: Muestras diluidas con Biladyl®, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

Sw-By: Muestras de semen descongelada, diluida con Biladyl® y seleccionadas mediante "swim-up".

5.1.3.2.1.2. PARÁMETROS CINÉTICOS ESPERMÁTICOS

El tiempo de conservación *postmortem* influyó sobre los parámetros cinéticos (Figura nº 5.14 A) tales como la velocidad media (VAP), la velocidad curvilínea (VCL) y la velocidad rectilínea (VSL), que disminuyeron ($p<0,05$) a medida que se incrementó el tiempo de conservación de los epidídimos, excepto la VCL en el grupo Sw-R24 diluido con Bioxcell®, que mostró valores similares a los del grupo Sw-R0.

Tanto en las muestras diluidas con Bioxcell®, como en las diluidas con Biladyl®, los índices de linealidad (LIN), rectitud (STR) y oscilación de la cabeza (WOB), fueron menores ($p<0,05$) a medida que el tiempo de conservación se alargó (Figura nº 5.14 B).

Otros parámetros, como el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y la frecuencia de batido del flagelo (BCF), experimentaron una disminución significativa

($p < 0,05$) en las muestras diluidas con Biladyl[®], al aumentar el tiempo de conservación de los epidídimos. Por el contrario, para el primer parámetro reseñado (ALH), los mejores resultados se obtuvieron en el grupo Sw-R24 cuando se utilizó Bioxcell[®], seguido del grupo Sw-R0 y del Sw-R48, con diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellos. En el caso de la frecuencia de batido de flagelo (BCF), solo aparecieron valores más bajos ($p < 0,05$) en el grupo Sw-R48 al compararlo con los otros dos grupos en estudio (Figura n° 5.14 C).

Al comparar ambos diluyentes (Tabla 5.11), las muestras diluidas con Bioxcell[®] experimentaron un incremento ($p < 0,05$) de los parámetros VAP, VCL y VSL en el grupo Sw-R24, mientras que en el grupo Sw-R0 la VSL fue superior ($p < 0,05$) y la VCL inferior ($p < 0,05$) a las muestras en las que se utilizó Biladyl[®].

En general el diluyente Bioxcell[®] proporcionó, en todos los grupos, mayores ($p < 0,05$) índices de linealidad, rectitud y oscilación de la cabeza. La excepción la presentó el índice de rectitud en el grupo Sw-R0, y de oscilación de la cabeza en el Sw-R48, donde no se apreciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

En las muestras preparadas con Biladyl[®] se obtuvieron, para el grupo Sw-R0, los valores más elevados ($p < 0,05$) en la frecuencia de batido del flagelo y de amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza, mientras que este último parámetro se incrementó ($p < 0,05$) en las muestras diluidas con Bioxcell[®] en el grupo Sw-R24.

Sobre el espermatozoos descongelaado (D), la selección espermática mediante la técnica “swim-up” (Sw) (Tabla 5.11) produjo, en los grupos R0 preparados con Biladyl[®], un incremento de todos los parámetros cinéticos ($p < 0,05$), excepto la ALH. Cuando las muestras se diluyeron con Bioxcell[®] aumentaron ($p < 0,05$), únicamente, la LIN y el WOB, mientras que disminuyeron ($p < 0,05$) la VAP, la VCL y la ALH. En los grupos R24, en general, este método de selección espermática mejoró significativamente los parámetros cinéticos, para los dos diluyentes utilizados.

Por el contrario, en los grupos R48 el método “swim-up” redujo significativamente ($p < 0,05$) los parámetros cinéticos de las muestras diluidas con Bioxcell[®], excepto el índice de rectitud que no mostró diferencias estadísticas ($p > 0,05$). En estos mismos grupos, el diluyente Biladyl[®] disminuyó significativamente ($p < 0,05$) los valores del LIN y del WOB, incrementando la VCL. La frecuencia de batido de flagelo (BCF) fue mayor ($p < 0,05$) después de la selección espermática para ambos diluyentes.

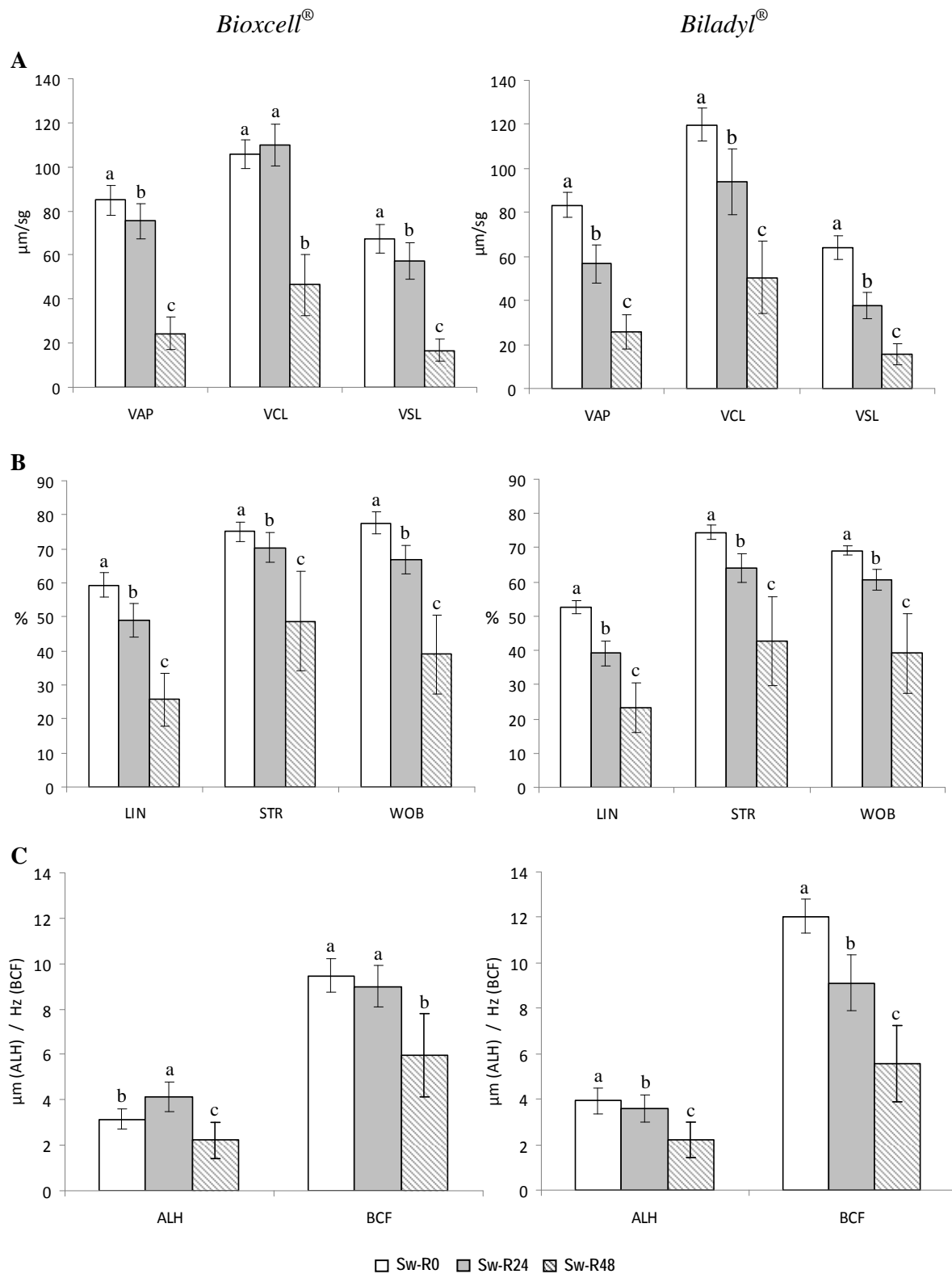


Figura nº 5.14. Influencia del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, en los parámetros cinéticos evaluados con el sistema CASA, empleando la técnica "swim-up" como método de selección espermática. **A.** VAP: velocidad media; VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad rectilínea. **B.** LIN: índice de linealidad; STR: índice de rectitud; WOB: índice de oscilación de la cabeza. **C.** ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide; BCF: frecuencia de batido del flagelo. Los datos se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Letras distintas indican diferencias significativas (a, b; $p < 0,05$).

Tabla 5.11. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante el proceso de selección espermática por "swim-up", en los parámetros cinéticos de calidad seminal.

	VAP	VCL	VSL	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
D-R0Bx	92,51±1,52 a	133,83±2,17 b	70,97±1,30 a	50,35±0,85 b	73,90±1,01 a	66,40±0,81 c	3,78±0,14 a	9,01±0,23 c,b
D-R0By	55,21±1,52 c	93,75±2,17 d	38,37±1,30 c	39,96±0,85 c	66,15±1,01 b	58,34±0,81 d	3,73±0,14 a	8,70±0,23 c
Sw-R0Bx	84,93±1,52 b	105,68±2,17 c	67,56±1,30 a	59,35±0,85 a	75,03±1,01 a	77,56±0,81 a	3,15±0,14 b	9,95±0,23 b
Sw-R0By	83,27±1,52 b	119,93±2,17 b	63,90±1,30 b	52,69±0,85 b	74,37±1,01 a	69,16±0,81 b	3,92±0,14 a	12,04±0,23 a
D-R24Bx	63,08±1,52 b	110,33±2,17 a	45,77±1,30 b	40,88±0,85 b	68,70±1,01 a	57,44±0,81 c	4,10±0,14 a	8,27±0,23 b
D-R24By	42,02±1,52 d	77,57±2,17 c	27,60±1,30 d	35,06±0,85 c	63,19±1,01 b	54,69±0,81 d	3,44±0,14 b	7,83±0,23 b
Sw-R24Bx	75,35±1,52 a	109,92±2,17 a	57,35±1,30 a	48,84±0,85 a	70,30±1,01 a	66,93±0,81 a	4,12±0,14 a	9,00±0,23 a
Sw-R24By	56,56±1,52 c	93,99±2,17 b	37,81±1,30 c	39,10±0,85 b	64,06±1,01 b	60,65±0,81 b	3,57±0,14 b	9,12±0,23 a
D-R48Bx	32,01±1,52 a	58,05±2,17 a	20,71±1,30 a	28,91±0,85 a	46,13±1,01 a,b	42,86±0,81 a	2,74±0,14 a	3,81±0,23 b
D-R48By	22,78±1,43 b	40,89±1,96 c	14,18±1,22 b	25,96±0,83 b	44,75±0,97 b,c	43,60±0,84 a	2,25±0,13 b	3,14±0,20 c
Sw-R48Bx	24,46±1,52 b	46,51±2,17 b,c	16,82±1,30 b	25,67±0,85 b	48,73±1,01 a	38,93±0,81 b	2,23±0,14 b	5,97±0,23 a
Sw-R48By	25,76±1,52 b	50,39±2,17 b	15,76±1,30 b	23,21±0,85 c	42,83±1,01 c	39,09±0,81 b	2,22±0,14 b	5,56±0,23 a

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Para cada tiempo de conservación de los epidídimos, índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b,c,d: p<0,05).

VAP: velocidad media; **VCL:** velocidad curvilínea; **VSL:** velocidad rectilínea; **LIN:** índice de linealidad; **STR:** índice de rectitud; **WOB:** índice de oscilación de la cabeza; **ALH:** amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide; **BCF:** frecuencia de batido del flagelo.

R0: Muestras sin refrigeración *postmortem*.

R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*.

R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*.

D-Bx: Muestras diluidas con Bioxcell®, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

Sw-Bx: Muestras de semen descongelada, diluida con Bioxcell® y seleccionadas mediante "swim-up".

D-By: Muestras diluidas con Biladyl®, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

Sw-By: Muestras de semen descongelada, diluida con Biladyl® y seleccionadas mediante "swim-up".

5.1.3.2.2. MORFOLOGÍA

Tras la selección espermática mediante "swim-up", el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales disminuyó a medida que aumentó el tiempo de conservación de los epidídimos. Mientras que en las muestras diluidas con Biladyl®, existieron diferencias significativas (p<0,05) entre los tres grupos de conservación de los epidídimos, en las muestras preparadas con Bioxcell® solo el grupo

Sw-R48 mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) al compararlo con los grupos Sw-R0 y Sw-R24 (Figura n° 5.15).

Las anomalías más frecuentes fueron las de pieza intermedia y las de cola para ambos diluyentes, siendo el grupo Sw-R48 el que presentó porcentajes significativamente más elevados ($p < 0,05$), al compararlo con los grupos Sw-R0 y Sw-R24. La alteración más relevante en el grupo Sw-R48By correspondió a la de cabezas sueltas.

La presencia de gotas proximales fue más elevada en las muestras procedentes de epidídimos que se mantuvieron en refrigeración. Con ambos diluyentes, el grupo Sw-R0 mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) con los grupos Sw-R24 y Sw-R48 (Figura n° 5.15).

Cuando se comparó el efecto de dichos diluyentes (Tabla 5.12), se observó un mayor porcentaje ($p < 0,05$) de espermatozoides normales en las muestras del grupo Sw-R24 diluidas con Bioxcell®. Por el contrario, en el grupo Sw-R48, se obtuvo el mayor ($p < 0,05$) número de espermatozoides con daño en la pieza intermedia. En ambos grupos (R24 y R48) el diluyente Biladyl® proporcionó los mayores ($p < 0,05$) valores de cabezas sueltas y gotas proximales.

Al evaluar la morfología espermática en las muestras seleccionadas mediante “swim-up” (Sw) y compararlas con las muestras descongeladas (D) (Tabla 5.12), se comprobó que el porcentaje de espermatozoides normales fue significativamente más elevado ($p < 0,05$) en todos los grupos, una vez realizada la selección y con independencia del diluyente empleado.

En las muestras obtenidas de epidídimos no almacenados *postmortem* (R0), este método de selección espermática disminuyó ($p < 0,05$) el porcentaje de anomalías de cabeza suelta, pieza intermedia, y gota proximal, siendo los valores de anomalías de cabeza y de cola similares a los observados en las muestras descongeladas no seleccionadas (D-R0 vs Sw-R0) (Tabla 5.12).

Tras la refrigeración de los epidídimos, bien durante 24 (R24) o 48 horas (R48), la selección espermática mediante “swim-up” permitió obtener espermatozoides con un porcentaje menor ($p < 0,05$) de alteraciones morfológicas que los descongelados. Esto sucedió en todos los grupos, excepto en los que fueron diluidos con Biladyl® para las anomalías de cabeza, cabeza suelta y gota proximal en el grupo R24 y para las de cola en el grupo R48, donde las diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$) (Tabla 5.12).

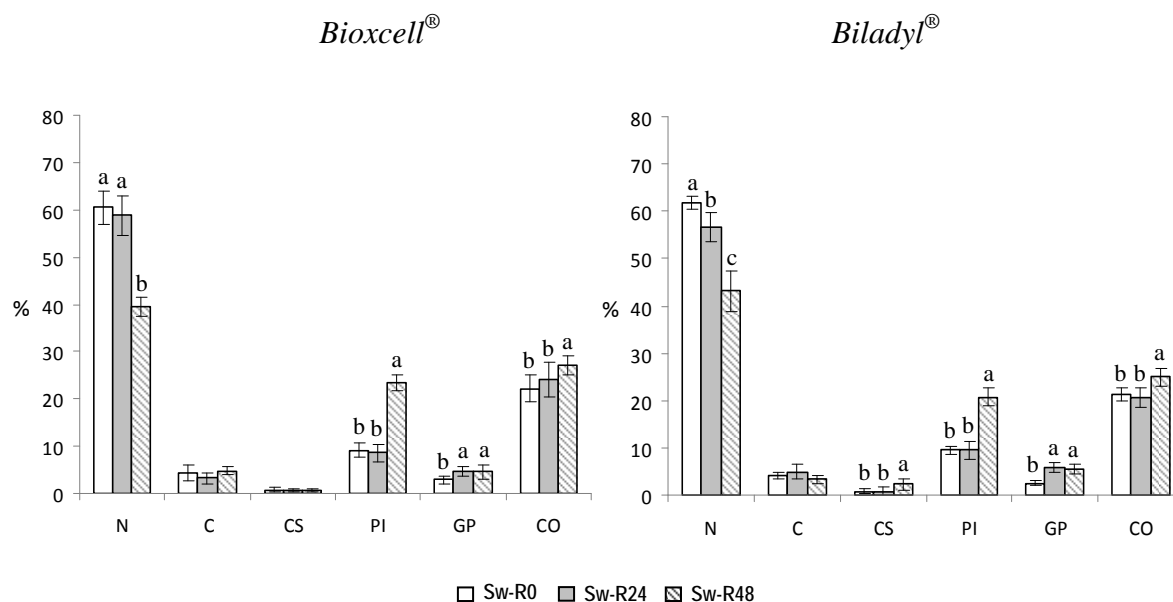


Figura nº 5.15. Influencia del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, en las características de morfología espermática, empleando la técnica “swim-up” como método de selección espermática. N: % de espermatozoides normales; C: % de espermatozoides con alteración en la cabeza; CS: % de espermatozoides con cabeza suelta; PI: % de espermatozoides con alteración en la pieza intermedia; GP: % de espermatozoides con presencia de gota proximal; CO: % de espermatozoides con alteración en la cola. Los datos se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Letras distintas indican diferencias significativas (a, b, c: $p < 0,05$).

5.1.3.2.3. INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

5.1.3.2.3.1. PRUEBA DE ENDÓSMOSIS CELULAR

Cuando en las muestras seleccionadas mediante “swim-up” se evaluó la viabilidad espermática, se encontró una disminución ($p < 0,05$) en todos los grupos, independientemente del diluyente empleado e inversamente proporcional al tiempo de almacenamiento (Sw-R0Bx: $67,15 \pm 1,08$ % vs Sw-R24Bx: $59,47 \pm 1,08$ % vs Sw-R48Bx: $49,45 \pm 1,08$ %; Sw-R0By: $77,12 \pm 1,08$ % vs Sw-R24By: $61,82 \pm 1,08$ % vs Sw-R48By: $50,67 \pm 1,08$ %).

Al comparar ambos diluyentes comprobamos que el diluyente Biladyl® proporcionó un porcentaje de espermatozoides vivos significativamente más elevado ($p < 0,05$) en el grupo Sw-R0, no encontrando diferencias estadísticas entre el resto de grupos (Tabla 5.13).

Respecto a las muestras descongeladas, la selección espermática mediante “swim-up” incrementó ($p < 0,05$), en general, el porcentaje de espermatozoides con membrana citoplasmática íntegra, para todos los grupos, con independencia del medio de dilución empleado. La excepción la presentó el grupo Sw-R0Bx, en el que no hubo

diferencias estadísticas ($p > 0,05$), y Sw-R48By en el que la integridad de membrana disminuyó significativamente ($p < 0,05$) después de la selección.

Tabla 5.12. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante el proceso de selección espermática por "swim-up", en las características de morfología espermática.

	N	C	CS	PI	GP	CO
D-R0Bx	53,52±0,83 b	3,77±0,54	2,29±0,35 a	13,90±0,47 a	4,16±0,23 a	22,31±0,77
D-R0By	51,90±0,83 b	4,01±0,54	2,63±0,35 a	14,70±0,47 a	4,01±0,23 a	22,72±0,77
Sw-R0Bx	60,43±0,83 a	4,45±0,54	0,81±0,35 b	9,18±0,47 b	2,88±0,23 b	22,22±0,77
Sw-R0By	61,72±0,83 a	4,17±0,54	0,79±0,35 b	9,52±0,47 b	2,45±0,23 b	21,37±0,77
D-R24Bx	42,90±0,83 d	7,25±0,54 a	3,87±0,35 a	11,16±0,47 b	5,50±0,23 b	29,31±0,77 a
D-R24By	48,10±0,83 c	5,70±0,54 b	1,87±0,35 b	14,75±0,47 a	6,21±0,23 a	23,33±0,77 c
Sw-R24Bx	58,75±0,83 a	3,24±0,54 c	0,68±0,35 c	8,56±0,47 c	4,70±0,23 c	24,04±0,77 b
Sw-R24By	56,63±0,83 b	4,95±0,54 b	0,72±0,35 b	9,45±0,47 c	5,88±0,23 a,b	20,61±0,77 d
D-R48Bx	12,68±0,83 b	10,76±0,54 a	11,27±0,35 b	26,89±0,47 b	6,34±0,23 a	32,04±0,77 a
D-R48By	14,52±0,77 b	9,28±0,54 a	13,96±0,37 a	30,78±0,61 a	5,66±0,23 b	25,76±0,83 b
Sw-R48Bx	39,54±0,83 a	4,78±0,54 b	0,58±0,35 d	23,45±0,47 c	4,55±0,23 d	27,07±0,77 b
Sw-R48By	43,15±0,83 a	3,32±0,54 b	2,31±0,35 c	20,72±0,47 d	5,48±0,23 c	24,94±0,77 b

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Para cada tiempo de conservación de los epidídimos, índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b,c,d: $p < 0,05$).

N: % de espermatozoides normales; **C:** % de espermatozoides con alteración en la cabeza; **CS:** % de espermatozoides con cabeza suelta; **PI:** % de espermatozoides con alteración en la pieza intermedia; **GP:** % de espermatozoides con presencia de gota proximal; **CO:** % de espermatozoides con alteración en la cola.

R0: Muestras sin refrigeración *postmortem*.

R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*.

R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*.

D-Bx: Muestras diluidas con Bioxcell®, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

Sw-Bx: Muestras de semen descongelada, diluida con Bioxcell® y seleccionadas mediante "swim-up".

D-By: Muestras diluidas con Biladyl®, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

Sw-By: Muestras de semen descongelada, diluida con Biladyl® y seleccionadas mediante "swim-up".

5.1.3.2.3.2. COMBINACIÓN DE FLUOROCROMOS (IP/PNA)

Se demostró (Figura nº 5.16) que la viabilidad de los espermatozoides con acrosomas funcionales (IP-/PNA-) se vio afectada por el tiempo de conservación, con una disminución significativa ($p < 0,05$) en los grupos Sw-R24 y Sw-R48 respecto al grupo Sw-R0, para ambos diluyentes. De igual forma, se observó un aumento en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosomas afuncionales (IP-/PNA+), con

diferencias estadísticas ($p < 0,05$) para todos los grupos, destacando los grupos Sw-R24 y Sw-R48.

El porcentaje de espermatozoides muertos fue más elevado, tanto con acrosomas funcionales (IP+/PNA-) como afuncionales (IP+/PNA+), en aquellos grupos que se mantuvieron refrigerados. Cuando el diluyente utilizado fue el Biladyl® encontramos para el parámetro IP+/PNA- diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tres grupos, y solo en el Sw-R0 cuando el método de dilución fue el Bioxcell®. El mayor porcentaje de acrosomas alterados se observó en el grupo Sw-R24, para ambos diluyentes, seguido del grupo Sw-R48 y por último del grupo Sw-R0, con diferencias estadísticas ($p < 0,05$) en todos los casos.

Al contrastar los resultados obtenidos, con ambos medios de dilución, se apreció que las muestras diluidas con Biladyl® presentaron los mayores porcentajes de espermatozoides muertos, con acrosomas funcionales (IP+/PNA-) en los grupos Sw-R0 y Sw-R48, y con acrosomas afuncionales (IP+/PNA+) en el grupo Sw-R0, y de espermatozoides vivos con acrosomas funcionales (IP-/PNA-) en el grupo Sw-R24. Con Bioxcell® se obtuvo un mayor porcentaje de espermatozoides vivos con acrosomas funcionales (IP-/PNA-) en el grupo Sw-R0, y con acrosomas afuncionales (IP-/PNA+) en los grupos Sw-R24 y Sw-R48 (Tabla 5.13).

El estudio del efecto de la selección mediante “swim-up” (Sw) en relación al esperma descongelado (D), mostró, en todos los grupos y para ambos diluyentes, un porcentaje significativamente menor ($p < 0,05$) de espermatozoides vivos con acrosomas intactos (IP-/PNA-), aumentando el porcentaje de células vivas con acrosomas alterados (IP-/PNA+). Al evaluar los espermatozoides muertos, se apreció un incremento ($p < 0,05$) en aquellos que presentaron el acrosoma alterado (IP+/PNA+), en los grupos refrigerados *postmortem* durante 24 (R24) y 48 (R48) horas, disminuyendo ($p < 0,05$) para el grupo Sw-R0Bx. El porcentaje de espermatozoides muertos con acrosomas funcionales (IP+/PNA-) fue significativamente menor ($p < 0,05$) en todos los grupos estudiados, excepto en el grupo Sw-R48By donde se incrementó ($p < 0,05$) (Tabla 5.13).

5.1.3.2.4. INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA ACROSÓMICA

5.1.3.2.4.1. BL-1 TAMPONADO CON GLUTARALDEHÍDO AL 2 %

Al analizar las muestras seleccionadas mediante “swim-up”, se puso de manifiesto que el daño acrosomal fue más importante a medida que aumentó el tiempo

de conservación de los epidídimos. Fue el grupo Sw-R48, independientemente del diluyente empleado, el que presentó un porcentaje de acrosomas normales significativamente menor ($p<0,05$) (Sw-R0Bx: $26,75\pm 1,16$ % vs Sw-R24Bx: $29,13\pm 1,16$ % vs Sw-R48Bx: $3,97\pm 1,16$ %; Sw-R0By: $26,61\pm 1,16$ % vs Sw-R24By: $26,60\pm 1,16$ % vs Sw-R48By: $14,75\pm 1,16$ %).

Al comprobar el efecto de los medios de dilución sobre los diferentes tiempos de conservación *postmortem*, solo se observó un mayor porcentaje, con diferencias estadísticas ($p<0,05$), de acrosomas íntegros en el grupo Sw-R48 diluido con Biladyl® (Tabla 5.13).

Asimismo se demostró que, sobre el esperma descongelado, la selección espermática mediante “swim-up” afectó negativamente ($p<0,05$) a la integridad del acrosoma, en todos los grupos (Tabla 5.13).

