



Facultad de Veterinaria

PREDICCIÓN DE LA FERTILIDAD "IN VIVO" DE LOS EYACULADOS DE VERRACO MEDIANTE PARÁMETROS RUTINARIOS DE CONTRASTACIÓN SEMINAL, PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y EL TEST HOMÓLOGO DE PENETRACIÓN "IN VITRO".

Gadea Mateos, Joaquín

Servicio de Publicaciones

Universidad de Murcia

1997



Universidad de Murcia

Dpto. Patología Animal (Reproducción y Obstetricia)

Facultad de Veterinaria

Campus de Espinardo. Apdo 4021 Murcia. España

EMILIO MARTINEZ GARCIA Y JUAN MARIA VAZQUEZ ROJAS,
profesores del Departamento de Patología Animal (Reproducción y Obstetricia),
de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia,

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Predicción de la fertilidad *in vivo* de los eyaculados de verraco mediante parámetros rutinarios de contrastación seminal, pruebas bioquímicas y el test homólogo de penetración *in vitro*”, de la que es autor D. Joaquín Gadea Mateos, ha sido realizada bajo nuestra dirección y cumple las condiciones para su lectura.

Murcia a 12 de marzo de 1997



DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD DE MURCIA

DÑA. M^a ROSA CARO VERGARA, Secretaria del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria.

CERTIFICA:

Que el Departamento de Patología Animal de la Universidad de Murcia en su última reunión de Consejo, una vez examinada por la Comisión de Investigación del Departamento la memoria de Tesis titulada "**PREDICCIÓN DE LA FERTILIDAD IN VIVO DE LOS EYACULADOS DE VERRACO MEDIANTE PARÁMETROS RUTINARIOS DE CONTRASTACIÓN SEMINAL, PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y EL TEST HOMÓLOGO DE PENETRACIÓN IN VITRO**", realizada por el Lcdo. D. Joaquin Gadea Mateos para optar al Grado de Doctor en Veterinaria, decidió por unanimidad, autorizar la tramitación de la citada memoria a la Comisión de Doctorado del grupo de Areas de Ciencias de la Salud.

Por lo que firmo el presente, a los efectos oportunos, en Murcia a dieciocho de Marzo mil novecientos noventa y siete.

Vº Bº
EL DIRECTOR DEL DPTO.

Fdo.: Emilio Martínez García



Fdo.: M^a Rosa Caro Vergara

*Este trabajo ha sido financiado
por los proyectos del CDTI
(94/0059), del IFRM (94/085) y
de la CICYT (AGF 95/1009)*

AGRADECIMIENTOS

A los profesores Emilio Martínez García y Juan María Vázquez Rojas por haberme permitido trabajar en su equipo, una etapa fundamental en mi formación y por su labor en la dirección de este trabajo.

Al profesor Jordi Roca Aleu por su ayuda y colaboración.

A la Dra. Carmen Matás Parra con la que compartí mucho trabajo e ilusión a lo largo de estos años, a Inmaculada Campos, Silvia Martínez, Xiomara Lucas, Ramón Montañó, los alumnos internos de Reproducción y Obstetricia y todos los que participaron y colaboraron en este trabajo.

A la profesora Miguela Iniesta por tantas horas que dedicó para que la estadística fuera algo más cercano.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de mi Beca de Formación de Personal Investigador y a la Generalitat Valenciana que me concedió los permisos y las licencias necesarios para disfrutarla.

A la empresa Agropor y en especial a su director técnico veterinario D. Francisco Grao López por su atención, su trabajo y su confianza.

A D. Alfonso Montesinos Rodríguez y la empresa Dalland Hybrid S.A. por permitir el desarrollo de este trabajo en sus instalaciones y ceder el material biológico.

A Industrias Fuertes y a los servicios veterinarios del matadero por las facilidades dadas para obtener el material biológico.

Por último agradecer su ayuda a los profesores Antonio Ramirez Medina, Salvador Ruiz López y Pilar Coy Fuster.

A vosotros dos

A mis padres,
a mis hermanos

RESUMEN

El objetivo del presente estudio ha sido evaluar la relación entre los parámetros de la calidad seminal y la capacidad de penetración *in vitro* de ovocitos homólogos (PIVh) con los resultados *in vivo* de fertilidad y prolificidad.