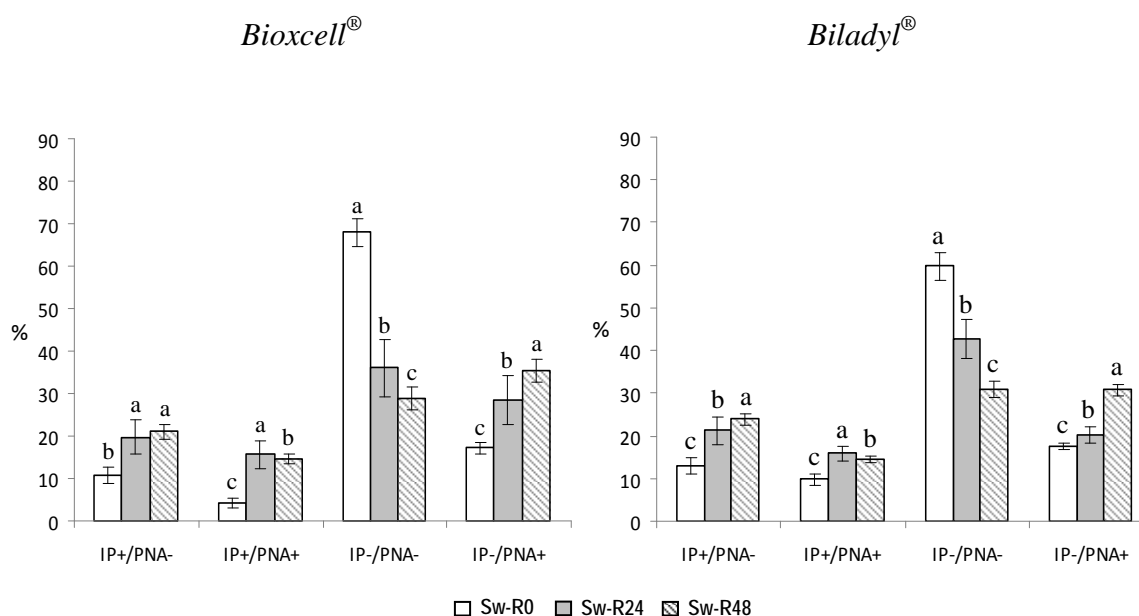


Figura nº 5.16. Influencia del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, sobre el porcentaje de viabilidad e integridad del acrosoma evaluados mediante citometría de flujo, empleando la técnica “swim-up” como método de selección espermática. IP: idouro de propidio; PNA-FITC: PNA conjugado con isotiocianato de fluoresceína. IP+/PNA-: % de espermatozoides muertos con acrosomas normales; IP+/PNA+: % de espermatozoides muertos con acrosomas alterados; IP-/PNA-: % de espermatozoides vivos con acrosomas normales; IP-/PNA+: % de espermatozoides vivos con acrosomas alterados. Los datos se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Letras distintas indican diferencias significativas (a, b, c; $p<0,05$).

Tabla 5.13. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante el proceso de selección espermática por "swim-up", en la integridad de la membrana plasmática y acrosomal.

	HOS+	IP+/PNA-	IP+/PNA+	IP-/PNA-	IP-/PNA+	GL
D-R0Bx	68,18±1,08 b	16,20±0,71 b	8,53±0,47 a	70,92±1,02 a	4,33±0,55 b	45,51±1,16 b
D-R0By	62,96±1,08 c	19,37±0,71 a	8,68±0,47 a	71,22±1,02 a	0,71±0,55 c	53,07±1,16 a
Sw-R0Bx	67,15±1,08 b	10,72±0,71 d	4,20±0,47 b	67,92±1,02 b	17,14±0,55 a	26,75±1,16 c
Sw-R0By	77,12±1,08 a	13,00±0,71 c	9,81±0,47 a	59,80±1,02 c	17,50±0,55 a	26,61±1,16 c
D-R24Bx	52,97±1,08 c	26,52±0,71 a	12,20±0,47 b	57,99±1,02 b	3,24±0,55 c	48,89±1,16 b
D-R24By	56,81±1,08 b	20,32±0,71 b	11,44±0,47 b	67,03±1,02 a	1,25±0,55 d	54,00±1,16 a
Sw-R24Bx	59,47±1,08 a,b	19,63±0,71 b	15,70±0,47 a	36,13±1,02 d	28,51±0,55 a	29,13±1,16 c
Sw-R24By	61,82±1,08 a	21,31±0,71 b	15,86±0,47 a	42,66±1,02 c	20,13±0,55 b	26,60±1,16 c
D-R48Bx	36,52±1,08 c	39,51±0,71 a	10,95±0,47 b	47,10±1,02 b	2,44±0,55 c	9,30±1,16 c
D-R48By	54,63±0,89 a	17,71±0,71 d	8,50±0,41 c	70,84±0,93 a	2,95±0,32 c	28,31±1,17 a
Sw-R48Bx	49,45±1,08 b	21,07±0,71 c	14,52±0,47 a	28,90±1,02 c	35,49±0,55 a	3,97±1,16 d
Sw-R48By	50,67±1,08 b	23,94±0,71 b	14,46±0,47 a	30,81±1,02 c	30,80±0,55 b	14,75±1,16 b

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Para cada tiempo de conservación de los epidídimos, índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b,c,d: p<0,05).

GL: % de espermatozoides con acrosomas normales; **HOS+:** % de espermatozoides vivos; **IP+/PNA-:** % espermatozoides muertos con acrosomas normales; **IP+PNA+:** % espermatozoides muertos con acrosomas alterados; **IP-/PNA-:** % espermatozoides vivos con acrosomas normales; **IP-/PNA+:** % espermatozoides vivos con acrosomas alterados.

R0: Muestras sin refrigeración *postmortem*.

R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*.

R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*.

D-Bx: Muestras diluidas con Bioxcell®, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

Sw-Bx: Muestras de semen descongelada, diluida con Bioxcell® y seleccionadas mediante "swim-up".

D-By: Muestras diluidas con Biladyl®, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

Sw-By: Muestras de semen descongelada, diluida con Biladyl® y seleccionadas mediante "swim-up".

5.1.3.2.5. PRUEBA *IN VITRO* DE DIVISIÓN EMBRIONARIA

Los resultados de la prueba *in vitro* de división embrionaria, utilizando espermatozoides seleccionados mediante el método de "swim-up", para ambos diluyentes, no mostraron diferencias estadísticas (p<0,05) entre los grupos Sw-R0 y Sw-R24, pero éstos presentaron porcentajes significativamente más elevados (p<0,05) respecto al grupo Sw-R48 (Tabla 5.14).

Tampoco aparecieron diferencias estadísticas (p<0,05) tras la comparación entre los diluyentes empleados (Bioxcell® o Biladyl®), excepto en el grupo Sw-R24 donde el mayor porcentaje (p<0,05) de división embrionaria se observó en las muestras diluidas con Biladyl® (Tabla 5.14).

Tabla 5.14. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante el proceso de selección espermática mediante “swim-up”, en el porcentaje de división embrionaria en el día 3 postinseminación.

DIV	Sw-Bx	Sw-By
R0	63,58±0,77 a;1	63,0±0,77 a;1
R24	62,04±0,77 b;1	65,76±0,77 a;1
R48	12,58±0,77 a;2	13,67±0,77 a;2

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Números distintos en la misma columna e índices distintos en la misma fila, indican diferencias significativas (1,2,3: $p < 0,05$; a,b: $p < 0,05$).

DIV: % de división al día tres postinseminación *in vitro*.

R0: Muestras sin refrigeración *postmortem*.

R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*.

R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*.

Sw-Bx: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Bioxcell® y seleccionadas mediante “swim-up”.

Sw-By: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Biladyl® y seleccionadas mediante “swim-up”.

5.1.3.3. GRADIENTE DE DENSIDAD

5.1.3.3.1. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

Al utilizar el gradiente de densidad (GD; Bovipure®), como método de selección espermática, y atendiendo al tiempo de conservación *postmortem* de los epidídimos, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tres grupos, con una mayor concentración espermática en las muestras que se conservaron durante menos tiempo. Cuando se estudió la influencia del diluyente, se apreció una mayor concentración ($p < 0,05$) en los grupos diluidos con Biladyl®, para todos los periodos de conservación. Por otro lado, tras la utilización del gradiente de densidad se obtuvieron concentraciones espermáticas más altas ($p < 0,05$), para todos los grupos en estudio, que en las muestras seleccionadas por “swim-up” (Tabla 5.9).

5.1.3.3.2. MOVILIDAD

5.1.3.3.2.1. MOVILIDAD INDIVIDUAL Y PROGRESIVA

El porcentaje de espermatozoides móviles (MO y MI) y de espermatozoides con movimiento progresivo (MP), en las muestras seleccionadas mediante gradiente de densidad, disminuyó a medida que se incrementó el periodo de conservación *postmortem* de los epidídimos, apreciándose entre los tres grupos diferencias significativas ($p < 0,05$) para estos parámetros (Figura nº 5.17).

Si consideramos el tipo de diluyente utilizado, el mayor porcentaje de espermatozoides móviles (MO y MI) correspondió a las muestras diluidas con Biladyl®, con significación estadística ($p < 0,05$) para los grupos GD-R0 y GD-R24. En la

movilidad progresiva, este diluyente únicamente mejoró los resultados ($p<0,05$) en el grupo GD-R24 (Tabla 5.15).

Respecto a las muestras descongeladas, la selección espermática mediante gradiente de densidad -Bovipure®- estimuló la movilidad individual, con diferencias significativas ($p<0,05$) en los grupos GD-R0By y GD-R24Bx. Por lo que se refiere a la movilidad progresiva ésta se incrementó ($p<0,05$), para ambos diluyentes, en los grupos GD-R24, disminuyendo ($p<0,05$) en el grupo GD-R0By (Tabla 5.15).

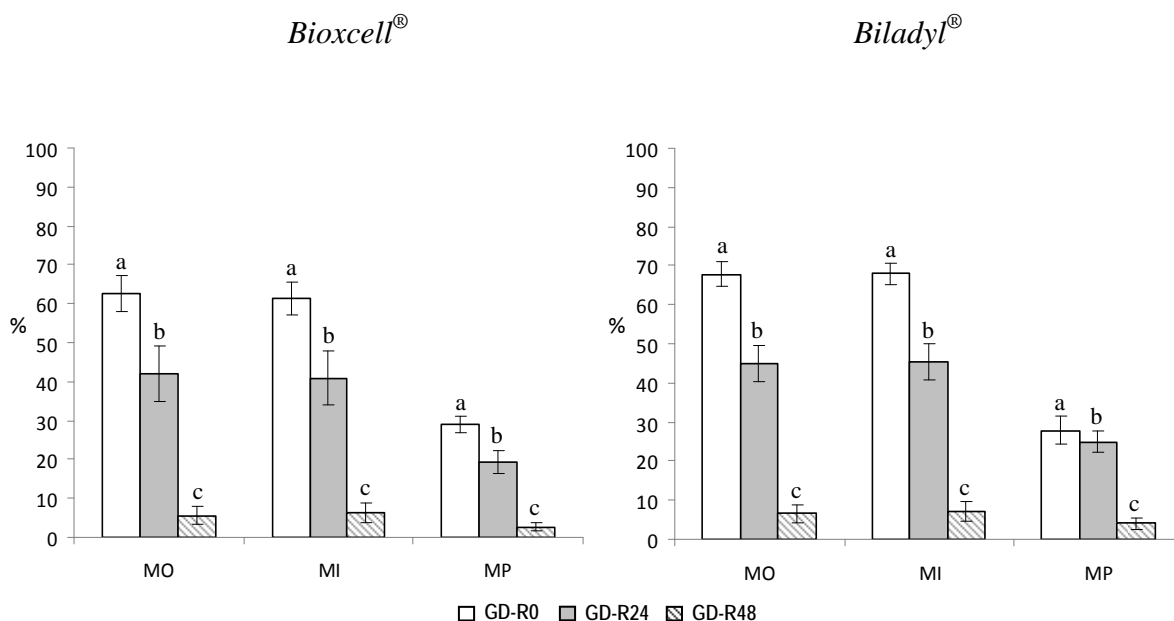


Figura nº 5.17. Influencia del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, sobre el porcentaje de movilidad individual y progresiva, empleando la técnica de gradiente de densidad como método de selección espermática. MO: % de movilidad individual, evaluada en el microscopio de contraste de fases; MI: % de movilidad individual y MP: % de movilidad progresiva, evaluadas con el sistema CASA. Los datos se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Letras distintas indican diferencias significativas (a, b, c: $p<0,05$).

5.1.3.3.2. PARÁMETROS CINÉTICOS ESPERMÁTICOS

La selección mediante gradiente de densidad, independientemente del medio empleado en la dilución espermática, provocó a una disminución ($p<0,05$) de todos los parámetros estudiados, excepto en la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) que presentó un valor similar entre los grupos GD-R0 y GD-R24 y superior ($p<0,05$) al grupo GD-R48, a medida que aumentó el tiempo de conservación *postmortem* de los epidídimos (Figura nº 5.18 A, B y C).

Tabla 5.15. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante el proceso de selección espermática por gradiente de densidad, en la movilidad espermática individual y progresiva.

	MO	MI	MP
D-R0Bx	61,56±0,94 b	61,32±0,90 b	29,69±0,79 a,b
D-R0By	56,97±0,94 c	57,01±0,90 c	30,27±0,79 a
GD-R0Bx	62,60±0,94 b	61,24±0,90 b	28,81±0,79 a,b
GD-R0By	67,80±0,94 a	67,97±0,90 a	27,92±0,79 b
D-R24Bx	31,97±0,94 c	30,66±0,90 c	10,09±0,79 d
D-R24By	46,87±0,94 a	45,00±0,90 a	16,33±0,79 c
GD-R24Bx	41,87±0,94 b	40,95±0,90 b	19,34±0,79 b
GD-R24By	45,00±0,94 a	45,27±0,90 a	24,97±0,79 a
D-R48Bx	5,00±0,94	4,60±0,90	2,22±0,79
D-R48By	6,85±0,94	6,64±0,90	4,29±0,79
GD-R48Bx	5,62±0,94	6,41±0,90	2,65±0,79
GD-R48By	6,62±0,94	6,99±0,90	4,16±0,79

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Para cada tiempo de conservación de los epidídimos, índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b,c,d: p<0,05).

MO: % de movilidad individual al microscopio de contraste de fases; **MI:** % de movilidad individual y **MP:** % de movilidad progresiva, evaluadas con el sistema CASA.

R0: Muestras sin refrigeración *postmortem*.

R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*.

R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*.

D-Bx: Muestras diluidas con Bioxcell®, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

GD-Bx: Muestras de semen descongelada, diluida con Bioxcell® y seleccionadas mediante gradiente de densidad.

D-By: Muestras diluidas con Biladyl®, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

GD-By: Muestras de semen descongelada, diluida con Biladyl® y seleccionadas mediante gradiente de densidad.

Atendiendo al efecto del diluyente (Tabla 5.16), en las muestras en las que se utilizó Bioxcell® se obtuvieron, en general, mayores (p<0,05) registros de todos los parámetros cinéticos estudiados en los tres grupos de conservación. Con el diluyente Biladyl® se consiguieron valores más elevados (p<0,05) que con Bioxcell®, únicamente, en el índice de rectitud del grupo GD-R0 y en la frecuencia de batido de flagelo del grupo de más tiempo de conservación *postmortem* (GD-R48),

La selección espermática mediante gradiente de densidad (GD), en relación al esperma descongelado (D), en los grupos GD-R0 y GD-R24, incrementó significativamente (p<0,05) los valores de los índices de linealidad y de oscilación de la cabeza, disminuyendo (p<0,05) otros parámetros como la velocidad curvilínea, la

amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza y la frecuencia de batido del flagelo, con independencia del diluyente empleado (Tabla 5.16).

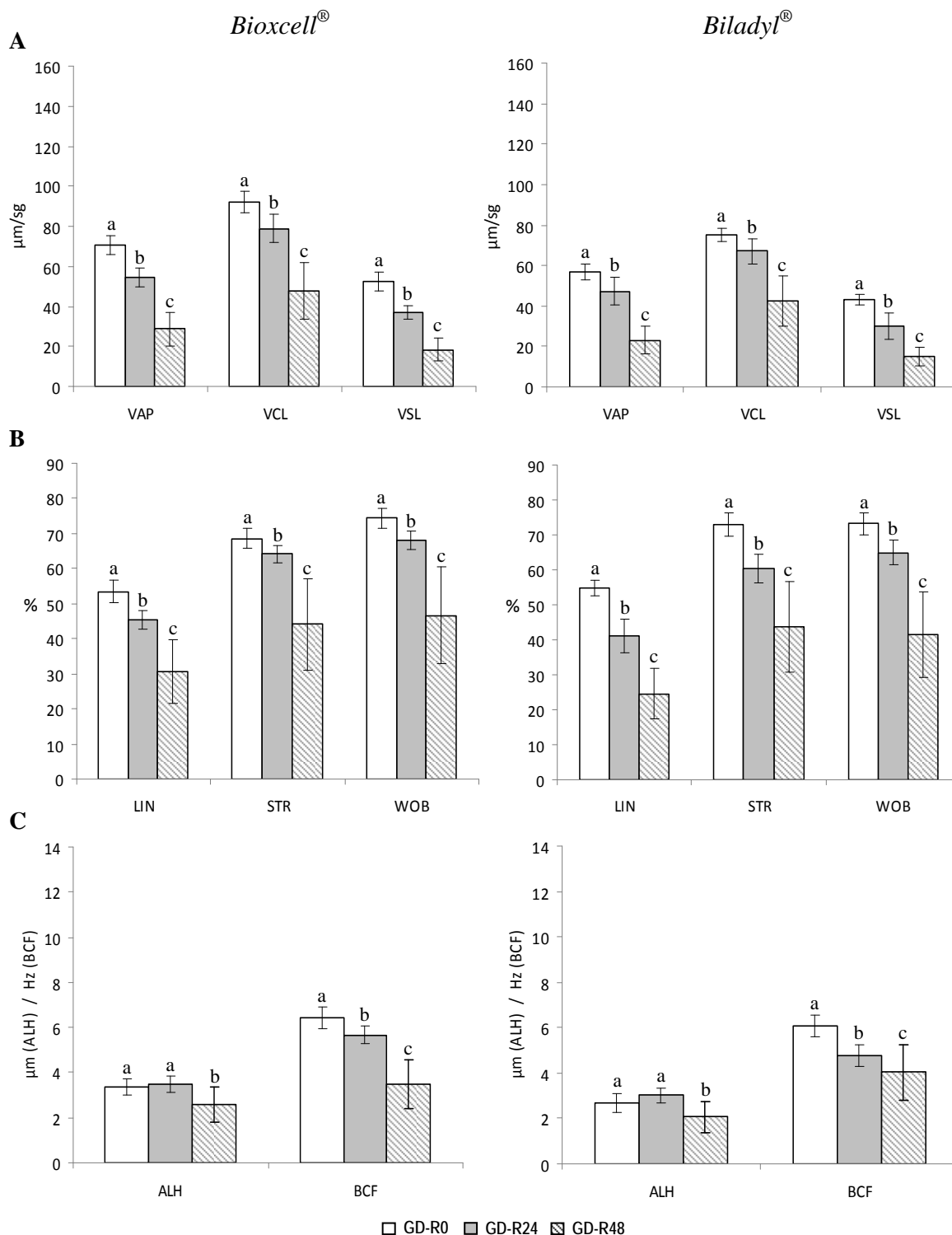


Figura n° 5.18. Influencia del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, sobre los parámetros cinéticos evaluados con el sistema CASA, empleando la técnica de gradiente de densidad como método de selección espermática. **A:** VAP: velocidad media; VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad rectilínea. **B:** LIN: índice de linealidad; STR: índice de rectitud; WOB: índice de oscilación de la cabeza. **C:** ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide; BCF: frecuencia de batido del flagelo. Los datos se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS \pm ES. Letras distintas indican diferencias significativas (a, b, c; $p < 0,05$).

Tabla 5.16. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante el proceso de selección espermática por gradiente de densidad, en los parámetros cinéticos de calidad seminal.

	VAP	VCL	VSL	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
D-R0Bx	92,51±1,43a	133,83±1,96a	70,97±1,22a	50,35±0,83b	73,90±0,97a	66,40±0,84b	3,78±0,13a	9,06±0,20a
D-R0By	55,21±1,43c	93,75±1,96b	38,37±1,22d	39,96±0,83c	66,15±0,97b	58,34±0,84c	3,73±0,13a	8,70±0,20a
GD-R0Bx	70,56±1,43b	92,03±1,96b	52,26±1,22b	53,48±0,83a	68,55±0,97b	74,38±0,84a	3,36±0,13b	6,41±0,20b
GD-R0By	56,87±1,43c	74,95±1,96c	43,09±1,22c	54,90±0,83a	72,97±0,97a	73,18±0,84a	2,68±0,13c	6,08±0,20c
D-R24Bx	63,08±1,43a	110,33±1,96a	45,77±1,22a	40,88±0,83b	68,70±0,97a	57,44±0,84c	4,10±0,13a	8,27±0,20a
D-R24By	42,02±1,43d	77,57±1,96b	27,60±1,22c	35,06±0,83c	63,19±0,97b	54,69±0,84d	3,44±0,13b	7,83±0, 0a
GD-R24Bx	54,63±1,43b	78,94±1,96b	37,02±1,22b	45,50±0,83a	64,14±0,97b	68,01±0,84a	3,48±0,13b	5,67±0,20b
GD-R24By	47,13±1,43c	66,99±1,96c	29,89±1,22c	41,21±0,83b	60,31±0,97c	64,90±0,84b	3,03±0,13c	4,75±0,20b
D-R48Bx	32,01±1,43a	58,05±1,96a	20,71±1,22a	28,91±0,83a	46,13±0,97	42,86±0,84b	2,74±0,13a	3,81±0,20b
D-R48By	22,78±1,43c	40,89±1,96c	14,18±1,22c	25,96±0,83b	44,75±0,97	43,60±0,84b	2,25±0,13b,c	3,14±0,20c
GD-R48Bx	28,71±1,43b	47,79±1,96b	18,46±1,22a,b	30,61±0,83a	44,11±0,97	46,65±0,84a	2,58±0,13a,b	3,50±0,20b,c
GD-R48By	22,96±1,43c	42,51±1,96b,c	15,14±1,22b,c	24,46±0,83b	43,82±0,97	41,55±0,84b	2,06±0,13c	4,03±0,20a

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Para cada tiempo de conservación de los epidídimos, índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b,c,d: p<0,05).

VAP: velocidad media; **VCL:** velocidad curvilínea; **VSL:** velocidad rectilínea; **LIN:** índice de linealidad; **STR:** índice de rectitud; **WOB:** índice de oscilación de la cabeza; **ALH:** amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide; **BCF:** frecuencia de batido del flagelo.

R0: Muestras sin refrigeración *postmortem*.

R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*.

R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*.

D-Bx: Muestras diluidas con Bioxcell®, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

GD-Bx: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Bioxcell® y seleccionadas mediante gradiente de densidad.

D-By: Muestras diluidas con Biladyl®, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

GD-By: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Biladyl® y seleccionadas mediante gradiente de densidad.

Estos mismos grupos (GD-R0 y GD-R24) diluidos con Bioxcell® presentaron, postselección, valores significativamente inferiores (p<0,05) en el índice de rectitud (STR) y en las velocidades rectilínea (VSL) y media (VAP), en relación a las muestras descongeladas, mientras que el diluyente Biladyl® incrementó (p<0,05) los dos primeros parámetros en el grupo GD-R0 y el último en el grupo GD-R24. Cuando el periodo de conservación se amplió hasta las 48 horas, en las muestras diluidas con Bioxcell®, las velocidades media y curvilínea disminuyeron (p<0,05), aumentando (p<0,05) el índice de oscilación de la cabeza, mientras que cuando se utilizó Biladyl® las muestras presentaron una mayor (p<0,05) frecuencia de batido del flagelo.

5.1.3.3. MORFOLOGÍA

Al estudiar mediante tinción con Eosina-Nigrosina la influencia, del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, sobre la morfología de las células espermáticas seleccionadas con el método de gradiente de densidad, se observó que el porcentaje de espermatozoides normales fue superior ($p<0,05$) en los grupos GD-R0Bx y GD-R24Bx respecto al grupo GD-R48Bx. El diluyente Biladyl® dio lugar a diferencias significativas ($p<0,05$) entre los tres grupos, siendo también el grupo GD-R48 el que proporcionó los resultados más bajos (Figura nº 5.19).

Las anomalías más frecuentes fueron las de pieza intermedia y las de cola, con significación estadística ($p<0,05$) entre los tres grupos, destacando con ambos diluyentes el grupo GD-48, por presentar las mayores alteraciones. A este mismo grupo, pero con el diluyente Biladyl®, le correspondió el porcentaje más elevado ($p<0,05$) de cabezas sueltas, mientras que la presencia de gota proximal fue superior ($p<0,05$) en el GD-R24By, seguido de los grupos GD-R48Bx, y GD-R48By (Figura nº 5.19).

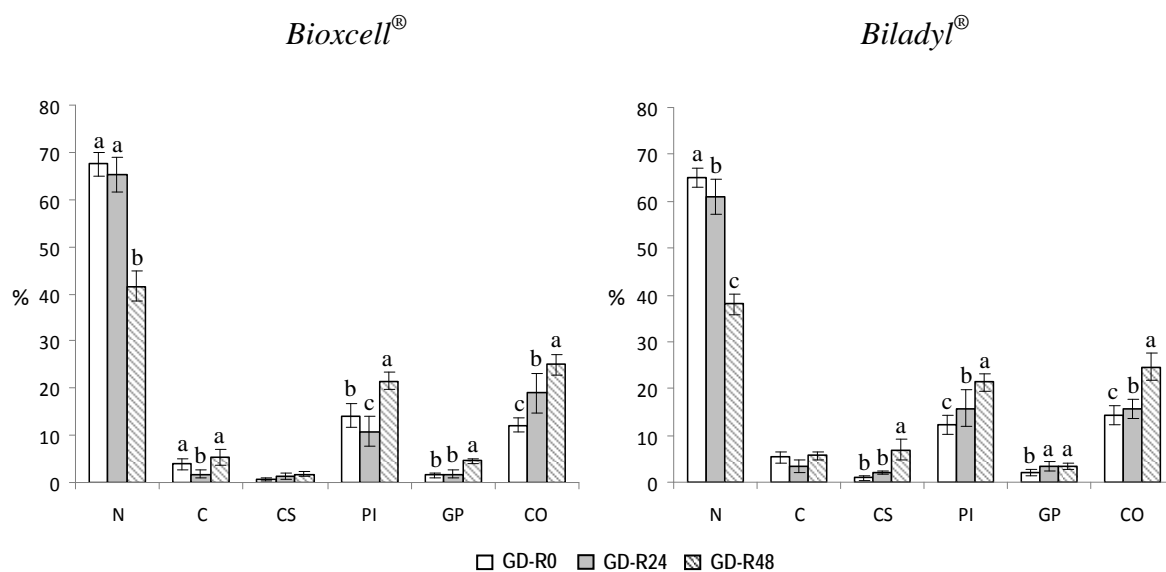


Figura nº 5.19. Influencia del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, en las características de morfología espermáticas, empleando la técnica de gradiente de densidad como método de selección espermática. N: % de espermatozoides normales; C: % de espermatozoides con alteración en la cabeza; CS: % de espermatozoides con cabeza suelta; PI: % de espermatozoides con alteración en la pieza intermedia; GP: % de espermatozoides con presencia de gota proximal; CO: % de espermatozoides con alteración en la cola. Los datos se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Letras distintas indican diferencias significativas (a, b, c: $p<0,05$).

Al comparar los diluyentes utilizados, el mayor porcentaje de espermatozoides normales se obtuvo en las muestras diluidas con Bioxcell®, presentando diferencias

significativas ($p<0,05$) entre los grupos que fueron sometidos a refrigeración *postmortem*, disminuyendo a medida que este periodo fue mayor (Tabla 5.17).

Tabla 5.17. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante el proceso de selección espermática por gradiente de densidad, en las características de morfología espermática.

	N	C	CS	PI	GP	CO
D-R0Bx	53,52±0,77 b	3,77±0,54 b	2,29±0,37 a	13,90±0,61 a,b	4,16±0,23 a	22,31±0,83 a
D-R0By	51,90±0,77 b	4,01±0,54 a,b	2,63±0,37 a	14,70±0,61 a	4,01±0,23 a	22,72±0,83 a
GD-R0Bx	67,54±0,77 a	3,92±0,54 b	0,69±0,37 b	14,21±0,61 a	1,51±0,23 b	12,12±0,83 b
GD-R0By	65,02±0,77 a	5,38±0,54 a	0,86±0,37 b	12,29±0,61 b	2,10±0,23 b	14,31±0,83 b
D-R24Bx	42,90±0,77 d	7,25±0,54 a	3,87±0,37 a	11,16±0,61 b	5,50±0,23 b	29,31±0,83 a
D-R24By	48,10±0,77 c	5,70±0,54 b	1,87±0,37 b	14,75±0,61 a	6,21±0,23 a	23,33±0,83 b
GD-R24Bx	65,30±0,77 a	1,80±0,54 d	1,36±0,37 b	10,76±0,61 b	1,81±0,23 d	18,04±0,83 c
GD-R24By	60,85±0,77 b	3,54±0,54 c	2,07±0,37 b	15,82±0,61 a	3,40±0,23 c	15,64±0,83 d
D-R48Bx	12,68±0,77 c	10,76±0,54 a	11,27±0,37 b	26,89±0,61 b	6,34±0,23 a	32,04±0,83 a
D-R48By	14,52±0,77 c	9,28±0,54 a	13,96±0,37 a	30,78±0,61 a	5,66±0,23 b	25,76±0,83 b
GD-R48Bx	47,67±0,77 a	5,28±0,54 b	1,80±0,37 d	21,49±0,61 c	4,64±0,23 b	25,08±0,83 b
GD-R48By	37,99±0,77 b	5,62±0,54 b	6,97±0,37 c	21,29±0,61 c	3,43±0,23 c	24,66±0,83 b

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Para cada tiempo de conservación de los epidídimos, índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b,c,d: $p<0,05$).

N: % de espermatozoides normales; **C:** % de espermatozoides con alteración en la cabeza; **CS:** % de espermatozoides con cabeza suelta; **PI:** % de espermatozoides con alteración en la pieza intermedia; **GP:** % de espermatozoides con presencia de gota proximal; **CO:** % de espermatozoides con alteración en la cola.

R0: Muestras sin refrigeración *postmortem*.

R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*.

R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*.

D-Bx: Muestras diluidas con Bioxcell®, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

GD-Bx: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Bioxcell® y seleccionadas mediante gradiente de densidad.

D-By: Muestras diluidas con Biladyl®, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

GD-By: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Biladyl® y seleccionadas mediante gradiente de densidad.

Para ambos diluyentes, la selección mediante gradiente de densidad (GD) incrementó ($p<0,05$), respecto a las muestras descongeladas, el porcentaje de espermatozoides normales, reduciendo ($p<0,05$) la presencia de gota proximal en todos los grupos estudiados (Tabla 5.17).

También, independientemente del diluyente utilizado, disminuyeron ($p<0,05$) las anomalías de cola en los grupos GD-R0 y GD-R24 y de cabezas sueltas en los grupos GD-R0 y GD-R48. Cuando las muestras se diluyeron en Bioxcell® se observó un menor número ($p<0,05$) de anomalías de cola en el grupo GD-R48, mientras que en el

grupo GD-R24 la alteración menos frecuente fue la de espermatozoides con cabeza suelta (Tabla 5.17).

Por lo que se refiere a las anomalías de cabeza, éstas se redujeron ($p < 0,05$), para ambos diluyentes, en los grupos GD-R24 y GD-R48, así como las alteraciones de pieza intermedia que disminuyeron ($p < 0,05$) en los grupos GD-R0By y GD-R48 (Tabla 5.17).

5.1.3.3.4. INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

5.1.3.3.4.1. PRUEBA DE ENDÓSMOSIS CELULAR

La viabilidad espermática, en los grupos cuyos epidídimos fueron conservados *postmortem* mediante refrigeración, se redujo significativamente ($p < 0,05$) en las muestras diluidas con Bioxcell® (GD-R0Bx: $78,85 \pm 0,89$ % vs GD-R24Bx: $74,70 \pm 0,89$ % vs GD-R48Bx: $55,30 \pm 0,89$ %). Cuando se utilizó Biladyl®, esta disminución solo se observó en el grupo GD-R48 respecto a los otros dos grupos (GD-R0By: $76,48 \pm 0,89$ % vs GD-R24By: $78,85 \pm 0,89$ % vs GD-R48By: $64,72 \pm 0,89$ %).

El efecto del diluyente se puso de manifiesto en la obtención de un porcentaje mayor ($p < 0,05$) de espermatozoides vivos en los grupos GD-R24 y GD-R48 diluidos con Biladyl®, respecto a los mismos grupos diluidos con Bioxcell® (Tabla 5.18).

Al comparar las muestras seleccionadas mediante gradiente de densidad (GD), respecto a las descongeladas (D), la viabilidad espermática (% HOS+) se incrementó ($p < 0,05$) en los tres grupos en estudio (R0, R24 y R48), e independientemente del diluyente utilizado (Tabla 5.18).

5.1.3.3.4.2. COMBINACIÓN DE FLUOROCROMOS (IP/PNA)

El estudio de las muestras seleccionadas por gradiente de densidad, mediante el uso de fluorocromos (IP/PNA), determinó para los espermatozoides vivos con acrosomas funcionales (IP-/PNA-) una relación ($p < 0,05$) inversamente proporcional al tiempo de almacenamiento *postmortem*, y una relación directa para los espermatozoides vivos con alteración del acrosoma (IP-/PNA+) (Figura nº 5.21).

Al comparar los medios de dilución se obtuvo un porcentaje significativamente mayor ($p < 0,05$) de espermatozoides muertos con acrosomas funcionales (IP+/PNA-) y vivos con acrosomas alterados (IP-/PNA+) en todos los grupos diluidos con Bioxcell®,

mientras que para los espermatozoides vivos con acrosomas funcionales (IP-/PNA-) los porcentajes fueron más elevados ($p < 0,05$) en los grupos diluidos con Biladyl® (Tabla 5.18).

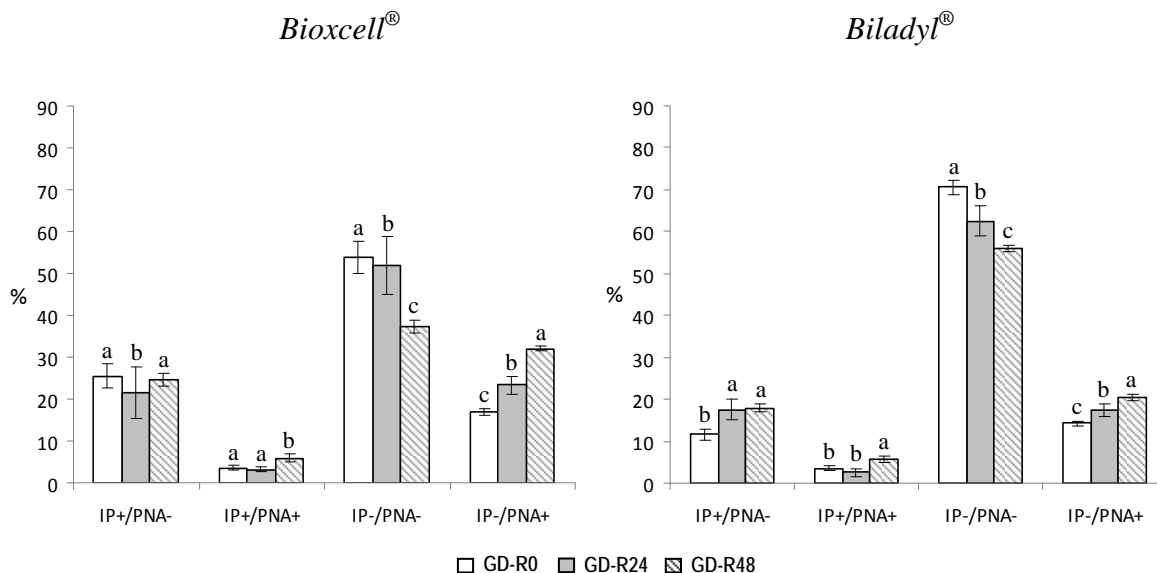


Figura nº 5.20. Influencia del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, en función del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®) del semen epididimario, en la viabilidad e integridad del acrosoma evaluados mediante citometría de flujo, empleando la técnica de gradiente de densidad como método de selección espermática. IP: idouro de propidio; PNA-FITC: PNA conjugado con isotiocianato de fluoresceína. IP+/PNA-: % de espermatozoides muertos con acrosomas normales; IP+/PNA+: % de espermatozoides muertos con acrosomas alterados; IP-/PNA-: % de espermatozoides vivos con acrosomas normales; IP-/PNA+: % de espermatozoides vivos con acrosomas alterados. Los datos se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Letras distintas indican diferencias significativas (a, b, c: $p < 0,05$).

Cuando se analizó la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de las muestras seleccionadas, mediante gradiente de densidad (GD), y se comparó con las descongeladas (D) se obtuvo, en todos los grupos y para ambos diluyentes, una disminución ($p < 0,05$) en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosomas funcionales (IP-/PNA-) (a excepción del grupo GD-R0By) y en el de espermatozoides muertos, tanto con acrosomas dañados (IP+/PNA+) como con acrosomas funcionales (IP+/PNA-). Por el contrario, en el grupo GD-R0Bx se incrementó ($p < 0,05$) el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosomas funcionales y en el GD-R48By no se apreciaron diferencias estadísticas. Aumentando ($p < 0,05$), en todos los grupos, el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosomas afuncionales (IP-/PNA+) (Tabla 5.18).

Tabla 5.18. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante el proceso de selección espermática por gradiente de densidad, en la integridad de la membrana plasmática y acrosomal.

	HOS+	IP+/PNA-	IP+/PNA+	IP-/PNA-	IP-/PNA+	GL
D-R0Bx	68,18±0,89 b	16,20±0,71 c	8,53±0,41 a	70,92±0,93 a	4,33±0,32 c	45,51±1,17 b
D-R0By	62,96±0,89 c	19,37±0,71 b	8,68±0,41 a	71,22±0,93 a	0,71±0,32 d	53,07±1,17 a
GD-R0Bx	78,85±0,89 a	25,52±0,71 a	3,51±0,41 b	53,95±0,93 b	16,99±0,32 a	46,06±1,17 b
GD-R0By	76,48±0,89 a	11,60±0,71 d	3,48±0,41 b	70,61±0,93 a	14,31±0,32 b	50,04±1,17 a
D-R24Bx	52,97±0,89 d	26,52±0,71 a	12,20±0,41 a	57,99±0,93 c	3,24±0,32 c	48,89±1,17 b
D-R24By	56,81±0,89 c	20,32±0,71 b	11,44±0,41 a	67,03±0,93 a	1,25±0,32 d	54,00±1,17 a
GD-R24Bx	74,70±0,89 b	21,49±0,71 b	3,25±0,41 b	51,83±0,93 d	23,37±0,32 a	36,70±1,17 c
GD-R24By	78,85±0,89 a	17,55±0,71 c	2,51±0,41 b	62,53±0,93 b	17,40±0,32 b	39,13±1,17 c
D-R48Bx	36,52±0,89 c	39,51±0,71 a	10,95±0,41 a	47,10±0,93 c	2,44±0,32 c	9,30±1,17 c
D-R48By	54,63±0,89 b	17,71±0,71 c	8,50±0,41 b	70,84±0,93 a	2,95±0,32 c	28,31±1,17 a
GD-R48Bx	55,30±0,89 b	24,54±0,71 b	5,92±0,41 c	37,40±0,93 d	32,09±0,32 a	6,55±1,17 c
GD-R48By	64,72±0,89 a	17,89±0,71 c	5,83±0,41 c	55,90±0,93 b	20,38±0,32 b	22,49±1,17 b

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Para cada tiempo de conservación de los epidídimos, índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b,c,d: p<0,05).

GL: % de espermatozoides con acrosomas normales; **HOS+:** % de espermatozoides vivos; **IP+/PNA-:** % de espermatozoides muertos con acrosomas normales; **IP+PNA+:** % de espermatozoides muertos con acrosomas alterados; **IP-/PNA-:** % de espermatozoides vivos con acrosomas normales; **IP-/PNA+:** % de espermatozoides vivos con acrosomas alterados.

R0: Muestras sin refrigeración *postmortem*.

R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*.

R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*.

D-Bx: Muestras diluidas con Bioxcell®, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

GD-Bx: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Bioxcell® y seleccionadas mediante gradiente de densidad.

D-By: Muestras diluidas con Biladyl®, congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas a 37 °C durante 30 segundos.

GD-By: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Biladyl® y seleccionadas mediante gradiente de densidad.

5.1.3.3.5. INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA ACROSÓMICA

5.1.3.3.5.1. BL-1 TAMPONADO CON GLUTARALDEHÍDO AL 2 %

Se demostró que la selección espermática, por medio de la técnica de gradiente de densidad, provocó un daño acrosomal que se incrementó significativamente (p<0,05) a medida que el periodo de conservación *postmortem* fue más largo (GD-R0Bx: 46,06±1,17 % vs GD-R24Bx: 36,70±1,17 % vs GD-R48Bx: 6,55±1,17 %; GD-R0By: 50,04±1,17 % vs GD-R24By: 39,13±1,17 % vs GD-R48By: 22,49±1,17 %).

En este caso fue con el diluyente Biladyl® con el que se consiguió un mayor (p<0,05) porcentaje de acrosomas normales en los grupos GD-R0 y GD-R48 (Tabla 5.18).

Al comparar las muestras seleccionadas mediante gradiente de densidad con las descongeladas se apreció, en las primeras, una disminución ($p < 0,05$) de los porcentajes de espermatozoides con acrosomas íntegros en los grupos GD-R24, independientemente del diluyente utilizado, así como en el GD-R48By (Tabla 5.18).

5.1.3.3.6. PRUEBA *IN VITRO* DE DIVISIÓN EMBRIONARIA

En las muestras seleccionadas mediante gradiente de densidad se observó, para ambos diluyentes, una disminución significativa ($p < 0,05$) del porcentaje de división embrionaria, proporcional al tiempo de conservación. En general, los mejores resultados correspondieron a las muestras diluidas con Biladyl[®], con diferencias estadísticas ($p < 0,05$) para los tres tiempos de conservación *postmortem* (Tabla 5.19).

Tabla 5.19. Efecto del medio de dilución (Bioxcell[®] o Biladyl[®]), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante el proceso de selección espermática mediante gradiente de densidad, en el porcentaje de división embrionaria al día 3 postinseminación.

DIV	GD-Bx	GD-By
R0	67,81±0,77 b;1	71,01±0,77 a;1
R24	59,22±0,77 b;2	67,08±0,77 a;2
R48	7,84±0,77 b;3	13,77±0,77 a;3

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Números distintos en la misma columna e índices distintos en la misma fila, indican diferencias significativas (1,2,3: $p < 0,05$; a,b: $p < 0,05$).

DIV: % de división al día tres postinseminación *in vitro*.

R0: Muestras sin refrigeración *postmortem*.

R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*.

R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*.

GD-Bx: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Bioxcell[®] y seleccionadas mediante gradiente de densidad.

GD-By: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Biladyl[®] y seleccionadas mediante gradiente de densidad.

5.1.3.4. CONTRASTE ENTRE LOS MÉTODOS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA, PARA CADA DILUYENTE, EN LAS CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD DEL SEMEN EPIDIDIMARIO EN RELACIÓN AL TIEMPO DE CONSERVACIÓN *POSTMORTEM* DEL EPIDÍDIMO

5.1.3.4.1. MOVILIDAD

5.1.3.4.1.1. MOVILIDAD INDIVIDUAL Y PROGRESIVA

Cuando se compararon las muestras seleccionadas mediante “swim-up” con las de gradiente de densidad, se observó que la movilidad individual se incrementó

significativamente ($p < 0,05$) en los grupos Sw-R0, con independencia del medio de dilución, y en el grupo Sw-R24 diluido con Biladyl[®], disminuyendo ($p < 0,05$) en este mismo grupo cuando el diluyente utilizado era el Bioxcell[®]. En cuanto a la movilidad progresiva, los valores fueron superiores ($p < 0,05$) en los grupos Sw-R0 y GD-R24 para ambos diluyentes (Tabla 5.20).

Tabla 5.20. Efecto del medio de dilución (Bioxcell[®] o Biladyl[®]), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante el proceso de selección espermática bien por "swim-up" o bien por gradiente de densidad, en la movilidad espermática individual y progresiva.

GRUPO		Sw-Bx	GD-Bx	Sw-By	GD-By
R0	MO	62,91±0,96	62,60±0,94	74,58±0,96 a	67,80±0,94 b
	MI	64,18±0,92 a	61,24±0,90 b	75,78±0,92 a	67,97±0,90 b
	MP	39,04±0,86 a	28,81±0,79 b	43,30±0,86 a	27,92±0,79 b
R24	MO	34,37±0,96 b	41,87±0,94 a	51,25±0,96 a	45,00±0,94 b
	MI	34,98±0,92 b	40,95±0,90 a	51,57±0,92 a	45,27±0,90 b
	MP	15,17±0,86 b	19,34±0,79 a	16,74±0,86 b	24,97±0,79 a
R48	MO	6,61±0,96	5,62±0,94	7,40±0,96	6,62±0,94
	MI	6,86±0,92	6,41±0,90	7,45±0,92	6,99±0,90
	MP	2,51±0,86	2,65±0,79	2,84±0,86	4,16±0,79

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Para un mismo tiempo de conservación de los epidídimos, y para cada uno de los parámetros estudiados, índices distintos en la misma fila, indican diferencias significativas (a,b: $p < 0,05$).

MO: % de movilidad individual al microscopio de contraste de fases; **MI:** % de movilidad individual y **MP:** % de movilidad progresiva, evaluadas con el sistema CASA.

R0: Muestras sin refrigeración *postmortem*.

R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*.

R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*.

Sw-Bx: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Bioxcell[®] y seleccionadas mediante "swim-up".

GD-Bx: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Bioxcell[®] y seleccionadas mediante gradiente de densidad.

Sw-By: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Biladyl[®] y seleccionadas mediante "swim-up".

GD-By: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Biladyl[®] y seleccionadas mediante gradiente de densidad.

5.1.3.4.1.2. PARÁMETROS CINÉTICOS ESPERMÁTICOS

La mayoría de los parámetros cinéticos de movilidad, presentaron registros significativamente más elevados ($p < 0,05$) en los grupos Sw-R0 y Sw-R24, para ambos diluyentes, a excepción de los índices de linealidad (LIN) y de oscilación de la cabeza (WOB) en las muestras diluidas con Biladyl[®], cuyos resultados fueron mejores ($p < 0,05$) para el gradiente de densidad. Las muestras del grupo R48 diluidas con Bioxcell[®] y seleccionadas mediante gradiente de densidad, obtuvieron los valores más bajos ($p < 0,05$) para el índice de rectitud (STR) y frecuencia de batido de flagelo (BCF), observándose un incremento ($p < 0,05$) en la velocidad media (VAP), en el índice de linealidad (LIN) y en la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH). En este

mismo grupo el índice de oscilación de la cabeza (WOB) experimentó un aumento significativo ($p < 0,05$), independientemente del diluyente empleado (Tabla 5.21).

Tabla 5.21. Efecto del medio de dilución (Bioxccl® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante el proceso de selección espermática bien por "swim-up" o bien por gradiente de densidad, en parámetros cinéticos de calidad seminal.

GRUPO		Sw-Bx	GD-Bx	Sw-By	GD-By
R0	VAP	84,93±1,52 a	70,56±1,43 b	83,27±1,52 a	56,87±1,43 b
	VCL	105,68±2,17 a	92,03±1,96 b	119,93±2,17 a	74,95±1,96 b
	VSL	67,56±1,30 a	52,26±1,22 b	63,90±1,30 a	43,09±1,22 b
	LIN	59,35±0,85 a	53,48±0,83 b	52,69±0,85 b	54,90±0,83 a
	STR	75,03±1,01 a	68,55±0,97 b	74,37±1,01	72,97±0,97
	WOB	77,56±0,81 a	74,38±0,84 b	69,16±0,81 b	73,18±0,84 a
	ALH	3,15±0,14	3,36±0,13	3,92±0,14 a	2,68±0,13 b
	BCF	9,95±0,23 a	6,41±0,20 b	12,04±0,23 a	6,08±0,20 b
R24	VAP	75,35±1,52 a	54,63±1,43 b	56,56±1,52 a	47,13±1,43 b
	VCL	109,92±2,17 a	78,94±1,96 b	93,99±2,17 a	66,99±1,96 b
	VSL	57,35±1,30 a	37,02±1,22 b	37,81±1,30 a	29,89±1,22 b
	LIN	48,84±0,85 a	45,50±0,83 b	39,10±0,85 b	41,21±0,83 a
	STR	70,30±1,01 a	64,14±0,97 b	64,06±1,01 a	60,31±0,97 b
	WOB	66,93±0,81	68,01±0,84	60,65±0,81 b	64,90±0,84 a
	ALH	4,12±0,14 a	3,48±0,13 b	3,57±0,14 a	3,03±0,13 b
	BCF	9,00±0,23 a	5,67±0,20 b	9,12±0,23 a	4,75±0,20 b
R48	VAP	24,46±1,52 b	28,71±1,43 a	25,76±1,52	22,96±1,43
	VCL	46,51±2,17	47,79±1,96	50,39±2,17 a	42,51±1,96 b
	VSL	16,82±1,30	18,46±1,22	15,76±1,30	15,14±1,22
	LIN	25,67±0,85 b	30,61±0,83 a	23,21±0,85	24,46±0,83
	STR	48,73±1,01 a	44,11±0,97 b	42,83±1,01	43,82±0,97
	WOB	38,93±0,81 b	46,65±0,84 a	39,09±0,81 b	41,55±0,84 a
	ALH	2,23±0,14 b	2,58±0,13 a	2,22±0,14	2,06±0,13
	BCF	5,97±0,23 a	3,50±0,20 b	5,56±0,23	4,03±0,20

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Para cada tiempo de conservación de los epidídimos, índices distintos en la misma fila, indican diferencias significativas (a,b: $p < 0,05$).

VAP: velocidad media; **VCL:** velocidad curvilínea; **VSL:** velocidad rectilínea; **LIN:** índice de linealidad; **STR:** índice de rectitud; **WOB:** índice de oscilación de la cabeza; **ALH:** amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide; **BCF:** frecuencia de batido del flagelo.

R0: Muestras sin refrigeración *postmortem*.

R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*.

R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*.

Sw-Bx: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Bioxccl® y seleccionadas mediante "swim-up".

GD-Bx: Muestras descongeladas, diluidas con Bioxccl® y seleccionadas mediante gradiente de densidad.

Sw-By: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Biladyl® y seleccionadas mediante "swim-up".

GD-By: Muestras descongeladas, diluidas con Biladyl® y seleccionadas mediante gradiente de densidad.

5.1.3.4.2. MORFOLOGÍA

Al evaluar mediante tinción de Eosina-Nigrosina, el efecto de los métodos de selección sobre la morfología espermática, se encontró en los grupos GD-R0 y GD-R24 un porcentaje significativamente más elevado ($p < 0,05$) de espermatozoides normales en las muestras diluidas con Bioxcell[®]. Además, con el método de gradiente de densidad, disminuyeron ($p < 0,05$), en todos los grupos y para ambos diluyentes, las anomalías de cola, la presencia de gota proximal y las anomalías de cabeza. Para esta última alteración se encontró una excepción en el grupo GD-R0By, que presentó valores superiores ($p < 0,05$) a los observados en las muestras seleccionadas mediante “swim-up”. No obstante, esta última técnica hizo decrecer, para ambos diluyentes, el porcentaje de piezas intermedias dañadas en los grupos R0 y R24 y la presencia de cabezas sueltas en este último (Tabla 5.22).

En cuanto a los grupos R48 seleccionados mediante “swim-up”, se incrementó significativamente ($p < 0,05$) el porcentaje de espermatozoides normales en las muestras diluidas con Biladyl[®], disminuyendo ($p < 0,05$), para ambos diluyentes, las anomalías de cabeza y la presencia de cabezas sueltas. Sin embargo, en las muestras seleccionadas mediante gradiente de densidad, las alteraciones de pieza intermedia y de cola fueron menores ($p < 0,05$) cuando se utilizó como diluyente el Bioxcell[®], mientras que la presencia de gotas proximales presentó porcentajes mas bajos ($p < 0,05$) en las muestras diluidas con Biladyl[®] (Tabla 5.22).