Se han analizado 60 eyaculados realizando sobre cada uno las mediciones clásicas del espermograma (motilidad, calidad de movimiento, volumen, concentración espermática, estado del acrosoma, morfoanomalías y tinción vital), pruebas bioquímicas (contenido de ATP, calcio, sodio, potasio, magnesio y zinc), ensayos de la funcionalidad del espermatozoide (test de endósmosis, test del diacetato de carboxifluoresceína, test ORT) y la valoración mediante un test de penetración *in vitro* homóloga. Los resultados de la valoración *in vitro* del semen fueron contrastados con los resultados obtenidos en un ensayo *in vivo* con inseminaciones homospérmicas.

En una primera etapa se analizaron las diferencias en la calidad seminal de eyaculados que fueron agrupados de acuerdo a la tasa de fertilidad resultante de la inseminación de 300 reproductoras (Fertilidad Tipo I: < 20% (n = 10); Tipo II: 40 - 60% (n = 19); Tipo III: >80% (n = 31)). No se encontraron diferencias significativas para los valores de volumen, concentración, tinción vital y parámetros bioquímicos entre los tres grupos de fertilidad. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$) para la motilidad, las morfoanomalías totales, el acrosoma y las valoraciones de la funcionalidad de la membrana entre los grupos de fertilidad tipo I frente a los del tipo III. Mientras que el test de penetración *in vitro* mostró diferencias significativas para los tres grupos de fertilidad ($p < 0.01$), tanto para la tasa de penetración como para el número de espermatozoides por ovocito.

Posteriormente se analizó la relación entre la prolificidad y las valoraciones seminales realizadas sobre los eyaculados. Estos se agruparon por el tamaño de la camada (Prolificidad Tipo A: <8 lechones nacidos (n=9); Tipo B: 8-10 lechones nacidos (n=28); Tipo C: >10 lechones nacidos (n=17)). Se encontró que únicamente el test de penetración *in vitro* es capaz de diferenciar eyaculados de prolificidad tipo C frente a

los de tipo A y B , tanto para la tasa de penetración como para el número medio de espermatozoides por ovocito.

En nuestras condiciones experimentales el estudio de los parámetros de motilidad, morfología, acrosomas y de los test de funcionalidad de la membrana puede ser una herramienta útil, en un primer término, para desechar eyaculados de baja calidad, aunque estas técnicas no alcanzan la sensibilidad suficiente para dar un resultado satisfactorio en la predicción de la fertilidad. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que el test de penetración *in vitro* es la única técnica de las estudiadas capaz de discriminar adecuadamente los eyaculados que darán lugar a los distintos grupos de fertilidad.

SUMMARY

The purpose of the present study was to evaluate the relationship between the parameters of seminal quality and homologous oocytes in vitro penetration capacity versus the reproductive parameters, fertility and litter size which were both determined in a field trial.

Sixty boar ejaculates have been analysed, performing on each of them: conventional semen analysis (motility, volume, sperm concentration, normal acrosome, morphology and structural integrity), biochemical parameters (ATP, calcium, sodium, potassium, magnesium and zinc), functional sperm assays (Hypoosmotic swelling test (HOST), Carboxiflorescin Diacetate Test (DCF), Osmotic Resistance Test (ORT)) and the homologous in vitro penetration test. The results observed upon a in vitro semen valoration were checked with those obtained upon a in vivo trial with homospermic insemination.

In a first phase, these ejaculates were gathered according to the fertility obtained upon the artificial insemination of 300 sows (Fertility group I: < 20%, (n= 10); group II: 40 - 60%, (n= 19); group III: >80%, (n= 31)) and the differences of the seminal quality were analysed. Volume, sperm concentration, structural integrity and biochemical values did not differ significantly between the fertility groups. However, significant differences were detected ($p < 0.01$) in motility, morphology, normal acrosomes and functional integrity of sperm membrane assays between the fertility groups I and III. The oocyte penetration percentage and the number of sperm penetrated per oocyte in the homologous in vitro penetration test differed between all these three fertility groups ($p < 0.01$).

The relationship between the seminal analysis and the litter size of these ejaculates was later evaluated. These ejaculates were gathered in 3 groups according to the litter size (Group A: <8 (n=9); group B: 8-10 (n=28); group C: >10 (n=17)). Only the homologous in vitro penetration test was found able to discriminate the group C against A and B for both oocyte penetration percentage and the average number of sperm penetrated per oocyte.

In our experimental conditions the study of motility, morphology, normal acrosomes and functional test may be a good tool, in a first analysis, to get rid of poor seminal quality ejaculates. Still, this analysis is not accurate enough to bring out satisfactory results to predict the in vivo fertilization capacity. In the light of these results only the homologous in vitro penetration test has been found able to discriminate the different groups of fertility and litter size. None the less an extensive study is required.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1.- Conceptos de capacidad fecundante y calidad seminal	6
2.2.- Estimación de la fertilidad in vivo mediante pruebas de campo	8
2.3.- Estimación de la fertilidad in vivo mediante pruebas in vitro	9
2.3.1.- El espermograma clásico y aquellos nuevos parámetros que lo complementan	10
2.3.1.1.- Estudio del volumen y la concentración espermática	11
2.3.1.2.- Estudios de la motilidad	13
2.3.1.3.- Estudio de la morfología espermática	15
2.3.1.4.- Estudio del acrosoma	17
2.3.1.5.- Estudios bioquímicos	19
2.3.1.6.- Estudios del núcleo	25
2.3.2.- Pruebas que evalúan la funcionalidad de los espermatozoides	27
2.3.2.1.- Integridad estructural de las membranas espermáticas	27
2.3.2.2.- Integridad funcional de las membranas espermáticas	28
2.3.2.3.- Test de resistencia osmótica (ORT)	30
2.3.3.- Análisis de la interacción ovocito-espermatozoide	31
2.3.3.1.- Tests de unión a zona pelúcida	31
2.3.3.2.- Test FIV heteroespecíficos. Test de penetración de ovocitos de hámster libres de zona pelúcida (SPA)	32
2.3.3.3.- Test de fecundación in vitro homoespecíficos	33
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	36
3.1.- Obtención del semen, dilución y preparación de dosis seminales	36
3.2.- Pruebas in vitro	38
3.2.1.- Espermograma clásico	38
3.2.1.1.- Concentración espermática	38
3.2.1.2.- Motilidad y calidad de movimiento	39
3.2.1.3.- Formas anormales	39

3.2.1.4.- Estado del acrosoma	39
3.2.1.5.- Tinción vital de eosina-nigrosina	40
3.2.2.- Pruebas bioquímicas	40
3.2.2.1.- Contenido de ATP	40
3.2.2.2.- Contenido en cationes del plasma seminal	42
3.2.3.- Pruebas de funcionalidad	43
3.2.3.1.- Test con diacetato de carboxifluoresceína (DCF)	43
3.2.3.2.- Test de endósmosis (HOST)	43
3.2.3.3.- Test de resistencia osmótica (ORT)	44
3.2.4.- Test de penetración in vitro homóloga	44
3.2.4.1.- Preparación de medios de cultivo	44
3.2.4.2.- Preparación de los espermatozoides	45
3.2.4.3.- Obtención de los ovocitos	46
3.2.4.4.- Coincubación, fijación, tinción y valoración de resultados	46
3.3.- Ensayo in vivo	49
3.3.1.- Inseminación artificial	49
3.3.2.- Diagnóstico de gestación	49
3.3.3.- Evaluación de los parámetros reproductivos	50
3.4.- Análisis estadístico	51
4.- RESULTADOS	53
	53
4.1.- Estudio de la fertilidad	
4.2.- Estudio de la prolificidad	62
4.3.- Correlaciones entre los distintos parámetros seminales	69
5.- DISCUSIÓN	72
5.1.- Relación de la fertilidad con diferentes parámetros seminales	73
5.2.- Relación de la fertilidad con el test de penetración in vitro homólogo	77
5.3.- Relación de la prolificidad con diferentes parámetros seminales	79
5.4.- Correlaciones entre parámetros seminales	80
5.5.- Correlación entre los parámetros de calidad seminal y el test de penetración in vitro	81

6.- CONCLUSIONES 83

7.- BIBLIOGRAFÍA 84

ABREVIATURAS.