5.1.3.4.3. INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y ACROSÓMICA: PRUEBA DE ENDÓSMOSIS CELULAR, BL-1 TAMPONADO CON GLUTARALDEHÍDO AL 2 % Y COMBINACIÓN DE FLUOROCROMOS (IP/PNA)

Al evaluar el efecto de los métodos de selección espermática, se comprobó que, en todos los grupos, el método de gradiente de densidad preservó mejor ($p < 0,05$) la integridad de la membrana plasmática y acrosomal, a excepción del porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática integra (HOS) en el grupo R0By, que no presentó diferencias estadísticas entre ambos métodos ($p > 0,05$) (Tabla 5.23).

El estudio de ambos parámetros en conjunto, mediante citometría de flujo, puso de manifiesto que fue con el gradiente de densidad, en todos los grupos, con el que se consiguió el mayor porcentaje ($p < 0,05$) de espermatozoides vivos con acrosomas funcionales (IP-/PNA-) y el menor ($p < 0,05$) de espermatozoides vivos y muertos con acrosomas alterados (IP-/PNA+ e IP+/PNA+, respectivamente). Se observó una

excepción para el grupo R0Bx seleccionado mediante “swim-up”, en el que los espermatozoides vivos con acrosomas funcionales (IP-/PNA-) fueron más numerosos ($p < 0,05$), mientras que los porcentajes de espermatozoides vivos y muertos con acrosomas alterados (IP-/PNA+ y IP+/PNA+ respectivamente) no mostraron diferencias estadísticas ($p > 0,05$) (Tabla 5.23).

Tabla 5.22. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante el proceso de selección espermática bien por “swim-up” o bien por gradiente de densidad, en las características de morfología espermática.

GRUPO		Sw-Bx	GD-Bx	Sw-By	GD-By
R0	N	60,43±0,83 b	67,54±0,77 a	61,72±0,83	65,02±0,77
	C	4,45±0,54 a	3,92±0,54 b	4,17±0,54 b	5,38±0,54 a
	CS	0,81±0,35	0,69±0,37	0,79±0,35	0,86±0,37
	PI	9,18±0,47 b	14,21±0,61 a	9,52±0,47 b	12,29±0,61 a
	GP	2,88±0,23 a	1,51±0,23 b	2,45±0,23 a	2,10±0,23 b
	CO	22,22±0,77 a	12,12±0,83 b	21,37±0,77 a	14,31±0,83 b
R24	N	58,75±0,83 b	65,30±0,77 a	56,63±0,83	60,85±0,77
	C	3,24±0,54 a	1,80±0,54 b	4,95±0,54 a	3,54±0,54 b
	CS	0,68±0,35 b	1,36±0,37 a	0,72±0,35 b	2,07±0,37 a
	PI	8,56±0,47 b	10,76±0,61 a	9,45±0,47 b	15,82±0,61 a
	GP	4,70±0,23 a	1,81±0,23 b	5,88±0,23 a	3,40±0,23 b
	CO	24,04±0,77 a	18,04±0,83 b	20,61±0,77 a	15,64±0,83 b
R48	N	39,54±0,83	47,67±0,77	43,15±0,83 a	37,99±0,77 b
	C	4,78±0,54 b	5,28±0,54 a	3,32±0,54 b	5,62±0,54 a
	CS	0,58±0,35 b	1,80±0,37 a	2,31±0,35 b	6,97±0,37 a
	PI	23,45±0,47 a	21,49±0,61 b	20,72±0,47	21,29±0,61
	GP	4,55±0,23	4,64±0,23	5,48±0,23 a	3,43±0,23 b
	CO	27,07±0,77 a	25,08±0,83 b	24,94±0,77	24,66±0,83

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Para cada tiempo de conservación de los epidídimos, índices distintos en la misma fila, indican diferencias significativas (a,b: $p < 0,05$).

N: % de espermatozoides normales; **C:** % de espermatozoides con alteración en la cabeza; **CS:** % de espermatozoides con cabeza suelta; **PI:** % de espermatozoides con alteración en la pieza intermedia; **GP:** % de espermatozoides con presencia de gota proximal; **CO:** % de espermatozoides con alteración en la cola.

R0: Muestras sin refrigeración *postmortem*.

R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*.

R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*.

Sw-Bx: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Bioxcell® y seleccionadas mediante “swim-up”.

GD-Bx: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Bioxcell® y seleccionadas mediante gradiente de densidad.

Sw-By: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Biladyl® y seleccionadas mediante “swim-up”.

GD-By: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Biladyl® y seleccionadas mediante gradiente de densidad.

Tabla 5.23. Efecto del medio de dilución (Bioxcell® o Biladyl®), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante el proceso de selección espermática bien por “swim-up” o bien por gradiente de densidad, en la integridad de la membrana plasmática y acrosomal.

GRUPO		SwBx	GD-Bx	Sw-By	GD-By
R0	HOS+	67,15±1,08 b	78,85±0,89 a	77,12±1,08	76,48±0,89
	IP+/PNA-	10,72±0,71 b	25,52±0,71 a	13,00±0,71	11,60±0,71
	IP+/PNA+	4,20±0,47	3,51±0,41	9,81±0,47 a	3,48±0,41 b
	IP-/PNA-	67,92±1,02 a	53,95±0,93 b	59,80±1,02 b	70,61±0,93 a
	IP-/PNA+	17,14±0,55	16,99±0,32	17,50±0,55 a	14,31±0,32 b
	GL	26,75±1,16 b	46,06±1,17 a	26,61±1,16 b	50,04±1,17 a
R24	HOS+	59,47±1,08 b	74,70±0,89 a	61,82±1,08 b	78,85±0,89 a
	IP+/PNA-	19,63±0,71	21,49±0,71	21,31±0,71 a	17,55±0,71 b
	IP+/PNA+	15,70±0,47 a	3,25±0,41 b	15,86±0,47 a	2,51±0,41 b
	IP-/PNA-	36,13±1,02 b	51,83±0,93 a	42,66±1,02 b	62,53±0,93 a
	IP-/PNA+	28,51±0,55 a	23,37±0,32 b	20,13±0,55 a	17,40±0,32 b
	GL	29,13±1,16 b	36,70±1,17 a	26,60±1,16 b	39,13±1,17 a
R48	HOS+	49,45±1,08 b	55,30±0,89 a	50,67±1,08 b	64,72±0,89 a
	IP+/PNA-	21,07±0,71 b	24,54±0,71 a	23,94±0,71 a	17,89±0,71 b
	IP+/PNA+	14,52±0,47 a	5,92±0,41 b	14,46±0,47 a	5,83±0,41 b
	IP-/PNA-	28,90±1,02 b	37,40±0,93 a	30,81±1,02 b	55,90±0,93 a
	IP-/PNA+	35,49±0,55 a	32,09±0,32 b	30,80±0,55 a	20,38±0,32 b
	GL	3,97±1,16 b	6,55±1,17 a	14,75±1,16 b	22,49±1,17 a

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Para un mismo diluyente, para cada tiempo de conservación de los epidídimos, índices distintos en la misma fila, indican diferencias significativas (a,b: p<0,05).

GL: % de espermatozoides con acrosomas normales; **HOS+:** % de espermatozoides vivos; **IP+/PNA-:** % de espermatozoides muertos con acrosomas normales; **IP+PNA+:** % de espermatozoides muertos con acrosomas alterados; **IP-/PNA-:** % de espermatozoides vivos con acrosomas normales; **IP-/PNA+:** % de espermatozoides vivos con acrosomas alterados.

R0: Muestras sin refrigeración *postmortem*.

R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*.

R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*.

Sw-Bx: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Bioxcell® y seleccionadas mediante “swim-up”.

GD-Bx: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Bioxcell® y seleccionadas mediante gradiente de densidad.

Sw-By: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Biladyl® y seleccionadas mediante “swim-up”.

GD-By: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Biladyl® y seleccionadas mediante gradiente de densidad.

5.1.3.4.4. PRUEBA *IN VITRO* DE DIVISIÓN EMBRIONARIA

Al contrastar, para un mismo diluyente, ambos métodos de selección espermática, se observó que en el grupo sin conservación (R0) la técnica que proporcionó, tanto para Bioxcell® como para Biladyl®, porcentajes significativamente mayores (p<0,05) de división embrionaria, en el día 3 postinseminación, fue el

gradiente de densidad. Sin embargo, cuando los epidídimos se conservaron *postmortem* mediante refrigeración (R24 y R48), el porcentaje más elevado de división embrionaria ($p < 0,05$) correspondió a las muestras diluidas con Bioxcell[®] y que fueron seleccionadas mediante “swim-up”, no encontrándose diferencias estadísticas ($p > 0,05$) al emplear Biladyl[®] como diluyente (Tabla 5.24).

Tabla 5.24. Efecto del medio de dilución (Bioxcell[®] o Biladyl[®]), en función del tiempo de conservación *postmortem* del epidídimo, durante el proceso de selección espermática (“swim-up” o gradiente de densidad), en el porcentaje de división embrionaria al día 3 postinseminación.

DIV	Sw-Bx	GD-Bx	Sw-By	GD-By
R0	63,58±0,77 b	67,81±0,77 a	63,0±0,77 b	71,01±0,77 a
R24	62,04±0,77 a	59,22±0,77 b	65,76±0,77	67,08±0,77
R48	12,58±0,77 a	7,84±0,77 b	13,67±0,77	13,77±0,77

Los porcentajes se expresan como MEDIAS CUADRÁTICAS±ES. Índices distintos en la misma fila, indican diferencias significativas (a,b: $p < 0,05$).

DIV: % de división al día tres postinseminación *in vitro*.

R0: Muestras sin refrigeración *postmortem*.

R24: Muestras con 24 horas de refrigeración *postmortem*.

R48: Muestras con 48 horas de refrigeración *postmortem*.

Sw-Bx: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Bioxcell[®] y seleccionadas mediante “swim-up”.

Sx-By: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Biladyl[®] y seleccionadas mediante “swim-up”.

GD-Bx: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Bioxcell[®] y seleccionadas mediante gradiente de densidad.

GD-By: Muestras de semen descongeladas, diluidas con Biladyl[®] y seleccionadas mediante gradiente de densidad.

6. Discusión

Dentro de la estrategia general de gestión y organización de un banco de germoplasma, para salvaguardar la variabilidad genética del toro de Lidia y recuperarla de una manera rápida y efectiva, podemos establecer varios puntos a la hora de decidir si se admite o se descarta una muestra. El objeto de estudio, en esta Tesis Doctoral, han sido muestras espermáticas epididimarias, obtenidas de toro de Lidia después de su sacrificio en diferentes plazas de Castilla y León. Los principales puntos a evaluar fueron: la influencia del tiempo *postmortem* de almacenamiento refrigerado hasta el procesado de la muestra; los efectos, en el semen precongelado y descongelado, de dos diluyentes espermáticos de comprobada efectividad en el esperma eyaculado, con diferente naturaleza de sus componentes (a base de yema de huevo o de lecitina de soja); y el mejor método de selección con el fin de realizar la fecundación *in vitro*.

6.1. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE CONSERVACIÓN *POSTMORTEM* DEL EPIDÍDIMO Y DEL DILUYENTE ESPERMÁTICO, EN EL PROCESO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN, SOBRE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL

Entre los factores que determinan la viabilidad de los espermatozoides, el tiempo transcurrido desde la muerte del animal hasta la congelación de los gametos, y el manejo que se le dé al epidídimo durante ese tiempo, van a ser algunos de los factores más condicionantes para la supervivencia y capacidad fecundante de los espermatozoides en el futuro (Anel *et al.*, 2002).

El efecto del tiempo de almacenamiento en el esperma epididimal se ha evaluado en diferentes especies, por muchos autores, siendo la importancia de este factor trascendental, ya que muestras de gran calidad pueden deteriorarse rápidamente, sobre todo si son mantenidas en condiciones inadecuadas. La mayoría de los estudios, emplearon como diseño experimental la separación de ambas colas epididimales, usando una como control de la otra, cada una sometida a diferentes tiempos de almacenamiento, ya sea refrigerado o no. No obstante, en este trabajo, se utilizó la mezcla del esperma de ambos epidídimos, del mismo toro, para un mismo grupo, ya que

se ha comprobado que las dos colas epididimales no son totalmente comparables (Goovaerts *et al.*, 2006). Además esto permitiría obtener una mayor cantidad de muestra, para la realización de las diferentes diluciones y las numerosas pruebas de calidad espermática y de fecundación *in vitro*, planteadas en este estudio.

Por lo que se refiere a la temperatura de almacenamiento de los epidídimos, con el fin de lograr la mejor conservación espermática, se decidió utilizar muestras refrigeradas, ya que los trabajos de otros autores en diferentes especies, como en ratones (Songsasen *et al.*, 1998; An *et al.*, 1999; Kishikawa *et al.*, 1999; Sankai *et al.*, 2001), jabalí (Kikuchi *et al.*, 1998), perro (Yu and Leibo, 2002), algunas especies silvestres de África (Lambrechts *et al.*, 1999; Friedmann *et al.*, 2000; Lubbe *et al.*, 2000), muflones (Garde *et al.*, 1995), ciervo ibérico (Garde *et al.*, 1998; Soler *et al.*, 2003) y toro (Foote, 2000), coincidían en general, que la refrigeración del epidídimo hasta alrededor de los 5 °C era la mejor estrategia para reducir el deterioro de la calidad espermática, que se produce sobre todo en las primeras horas *postmortem*. Aunque otros estudios en ratón (Sankai *et al.*, 2001), han indicado que la refrigeración es beneficiosa a más largo plazo (4 días), sugiriendo que las muestras deberían analizarse a varias temperaturas de refrigeración. De hecho, estos autores recomiendan refrigerar a 10 °C, en vez de a 5 °C.

El efecto beneficioso, de la refrigeración epididimal, en varios parámetros de calidad del esperma, podría explicarse por la reducción de la tasa metabólica de las células, cuando se encuentran almacenadas a 5 °C (Salamon and Maxwell, 2000). Además, es sabido que la cola epididimaria proporciona un excelente ambiente para el almacenamiento del esperma, en un estado de reposo.

La metodología, que consistió en dejar los testículos y epidídimos protegidos simplemente por el escroto, fue escogida atendiendo a la experiencia de otros autores (Sankai *et al.*, 2001; Martínez-Pastor *et al.*, 2005a), quienes han reportado que manteniendo los testículos y epidídimos dentro de la bolsa escrotal se impedía la desecación y se protegía la cola epididimaria, siendo un método tan eficaz como otros más complicados.

Al recuperar las células espermáticas de los epidídimos, no se encontraron diferencias, en cuanto a la concentración, para los diferentes tiempos de conservación *postmortem* (I-R24 y I-R48) cuando se compararon con el grupo sin conservación

(I-R0). El volumen obtenido fue similar, pero con una concentración inferior a la publicada, para bovinos, por algunos autores (Goovaerts *et al.*, 2006) o superior a la reflejada en otros trabajos (Martins *et al.*, 2007; 2009). Estas discrepancias podrían ser explicadas por la diferencia racial, puesto que los primeros autores trabajaron con diferentes tipos de razas (Frisona, Azul Belga y Limousin) y los segundos con cruces de varias razas. En estos casos la selección estaba claramente orientada hacia la producción y la fertilidad, contraria a la del toro de Lidia, en el que este último parámetro no fue considerado, durante siglos, como prioritario en los patrones de selección.

Para la realización de las pruebas de calidad correspondientes, los espermatozoides una vez recuperados de los epidídimos, fueron sometidos durante un periodo de 30 minutos, a un proceso de calentamiento a 37 °C. Este proceso tenía como objeto estimular su movilidad, ya que tanto en el espermatozoide recién obtenido del epidídimo, como después de la refrigeración -en la precongelación- y de la descongelación, los espermatozoides casi no presentaban actividad. Esta escasa o nula movilidad, puede ser atribuida a la inactividad metabólica de los gametos almacenados en la cola epididimaria.

Goovaerts *y col.* (2006) analizaron mediante ordenador los movimientos del espermatozoide eyaculado y epididimal del mismo toro, observando que en un período de tiempo determinado, un espermatozoide obtenido de la cola del epidídimo presentaba, en comparación al espermatozoide eyaculado: menor velocidad rectilínea (VSL), velocidad media (VAP) y frecuencia de batido del flagelo (BCF) e inferior rectitud (STR) y linealidad (LIN) del movimiento. Sin embargo, su velocidad curvilínea (VCL) fue mayor así como la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH).

Como consecuencia de ello, el espermatozoide eyaculado parece tener mejores características de movimiento y, por lo tanto, sería el más adecuado para recorrer, en toda su longitud, el tracto femenino de forma más eficaz y más rápida que el espermatozoide epididimal. Sin embargo, las características de movimiento de los espermatozoides no tienen tanta importancia, puesto que las contracciones del útero podrían jugar un papel fundamental en este proceso. Como se ha señalado, los espermatozoides eyaculados, comparados con los epididimales, presentaban una mayor frecuencia de batido del flagelo y una menor amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza que posiblemente sería más importante en la penetración de la zona pelúcida (Suárez *et al.*, 1991).

La reducción de la temperatura por debajo de los 37 °C, y principalmente de los 20 °C, induce una serie de alteraciones de naturaleza biofísica en el espermatozoide (Amann and Pickett, 1987). En este trabajo, el esperma recién recuperado (I-R0) de epidídimos de toros de Lidia, no varió su movilidad individual, ni la progresiva hasta las 24 horas de refrigeración (I-R24), disminuyendo bruscamente en el grupo almacenado durante 48 horas *postmortem* (I-R48). Estos resultados coinciden con los encontrados para la misma especie por Martins y *col.* (2009) y, con otros autores en diferentes especies como en caprinos (Blash *et al.*, 2000), en caninos (Yu and Leibo, 2002), en ovinos (Kaabi, 2003) y en cérvidos (Martínez-Pastor *et al.*, 2005a). Estos últimos autores, Martínez-Pastor y *col.* (2005b) observaron un incremento de la subpoblación lenta y no lineal, y una disminución de la calidad espermática, con el tiempo *postmortem*, lo cual refleja el efecto del tiempo de conservación de los epidídimos en los espermatozoides. Sin embargo, en cérvidos, otros autores no encontraron diferencias significativas en la movilidad de las muestras iniciales del esperma epididimario almacenado durante 4 días a 5 °C (Soler *et al.*, 2005). Estos resultados podrían evidenciar la existencia de diferencias entre especies, y entre individuos de la misma especie, en relación con el mantenimiento de la movilidad de los espermatozoides almacenados, *postmortem*, en el epidídimo.

El uso de diluyentes de constitución química definida, sin la adición de proteínas de origen animal, para la criopreservación del semen, evita los problemas asociados a la adición tradicional de yema huevo, incluyendo la contaminación de microorganismos, la variabilidad en su composición y la dificultad o interferencia con algunos métodos de evaluación de la calidad espermática.

Durante algún tiempo, se ha asumido que los espermatozoides que sobrevivían a los procesos de refrigeración, congelación y descongelación eran semejantes a las células precongeladas, es decir, que no se veían afectados por los tratamientos de conservación. Sin embargo, Watson (1995) advirtió que los espermatozoides supervivientes presentaban características diferentes a las que tenían antes de la congelación. La evidencia de que la movilidad del semen descongelado se mantiene durante menos tiempo, en comparación con la del semen no congelado, permite concluir que los espermatozoides descongelados son menos resistentes y que el proceso de congelación altera las membranas (Parks and Graham, 1992).

Los principales daños celulares, inducidos por la refrigeración, incluyen alteraciones morfológicas como rotura de la membrana plasmática (principal estructura afectada durante la refrigeración), degeneración acrosomal y lesiones en las mitocondrias (De Leeuw *et al.*, 1990). La pérdida de las propiedades de selectividad, en la permeabilidad de la membrana, es uno de los hechos que se producen, de forma más precoz, en el proceso (Quinn *et al.*, 1980) y, que como hemos descrito en la revisión bibliográfica, está asociada a las fases de transición de los lípidos de la membrana debidas al choque térmico (Drobnis *et al.*, 1993; Watson, 1995).

La refrigeración anticipa las modificaciones de la membrana plasmática que, normalmente, se producen durante la capacitación (Watson, 1995). Este fenómeno también se ha observado a nivel de la reactividad y de la fluidez de la membrana, y en las concentraciones celulares de iones, como es el caso del Ca^{2+} (Green and Watson, 2001). El aumento de Ca^{2+} intracelular, durante la refrigeración, contribuye a las reacciones de capacitación y al fenómeno de fusión entre las membranas plasmática y acrosomal externa (Watson, 2000). Sin embargo, estas alteraciones no reflejan la totalidad de los cambios detectados durante la capacitación *in vitro*, dando lugar a un estado de capacitación “intermedia”. Estos espermatozoides probablemente no permanecerían viables el tiempo suficiente para alcanzar el lugar de fecundación y por eso, no proporcionarían porcentajes de fertilidad normales *in vivo* (principalmente cuando son depositados en el tracto genital posterior). Por otra parte, podrían sufrir la reacción acrosómica precoz y serían incapaces de fecundar el ovocito (Green and Watson, 2001).

En este trabajo, durante la pre congelación (P), se observó una reducción significativa en la movilidad, proporcional al tiempo de conservación *postmortem*, para todos los grupos. El diluyente a base de yema de huevo (Biladyl[®]) protegió mejor la movilidad del espermatozoide, tanto individual como progresiva y en todos los tiempos, que el otro diluyente a base de lecitina de soja (Bioxcell[®]), aunque no presentaron diferencias significativas en el grupo R48.

El mayor desafío para las células, en el proceso de congelación, no es resistir a las bajas temperaturas del nitrógeno líquido, sino mantener la viabilidad en un rango de temperaturas, entre los -15 y -60 °C, que las células experimentan en dos ocasiones, durante la congelación y durante la descongelación. A -196 °C no se producen

reacciones térmicas, puesto que por debajo de los $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ no existe agua en estado líquido (Mazur, 1984). La bibliografía consultada demuestra que el espermatozoide se hace susceptible al choque térmico en la región proximal del cuerpo del epidídimo, cuando la gota citoplasmática se mueve en dirección a la porción distal de la pieza intermedia. Así, durante la maduración del espermatozoide en el epidídimo, éste adquiere la capacidad de moverse pero también la susceptibilidad al choque térmico (White, 1993). Por lo tanto nuestras muestras, extraídas de la cola del epidídimo, son susceptibles a este efecto.

En cuanto a los daños sufridos tras la congelación, Salamon y Maxwell (2000), señalan que las membranas plasmática y acrosomal son más sensibles que el núcleo y que la pieza intermedia, y que en el acrosoma la membrana externa es más vulnerable que la membrana interna y que su contenido, es decir, que el acrosoma propiamente dicho.

Otro aspecto de la función espermática, afectada por la congelación, es el proceso de capacitación. El espermatozoide congelado y descongelado puede desarrollar reacción acrosómica y fecundar con más rapidez que un espermatozoide fresco no capacitado (Watson *et al.*, 1992a), presentando un estado semejante a la capacitación que contribuiría a su reducida longevidad y a su rapidez en penetrar los ovocitos sin incubación (Watson, 1995). Una vez capacitado, el espermatozoide exhibiría una tasa metabólica elevada (Cormier *et al.*, 1997), movilidad hiperactiva (Curry, 2000), aumento de la fluidez y de la permeabilidad de la membrana y, si no llega a fecundar, sufre una reacción acrosómica espontánea debido al influjo descontrolado de Ca^{2+} (Cormier *et al.*, 1997). Sin embargo, una vez alcanzado un determinado grado de desestabilización, el espermatozoide continúa progresivamente con la pérdida de la función de membrana hasta un punto en que es incapaz de mantener la integridad de la misma, de modo que la capacitación conduce inevitablemente a la muerte celular de los espermatozoides que no fecundaron (Curry, 2000).

El tiempo necesario para la capacitación suele ser más reducido en las muestras congeladas, y los valores de los parámetros de movilidad espermática, considerados como característicos de la hiperactivación, más altos. De este modo, el incremento en la velocidad curvilínea (VCL) y del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) se observaron, con mayor precocidad, en dichas muestras. Este grupo de espermatozoides

que se desestabilizan con el proceso de criopreservación, podría perder rápidamente su capacidad fecundante, lo que disminuiría la proporción de espermatozoides disponibles para la fecundación (Rota *et al.*, 1999).

Según algunos autores (Martins *et al.*, 2009) la congelación del esperma recuperado del epidídimo bovino, provocó una disminución de la movilidad individual, independientemente del tiempo de almacenamiento (3 días), aunque no se detectaron cambios en la movilidad progresiva. Los resultados de nuestro trabajo, en cierto modo, son similares, ya que la movilidad individual disminuyó en todos los grupos de conservación mientras que la movilidad progresiva se incrementó después del proceso de congelación-descongelación, en relación a los datos de precongelación, con diferencias en los grupos D-R0 y D-R24. Este hecho coincide con informes anteriores, en diferentes especies, los cuales han encontrado que la movilidad individual es la variable más afectada por el tiempo de almacenamiento (Sankai *et al.*, 2001; Yu and Leibo, 2002; Hishinuma *et al.*, 2003; Kaabi, 2003; Martínez-Pastor *et al.*, 2005a).

Soler *y col.* (2005), en un estudio en el que mantuvieron el esperma de ciervo rojo almacenado en los epidídimos durante 4 días a 5 °C, no encontraron diferencias significativas en la movilidad espermática de las muestras iniciales de los diferentes tiempos de conservación. Sin embargo, después de la descongelación, la movilidad, tanto en el grupo control (67%) como en el grupo almacenado durante 12 y 24 horas (68% y 58% respectivamente), fue similar a la de los eyaculados de ciervos (70%) mencionado por otros autores (Fukui *et al.*, 1991). Estos datos son comparables con los obtenidos por Kaabi (2003) en esperma epididimal de morueco, ya que en la evaluación después de la descongelación, tanto en el grupo control (69,8%) como en el grupo de 24 horas (64,6%), la movilidad fue similar a la del esperma eyaculado de la misma especie (70%).