ADN		Acido Desoxirribonucleico
AMPc		Adenosin Monofosfato cíclico
ASAT		Aspartato Amino Transferasa
ATP		Adenosin Trifosfato
DCF		Diacetato de Carboxifluoresceína
EDTA		Acido etilendiamino tetraacético
espz		espermatozoide
GAPD		Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
GCP		Gotas citoplásmica proximal
HOST	Hypoosmotic swelling test	Prueba de endósmosis
HZA	Hemizone Assay	Prueba de hemizona
NAD		Dinucleótido de nicotinamida y de adenina
NAR	Normal Apical Ridge	Acrosomas normales
ORT	Osmotic Resistance Test	Prueba de resistencia osmótica
p		probabilidad
PBSDm		Solución fosfatada tamponada de Dulbecco modificada
PGA		Acido fosfoglicérico
PGK		Fosfoglicerato fosfoquinasa
PIVh		Penetración in vitro homóloga
ppm		partes por millón
r		coeficiente de correlación lineal
SEM		Error estándar de la media
SPA	Sperm Penetration Assay	Test de penetración con ovocitos de hámster libres de zona pelúcida

1.- INTRODUCCIÓN

El sector porcino tiene una gran importancia a nivel mundial llegando a suponer la fuente del 25 % de la energía y un 5 % de la proteína que el hombre obtiene de los animales (Nagai, 1996). Sin embargo, la producción de la especie porcina no es homogénea; así, hay grandes zonas donde los condicionantes culturales y religiosos limitan el consumo de los productos del cerdo y en consecuencia la producción porcina es muy poco importante, mientras que en otras zonas es el principal animal de abasto.

Después de China, que alcanza casi un 30% de la producción mundial, la Unión Europea se sitúa como el segundo productor con el 20% de dicha producción mundial, por lo que el sector porcino supone un porcentaje muy importante de la actividad agraria europea (en torno al 11% de la producción final agraria). Este sector se caracteriza por un alto nivel tecnológico, alta especialización productiva y un considerable grado de integración industrial que hacen de él, junto con la avicultura, uno de los sectores ganaderos más modernos y dinámicos (Avellá y cols., 1992).

La rentabilidad económica de la explotación porcina, en las condiciones del mercado actual, está basada en la utilización de reproductores de alto valor genético que mediante las mejores técnicas de producción consiguen productos cárnicos de alta calidad a unos costes competitivos. Este mercado tan competitivo ha impulsado un complejo proceso de modernización del sector que implica la optimización de todos los recursos y factores que intervienen en la producción porcina.

Hasta el momento se han realizado importantes pasos en las mejoras de la producción porcina con la aplicación de los programas de selección genética, los avances en el campo de la nutrición animal, en el diseño y construcción de instalaciones y alojamientos, que mantienen a los animales en unas condiciones óptimas de bienestar, y en los sistemas de diagnóstico y prevención de las enfermedades infecciosas que tan insidiosamente afectan a la producción porcina.

En el campo de la reproducción porcina se ha producido un gran desarrollo en las técnicas de gestión y control reproductivo que van íntimamente unidas a la aplicación de la inseminación artificial. Esta técnica ha permitido la máxima utilización del potencial genético de reproductores de alto valor, ha sido una herramienta fundamental en la prevención y lucha contra las enfermedades porcinas (Phillpott, 1993) y ha supuesto, en definitiva, un mejor control de todo el proceso reproductivo (Hurtgen, 1986).

En la aplicación de las técnicas de inseminación artificial porcina se han realizado numerosos e importantes avances, lo que ha permitido alcanzar una amplia difusión en las explotaciones con unos resultados equiparables o superiores a los obtenidos con la monta natural (Martínez y cols., 1984; Colenbrander y cols., 1993). Para lograr resultados óptimos mediante la utilización de la inseminación artificial se han desarrollado numerosos trabajos que estudian los diferentes factores que afectan a la técnica y sus resultados productivos como el método de recogida seminal, el ritmo de recogida, la determinación del número de espermatozoides por dosis y el volumen de las dosis seminales (Martínez y cols., 1986). Del mismo modo se desarrollaron experiencias para conseguir diluyentes que permitieran la conservación de la calidad seminal durante varios días (Martín, 1984; Johnson y cols., 1988; Waberski y cols., 1994a) lo que permite maximizar la utilidad de la técnica y proporciona una mayor flexibilidad en su uso. Se ha evaluado, así mismo, el efecto de la adición de sustancias al semen (revisado por Flowers y Esbenshade, 1993; Quintín, 1997). Finalmente, el diagnóstico por imagen puede permitir, en un futuro próximo, la determinación práctica del momento óptimo de aplicación de las dosis seminales en relación al momento de ovulación (Waberski y cols., 1994b; Soede y cols., 1995).