En el esperma del epidídimo de ciervo ibérico, y de corzo, el aumento del tiempo de almacenamiento *postmortem* disminuyó los porcentajes de movilidad individual y progresiva, justo después de las primeras 24 horas (aunque no se encontraron diferencias significativas antes de las 48 horas) (Martínez-Pastor *et al.*, 2005a). En equinos, la refrigeración de los testículos durante 24 horas, permitió congelar espermatozoides con buenos resultados a la descongelación, con mejor movilidad progresiva (24%), respecto al mismo parámetro evaluado (7%) para el grupo

que se mantuvo almacenado a temperatura ambiente durante el mismo tiempo (Neild *et al.*, 2006).

Nuestro trabajo corrobora los resultados obtenidos por Martins *y col.* (2009), quienes afirmaron que los espermatozoides, mantenidos en los testículos sin flujo sanguíneo durante el almacenamiento refrigerado, sufrieron más daño que en el proceso de congelación-descongelación, aunque en nuestra experiencia, la integridad de las membranas (plasmática y acrosomal) se vio más dañada por el segundo proceso. Sin embargo, Fernández-Santos *y col.* (2009) demostraron que, durante las primeras 96 horas de almacenamiento, la movilidad (individual y progresiva) no reveló diferencias significativas, cuando se valoró tras la descongelación, aunque sí produjo una disminución significativa cuando los epidídimos de cérvidos habían estado almacenados durante 192 horas, a 5 °C.

Las discrepancias encontradas, en los diferentes estudios, podrían explicarse apelando a que la movilidad en el esperma descongelado parece depender más de la calidad inicial del semen, que del método de congelación en si mismo (Fernandes *et al.*, 1990). Estos resultados, tomados en conjunto, evidencian que existen diferencias entre especies, en relación con el mantenimiento de la movilidad, en el momento de la descongelación, de los espermatozoides almacenados *postmortem* en el epidídimo.

El tiempo de almacenamiento *postmortem* también afectó a los parámetros cinéticos espermáticos en la muestra inicial (I), disminuyendo, después de las 24 horas de conservación, las velocidades media (VAP), curvilínea (VCL) y rectilínea (VSL), y los índices de linealidad (LIN), de oscilación lateral de la cabeza (WOB) y de la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH). Los índices de rectitud de la trayectoria (STR) y la frecuencia de batido del flagelo (BCF) parecen tener una mayor resistencia a la conservación, ya que no presentaron diferencias hasta las 48 horas. Se esperaban estos resultados ya que, en estudios anteriores como el de Martínez-Pastor *y col.* (2005b) evaluando subpoblaciones espermáticas, se confirmó que la disminución de la movilidad, relacionada con el tiempo *postmortem*, no solo se observó en el porcentaje de espermatozoides móviles, sino también en su calidad de movimiento. Esto se podría explicar por la desregulación de los mecanismos implicados en la movilidad del esperma debido al tiempo de almacenamiento *postmortem*, pudiendo estar relacionada con anomalías en la señalización del esperma (Turner,

2006) ya que, después de la muerte del animal, el epidídimo sigue un proceso degenerativo en el que el nivel de iones, y las diferentes vías, se han modificado debido a la descomposición del tejido.

La pre congelación espermática afectó principalmente a los grupos P-R0 y P-R24 disminuyendo, en general, todos los parámetros cinéticos de manera homogénea, y presentando las mismas variaciones entre grupos que las muestras iniciales. Sin embargo, las muestras del grupo P-R48, casi no se vieron modificadas por este proceso (fue afectado en mayor medida por el tiempo de conservación *postmortem*). Ambos diluyentes protegieron, de manera similar, al espermatozoide del shock térmico durante la pre congelación, aunque las muestras diluidas con Biladyl® presentaron, en general, valores superiores para los parámetros cinéticos de los espermatozoides.

Durante el proceso de congelación-descongelación, se ven afectadas la organización de los lípidos y la composición química de la membrana plasmática del espermatozoide (Amann and Pickett, 1987). Las LDL son, en gran medida, responsables de la acción protectora y, directa o indirectamente, reducen las modificaciones en la membrana del espermatozoide (Pace and Graham, 1974; Manjunath *et al.*, 2002; Moussa *et al.*, 2002; Bergeron *et al.*, 2004).

Los daños acrosomales de muchas células, causados por el proceso de congelación-descongelación, se manifiestan por la vacuolización acrosómica, conocida como reacción acrosómica “falsa”, o por la degeneración celular. Esa reacción, a diferencia de la reacción acrosómica “verdadera” o fisiológica, no representa la población espermática con posibilidades de fecundar ovocitos (Way *et al.*, 1995). Las alteraciones acrosómicas observadas, en una elevada proporción de los espermatozoides, y la alteración en la composición de las cabezas sugieren que las modificaciones inducidas por la criopreservación pueden afectar a su longevidad y a su capacidad fecundante (Ström-Holst *et al.*, 1997).

El proceso de congelación-descongelación afectó, en mayor medida, a la movilidad de las muestras que se mantuvieron refrigeradas *postmortem*, presentando, en general, diferencias significativas entre los tres grupos, proporcionales al tiempo de conservación *postmortem*. Este proceso aumentó todos los parámetros cinéticos, al enfrentarlas con las muestras pre congeladas, de los grupos D-R0Bx/By y D-R24Bx. Sin

embargo, en general, encontramos algunos valores cinéticos superiores, en las muestras diluidas con Bioxcell® en los grupos D-R0 y D-R24 comparándolas con las muestras de Biladyl®. Las muestras conservadas durante 48 horas *postmortem*, en general, no estuvieron afectadas, aunque se observó un incremento de algunos parámetros en las muestras diluidas con Bioxcell®. De los grupos refrigerados *postmortem*, las muestras diluidas con un medio a base de yema de huevo, no presentaron diferencias con las muestras precongeladas. Esta diferencia encontrada entre diluyentes podría deberse a la viscosidad del medio, teniendo en cuenta que ésta influye sobre las características de movilidad (Amann, 1989). La presencia de yema de huevo en el diluyente hace que aumente la viscosidad del medio, y que se reduzca la velocidad del espermatozoide, como se había observado anteriormente en el eyaculado bovino (Amann and Hammerstedt, 1980; Hirai *et al.*, 1997). Esto hace que la comparación de diluyentes con diferentes viscosidades, mediante examen computerizado de la movilidad sea, en la actualidad, delicada debido a la dificultad de establecer diferencias en el programa informático que gestiona los datos computarizados. Por tanto, no se debería excluir el examen visual de la movilidad total y progresiva. Wagtendonk Van de Leeuw y *col.* (2000) sugirieron que el aumento de la viscosidad, y la presencia de partículas de suciedad de los extensores, podrían ser causa, además, de una reducción en la fecundidad.

Este incremento, en los parámetros cinéticos, podría explicarse por la aceleración de una subpoblación de espermatozoides maduros, sometidos a algún tipo de activación pero con poca resistencia en el tiempo, presentando mayores velocidades y frecuencia de batido del flagelo en el grupo sin refrigeración epididimal *postmortem* (D-R0), disminuyendo la actividad en el grupo conservado durante 24 horas (D-R24), para desaparecer, prácticamente, en el grupo que se mantuvieron los epidídimos refrigerados 48 horas (D-R48). Esto coincide con el daño acrosomal presente, en mayor medida, en el grupo sin conservación y casi insignificante en los conservados, lo cual podría dar indicios de una “criocapacitación” espermática. Este fenómeno también fue documentado por Martínez-Pastor y *col.* (2005b) quienes, trabajando con poblaciones de esperma epididimal de ciervo rojo, encontraron una subpoblación con movimientos rápidos y poco lineales (alta VAP, BCF y ALH y, en menor medida, la LIN), que disminuyeron su actividad de forma proporcional al tiempo de conservación *postmortem*. Hay que tener en cuenta que los mayores registros tanto de alteración

acrosomal como de parámetros cinéticos, en los grupos refrigerados *postmortem*, se presentaron en las muestras diluidas con Bioxcell[®], indicando que el diluyente a base de yema de huevo frenaría, en cierta medida, esta reacción de activación.

Estudiando poblaciones espermáticas, Fernández-Santos y *col.* (2009) señalaron la posibilidad de la existencia de una subpoblación de espermatozoides resistentes, capaces de permanecer móviles al menos hasta 96 horas después de la descongelación e incubación durante 2 horas. Esta pequeña subpoblación, en las muestras almacenadas *postmortem* durante 0, 24 y 96 horas, sería capaz de sobrevivir, mucho tiempo a los procesos de congelación e incubación. Sin embargo, el almacenamiento de 196 horas sería un periodo demasiado largo para que incluso la subpoblación resistente pudiera sobrevivir.

La morfología espermática también estuvo afectada por el tiempo de almacenamiento *postmortem* de los epidídimos de toro de Lidia (muestras iniciales), disminuyendo el número de espermatozoides normales, desarrollando una mayor cantidad de anomalías los grupos conservados durante más tiempo e incrementando principalmente la presencia de cabezas sueltas así como las alteraciones del flagelo -de pieza intermedia y de cola-. Estos resultados eran de esperar, ya que diferentes trabajos, en otras especies, habían apuntado un aumento de las alteraciones después de varios días de almacenamiento *postmortem*. Así en ratones, Sankai y *col.* (2001), informaron de un mayor porcentaje de colas dobladas, que se situaría por encima del 60%, causado por un endurecimiento de la membrana por las bajas temperaturas. Sin embargo, en ciervos, el incremento fue de piezas intermedias dobladas, aunque en menor proporción (alrededor del 20%) (Soler *et al.*, 2003).

Diversos estudios, reportaron que, en la pieza intermedia, el proceso de congelación-descongelación causaba pérdida de la matriz mitocondrial, con una evidente disminución en la densidad eléctrica de la matriz en los espermatozoides del morueco (Quinn *et al.*, 1969) y del toro (Jones and Stewart, 1979). Los defectos morfológicos, antes de la congelación, del esperma de camélidos (*Camelus dromedarius*) fueron principalmente las anomalías del flagelo (64,5%), aumentando significativamente en las muestras descongeladas (74,8%) (Wani, 2009). Esto coincide con los resultados obtenidos en nuestro trabajo. En las muestras precongeladas no se encontraron diferencias significativas con las iniciales, mientras que en el momento de

la descongelación observamos una mayor proporción de daños sobre el flagelo, aumentando las alteraciones de la pieza intermedia y de la cola en todos los grupos, afectando en mayor medida al grupo con más tiempo de conservación *postmortem* (D-R48). En este grupo también disminuyó la proporción de gotas proximales, debido quizás a un debilitamiento de la membrana.

En las muestras descongeladas, de los grupos cuyos epidídimos fueron almacenados y conservados a 5 °C, el diluyente a base de yema de huevo (Biladyl[®]) protegió el daño estructural de la cola y las alteraciones de cabeza (no presentando diferencias con las muestras precongeladas), mientras que éstas morfoanomalías aumentaron en las muestras diluidas con el diluyente a base de lecitina de soja (Bioxcell[®]). Este último medio protegió mejor la pieza intermedia pasadas las 24 horas de conservación (D-R48).

Es de suma importancia conocer qué factores afectan a la viabilidad y la integridad del acrosoma del espermatozoide epididimal, para lograr obtener una mejor calidad espermática. Además, algunas publicaciones en diferentes especies, han acreditado que las condiciones de almacenamiento de los epidídimos (la temperatura y el medio ambiente del epidídimo) pueden preservar mejor la viabilidad del espermatozoide epididimal, por retrasar los procesos de degeneración. En moruecos (Aguado *et al.*, 1994), en ciervo y en muflón (Garde *et al.*, 1994d) la viabilidad de los espermatozoides recolectados de la cola del epidídimo disminuyó progresivamente a medida que el tiempo, entre la muerte del animal y la recolección espermática, fue mayor. Nuestros resultados, obtenidos mediante la observación bajo microscopio de contraste de fases, guardan relación con estos estudios, ya que el porcentaje de espermatozoides con daños en la membrana plasmática y acrosomal se incrementó proporcionalmente al tiempo de conservación *postmortem* de los epidídimos.

Cuando el estudio de estos parámetros se realizó mediante citometría de flujo, utilizando la combinación de fluorocromos (IP/PNA), no se encontraron diferencias significativas, entre los diferentes grupos de tiempos de conservación de los epidídimos, tanto en las muestras iniciales como en las precongeladas, coincidiendo con los resultados de Martins *y col.* (2009) en toro -utilizando microscopio óptico y la combinación de triptan azul y Giemsa-, y de Yu y Leibo (2002) en el perro -evaluando mediante microscopio de fluorescencia y utilizando IP y SYBR-14 para la integridad de

la membrana y PSA para la del acrosoma-. Estos autores apreciaron que la integridad de la membrana y del acrosoma, del espermatozoide epididimal, no resultó afectada tras 3 días de almacenamiento a 5 °C, mostrando altos porcentajes de espermatozoides con acrosomas intactos y con muy poca variación después de 24 horas de refrigeración. En dos especies de rumiantes salvajes (ciervo ibérico y corzo) estos parámetros soportaron bien las condiciones de almacenamiento, presentando ambos una correlación negativa, altamente significativa, con el tiempo de almacenamiento *postmortem* de los epidídimos (Martínez-Pastor *et al.*, 2005a), indicando que en realidad estos parámetros se ven afectados por este factor, pero no en la misma proporción que la movilidad.

En espermatozoides de humanos (Critser *et al.*, 1987) y de ratón (Wakayama and Yanagimachi, 1998) es bien conocido el efecto perjudicial que sobre los espermatozoides ejerce la congelación, y se sabe que puede afectar a la movilidad espermática y a la tasa de fecundación debido al compromiso de la integridad de la estructura acrosómica. En otras especies, los informes indican que los espermatozoides de epidídimo son menos tolerantes a la criopreservación que los espermatozoides de un eyaculado (Krzywinski, 1981; Zomborszky *et al.*, 1999).

En la especie canina, Ponglowhapan y *col.* (2006) encontraron que, después de la descongelación de espermatozoides epididimales almacenados a 5 °C hasta 4 días, la integridad de la membrana plasmática se vio gravemente comprometida para todos los tratamientos (24 y 48 horas). En general, los resultados del presente trabajo demostraron que, la viabilidad de las muestras descongeladas en todos los grupos, pero sobre todo en los que sus epidídimos fueron conservados a temperaturas de refrigeración, se vio influenciada por el proceso de congelación-descongelación. Sin embargo, la protección para esta estructura fue diferente para cada diluyente: con el Bioxcell[®] los valores más elevados se obtuvieron para los espermatozoides del grupo D-R0, mientras que fueron los grupos D-R24 y D-R48 en los que se observaron los mayores porcentajes de espermatozoides con membrana plasmática intacta cuando se utilizaba el diluyente Biladyl[®].

En los espermatozoides de cerdo, Kikuchi y *col.* (1998) demostraron que la integridad del acrosoma podía verse alterada durante la congelación, con un daño mayor a medida que el período de almacenamiento del epidídimo se prolongaba (3 días). Este estudio concuerda con dichos resultados, ya que la integridad del acrosoma no se vio

afectada por el tiempo de conservación *postmortem*, hasta las 24 horas de almacenamiento. Durante la pre congelación, el grupo sin conservación (P-R0) mantuvo mejor la integridad del acrosoma, estando afectado, este mismo grupo, en mayor medida, en el proceso de congelación-descongelación (D-R0). Por otro lado, en el grupo en el que se mantuvieron los epidídimos refrigerados durante 24 horas *postmortem* (R24), el proceso de pre congelación (P-R24) tuvo mayor influencia que la descongelación (D-R24), apareciendo dañado por los dos procesos el grupo de mayor tiempo de conservación *postmortem* (R48). Además, para ambos diluyentes, fue mayor el daño causado en el grupo en el que no se realizó conservación *postmortem* del epidídimo, mientras que Bioxcell® evitó el daño acrosomal hasta las 24 horas, Biladyl® logró una mejor protección de esta estructura hasta las 48 horas.

En otras especies como en *Cervus nippon* (Hishinuma *et al.*, 2003) y *Cervus elaphus hispanicus* (Fernández-Santos *et al.*, 2009), la criopreservación sólo comprometió la viabilidad de los espermatozoides del epidídimo después de largos períodos de almacenamiento. En moruecos (Kaabi, 2003), se comprobó que la integridad de la membrana, en las muestras descongeladas -evaluadas por la prueba de HOS-, no fue modificada por los procesos de manipulación de los epidídimos, aunque sí lo fue la integridad acrosómica, presentando alteraciones en el grupo conservado durante 24 horas por el tiempo, y no por la temperatura de almacenamiento *postmortem*.

Martins *y col.* (2009) afirmaron que la integridad de la membrana del espermatozoide epididimal de toro, se vio influenciada más por el proceso de congelación de las muestras, que por el tiempo de almacenamiento de los epidídimos. En nuestro caso, a mayor tiempo de almacenamiento, el medio de dilución fue el factor que más afectó a los resultados, siendo el que mejor protegió los acrosomas, el medio que presentó yema de huevo en su composición (Biladyl®). El trabajo realizado por Muño-Otero (2008), puso de manifiesto resultados similares con espermatozoide eyaculado, obteniendo una mayor supervivencia, longevidad espermática e integridad del acrosoma, en las muestras de semen procesadas con Biladyl® que con los diluyentes elaborados a base de extractos de soja. Aires *y col.* (2003) no encontraron diferencias en la viabilidad celular y el estado acrosomal, cuando evaluaron diluyentes a base de yema de huevo y lecitina de soja. Sin embargo, coincidimos con estos autores en que, cuando se utilizó el medio con base de yema de huevo, aumentó la aglutinación de los espermatozoides, siendo un fenómeno

que perturba gravemente la evaluación de los mismos. Por el contrario, el medio con base de lecitina de soja produjo menos aglutinación.

Las aglutinaciones entre espermatozoides parecen indicar alteraciones acrosomales y de las membranas plasmáticas, susceptibles de afectar la capacidad fecundante del semen (Rota *et al.*, 1998), aunque también parece influir la ausencia de plasma seminal (Harrison *et al.*, 1978).

6.2. EFECTO DEL MÉTODO DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA EN LAS CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD DEL SEMEN EPIDIDIMARIO, EN RELACIÓN AL TIEMPO DE CONSERVACIÓN *POSTMORTEM* DEL EPIDÍDIMO Y AL MEDIO DE DILUCIÓN

Teniendo en cuenta que las técnicas de “swim-up” y de gradiente de densidad tienen distinto fundamento, podrían seleccionar poblaciones espermáticas diferentes. Hasta el momento, no hemos encontrado trabajos publicados que comparen estos dos métodos utilizándolos para esperma epididimario, por lo tanto haremos una extrapolación con los trabajos realizados en esperma eyaculado.

En la técnica de separación por “swim-up”, son las propias características de movilidad las que influirían en la selección de los espermatozoides. Sin embargo, con el método de gradiente, además de la movilidad espermática, ayudarían la velocidad, la densidad de los espermatozoides, la fuerza centrífuga y los efectos del gradiente en si (Vélez, 1991), proporcionando espermatozoides con unas características de movilidad y calidad superiores al “swim-up”, pero con menores porcentajes de penetración, dando lugar a tasas más bajas de división después de la fecundación (Parrish *et al.*, 1995).

En la preparación del esperma para fecundación *in vitro*, se requiere una separación de los espermatozoides del plasma seminal (Parrish, 1991) y, en el caso de dosis espermáticas congeladas-descongeladas, también del diluyente empleado en la conservación. Se ha observado (Risopatrón *et al.*, 1996) que con los métodos de migración-sedimentación esta separación sería más efectiva y se eliminarían mejor las posibles bacterias o virus que pudieran estar presentes contaminando el esperma, ya que con las

técnicas de lavado-centrifugación quedarían atrapadas en el pelotón de espermatozoides y no se eliminarían.

Además, el procedimiento de migración-sedimentación puede ser un método adecuado para capacitar espermatozoides crioconservados (Risopatrón *et al.*, 1996). Estos autores, al comparar métodos de selección basados en técnicas de lavado-centrifugación y procesos de migración-sedimentación de los espermatozoides, obtuvieron un mayor número de espermatozoides en el primer caso. Sin embargo, con el método de migración-sedimentación el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva y morfología normal fue mayor, obteniéndose además, una mayor proporción de espermatozoides con el acrosoma intacto, proporcionando un porcentaje superior de ovocitos penetrados. Risopatrón *y col.* (1996) concluyeron que el hecho de obtener mayor cantidad de espermatozoides con los métodos de lavado-centrifugación, se debe a que estas técnicas no seleccionan. Pero, aún así, comprobaron que el número de espermatozoides recogidos por migración-sedimentación fue 20 veces superior al que se necesita para realizar una fecundación *in vitro*.

En esta Tesis Doctoral, la separación espermática mediante gradiente de densidad (Bovipure[®]), fue el proceso con el que se obtuvo una mayor concentración espermática para los tres grupos –tiempo *postmortem* de almacenamiento de los epidídimos- y los dos diluyentes evaluados. Al seleccionar la muestra, mediante “swim-up” y gradiente de densidad, la concentración espermática fue significativamente mayor cuanto menor fue el tiempo de conservación *postmortem*, encontrando diferencias en todos los grupos. Al contrastar ambos diluyentes, con cada método de selección espermática, se observó una mayor concentración al seleccionar las muestras diluidas con Biladyl[®], a excepción del grupo Sw-R48, que no mostró diferencias.

Los métodos de selección espermática, estudiados en este trabajo, recuperaron, respecto a la población inicial, un bajo porcentaje de espermatozoides móviles. Hay que considerar que el estudio se realizó con esperma epididimal, con grupos experimentales sometidos a una conservación *postmortem* de hasta 48 horas, y que fueron criopreservados antes de su utilización. Cada uno de estos procesos fue causando un efecto negativo en las funciones de los espermatozoides y en su capacidad de fecundación. Como se ha demostrado en diversos estudios (Grondahl *et al.*, 1994; Holt and North, 1994), los espermatozoides congelados-descongelados pueden presentar alteraciones en su membrana

debido a la congelación, al almacenamiento a temperaturas de congelación y a los procedimientos de descongelación.

Con respecto a los parámetros estudiados, en el grupo que se procesó inmediatamente después de la muerte del animal, la MI, MP y la mayoría de las variables cinéticas (VAP, VCL, VSL, LIN, ALH Y BCF), fueron más elevadas para el método de “swim-up” que para el gradiente de densidad. Sin embargo, en el grupo en el que los epidídimos fueron conservados *postmortem* durante 24 horas, con la separación realizada por esta última técnica se consiguieron mayores porcentajes de MI y MP, aunque los parámetros cinéticos de velocidad (VAP, VCL y VSL), la STR, la ALH y la BCF, siguieron siendo superiores en el método de migración-sedimentación. No se encontraron diferencias en la movilidad individual y progresiva entre las diferentes técnicas para el grupo R48.

Para todos los grupos, fue el diluyente Biladyl[®] el que proporcionó mayores porcentajes de movilidad individual y progresiva, mientras que los parámetros cinéticos fueron ligeramente superiores en las muestras diluidas con Bioxcell[®]. Al relacionar la concentración espermática -que fue entre 3 y 4 veces superior para el método de gradiente de densidad- y la movilidad, coincidimos con los resultados de Eltes y *col.* (1982), quienes observaron que el porcentaje de espermatozoides (de eyaculado) móviles, obtenidos con la técnica de “swim-up” fue elevado, aunque con baja concentración, lo que podría constituir un factor limitante para los resultados de fecundación *in vitro*. Posteriormente se comprobó que en ganado vacuno (Parrish *et al.*, 1995) la separación mediante gradiente de densidad (Percoll[®]), además de ser un método más rápido, permitía recoger un mayor número de espermatozoides móviles (40% vs. 9%), siendo la movilidad un factor primordial, ya que aumentaría la capacidad de los espermatozoides para penetrar la zona pelúcida de los ovocitos (Suarez and Ho, 2003).

La selección espermática excluye la mayoría de los defectos de cola y de la pieza intermedia (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1997). En el estudio morfológico con eosina-nigrosina, se observó que ambos métodos sirvieron para mejorar la morfología, incrementando el número de espermatozoides normales respecto a las muestras descongeladas. Sin embargo, cuando se compararon ambos métodos entre sí, se obtuvo un mayor número de espermatozoides normales con el método de gradiente de densidad, sobre todo en las muestras diluidas con Bioxcell[®], disminuyendo principalmente las anomalías de

cola y la presencia de gotas proximales; mientras que la técnica de “swim-up” redujo, en mayor medida, la presencia de cabezas sueltas y las anomalías de pieza intermedia.

Se ha comprobado que, la reducción de la movilidad y la capacidad de fecundación del espermatozoide, después de estar almacenado a bajas temperaturas, estaba relacionado con alteraciones estructurales, y únicamente los espermatozoides con membranas intactas podrían llegar a capacitarse y experimentar la reacción acrosómica (Watson *et al.*, 1992a). Este daño puede aumentar con la centrifugación, ya que repetidas centrifugaciones inducen la activación de proteinasas en el acrosoma, dando lugar a una reacción acrosómica prematura (Sánchez *et al.*, 1995).

Además, varias centrifugaciones y resuspensiones se consideran inapropiadas debido a que podrían generar estrés oxidativo, provocar daños en la membrana celular de los espermatozoides y alteraciones del ADN (Twigg *et al.*, 1998). En este sentido, Solvas y *col.* (2002) comprobaron que el método de “swim-up”, sin centrifugación, fue más eficaz que con centrifugación, en cuanto al número de espermatozoides móviles recuperados.

En los espermatozoides de los mamíferos es muy importante analizar su morfología y el estado del acrosoma, pues está directamente relacionado con la capacidad de fecundación (Henkel *et al.*, 1993). En todos los grupos estudiados en este trabajo, ambos métodos de selección mejoraron la proporción de espermatozoides con membrana plasmática íntegra, en relación al espermatozoide descongelado, aunque no protegieron la integridad del acrosoma de igual forma, registrando mayores daños en esta estructura.

A diferencia de estudios realizados en espermatozoides eyaculados en bovino (Parrish *et al.*, 1995) y caprino (Palomo *et al.*, 1999), en el presente estudio el método de gradiente de densidad dio lugar a un mayor número de células con membrana plasmática y acrosomal intacta, para todos los grupos, en comparación con la técnica de migración-sedimentación. Estos resultados concuerdan con los publicados por Somfai y *col.* (2002), que observaron en espermatozoide eyaculado y congelado-descongelado de ganado bovino, mayor viabilidad y porcentaje de acrosomas intactos después de la separación con gradiente de Percoll® frente al “swim-up”.