Sin embargo, quedan aún importantes temas en los que es posible trabajar para mejorar los resultados productivos. Entre ellos se incluyen la crioconservación del semen, cuya eficacia hasta ahora ha sido reducida (revisado por Bwanga, 1991), y la mejora de los métodos de evaluación del semen (Hammerstedt, 1996).

Tradicionalmente, la calidad del eyaculado ha sido evaluada con el espermiograma clásico, que está basado en la aplicación de una serie de pruebas de una ejecución relativamente simple y que pueden ser realizadas con un coste moderado. En el análisis rutinario se incluye un examen macroscópico y microscópico del eyaculado en los que se mide el volumen, la concentración, la motilidad, el estado del acrosoma y las morfoanomalías espermáticas.

En el trabajo diario en los centros de inseminación artificial se detectan animales que tienen una fertilidad reducida y que al realizar un análisis de rutina presentan un espermiograma anormal. Sin embargo en otras ocasiones se presentan espermiogramas normales correspondientes a verracos infértiles o subfértiles. Por ello, ninguno de los parámetros del espermiograma clásico por sí solo parece ser suficiente para predecir adecuadamente la fertilidad, aunque la información combinada de todos ellos ofrece una buena estimación de la calidad seminal.

El desarrollo de métodos que puedan ayudar a predecir la fertilidad *in vivo* con una precisión adecuada es una de las prioridades del sector porcino, tal y como fue recogido en fechas recientes en la 7ª Conferencia Europea de Veterinarios Especialistas en Inseminación Artificial Porcina. El desarrollo de estas técnicas precisas permitiría trabajar con reproductores que aseguren altas tasas de fertilidad *in vivo*.

Para dar una solución a este problema se han desarrollado técnicas que pretenden alcanzar un mejor conocimiento de la célula espermática. Con este objetivo se puede evaluar la estructura y funcionalidad del espermatozoide. El estudio de la membrana parece ser un buen procedimiento para evaluar la funcionalidad del gameto masculino, ya que ésta interviene activamente en la mayoría de las fases del proceso reproductivo. La membrana puede ser estudiada desde el punto de vista estructural mediante la utilización de tinciones, o bien valorar su funcionalidad, para lo que se han diseñado el test hipoosmótico (Jeyendran y cols., 1984; Vázquez y cols., 1997a) y distintas técnicas con fluorocromos (Harrison y Vickers, 1990).

Los estudios bioquímicos se desarrollaron con la intención de tener una medición objetiva y fácilmente reproducible de la calidad seminal y que fueran reflejo de su actividad funcional. Se han realizado estudios metabólicos y enzimáticos, cuantificándose los diferentes componentes químicos presentes en el eyaculado y que pueden condicionar la actividad del espermatozoide (Ciereszko y cols., 1994).

Por otra parte, el estudio del núcleo del espermatozoide permite valorar la madurez y la estabilidad del mismo, condiciones necesarias para que pueda llegar a producirse la descondensación cromosómica y la singamia. Estos estudios se desarrollaron cuando se asociaron problemas de fertilidad con alteraciones de la estructura del núcleo (Evenson y cols., 1980; Rosenbusch y Sterzik, 1991). Estas alteraciones del núcleo han sido clasificadas como factores uncompensables de la fertilidad (Saacke y cols., 1994), ya que no es posible mejorar la fertilidad aumentando el número de espermatozoides por dosis de inseminación.

Los procesos de capacitación y reacción acrosómica son pasos fundamentales en la fecundación. Por ello, se ha realizado un importante esfuerzo en estudiar los mecanismos íntimos que regulan estos procesos y que aún son en parte poco conocidos (Barboni, 1994; Harrison, 1996).