Al estudiar, en conjunto, la funcionalidad de la membrana plasmática y de la acrosomal mediante la combinación de fluorocromos, se comprobó que ambos métodos disminuyeron la proporción de espermatozoides con membrana plasmática y acrosomal

funcionales, incrementando las células vivas con acrosomas alterados. Sin embargo, al contrastar dichas técnicas de selección, se puso de manifiesto que el método de “swim-up” incrementó significativamente la proporción de espermatozoides con una buena funcionalidad de la membrana plasmática, pero con la acrosomal alterada -sobre todo en los grupos en los que los epidídimos se almacenaron refrigerados-, siendo más elevada para el gradiente de densidad la correcta funcionalidad de ambas membranas. Estos datos son de gran importancia, ya que la integridad de la membrana plasmática es fundamental para la supervivencia celular y la capacidad de fecundación y, únicamente los espermatozoides con membranas intactas podrían llegar a capacitarse, experimentar la reacción acrosómica y fecundar.

Se demostró, asimismo que la viabilidad, por si sola, era significativamente mayor a favor del método de “swim-up”, pero proporcionaba muchos espermatozoides con acrosomas alterados. Este hecho podría indicar que los espermatozoides epididimarios empezarían a capacitarse durante la selección, dando acrosomas reaccionados (y no dañados), lo que explicaría también la mayor velocidad de desplazamiento detectada para este método.

El diluyente Bioxcell[®] preservó mejor la integridad de la membrana plasmática cuando los epidídimos no fueron almacenados, mientras que el diluyente Biladyl[®] fue significativamente mejor en los grupos refrigerados, y para la preservación de la integridad del acrosoma de todos los grupos estudiados en este trabajo.

6.2.1. INFLUENCIA DEL MÉTODO DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA, EN RELACIÓN AL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO *POSTMORTEM* Y AL MEDIO DE DILUCIÓN, SOBRE LA DIVISIÓN EMBRIONARIA *IN VITRO*

La capacidad fecundante de los espermatozoides del epidídimo es bien conocida, pudiendo variar debido a una serie de factores tales como el lugar de recogida del esperma, la edad de los animales, los métodos de preparación del semen y también la capacidad de desarrollo de los ovocitos.

Estudios anteriores han comprobado la fecundidad después de la inseminación artificial, tanto con esperma eyaculado como epididimal del mismo toro. En 1968,

Igboeli y Foote, de cuatro toros, recuperaron el espermatozoide de las colas de los epidídimos que se habían almacenado a 5 °C, y lo utilizaron a las 60 horas *postmortem* para inseminar 100 vacas. El valor medio de la tasa de no retorno (TNR), para el espermatozoide epididimal, fue del 69%, y la media del eyaculado de estos mismos toros fue del 75%. También Martins *y col.* (2007) demostraron la capacidad fecundante de los espermatozoides epididimales de toro, congelado poco tiempo después de la muerte de los animales. Aunque, en un estudio posterior estos mismos autores (Martins *et al.*, 2009), con espermatozoides refrigerados durante diferentes períodos *postmortem*, encontraron que los espermatozoides de todos los tratamientos (24, 48 y 72 horas), produjeron menos embriones que en el grupo control (0 horas), confirmando que el almacenamiento y la congelación dañan la integridad de las células germinales.

Lo adecuado sería recuperar y procesar los espermatozoides lo más pronto posible, ya que estas células pierden calidad y capacidad fecundante a las pocas horas de la muerte del animal (Garde *et al.*, 1994b; Songsasen *et al.*, 1998) y, más aún, cuando el tiempo transcurrido entre la muerte y la recuperación de los gametos se alarga considerablemente (Kikuchi *et al.*, 1998, Kishikawa *et al.*, 1999). Sin embargo, Kaabi (2003) no obtuvo diferencias significativas en los resultados de FIV, entre los espermatozoides recuperados del epidídimo, almacenados bajo refrigeración o a temperatura ambiente durante 24 horas, y los espermatozoides eyaculados, aunque la capacidad fecundante del espermatozoide epididimal almacenado, en las mismas condiciones, durante 48 horas se redujo significativamente. Nuestros resultados coinciden con este último autor, ya que las muestras obtenidas de los epidídimos refrigerados durante más de 24 horas separadas por “swim-up” (SW-R48), promovieron la división embrionaria en un porcentaje menor ($p < 0,05$) al de las muestras que no fueron conservadas o fueron sometidas a menos tiempo de conservación *postmortem*. Sin embargo, las muestras procedentes de epidídimos almacenados *postmortem*, separadas por gradiente de densidad (GD-R24 y GD-R48), dieron lugar a un porcentaje de división inferior ($p < 0,05$) al observado en el grupo sin conservación (GD-R0), aunque esta disminución fue mucho más evidente en las muestras procedentes de epidídimos conservados durante 48 horas (GD-R48).

Ikeda y *col.* (2002) sugieren que el mantenimiento de la integridad acrosomal, es más importante, en la capacidad de fecundación *in vitro*, que la movilidad de los espermatozoides.

Esta afirmación concuerda con nuestro estudio donde se observó, en general, que las muestras diluidas con Biladyl[®] conservaron mejor la integridad del acrosoma, sobre todo en los grupos de epidídimos refrigerados, obteniendo los mejores resultados de división embrionaria. Destacó, en este sentido, el grupo GD-R0By -grupo donde se consiguió una mayor división mediante la separación por gradiente de densidad-, que presentó una mayor proporción de acrosomas intactos. Sin embargo, en las muestras en las cuales no hubo diferencias significativas (muestras de Bioxcell[®] en los grupos procedentes de epidídimos refrigerados), influyeron otras características de calidad seminal, consiguiendo un porcentaje mayor de división cuando se seleccionaban por “swim-up”.

En el ganado vacuno se ha recuperado una mayor concentración de esperma de eyaculado, después de la selección por gradiente de densidad que con la separación por “swim-up”. Sin embargo, se observaron mayores índices de penetración espermática y división embrionaria (día 3 postfecundación) cuando los ovocitos fueron inseminados con espermatozoides separados por el método de “swim-up” (Parrish *et al.*, 1995; De la Varga, 2005).

En este estudio, el porcentaje de división fue superior en el grupo GD-R0, para ambos diluyentes, sin embargo el método de “swim-up” obtuvo un mayor porcentaje de división en los grupos procedentes de epidídimos refrigerados cuando el diluyente empleado fue a base de lecitina de soja, no encontrando diferencias significativas entre ambos métodos para las muestras diluidas con el otro diluyente. Sin embargo, Aires y *col.* (2003), a diferencia de los resultados que consiguieron *in vivo*, evaluando la interacción espermatozoide-zona pelúcida *in vitro*, no encontraron diferencias entre diluyentes a base de yema de huevo o lecitina de soja, concluyendo que los medios crioprotectores libres de productos de origen animal, son una alternativa viable a los medios tradicionales basados en la yema de huevo como protector de membrana. Otros autores, con esperma eyaculado de bovinos (Díaz, 1999) y de búfalos (Mehmood *et al.*, 2009), no encontraron diferencias en el porcentaje de división embrionaria (día 3 postfecundación), entre ambos métodos de selección.

Wani (2009), demostró que los espermatozoides del epidídimo de dromedario mantenían la capacidad de fecundar ovocitos madurados *in vitro* después del almacenamiento a 4° C, durante 8 días, en los diluyentes Tris-Lactosa y Tris-Tes, con un porcentaje de división de los ovocitos comparable al obtenido con semen eyaculado fresco para la misma especie (43-60% vs 64% respectivamente) (Khatir y Anouassi, 2006) y superior al que se publicó con espermatozoides epididimales, en llamas (32%) (Del Campo *et al.*, 1994). Esto podría reflejar una diferencia entre las condiciones de almacenamiento, la especie, el tipo de diluyente empleado y/o el método de selección utilizado.

Los estudios realizados han proporcionado información útil, y potencialmente aplicable al diseño y gestión de un banco de germoplasma, fundamentalmente para el toro de Lidia. Atendiendo a los resultados obtenidos en los estudios sobre el efecto del tiempo *postmortem*, recomiendan unos periodos en los que el procesado de las muestras debería realizarse antes de las 48 horas.

Al considerar al toro de Lidia, una especie que no se encuentra especialmente amenazada, y de la que podemos obtener un número importante de muestras anualmente -debido a los festejos realizados en todo el país-, este banco de germoplasma estaría orientado a la mejora genética, preservar e incrementar la variabilidad y a prevenir riesgos futuros (endogamia por aislamiento de poblaciones, epidemias, etc.). Por lo tanto, disponer de este tipo de banco permitiría descartar un buen número de muestras que presuntamente no tendrían buena calidad. Por supuesto, la estrategia variaría con el propósito del banco de germoplasma, o dependiendo del valor de las muestras. Así, en el caso de animales especialmente valiosos, se podría optar por la preservación de aquellas muestras que no reuniesen los criterios recomendados. Actualmente disponemos de técnicas que nos permitirían utilizar muestras de baja calidad (FIV, ICSI) o seleccionar subpoblaciones espermáticas especialmente aptas (“swim-up”, gradiente de densidad, entre otras), de manera que incluso muestras seminales con un diagnóstico de calidad bajo podrían ser utilizadas en programas de recuperación, habiendo comprobado en este trabajo la capacidad de división embrionaria *in vitro* de los espermatozoides almacenados hasta 48 horas *postmortem*.

7. Conclusiones

Teniendo en cuenta los objetivos planteados en este trabajo, se han obtenido las siguientes conclusiones:

PRIMERA:

La calidad de los espermatozoides de toro de Lidia, almacenados en la cola epididimaria disminuye al aumentar el tiempo de conservación *postmortem*. Sin embargo, la conservación de los epidídimos a una temperatura de refrigeración de 5 °C hasta 24 horas, mantiene la calidad, aunque provoca un ligero descenso en la misma en relación a las muestras que no fueron conservadas. Las muestras almacenadas durante 48 horas, sufrieron una pérdida marcada en su calidad, aunque podrían ser consideradas viables y útiles para un uso futuro mediante técnicas de biotecnología.

SEGUNDA:

El tiempo de conservación *postmortem* de los epidídimos no afectó por igual a todos los parámetros de calidad seminal, siendo la movilidad el parámetro más perturbado, mientras que la integridad de la membrana plasmática y la integridad del acrosoma soportaron mejor las condiciones de refrigeración *postmortem*, resultando estas dos estructuras dañadas, en mayor medida, durante el proceso de congelación-descongelación.

TERCERA:

La pre congelación, en los grupos procesados inmediatamente y en los que fueron sometidos a 24 horas de refrigeración *postmortem*, en general, afectó negativamente a la movilidad -principalmente en las muestras diluidas con Bioxcell[®]-, los parámetros cinéticos y a la integridad del acrosoma, de ambos diluyentes, sin modificar la morfología y la integridad de la membrana de los mismos. Para el grupo sometido a 48 horas de refrigeración *postmortem*, fueron más importantes los daños causados por este almacenamiento que por el proceso de pre congelación.

CUARTA:

Los dos diluyentes evaluados se mostraron eficaces para la conservación del esperma epididimal aunque, en general, el diluyente a base de lecitina de soja mantuvo una mejor calidad espermática en las muestras sin conservación *postmortem*, mientras

que el diluyente formulado a base de yema de huevo, la sostuvo en los grupos refrigerados *postmortem* hasta 48 horas.

QUINTA:

Ambos métodos de selección espermática, lograron fecundar e iniciar la división embrionaria, obteniéndose una mejor calidad espermática en las muestras seleccionadas mediante “swim-up”, aunque estas presentaron un mayor número de alteraciones y/o reacción acrosomal. La separación por gradiente de densidad logró una mayor concentración, con una alta calidad espermática, conservando este método mejor la estructura acrosomal.

SEXTA

Los espermatozoides congelados-descongelados, recogidos de epidídimos conservados a 5 °C durante 24 horas *postmortem*, muestran una capacidad fecundante similar a la de los espermatozoides obtenidos de epidídimos no refrigerados. También, los espermatozoides procedentes de epidídimos conservados por más tiempo, lograron fecundar y dividir al ovocito, aunque en un porcentaje significativamente inferior.

8. Bibliografía

- A Porta Gayola: Información Taurina** (2010). Castas y Encastes. <http://aportagayola.wordpress.com>.
- Acott TS and Carr DW** (1984). Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. *Biology of Reproduction* 33: 588-593.
- Aguado MJ, Garde J, Madriadano JM, Pérez S, Garrido D and Montoro V** (1994). Congelación post mortem de semen de epidídimo de morueco. In: *Proceedings of the 7th Jornadas Int Reprod Anim e IA*. Murcia. España; pp. 283.
- Aires VA, Hinsch K, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S and Hinsch E** (2003). *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* 60: 269-279.
- Ali AA, Bilodeau JF and Sirard MA** (2003). Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 59: 939-949.
- Álvarez J** (2010). Estudio de las Influencias de los factores de crecimiento en la producción *in vitro* de embriones bovinos. Tesis Doctoral. *Departamento de Sanidad Animal y Reproducción*. Universidad de León. España.
- Amann RP** (1989). Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *Journal of Andrology* 10: 89-98.
- Amann RP, Johnson L, Thompson DL and Pickett BW** (1976). Daily spermatozoa production, epididymal spermatozoal reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the rhesus monkey. *Biology of Reproduction* 15: 586-592.
- Amann RP and Hammerstedt RH** (1980). Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biology of Reproduction* 23: 647-656.
- Amann RP and Schenbacher BD** (1983). Physiology of male reproduction. *Animal Science* 57: 380-403.
- Amann RP and Pickett BW** (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* 7: 145-173.
- Amann RP and Hammerstedt RH** (1993). *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. *Journal of Andrology* 14: 397-406.
- An TZ, Wada S, Edashige, K, Sakurai T and Kasai M** (1999). Viable spermatozoa can be recovered from refrigerated mice up to 7 days after death. *Cryobiology* 38: 27-34.
- Anel L, Gerra C, Álvarez M, Anel E, Martínez AF, Boixo CJ, Kaabi M, Herraez P and Paz P** (2002). Effect of *postmortem* interval in quality of epididymal spermatozoa in Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Theriogenology* 57: 577 (Abstr.).
- Anton M, Martinet V, Dalgalarondo M, Beaumal V, David-Briand E and Rabesona H** (2003). Chemical and structural characterization of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chemistry* 83: 175-183.
- Aoyagi Y, Fukui Y, Irazumi Y, Urakawa M, Minegishi Y and Ono H** (1990). Effects of culture system on development of *in vitro*-fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology* 34: 749-759.
- Arlotto T, Schwartz JL, First NL and Leibfried-Rutledge ML** (1996). Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 45: 943-956.

- Ashdown RR and Hafez ESE** (1996). Anatomía del aparato reproductor masculino. En *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales* (Ed. ESE Hafez). Interamericana McGraw-Hill (6ª edición). México; pp. 3-19.
- Avery B, Bavister BD and Greve T** (1998). Development of bovine oocytes *in vitro* matured in a chemically defined protein-free medium, supplemented with different amino acid formulations. *Theriogenology* 49: 306 (Abstr.).
- Ballachey BE, Saacke RG and Evenson DP** (1988). The sperm chromatin structure assay: relationship with alternate test of sperm quality and heterospermic performance of bulls. *Journal of Andrology* 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.
- Barth AD and Oko RJ** (1989). Anormal morfology of bovine spermatozoa. 1 ed. Iowa city I.A: *Iowa State University press*. Iowa City. USA; pp. 20.
- Barth AD** (2000). Bull breeding soundness evaluation. *The Western Canadian association of bovine practitioners*. Dept. Herd Medicine and Theriogenology. University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada; pp. 30-39.
- Barth AD, Bo G and Tribulo H** (2000). Curso de evaluación de toros y control de la calidad seminal: 16 al 19 de Agosto del 2000. 1 ed. Universidad Católica de Córdoba. Córdoba. Argentina; pp. 3-10.
- Bavister BD, Rose-Hellekany TA and Pinyopummintr T** (1992). Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology* 37: 127-146.
- Bavister BD** (1995). Culture of preimplantation embryos: facts and artefacts. *Human Reproduction Update* 1: 91-148.
- Bazer FW, Geisert RD and Zavi MT** (1996). Fecundación, escisión e implantación. In: *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales* (Ed. ESE Hafez); Interamericana McGraw-Hill (6ª edición). México; pp. 180-202.
- Bergeron A, Crete MH, Brindle Y and Manjunath P** (2004). Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biology of Reproduction* 70: 708-717.
- Bergeron A, Villemure M, Lazure C and Manjunath P** (2005). Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Molecular Reproduction and Development* 71: 461-470.
- Bitácora de un corredor de encierros** (2009). Casta Castellana o Morucha. <http://corredordeencierros.blogspot.com>.
- Blach EL, Amann RP, Bowen RA, Sawyer HR and Hermetet MJ** (1988). Use of monoclonal antibody to evaluate integrity of the plasma membrane of stallion sperm. *Gamete Research* 21: 233-241.
- Blach EL, Amann RP, Bowen RA and Frantz D** (1989). Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: Plasma membrane integrity and motion characteristics. *Theriogenology* 31: 283-293.

Blanco OM (1998). Análisis objetivo de la movilidad espermática: evaluación de los espermatozoides de verraco y su relación con la fertilidad. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria de Murcia, España.

Blash S, Melican D and Gavin W (2000). Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology* 54: 899-905.

Blondin P and Sirard MA (1994). The influence of oocytes and follicular morphology on developmental competence in superovulated heifers. *Theriogenology* 41: 164 (Abstr.).

Blondin P and Sirard MA (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 41: 54-62.

Bogart R and Mayer DT (1950). The effects of egg yolk on the various physical and chemical factors detrimental to spermatozoan viability. *Journal of Animal Science* 9: 143-152.

Bordignon V and Smith LC (1999). Ultraviolet-irradiated spermatozoa activate oocytes but arrest preimplantation development after fertilization and nuclear transplantation in cattle. *Biology of Reproduction* 61: 1513-1520.

Bousseau S, Brillard JP, Marguant-Le Guienne B, Guerin B, Camus A and Lechat M (1998). Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* 50: 699-706.

Boyers SP, Davis R and Katz DF (1989). Automated semen analysis. *Current Problems in Obstetrics, Gynecology, and Fertility* 12: 172-200.

Brackett BG and Zuelke KA (1993). Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology* 39: 43-44.

Bruemmer JE, Reger H, Zibinski G and Squires EL (2002). Effect of storage at 5 °C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 58: 405-407.

Burdsal CA (1999). Embryogenesis, Mammalian. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 1. (Eds. E Knobil and JD Neill). Academic Press. San Diego. California. USA; pp. 1029-1037.

Butler WJ and Roberts TK (1975). Effects of some phosphatidyl compounds on boar spermatozoa following cold shock or slow cooling. *Journal of Reproduction and Fertility* 43: 183-187.

Cabrita E, Robles V, Rebordinos L, Sarasquete C and Herraes MP (2005). Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* 50: 144-153.

Carolan C, Monaghan P, Gallager M and Gordon I (1993). Developmental capacity of unselected bovine oocytes recovered from individual pairs of ovaries by surface dissection. In *Proceedings of the 9th Annual Congress of the European Embryo Transfer Association*. Lyon. France; pp. 180.

Carolan C, Monaghan P, Gallager M and Gordon I (1994). Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Theriogenology* 41: 1061-1068.

Carr DW, Usselman MC and Acott TS (1985). Effects of pH, lactate and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison. *Biology of Reproduction* 33: 588-593.

- Cascieri M, Amann RP and Hammerstedt RH** (1976). Adenine nucleotide changes at initiation of bull sperm motility. *Journal of Biological Chemistry* 251: 787-793.
- Centola GM, Herko R, Andolina E and Weisensel S** (1998). Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters, and hyperactivation. *Fertility and Sterility* 70: 1173-1175.
- Centro etnográfico y bibliográfico virtual del toro de lidia** (2009). Castas Fundacionales: *Casta Jijona y los Toros de la Tierra*. <http://www.cetnotorolidia.es>.
- Chan SY, Tsoi WL, Leung J, Ng V, Lo T and 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.
- Chanson A, Nocera D, Senn A, de Grandi P and Germond M** (2001). Development of a well-defined medium for the *in vitro* maturation of immature bovine *cumulus*-oocytes complexes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 18: 97-105.
- Chen MJ and Bongso A** (1999). Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. *Human Reproduction* 14: 759-764.
- Christian C, Songsasen N and Leibo S** (1993). Presence of motile sperm in mice 24 hours *postmortem*. *Theriogenology* 39: 201 (Abstr.).
- Colenbrander B, Gadella BM and Scout TAE** (2003). The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reproduction in Domestic Animals* 38: 305-311.
- Cookson AD, Thomas AN and Foulkes JA** (1984). Immunochemical investigation of the interaction of egg-yolk lipoproteins with bovine spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 70: 599-604.
- Cooper TG** (1998). The epididymis: cellular and molecular aspects. En: *Interactions between epididymis secretions and spermatozoa*. Eds. Jones, R.C.; Holland, M.K.; Doberska, *Journal of Reproduction and Fertility* 53: 119-136.
- Cormier N, Sirard MA and Bailey JL** (1997). Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *Journal of Andrology* 18: 461-468.
- Correa JR and Zavos PM** (1994). The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology* 42: 351-360.
- Correa JR, Heersche G and Zavos PM** (1997). Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at varying temperatures. *Theriogenology* 47: 715-721.
- Cox JF, Saravia F, Briones M and Sants Maris A** (1995). Dose-dependent effect of heparin on fertilizing ability of coat spermatozoa. *Theriogenology* 44: 451-460.
- Critser JK, Arneson BW, Aaker DV, Huse-Benda AR and Ball GD** (1987). Cryopreservation of human spermatozoa. II. Post-thaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertility and Sterility* 47: 980-984.
- Cross NL and Meizel S** (1989). Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biology of Reproduction* 41: 653-641.
- Cruz Sagredo J** (1998). *El Toro de lidia: en la Biología, en la Zootecnia y en la Cultura*. Ed. Junta de Castilla y León. Consejería de Agricultura y Ganadería, Salamanca. España.

- Curry MR** (2000). Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction* 5: 46-52.
- Darin-Bennett A, Poulos A and White IG** (1973). The effect of cold shock and freeze-thawing on release of phospholipids by ram, bull, and boar spermatozoa. *Australian Journal of Biological Sciences* 26: 1409-1420.
- Davis RO and Siemers RJ** (1995). Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. *Reproduction, Fertility and Development* 7: 857-869.
- De la Varga S** (2005). Fecundación *in vitro* en ganado vacuno: Estudio de algunos de los factores que afectan a la producción de embriones. Tesis Doctoral. Departamento de Sanidad Animal y Reproducción. Universidad de León. España.
- De Ieew FE, Colenbrander B and Verkleij AJ** (1990). The role membrane plays in cold shock and freezing injury. *Reproduction in Domestic Animals* 1: 95-104.
- De Loos F, Van Maurik P and Kruip TA** (1989). Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Research* 24: 197-204.
- De Loos F, Bevers MM, Dieleman SJ and Kruip TA** (1991). Morphology of preovulatory bovine follicles as related to oocyte maturation. *Theriogenology* 35: 527-535.
- Del Campo MR, Donosos MX, Del Campo CH and Berland M** (1994). *In vitro* fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology* 41: 1219-1229.
- Demianowicz W and Strezek J** (1996). The effect of lipoprotein fraction of egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. *Reproduction in Domestic Animals* 31: 279-280.
- Demott RP and Suárez SS** (1992). Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biology of Reproduction* 46: 779-785.
- Dhami AJ, Sahni KL and Mohan G** (1992). Effect of various cooling rates (from 30 degrees C to 5 degrees C) and thawing temperatures on the deep-freezing of *bos taurus* and *bos bubalis* semen. *Theriogenology* 38: 565-574.
- Díaz E** (1999). Fecundación *in vitro* en ganado bovino: Alternativas de cultivo y congelación de embriones. Aplicación a ovocitos obtenidos mediante punción transvaginal guiada por ecografía. Tesis Doctoral. Universidad de León. España.
- Dode MA, Rodavalho NC, Ueno VG and Fernandes CE** (2002). The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of *Bos indicus* oocytes. *Animal Reproduction Science* 69: 15-23.
- Donnay I, Faerge I, Grondahi C, Verhaeghe B, Sayoud H, Ponderato N, Galli C and Lazzari G** (2004). Effect of prematuration, meiosis activating sterol and enriched maturation medium on the nuclear maturation and competence to development of calf oocytes. *Theriogenology* 62: 1093-1107.
- Dott HM and Foster GC** (1979). The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. *Journal of Reproduction and Fertility* 55: 161-166.
- Drevius LO and Eriksson H** (1966). Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Experimental Cell Research* 42: 136-156.

- Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW and Crowe JH** (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *The Journal of Experimental Zoology* 265: 432-437.
- Eckert J and Niemann H** (1996). Effects of platelet-derived growth factor (PDGF) on the *in vitro*-production of bovine embryos in protein-free media. *Theriogenology* 46: 307-320
- Eltes F, Fisher J and Bartoov B** (1982). Transmission electron microscope morphogram of progressive motile sperm cell fraction separated from teratozoospermic human semen. *Archives of Andrology* 8: 129-134.
- Enciso M, Muriel L, Fernández JL, Goyanes V, Segrelles E., Marcos M, Montejo JM, Ardoy M, Pacheco A and Gosálvez J** (2006). Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *Journal of Andrology* 27: 106-111.
- Englert Y, Van Den Bergh M, Rodesch C, Bertrand E, Biramane J and Legreve A** (1992). Comparative auto-controlled study between swim-up and Percoll preparation of fresh semen samples for *in vitro* fertilization. *Human Reproduction* 7: 399-402.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z and Melamed MR** (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210: 1131-1133.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z and Melamed MR** (1982). Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *Journal of the Histochemical Society* 30: 279-280.
- Evenson DP, Tomphson L and 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.
- Evenson DP, Larson KL and Jost LK** (2002). Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology* 23: 25-43.
- Eyestone WH and First NL** (1986). A study of the 8 to 16-cell developmental block in bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology* 25: 152 (Abstr.).
- Eyestone WH, Northey DL and Leibfried-Rutledge ML** (1985). Culture of 1-cell bovine embryos in the sheep oviduct. *Biology of Reproduction* 32: 100 (Abstr.).
- Eyestone WH and Boer HA** (1993). FSH enhances developmental potential of bovine oocytes matured in chemically defined medium. *Theriogenology* 39: 216 (Abstr.).
- Farlin ME, Jasko DJ, Graham JK and Squires EL** (1992). Assesment of *Pisum Sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 32: 223-277.
- Fatehi AN, Zeinstra EC, Kooij RV, Colenbrander B and Bevers MM** (2002). Effect of *cumulus* cell removal of *in vitro* matured bovine oocytes prior to *in vitro* fertilization on subsequent cleavage rate. *Theriogenology* 54: 1347-1355.
- Fernandes PA, McCoshen JA, Cheang M, Kredentser JV and Wodzicki AM** (1990). Quantitative analysis of the effect of freezing on donor sperm motion kinetics. *Fertility and Sterility* 54: 322-327.
- Fernández AM** (2000). Fecundación *in vitro* en ganado vacuno: estudio de las características microscópicas y ultraestructurales de los complejos *cumulus*-ovocito. *Tesina de licenciatura*. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. España.

- Fernández-Santos MR, Martínez-Pastor F, Matias D, Domínguez-Rebolledo AE, Estes MC, Montoro V and Garde JJ** (2009). Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 111: 93-104.
- First NL and Parrish JJ** (1987). *In vitro* fertilization of ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility* 34: 151-165.
- Flesch FM and Gadella BM** (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1469: 197-235.
- Foote RH** (2000). Letter to Editor. *Journal of Andrology* 21: 355.
- Free MJ, Schluntz GA and Jaffe RA** (1976). Respiratory gas tensions in tissues and fluids of the male ruminant reproductive tract. *Biology of Reproduction* 14: 481-488.
- Friedmann Y, Lubbe K, Kilian I, Grobler D and Denniston R** (2000). Changes in motility and morphological characteristics of African buffalo (*Syncerus caffer*) sperm during storage of the epididymis. *Theriogenology* 53: 332 (Abstr.).
- Fukui Y, McGowan LT, James RW, Asher GW and Tervit HR** (1991). Effects of culture duration and time of gonadotropin addition on *in vitro* maturation and fertilization of red deer (*Cervus elaphus*) oocytes. *Theriogenology* 35: 499-512.
- Furuya S, Endo Y, Oba M, Matsui Y, Nozawa S and Suzuki S** (1992). Protein phosphorylation regulates the mouse sperm acrosome reaction induced by the zona pellucida. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 9: 384-390.
- Galli C and Moor RM** (1991). Gonadotrophin requirements for the *in vitro* maturation of sheep oocytes and their subsequent development. *Theriogenology* 35: 1083-1093.
- Gao DY, Mazur P, Kleinhans FW, Watson PF, Noiles EE and Critser JK** (1992). Glycerol permeability of human spermatozoa and its activation energy. *Cryobiology* 29: 657-667.
- García-Artiga C, Fontanillas JC, Pérez J, García-Cuenca I, Martín-Rillo S and Pérez-García T** (1994). Técnicas de tinción espermática. *Porci* 21: 11-18.
- García-Llamazares JL** (2008). El Veterinario en los espectáculos taurinos: Especial referencia a Castilla y León. Edit. Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de León. Gráficas ALSE. España; pp. 15-39.
- García-Macías V, Martínez-Pastor F, Álvarez M, Garde JJ, Anel E, Anel L and de Paz P** (2006). Assessment of chromatin status (SCSA[®]) in epididymal and ejaculated sperm in Iberian red deer, ram and domestic dog. *Theriogenology* 66: 1921-1930.
- García-Macías V, de Paz P, Martínez-Pastor F, Álvarez M, Gomes-Alves S, Bernardo J, Anel E and Anel L** (2007). DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull semen. *International Journal of Andrology* 30: 88-98.
- Garde J, Aguado M, Pérez S, Garrido D, Pérez-Guzmán M and Montoro V** (1994a). Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from *postmortem* rams. *Theriogenology* 41: 203 (Abstr.).
- Garde J, Aguado MJ, Montoro V, Pérez-Guzmán MD, García O, Pérez S and Garzón A** (1994b). Estudio *postmortem* de la viabilidad y del poder fecundante del semen de morueco. Resultados preliminares. En: *Proceedings of the XVIII Jornadas de la SEOC*, España; pp. 533-537.

- Garde J, Pérez SS, Aguado MJ, Garrido D, Ayllon E, Montoro V and Díaz JD** (1994c). Evolución *postmortem* de la viabilidad y de la capacidad fecundante del semen de ciervo y de muflón. En: *Proceedings of the XIX Jornadas de la SEOC*, Burgos, España. pp. 542-545.
- Garde J, Aguado M, Garrido D, Montoro V, Pérez S and García-Artiga C** (1994d). Determinación *postmortem* de la viabilidad y de la capacidad para penetrar ovocitos del semen de ciervo. En: *VII Jornadas Internacionales de Reproducción Animal*. Murcia, España; pp. 117.
- Garde JJ, Pérez S, Aguado MJ, Ayllon E, Garrido D and Montoso V** (1995). Live birth of hybrid (*O. musimon* x *O. aries*) lambs following intrauterine insemination in domestic sheep with mouglon semen obtained 40 h *postmortem*. *Theriogenology* 43: 218 (Abstr.).
- Garde JJ, Ortiz N, García AJ, Gallego L, Landete-Castillejos T and López A** (1998). *Postmortem* assessment of sperm characteristics of the red deer during the breeding season. *Arch Androl* 41: 195-202.
- Garner DL and Hafez ESE** (1996). Espermatozoide y plasma seminal. In: *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales* (Ed. ESE Hafez). Interamericana McGraw-Hill (6ª edición). México; pp. 158-179.
- Gatti J, Chevrier C, Paquignon M and Dacheux J** (1993). External ionic conditions, internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 98: 439-449.
- Gerber D, Irons PC, Arlotto A and Cooper D** (2001). Quality and freezability of epididymal semen from African buffalo (*Syncerus caffer*) under field conditions. *Theriogenology* 55: 384 (Abstr.).
- Gil J, Januskaukas A, Haard M Ch, Haard MGM, Johanisson A, Söderquist L and Rodríguez-Martínez H** (2000). Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-plus[®] and Triladyl[®]. *Reproduction in Domestic Animals* 35: 69-77.
- Gil MA, Abeydeera LR, Day BN, Vázquez JM, Roca J and Martínez EA** (2003). Effect of the volume of medium and number of oocytes during *in vitro* fertilization on embryo development in pigs. *Theriogenology* 60: 767-776.
- González-Urdiales R, Tejerina F, Domínguez JC, Alegre B, Ferreras A, Peláez J, Bernal S and Cárdenas S** (2006). Técnicas de análisis rutinario de la calidad espermática: movilidad, 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, España; pp. 19-38.
- Goovaerts IGF, Hoflack GG, Van Soom A, Dewulf J, Nichi M, de Kruif A and Bols PEJ** (2006). Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton–Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. *Theriogenology* 66: 323-330.
- Gordon I** (1994). Laboratory production of cattle embryos. In: *Biotechnology in Agriculture* (Ed. I Gordon). CAB International. Wallingford. USA; pp. 77-257.
- Graham EF** (1978). Fundamental of the preservation of spermatozoa. In: *The integrity of Frozen Spermatozoa*. Nat Acad. Sci. Ed The National Research Council. Washington, DC.USA; pp. 4-44.
- Graham EF, Schmehl MKL and Nelson DS** (1980). Problems with laboratory assays. *Proceedings of the 8th NAAB Tech. Conf. A.I. Reproduction* 1: 8 (Abstr.).

Graham JK and Foote RH (1987). Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* 24: 42-52.

Graham JK (1996). Cryopreservation in stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America* 12: 131-147.

Graham JK (2001). Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science* 68: 249-265.

Green CE and Watson PF (2001). Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 122: 889-898.

Greve T and Madison V (1991). *In vitro* fertilization in cattle: a review. *Reproduction, Nutrition, Development* 31: 147-157.

Griswold MD (1993). Actions of FSH on mammalian Sertoli cells. In: *Russell LD, Griswold MD* (eds.) *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater, Florida, USA; pp. 493-508.

Gron Dahl C, Gron Dahl ML, Hyttel P and Greve T (1994). Acrosomal status in fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa evaluated by scanning electron microscopy. *Anatomy and Embryology* 190: 195-200.

Hammerstedt RH, Graham JK and Nolan JP (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology* 11: 73-88.

Hanabusa H, Kuji N, Kato S, Tagami H, Kaneko S, Tanaka H and Yoshimura Y (2000). An evaluation of semen processing methods for eliminating HIV-1. *AIDS* 14: 1611-1616.

Harkema W, Colenbrander B, Engel B and Woelders H (2004). Effects of exposure of epididymal boar spermatozoa to seminal plasma on the binding of zona pellucida proteins during *in vitro* capacitation. *Theriogenology* 61: 215-226.

Harper MJK (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, UK; pp. 102-127.

Harrison RA and White IG (1972). Glycolytic enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull, boar and ram, and their leakage after shock. *Journal of Reproduction and Fertility* 30: 105-115.

Harrison RAP, Dott HM and Foster GC (1978). Effect of ionic strength, serum albumin and other macromolecules on the maintenance of motility of motility and the surface of mammalian spermatozoa in a simple medium. *Journal of Reproduction and Fertility* 52: 65-73.

Hartmann S, Lacorn M and Steinhardt H (1998). Natural occurrence of steroid hormones in food. *Food Chemistry* 62: 7-20.

Hashimoto S, Takakura R, Kishi M, Sudo T, Minami N and Yamada M (1999). Ultrasound-guided follicle aspiration: the collection of bovine *cumulus*-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. *Theriogenology* 51: 757-765.

Hazeleger NL, Hill DJ, Stubbings RB and Walton JS (1995). Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. *Theriogenology* 43: 509- 522.

Hedger MO and Meinhardt A (2003). Cytokines and the immune-testicular axis. *Journal of Reproductive Immunology* 58: 1-26.

- Hendriksen PJ, Vos PL, Steenwg WN, Bevers MM and Dieleman SJ** (2000). Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. *Theriogenology* 53: 11-20.
- Henkel R, Müller C, Miska W, Gips H and Schill WB** (1993). Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive of fertilization *in vitro*. *Human Reproduction* 8: 2128-2132.
- Herold FC, Aurich JE and Gerber D** (2003). Epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) can be frozen successfully with Andromed[®] and with Triladyl[™] but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. *Theriogenology* 61: 715-24.
- Hidalgo CO** (2005). Estrategias de mejora de las tecnologías reproductivas en el ganado vacuno. Tesis Doctoral. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) y el Departamento de Patología Animal-Sanidad Animal. Universidad de León. España.
- Hirai M, Cerbito WA, Wijayagunawardane MPB, Braun J, Leidl W, Ohosaki K, Matsuzawa T, Miyazawa K and Sato K** (1997). The effect of viscosity of semen diluents on motility of bull spermatozoa. *Theriogenology* 47: 1463-1478.
- Hishinuma M, Suzuki K and Sekine J** (2003). Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4 °C. *Theriogenology* 59: 813-820.
- Holm P, Shukri NN, Vajta G, Booth P, Bendixen C and Callesen H** (1998). Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine *in vitro* produced embryos in relation to their *in vitro* viability and sex. *Theriogenology* 50: 1285-1299.
- Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T and Callesen H** (1999). High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 52: 683-700.
- Holt WV and North RD** (1994). Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biology of Reproduction* 51: 414-424.
- Holt W** (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53: 47-58.
- Hu JH, Li QW, Zan LS, Jiang ZL, An JH, Wang LQ and Jia YH** (2010). The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Animal Reproduction Science* 117: 11-17.
- Igboeli G and Foote RH** (1968). Maturation changes in bull epididymal spermatozoa. *Journal of Dairy Science* 51: 1703-1705.
- Iguer-Ouada M and Verstegen JP** (2001). Evaluation of the “Hamilton thorn computer-based automated system” for dog semen analysis. *Theriogenology* 55: 733-749.
- Ikeda H, Kikuchi K, Noguchi J, Takeda H, Shimada A, Mizokami T and Kaneko H** (2002). Effect of preincubation of cryopreserved porcine epididymal sperm. *Theriogenology* 57: 1309-1318.
- Inter-toros.com** (2009). Castas fundacionales. <http://www.inter-toros.com>.
- Iwata H, Hashimoto S, Ohta M, Kimura K, Shibano K and Miyake M** (2004). Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction* 127: 159-164.

- Jasko DJ, Little TV, Lein DH and Foote RH** (1992). Comparison of spermatozoa movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988). *JAVMA* 200: 979-985.
- Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Pérez-Peláez M, Crabo BJ and Zaneveld LJD** (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility* 70: 219-228.
- Jiang ZL, Li QW, Hu JH, Li WY, Zhao HW and Zhang SS** (2007). Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. *Cryobiology* 54: 301-304.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P and Maxwell WM** (2000). Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science* 62: 143-172.
- Jones RC and Martin IC** (1973). The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5 degrees C on the ultrastructure of ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 35: 311-320.
- Jones RC and Stewart DL** (1979). The effects of cooling to 5 °C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 56: 233-238.
- Jones RC and Murdoch RN** (1996). Regulation of the motility and metabolism of spermatozoa for storage in the epididymis of eutherian and marsupial mammals. *Reproduction, Fertility and Development* 8: 553-568.
- Kaabi M** (2003). Etude de la qualite et de l'aptitude a la congelation des spermatozoides du belier obtenus en post-mortem de la queue de l'epididyme. Centro Internacional de Altos Estudios Agronómico Mediterráneo. Tesina Master of Science.
- Katska L** (1984). Comparison of two methods for recovery of ovarian oocytes from slaughter cattle. *Animal Reproduction Science* 7: 461-463.
- Keskintepe L, Burnley CA and Brackett BG** (1995). Production of viable bovine blastocysts in defined *in vitro* culture conditions. *Biology of Reproduction* 52: 1410-1417.
- Khatir H and Anouassi A** (2006). The first dromedary (*Camelus dromedarius*) offspring obtained from *in vitro* matured, *in vitro* fertilized and *in vitro* cultured abattoir-derived oocytes. *Theriogenology* 65: 1727-1736.
- Kikuchi K, Nagai T, Kashiwazaki N, Ikeda H, Noguchi J, Shimada A, Soloy E and Kaneko H** (1998). Cryopreservation and ensuing *in vitro* fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4 °C. *Theriogenology* 50: 615-623.
- Killian I, Lubbe K, Bartels P, Friedmann Y and Denniston R** (2000). Evaluating epididymal sperm of African wild ruminants: longevity when stored at 4 °C and viability following cryopreservation. *Theriogenology* 53: 336 (Abstr.).
- Kim BK, Lee SC, Lee KS, Lee BK, Han CH, Kim JH and Lee CS** (2002). Effect of medium milieu on sperm penetration and pronuclear formation of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 57: 2093-2104.
- Kim TD and Babcock DF** (1991). Determinants of bull sperm membrane potential: possible activation of K⁺ channels during capacitation. *Biology of Reproduction* 44: 118 (Abstr.).
- King WA, Niar A, Chartrain I, Betteridge KJ and Quay P** (1988). Nucleolus organizer regions and nucleoli in preattachment bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 82: 87-95.

- Kishikawa H, Tateno H and Yanagimachi R** (1999). Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4 degrees C. *Journal of Reproduction and Fertility* 116: 217-222.
- Kochhar HS, Kochhar KP, Basrur PK and King WA** (2003). Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of *in vitro* produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science* 77: 33-49.
- Kruip TAM and Dieleman SJ** (1982). Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reproduction, Nutrition, Development* 22: 465-473.
- Krzywinski A** (1981). Freezing of *postmortem* collected semen from moose and red deer. *Acta Theriologica* 26: 424-426.
- Kumi-Diaka J** (1993). Subjecting the canine spermatozoa to the hypoosmotic swelling test. *Theriogenology* 39: 1279-1289.
- Lambrechts H, Van Niekerk FE, Coetzer WA, Cloete SW and van Der Horst G** (1999). The effect of cryopreservation on the survivability, viability and motility of epididymal African buffalo (*Syncerus caffer*) spermatozoa. *Theriogenology* 52: 1241-1249.
- Lee ES and Fukui Y** (1995). Effect of various growth factors in a defined culture medium on *in vitro* development of bovine embryos matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 44: 71-83.
- Leibfried L and First NL** (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *Journal of Animal Science* 48: 76-86.
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES and First NL** (1986). Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster *cumulus*-oocyte complexes. *Biology of Reproduction* 35: 850-857.
- Lequarre AS, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I, Dalbiés-Tran R, Callesen H and Mermillod P** (2005). Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology* 63: 841-859.
- Leroy JL, Genicot G, Donnay I and Van Soom A** (2005). Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with Nile red: a practical approach. *Reproduction in Domestic Animals* 40: 76-78.
- Liu Z and Foote RH** (1998). Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. *Journal of Dairy Science* 81: 1868-1873.
- Lohuis MM** (1995). Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology* 43: 51-60.
- Lonergan P, Carolan C and Mermillod P** (1994). Development of bovine embryos *in vitro* following oocyte maturation under defined conditions. *Reproduction, Nutrition, Development* 34: 329-339.
- Lu KH, Gordon I, Gallager M and McGovern H** (1987). Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of follicular oocytes matured *in vitro*. *Veterinary Record* 121: 259-260.
- Lu KH and Seidel GE Jr** (2004). Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. *Theriogenology* 62: 819-830.

- Lubbe K, Bartels P, Kilian I, Friedmann Y and Godke RA** (2000). Comparing motility and morphology of horse, zebra and rhinoceros epididymal spermatozoa when cryopreserved with two different cryodiluents or stored at 48 °C. *Theriogenology* 53: 338 (Abstr.).
- Luciano AM, Lodde V, Beretta MS, Colleoni S, Lauria A and Modena S** (2005). Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-culture system with intact *cumulus*-oocyte complexes: role of *cumulus* cells, cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate, and glutathione. *Molecular Reproduction and Development* 71: 389-397.
- Magistrini M, Guitton E, Levern Y, Nicolle J Cl, Vidament M, Kerboeuf D and Palmer E** (1997). New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. *Theriogenology* 48: 1229-1235.
- Malo AF, Garde JJ, Soler AJ, García AJ, Gomendio M and Roldán ERS** (2005). Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biology of Reproduction* 72: 822-829.
- Manjunath P, Nauc V, Bergeron A and Menard M** (2002). Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reproduction* 67: 1250-1258.
- Mann T and Lutwak-Mann C** (1981). Biochemistry of spermatozoa: chemical and functional correlations in ejaculated semen. Andrological aspects. In: *Male reproductive function and semen*. Ed. Springer-Verlag. New York. USA; pp. 205-217.
- Marco-Jiménez F, Puchades S, Gadea J, Vicente JS and Viudes-de-Castro MP** (2005). Effect of semen collection method on pre- and post- thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology* 64: 1756-1765.
- Martínez F, Martínez-Pastor F, Álvarez M, Fernández-Santos MR, Estesó MC, de Paz P, Garde JJ and Anel L** (2008). Sperm parameters on Iberian red deer: electroejaculation and *postmortem* collection. *Theriogenology* 70: 216-226.
- Martínez-Pastor F, Guerra C, Kaabi M, Díaz AR, Anel E, Herráez P, de Paz P and Anel L** (2005a). Decay of sperm obtained from epididymides of wild ruminants depending on *postmortem* time. *Theriogenology* 63: 24-40.
- Martínez-Pastor F, Díaz-Corujo AR, Anel E, Herraiez P, Anel L and de Paz P** (2005b). Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. *Theriogenology* 64: 958-974.
- Martínez-Pastor F, Martínez F, García-Macias V, Estesó MC, Anel E, Fernández-Santos MR, Soler AJ, de Paz P, Garde J and Anel L** (2006). A pilot study on post-thawing quality of iberian red deer spermatozoa (epididymal and electroejaculated) depending on glycerol concentration and extender osmolality. *Theriogenology* 66: 1165-1172.
- Martins CF, Rumpf R, Pereira DC and Dode MN** (2007). Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses *in vitro* embryo production. *Animal Reproduction Science* 101: 326-331.
- Martins CF, Driessen K, Melo Costa P, Carvalho-Neto JO, de Sousa RV, Rumpf R and Dode MN** (2009). Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 °C by different periods of time. *Animal Reproduction Science* 116: 50-57
- Maxwell WMC and Johnson LA** (1997). Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 48: 209-219.

- Mazur P** (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology* 247: 125-142.
- McNatty KP, Heath DA, Henderson KM, Lun S, Hurst PR, Ellis LM, Montgomery GW, Morrison L and Thurley DC** (1984). Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* 72: 39-53.
- McNutt T, Rogowski J, Vasilatos-Younken R and Killian G** (1992). Adsorption of oviductal fluid proteins by the bovine sperm membrane during *in vitro* capacitation. *Molecular Reproduction and Development* 33: 313-323.
- Mehmood A, Anwar M and Saqlan-Naqvi SM** (2009). Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen-thawed buffalo semen. *Animal Reproduction Science* 111: 141-148.
- Mendes JO, Burns PD, De La Torre-Sanchez JF and Seidel GE** (2003). Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. *Theriogenology* 60: 331-340.
- Mermillod P, Vansteenbrugge A, Wils C, Mourmeaux JL, Massip A and Dessy F** (1993). Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct conditioned medium used in culture of cattle embryos. *Biology of Reproduction* 49: 582-587.
- Miller DL and Ax RL** (1990). Carbohydrates and fertilization in animals. *Molecular Reproduction and Development* 26: 184-198.
- Momozawa K and Fukuda Y** (2003). Caffeine in fertilization medium is not essential for bovine IVF by fully capacitated spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development* 49: 507-512.
- Mortimer D, Aitken RJ, Mortimer ST and Pacey AA** (1995). Workshop report: Clinical CASA-the quest for consensus. *Reproduction, Fertility and Development* 7: 951-959.
- Mortimer D, Oehninger S and Tesarik J** (1997). Consensus workshop on advanced diagnostic andrology techniques. ESHRE andrology special interest group. *Human Reproduction* 12: 873 (Abstr.).
- Moussa M, Marinet V, Trimeche A, Tainturier D and Anton M** (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: Cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57: 1695-1706.
- Muiño-Otero R** (2008). Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. España; pp. 59-60.
- Nauc V and Manjunath P** (2000). Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biology of Reproduction* 63: 1058-1066.
- Neild D, Miragaya M, Chaves G, Pinto M, Alonso A, Gambarotta M, Losinno L and Agüero A** (2006). Cryopreservation of cauda epididymis spermatozoa from slaughterhouse testicles 24 hs after ground transportation. *Animal Reproduction Science* 94: 92-95.
- Neuber E, Luetjens CM, Chan AWS and Schatten GP** (2002). Analysis of DNA fragmentation of *in vitro* cultured bovine blastocyst using TUNEL. *Theriogenology* 57: 2193-2202.

- Niwa K and Ohgoda O** (1988). Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology* 30: 733-741.
- Nolan JP and Hammerstedt RH** (1997). Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *Nicholasville alltech Technicals Publications* 11: 670-682.
- Numabe T, Oikawa T, Kikuchi T and Horuchi T** (2001). Pentoxifylline improves *in vitro* fertilization and subsequent development of bovine oocytes. *Theriogenology* 56: 225-233.
- O'Dell WT and Hurst V** (1956). The effect of glycerol equilibration time on the freezing of bovine spermatozoa in egg yolk sodium citrate and skim milk semen extenders. *Journal of Dairy Science* 39: 1156-1160.
- Oettlé EE** (1986). Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology. *Veterinary Medical* 81: 263-266.
- Ortman K and Rodriguez-Martinez H** (1994). Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags. *Zentralbl Veterinarmed A* 41: 37-47.
- Pace MM and Graham EF** (1974). Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal of Animal Science* 39: 1144-1149.
- Pace MM, Sullivan JJ, Elliot FI, Graham EF and Coulter GH** (1981). Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoa quality on fertility of bovine spermatozoa package in 0.5 ml fresh straw. *Journal of Animal Science* 53: 693-701.
- Palomo MJ, Izquierdo D, Mogas T and Paramio T** (1999). Effect of semen preparation on IVF of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 51: 927-940.
- Parks JE and Graham JK** (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38: 209-222.
- Parrish JJ, Parrish JL and First NL** (1984). Effect of swim-up separation and heparin pre-treatment of frozen-thawed spermatozoa on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Biology of Reproduction* 30: 112 (Abstr.).
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH and First NL** (1986). Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25: 591-600.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA and First NL** (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction* 38: 1171-1180.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL and First NL** (1989). Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biology of Reproduction* 41: 683-699.
- Parrish JJ** (1991). Application of *in vitro* fertilization to domestic animal. In: *The Biology and Chemistry of Mammalian Fertilization*. Vol II. (Ed PM Wassarman), CRC Press, New York. USA; pp. 111-132.
- Parrish JJ, Krogenaes A and Susko-Parrish JL** (1995). Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 44: 859-869.
- Pasquier C, Daudin M, Righi L, Berges L, Thauvin L, Berrebi A, Massip P, Puel J, Bujan L and Izopet J** (2000). Sperm washing and virus nucleic acid detection to reduce HIV and hepatitis C virus transmission in serodiscordant couples wishing to have children. *AIDS* 14: 2093-2099.

- Paufler S and Foote RH** (1968). Morphology, motility and fertility of spermatozoa recovered from different areas of ligated rabbit epididymides. *Journal of Experimental Zoology* 17: 125-137.
- Paulenz H and Hofmo PO** (1996). Routine assessment of sperm concentration at a boar AI station using a Coulter Counter. *Reproduction in Domestic Animals* 31: 257-258.
- Pérez-Llano B, González JL, Clemente MJ and García-Casado P** (1998). Nueva técnica de ORT corta para su evaluación. *Albéitar* 21: 6-7.
- Pérez-Llano B, González JL, Clemente MJ and García-Casado P** (1999). El test de endósmosis (HOST) en semen de ganado porcino. *Albéitar* 30: 16-17.
- Pérez-Llano B, Lorenzo JL, Yenes P, Trejo A and García-Casado P** (2001). A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology* 56: 387-398.
- Philips PH and Lardy HA** (1940). A yolk-buffer pabulum for the cryopreservation of bull semen. *Journal of Dairy Science* 23: 399-404.
- Pickett BW and Komarek RJ** (1967). Effect of cold shock and freezing on loss of lipid from spermatozoa. *Journal of Dairy Science* 50: 753-757.
- Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TA and Taverne MA** (1988). Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of bovine oocytes. *Theriogenology* 30: 751-762.
- Pieterse MC, Vos PL, Kruip YA, Van Beneden TH, Wilmense AH and Taverne MA** (1991). Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology* 35: 19-24.
- Pinyopummintr T** (1990). Bovine embryos develop to the morula/blastocyst stage *in vitro* in a chemically defined protein-free medium. *Biology of Reproduction* 42: 61 (Abstr.).
- Pinyopummintr T and Bavister BD** (1991). *In vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biology of Reproduction* 45: 736-742.
- Pinyopummintr T and Bavister BD** (1993). Effect of timing of addition and types of serum supplementation on bovine embryo development *in vitro*. *Biology of Reproduction* 48: 174 (Abstr.).
- Pinyopummintr T and Bavister BD** (1994). Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology* 41: 1241-1249.
- Polge C, Smith AU and Parkes AS** (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666 (Abstr.).
- Ponglowhapan S, Chatdarong K, Sirivaidyapong S and Lohachit C** (2006). Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. *Theriogenology* 66: 1633-1636.
- Pratap N, Reddy VNV, Sarma PA and Honnappa TG** (2000). Employment of the hypoosmotic swelling test (HOST) to evaluate sperm integrity of fresh and frozen buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Buffalo J* 16: 207-213.
- Quinn PJ and White IG** (1966). The effect of cold shock and deep-freezing on the concentration of major cations in spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 12: 263-270.

- Quinn PJ, White IG and Cleland KW** (1969). Chemical and ultrastructural change ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *Journal of Reproduction and Fertility* 18: 209-220.
- Quinn PJ, Chow PY and White IG** (1980). Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal of Reproduction and Fertility* 60: 403-407.
- Quintero-Moreno A** (2003). Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Tesis doctoral. Universidad autónoma de Barcelona. España.
- Quintero-Moreno A, Madrigal O, Gallardo F, Ramió L, Peña A, Miró J, Rigau T and Rodríguez-Gil JE** (2003). Subpoblaciones espermáticas en mamíferos. *Biología de la Reproducción* 8: 47-49.
- Rath D** (1992). Experiments to improve *in vitro* fertilization techniques for *in vivo* matured porcine oocytes. *Theriogenology* 37: 885-886.
- Rath D and Niemann H** (1997). *In vitro* fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology* 47: 785-793.
- Reichenbach HD, Wiebke NH, Mödl J, Zhu J and Brem G** (1994). Laparoscopic through the vaginal fornix cows for the repeated aspiration of follicular oocytes. *Veterinary Record* 135: 353-356.
- Reta de Casta Navarra** (2009). Historia. <http://www.retadecastanavarra.com/historia/>.
- Rieger D** (1996). The metabolic activity of cattle oocytes and early embryos. *Journal of Reproduction and Development* 42: 85-89.
- Risopatrón J, Sanchez R, Sepúlveda N, Peña P, Villagran E and Miska W** (1996). Migration/sedimentation sperm selection method used in bovine *in vitro* fertilization: comparison with washing/centrifugation. *Theriogenology* 46: 65-73.
- Rodríguez-Martínez H, Larsson B and Pertoft H** (1997). Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reproduction, Fertility and Development* 9: 297-308.
- Rodríguez-Martínez H, Wallgren M, Selles E and Tienthai P** (2001). Aspectos de función espermática en cerdos. In: *III Congresso Ibérico de Reprodução Animal*. Porto, 6-8/. Livro de Resumos. Portugal; pp. 51-60.
- Rodríguez-Martínez H** (2003). Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reproduction in Domestic Animals* 38: 312-318.
- Rota A, Linde-Forsberg C, Vannozzi J, Romagnoli S and Rodríguez-Martínez H** (1998). Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentration and freezing/thawing rates. *Reproduction in Domestic Animals* 33: 355-361.
- Rota A, Peña AI, Linde-Forsberg C and 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. *Animal Reproduction Science* 57: 199-215.
- Ruknudin A** (1989). Cytochemical study of intracellular calcium in hamster spermatozoa during the acrosome reaction. *Gamete Research* 22: 375-384.
- Sadler TW** (2001). Primera semana de desarrollo: de la ovulación a la implantación. En: *Embriología médica. Con orientación clínica* (Ed. Langman). Médica Panamericana (8ª edición). Madrid. España; pp. 30-47.

- Saeki K, Hoshi M, Liebfried-Rutledge ML and First NL** (1990). Effects of gonadotrophins and estradiol 17 β (E) during *in vitro* maturation of bovine oocytes in serum-free medium on subsequent fertilization and development. *Biology of Reproduction* 42: 39 (Abstr.).
- Salamon S and Maxwell WM** (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 62: 77-111.
- Salisbury G, Vandemark N and Lodge J** (1978). Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos. *Editorial Acribia*. Zaragoza, España; pp. 832.
- Samardzija M, Karadjole M, Matkovic M, Cergolj M, Getz I, Dobranic T, Tomaskovic A, Petric J, Surina J, Grizelj J and Karadjole T** (2006). A comparison of BoviPure[®] and Percoll[®] on bull sperm separation protocols for IVF. *Animal Reproduction Science* 91: 237-247.
- Sanbuissho A and Threlfall WR** (1988). The influence of serum and gonadotropins on bovine oocyte maturation *in vitro*. *Theriogenology* 29: 301 (Abstr.).
- Sánchez R, Toepfer-Petersen E, Aitken RJ and Schill WB** (1991). A new method for evaluation of the acrosome reaction in viable spermatozoa. *Andrologia* 23: 197-203.
- Sánchez R, Risopatrón J, Sepúlveda G, Peña P and Miska W** (1995). Evaluation of the acrosomal membrane in bovine spermatozoa: Effects of proteinase inhibitors. *Theriogenology* 43: 761-768.
- Sankai T, Tsuchiya H and Ogonuki N** (2001). Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 55: 1759-1768.
- Santl B, Wenigerkind H, Scherthanner W, Möld J, Stojkovic M, Prella K, Holtz W, Brem G and Wolf E** (1998). Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in simmental heifers. *Theriogenology* 50: 89-100.
- Schellander K, Fuhrer F, Brackett BG, Korb H and Schelenger W** (1990). *In vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. *Theriogenology* 33: 477-485.
- Schilling E, Vengust M and Smidt D** (1984). ORT: un nuevo sistema para predecir la congelabilidad y la capacidad de almacenamiento de los espermatozoides de verraco. In: "Proceedings of the 8th IPVS Congress", Bélgica; pp. 346.
- Schilling E, Vengust M, Bajt G and Tomcic M** (1986). The osmotic resistance (ORT) of boar spermatozoa and the relation to pregnancy rate and litter size. In: "Proceedings of the 9th IPVS Congress", Barcelona, España; pp. 77.
- Setchell BP, Sánchez-Partida LG and Chairussyuhur A** (1993). Epididymal constituents and related substances in the storage of spermatozoa: a review. *Reproduction, Fertility and Development* 5: 601-612.
- Shamsuddin M, Larsson B, Gustafsson H and Rodriguez-Martinez H** (1994). A serum-free, cell-free culture system for development of bovine one-cell embryos up to blastocyst stage with improved viability. *Theriogenology* 41: 1033-1043.
- Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S and Hanada A** (1988). *In vitro* fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured *in vitro*. *Theriogenology* 30: 489-496.
- Sirisathien S, Hernández-Fonseca HJ and Brackett BG** (2003). Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development *in vitro*. *Animal Reproduction Science* 77: 21-32.

- Sisson S** (1975). Ruminant urogenital system. In: *The anatomy of the domestic animals*. Saunders, 5ª Edición, vol 1; pp. 937.
- Soler AJ, Pérez-Guzmán M and Garde JJ** (2003). Storage of red deer epididymides for four days at 5 °C: effects on sperm motility, viability and morphological integrity. *Journal of Experimental Zoology* 295: 188-199.
- Soler AJ, Estes MC, Fernandez-Santos MR and Garde JJ** (2005). Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5 °C in the epididymis for several days. *Theriogenology* 64: 1503-1517.
- Solvas I, Grossmann M, Santaló J and Pons M** (2002). Estudio comparativo entre dos métodos de Swim-up. *Asebir* 7: 28-32.
- Somfai T, Bodo S, Nagy S, Papp AB, Ivancsics J, Baranyai B, Goeza E and Kovacs A** (2002). Effect of swim-up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull sperm. *Reproduction in Domestic Animals* 37: 285-290.
- Songsasen N, Tong J and Leibo SP** (1998). Birth of live mice derived by *in vitro* fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death. *Journal of Experimental Zoology* 280: 189-196.
- Staigmiller RB and Moor RM** (1984). Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicles. *Gamete Research* 9: 1091-1099.
- Ström-Holst B, Rota A and Linde-Forsberg C** (1997). *In vitro* characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* 48: 247-256.
- Suarez SS, Katz DF, Owen DH, Andrew JB and Powell RL** (1991). Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biology of Reproduction* 44: 375-381.
- Suarez SS and Ho HC** (2003). Hyperactivated motility in sperm. *Reproduction in Domestic Animals* 38: 119-124.
- Szöllösi D and Hunter RH** (1978). The nature and occurrence of the acrosome reaction in spermatozoa of the domestic pig, *Sus scrofa*. *Journal of Anatomy* 127: 33-41.
- Talbot P and Chacon RSA** (1981). A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions in human sperm. *Journal of Experimental Zoology* 215: 201-208.
- Tamuli M and Watson PF** (1994). Use of simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Animal Reproduction Science* 35: 247-254.
- Tan JH, Yang ZM, Quin PC and Pashen RL** (1988). Light and electron microscope studies on follicular oocytes of Chinese yellow cattle prior to *in vitro* maturation. *Theriogenology* 29: 317 (Abstr.).
- Tanghe S, Van Soom A, Mehrzad J, Maes D, Duchateau L, and de Kruif A** (2004). Cumulus contributions during bovine fertilization *in vitro*. *Theriogenology* 60: 135-149.
- Tateno H and Mikamo K** (1987). A chromosomal method to distinguish between X- and Y-bearing spermatozoa of the bull in zona-free hamster ova. *Journal of Reproduction and Fertility* 81: 119-125.
- Tejerina F, González-Urdiales R, Alegre B, Castejón M, Martín AJ, Cárdenas S, García JC, Bernal S and Domínguez JC** (2006). Measure of sperm concentration in boar ejaculates: traditional systems *versus* the new Nucleocounter. *Reproduction in Domestic Animals* 41: 113 (Abstr.).

- Tervit HR, Whittingham G and Rowson LEA** (1972). Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *Journal of Reproduction and Fertility* 30: 493-497.
- Therien I, Moreau R and Manjunath P** (1999). Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction* 61: 590-598.
- Thibier M and Guerin B** (2000). Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 62: 233-251.
- Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, Wright RW Jr and Tervit HR** (1991). Glucose utilization by sheep embryos derived *in vivo* and *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development* 3: 517-576.
- Tramer F, Rocco F, Micali F, Sandri G and Panfili E** (1998). Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biology of Reproduction* 59: 753-758.
- Trejo R, Betancourt M and Casas E** (2005). Los gametos: células reproductoras de los mamíferos. Ed. *El Manual Moderno*, SA deCV. 1ª. Edición, Mexico, DF; pp. 31.
- Trimeche A, Anton M, Renard P, Gandemer G and Tainturier D** (1997). Quail egg yolk: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of poitou jackass sperm. *Cryobiology* 34: 385-393.
- Turner R** (2006). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertility and Development* 18: 25-38.
- Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L and Aitken RJ** (1998). Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of plasma seminal. *Molecular Human Reproduction* 4: 439-445.
- Van Soom A, Tanghe S, de Pauw I, Maes D and de Kruif A** (2002). Function of the *cumulus oophorus* before and during mammalian fertilization. *Reproduction in Domestic Animals* 37: 144-151.
- Varela Junior AS, Corcini CD, Ulguim RR, Alvarenga MV, Bianchi I, Correa MN, Lucia T Jr and Deschamps JC** (2009). Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Animal Reproduction Science* 115: 323-327.
- Vassena R, Mapletoft RJ, Allodi S, Singh J and Adams GP** (2003). Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology* 60: 923-932.
- Vázquez JM, Martínez EA, Pastor LM, Roca J, Matas C and Calvo A** (1996). Lectin histochemistry during *in vitro* capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa: new lectins for evaluating acrosomal status of boar spermatozoa. *Acta Histochemica* 98: 93-100.
- Vázquez JM, Martínez EA, Roca J, Blanco O, Lucas X and Matas C** (1997a). Utilización del analizador de imágenes para la evaluación de la movilidad de los espermatozoides de verraco. IV *Simposium Internacional de Reproducción e IA porcina*. Madrid; pp. 83-90.
- Vázquez JM, Martínez EA, Martínez P, García-Antiga C and Roca J** (1997b). Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. *Theriogenology* 47: 913-922.
- Vélez JF** (1991). Human spermatozoa selection in improved discontinuous percoll gradients. *Fertility and Sterility* 56: 737-742.

- Verstegen J, Iguer-Ouada M and Onclin K** (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practise. *Theriogenology* 57: 149-179.
- Vishwanath R and Shannon P** (1997). Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperatures. *Reproduction, Fertility and Development* 9: 321-331.
- Vishwanath R and Shannon P** (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science* 62: 23-53.
- Von Buiten A, Zhang J and Boule MS** (1989). Integrity of plasma membrane of stallion spermatozoa before and after freezing. *Journal of Reproduction and Fertility* 4: 11-18.
- Wagtendonk Van de Leeuw AM, Haring RM, Kaal-Lansbergen LM and den Daas JH** (2000). Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract. *Theriogenology* 54: 57-67.
- Wakayama T and Yanagimachi R** (1998). Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nature Biotechnology* 16: 639-646.
- Wall RJ and Foote RH** (1999). Fertility of bull sperm frozen and stored in clarified egg yolk-tris-glycerol extender. *Journal of Dairy Science* 82: 817-821.
- Wani NA** (2009). *In vitro* embryo production in camel (*Camelus dromedarius*) from *in vitro* matured oocytes fertilized with epididymal spermatozoa stored at 4 °C. *Animal Reproduction Science* 111: 69-79.
- Ward FA, Lonergan P, Enright BP and Boland MP** (2000). Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technology. *Theriogenology* 54: 433-446.
- Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M and Lonergan P** (2002). Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology* 57: 2105-2117.
- Ward F, Rizos D, Boland MP and Lonergan P** (2003). Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress. *Theriogenology* 59: 1575-1584.
- Watson PF** (1975). Use of Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Veterinary Record* 97: 12-15.
- Watson PF and Martin IC** (1975). The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 degrees C. *Australian Journal of Biological Sciences* 28: 145-152.
- Watson PF** (1979). The preservation of semen in mammals. In: *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Finn, CA (ed.). Oxford. UK; pp. 283-350.
- Watson PF** (1981). The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility* 62: 483-492.
- Watson PF, Kutze E, Cramer P and Hammerstedt RH** (1992). A comparison of critical osmolality and hydraulic conductivity and its activation energy in fowl and bull spermatozoa. *Journal Andrology* 13: 131-138.
- Watson PF** (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development* 7: 871-891.

- Watson PF** (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60: 481-492.
- Way AL, Henault MA and Killian GJ** (1995). Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Theriogenology* 43: 1301-1316.
- Wells ME and Awa OA** (1970). New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa. *Journal of Dairy Science* 53: 227-233.
- Wheeler MB and Seidel GE Jr** (1986). Time course of *in vitro* capacitation of frozen and unfrozen bovine spermatozoa. *Theriogenology* 25: 216 (Abstr.).
- White IG** (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction, Fertility and Development* 5: 639-658.
- Wiggin HB and Almquist JO** (1975). Combinations of glycerol percent, glycerol equilibration time, and thawing rate upon freezability of bull spermatozoa in plastic straws. *Journal of Dairy Science* 58: 416-419.
- Woelders H** (1990). Overview of *in vitro* methods for evaluation of semen quality. *Reproduction in Domestic Animals* 1: 145-164.
- Wrobel K and Dellmann** (1993). Sistema reproductor masculino. En *Histología Veterinaria de D. Dellmann*. 2^{da} Ed. Acribia. Zaragoza. España; pp. 245-257.
- Xu KP and Greve T** (1988). A detailed analysis of early events during *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* 82: 127-134.
- Yanagimachi R** (1989). Sperm capacitation and gamete interaction. *Journal of Reproduction and Fertility* 38: 27-33.
- Yanagimachi R** (1994). Mammalian fertilization. In: "*Physiology of reproduction. Second Edition*". Eds: Knobil E and Neill JK. Raven Press Ltd, New York. USA; pp. 189-317.
- Yang X, Kubota C, Suzuki H, Taneja M, Bols PEJ and Presicce GA** (1998). Control of oocytes maturation in cows-biological factors. *Theriogenology* 49: 471-482.
- Young WC** (1931). A study of the function of the epididymis. III. Functional changes undergone by spermatozoa during their passage through the epididymis and vas deferens in the ginea-pig. *Journal of Experimental Biology* 8: 151-62.
- Younis AI, Brakett BG and Fayer-Hosken RA** (1989). Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Research* 23: 189-209.
- Yu I and Leibo SP** (2002). Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4 °C. *Theriogenology* 57: 1179-1190.
- Yu I, Songsasen N, Godke RA and Leibo SP** (2002). Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology* 44: 62-78.
- Zaneveld LJ and Chatterton RT** (1982). In biochemistry of mammalian reproduction. *New York: Wiley/Interscience*.USA; pp. 38.
- Zaneveld LJ and Jeyendran RS** (1990). Hypoosmotic swelling test. "*Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility*". Eds: Keel, B.A. y Webster, B.W. *CRC press*, Boca Ratón, Florida, USA; pp. 91-110.

Zavos PM (1992). Preparation of human frozen-thawed seminal specimens using the SpermPrep filtration method: improvements over the conventional swim up method. *Fertility and Sterility* 57: 1326-1330.

Zomborszky Z, Zubor T, Toth J and Horn P (1999). Sperm collection from shot red deer stags (*Cervus elaphus*) and utilization of sperm frozen and subsequently thawed. *Acta veterinaria Hungarica* 47: 263-270.

9. Resumen

El toro de Lidia está muy ligado a la cultura española, inculcado fuertemente en las raíces artísticas, con influencia en el sector turístico y en el desarrollo de muchos pueblos y ciudades.

Si tenemos en cuenta que, la mayoría de los toros que se lidian provienen de una sola estirpe (Vistahermosa), unido a la práctica de cruzamientos cerrados durante tanto tiempo, podemos comprender por qué, en la actualidad, existe un alto grado de endogamia en esta raza. Los efectos pueden ser nefastos en un futuro, por lo que resulta imprescindible conservar material genético con el propósito de salvaguardar la variabilidad, y recuperarla de una forma rápida y efectiva. Los métodos *postmortem* más rápidos y eficientes, para recobrar el material genético, son la recuperación de ovocitos de los folículos ováricos, en el caso de las hembras, y de espermatozoides epididimales, en el caso de los machos.

Así, es fundamental conocer la anatomía epididimal y las características de su esperma, evaluar el tiempo del que disponemos para su manipulación, antes de que la pérdida de fertilidad sea significativa, así como determinar cual es el diluyente más adecuado a emplear. Por último es de suma importancia que el uso del esperma epididimal genere descendencia viva, dado su valor y la recuperación de un número limitado de dosis. En este sentido, la mejor estrategia a emplear es la fecundación *in vitro* (FIV), siendo el apartado de selección y preparación espermática uno de los desafíos a la hora de establecer la metodología más adecuada.

Los factores que afectan a la supervivencia de los espermatozoides en el epidídimo refrigerado, aún no están claros, pero se sabe que la cola epididimaria proporciona un excelente ambiente para el almacenamiento del esperma, en un estado de reposo.

Se ha demostrado que la yema de huevo puede ayudar en la resistencia contra el choque por frío y mejorar la fecundidad del esperma. Sin embargo, en el toro, el uso de un diluyente definido, además de no presentar componentes de origen animal, mantiene parámetros similares de calidad e iguales tasas de fertilidad, que los observados en diluyentes con yema de huevo.

Se estudió el efecto del tiempo de conservación *postmortem*, del medio de dilución y del método de selección espermática sobre las características de calidad del semen epididimario del toro de Lidia. Para ello se recogieron los testículos, inmediatamente después del sacrificio de los animales. Unos se procesaron inmediatamente (R0), otros se almacenaron refrigerados a 5 °C durante 24 (R24) ó 48 horas (R48). El esperma recolectado de cada toro se dividió en dos partes iguales y se diluyó, uno con Bioxcell® (lecitina de soja) y otro con Biladyl® (yema de huevo), congelando todas las muestras. Tras su descongelación, se estudiaron los métodos de selección espermática, “swim up” o gradiente de densidad. El estudio de los parámetros seminales se realizó en diferentes momentos del proceso: antes de la dilución de las muestras, durante la refrigeración, una vez descongelados y después de la descongelación y de la selección espermática, estudiando además la capacidad de fecundación y la división embrionaria de dichas muestras.

En todos los casos, la calidad de los espermatozoides epididimales de toro de Lidia almacenados en la cola epididimaria, decayó con el tiempo de conservación *postmortem*, manteniendo la calidad, aunque con un ligero descenso, hasta las 24 horas de almacenamiento. Las muestras obtenidas de epidídimos conservados durante 48 horas, fueron las que sufrieron mayores pérdidas de calidad, aunque podrían ser consideradas viables y útiles para su futuro uso empleando biotecnología.

Los parámetros de calidad seminal, no se vieron modificados de la misma manera por el tiempo *postmortem* y por la pre congelación, siendo la movilidad la característica más afectada, mientras que la integridad de la membrana plasmática y la del acrosoma soportaron mejor las condiciones de almacenamiento.

Ambos diluyentes evaluados fueron eficaces para la conservación del esperma epididimal, aunque mantuvo una mejor calidad espermática, en general, el diluyente a base de lecitina de soja para las muestras sin conservación, y el que contiene base de yema de huevo para los grupos almacenados hasta 48 horas.

Los métodos de selección evaluados, “swim-up” y gradiente de densidad, consiguieron fecundar y dividir los ovocitos, aunque se obtuvo una mejor calidad espermática en las muestras seleccionadas mediante “swim-up”, los espermatozoides presentaron un mayor número de alteraciones y/o reacción acrosomal. La separación por

gradiente de densidad, proporcionó muestras con una mayor concentración espermática, que también presentaban una buena calidad.

Los espermatozoides, congelados-descongelados, recogidos de epidídimos almacenados a 5 °C, durante 24 horas, mostraron una capacidad fecundante similar que la de los no conservados. Si bien los espermatozoides almacenados durante un periodo más largo, lograron fecundar y dividir al ovocito, éstos lo hicieron en un porcentaje inferior a los anteriores.

The Lidia bull is closely linked to the cultural roots of Spain. Strongly ingrained artistic roots, influencing the tourism sector and the development of many towns and cities.

If we consider that, today, most bulls that are fought come from a single strain (Vistahermosa), and the practice of crossing closed for so long, we can understand why there is currently a high degree of inbreeding in this race. The harmful effects can be drastic in the future. Therefore it is imperative to safeguard conserve genetic material variability, and recover in a fast and effective way. The fastest and more efficient *postmortem* methods for recovering the genetic material are the recovery of oocytes from ovarian follicles, in the case of females, and epididymal sperm in the case of males.

Thus, it is essential to know the epididymal anatomy and characteristics of their sperm to assess the time available for handling, before the loss of fertility is significant and determine which is the most suitable diluent to be used. Finally it is of utmost importance the use of epididymal sperm to generate offspring alive, given its value and that a limited number of doses can be obtained. In this sense, the best strategy to employ is *in vitro* fertilization (IVF), being the sperm selection and preparation one of the biggest challenges establishing the most appropriate methodology.

Factors affecting the survival of spermatozoa in the epididymis cooled are not yet clear. But it is known that epididymal tail provides an excellent environment for sperm storage in a resting state.

It has been shown that egg yolk may help in the resistance to cold shock and improve the fertility of the sperm. However, in the bull, the use of a diluent defined, whilst posing no animal ingredients, keeps parameters similar quality and equal fertility rates than those found in egg yolk extender.

It was intended to study the effect of *postmortem* storage time, the dilution medium and method of sperm selection over the characteristics of epididymal sperm quality of Lidia bull. For these testicles were collected immediately after slaughter of animals. Some were processed immediately (R0), others were stored refrigerated at 4 °C for 24 (R24) or 48 hours (R48). The sperm collected from each bull was divided into

two equal parts and diluted, one with Bioxcell[®] and the other with Biladyl[®], freezing all samples. The samples were thawed and sperm selection methods, "swim up" or density gradient, are studied. The study of semen parameters was performed at different times of the process, previous to dilution, during cooling, after thawing and after thawing of sperm selection, also studying the ability of fertilization and embryo splitting of these samples.

In all cases, the quality of Lidia bull epididymal sperm, declined with *postmortem* storage time. Maintaining sperm quality, but with a slight decrease up to 24 hours of storage. Samples from epididymides stored for 48 hours, were the ones that suffered major losses in quality, but may be considered viable and useful for future use using biotechnology.

Semen quality parameters were not affected in the same way by the *postmortem* time and the pre-freezing. Mobility was the most affected, while the plasma membrane integrity and acrosome stood better under storage conditions.

Both diluents tested were effective for the preservation of epididymal sperm, whilst maintaining a better quality sperm, in general, the solvent-based soy lecithin for the samples without conservation, and the one containing egg yolk stored up to 48 hours groups.

Evaluated selection methods, "swim-up" and density gradient, were able to fertilize and divide oocytes. However, it was better sperm quality in selected samples by "swim-up". Sperm had a higher number of impaired and or acrosome reaction. The density gradient separation provided samples with higher sperm concentration, which also had a good sperm quality.

The frozen-thawed sperm, collected from epididymides stored at 5 ° C for 24 hours, show a similar fertilizing capacity of sperm than the ones not preserved. Although, the sperm stored longer was able to fertilize and divide the egg, these did so in a much smaller percentage.