El método más preciso para predecir la fertilidad podría consistir en determinar la capacidad de los espermatozoides para penetrar ovocitos en un sistema *in vitro* (Bavister, 1990). Primeramente se desarrollaron sistemas basados en la penetración de ovocitos de hámster libres de zona pelúcida, principalmente diseñados para evaluar los espermatozoides humanos (Yanagimachi y cols., 1976). Este método se ha convertido en una buena herramienta para valorar la capacidad fecundante en la mayoría de las especies. Sin embargo, esta prueba no valora fases fundamentales del proceso de penetración del ovocito como son el reconocimiento, la unión y la penetración de la zona pelúcida. Por tanto, parece lógico pensar que con la utilización de un test de penetración de ovocitos homólogos se obtendrían unos resultados más ajustados a la realidad, ya que permitiría el estudio de todas las fases del proceso de penetración.

Hasta el momento los problemas metodológicos no han permitido la aplicación de los sistemas de fecundación *in vitro* como una herramienta práctica en la valoración de la capacidad fecundante de los espermatozoides. En los últimos años se ha trabajado con el objetivo de simplificar los diferentes procesos de la fecundación *in vitro*, para que pueda ser utilizada como un test de fertilidad. La posibilidad de utilizar ovocitos inmaduros en los sistemas de fecundación con unas tasas de penetración equivalentes a las de ovocitos maduros (Martínez y cols., 1993) supone facilitar en gran medida este estudio, ya que se puede disponer de un gran número de ovocitos a partir de hembras prepúberes sacrificadas en los mataderos comerciales. Por otra parte se ha conseguido simplificar el sistema de preparación de los espermatozoides, hasta llegar a un método que no necesita de lavados ni de preincubación espermática (Martínez y cols., 1996) y que permite obtener altas tasas de penetración. Del mismo modo, se han estudiado los diferentes factores que pueden condicionar el sistema, como la presencia de células del cumulus, el tiempo de conservación de los ovarios, el tamaño y la viabilidad del ovocito (Matás y cols., 1996; Roca y cols., 1997). Sin embargo, hasta el momento y debido a su reciente desarrollo no se han estudiado las correlaciones entre los resultados del test de penetración y los resultados reproductivos.

En la especie porcina son escasos y contradictorios los trabajos que estudian la relación entre los análisis *in vitro* del eyaculado y la fertilidad (Strezeck y Skaweta, 1984; Pursel y cols., 1984; Galli y Bosisio, 1988; Hamitt y cols., 1989; Berger y Parker, 1989; Berger y cols., 1996). En estos estudios la calidad seminal se valora fundamentalmente mediante el espermiograma clásico y las diferencias en las condiciones experimentales en las que se realizaron no permiten establecer comparaciones con rigor.

Por lo anteriormente descrito, el objetivo del presente estudio ha sido evaluar la relación entre los parámetros de la calidad seminal y la capacidad de penetración *in vitro* de ovocitos homólogos (PIVh) con los resultados *in vivo* de fertilidad y prolificidad, así como la valoración de las relaciones entre las diferentes pruebas de análisis seminal.

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.- Conceptos de capacidad fecundante y calidad seminal

La capacidad fecundante de los espermatozoides se ha definido como la habilidad que tienen estas células para fecundar un ovocito fisiológicamente normal y estructuralmente intacto (Yanagimachi, 1994). Sin embargo, tras esta sencilla definición hay un complejo proceso que incluye una serie de fases en las que el espermatozoide debe presentar las cualidades adecuadas para poder fecundar el ovocito tales como la unión con la zona pelúcida, el desencadenamiento de la reacción acrosómica, la penetración de la zona pelúcida, la unión con la membrana plasmática del ovocito y la fusión con dicha membrana (Berger, 1996).

Por calidad seminal se entiende el conjunto de parámetros que caracterizan la viabilidad de la célula espermática. En un principio se hacía referencia a los caracteres que definen la morfología y el movimiento de los espermatozoides (Larsson, 1986), pero posteriormente se le han añadido otra serie de parámetros que tienen por objetivo cuantificar de algún modo la funcionalidad del espermatozoide (Berger y cols., 1996).

La mayoría de los análisis *in vitro* utilizados hasta el momento ofrecen información sobre la calidad seminal, que es fundamental para los estudios en general de la fisiología del espermatozoide y en particular para la conservación del semen. Sin embargo, lo realmente importante para el sector productivo porcino es el estudio de los caracteres relacionados con el proceso de fecundación, es decir la determinación *in vitro* de la capacidad fecundante de los eyaculados (Woelders, 1991).

La evaluación de la calidad seminal es una parte importante y un punto crítico en el proceso de la inseminación artificial, ya que en muchos casos, verracos asociados con una fertilidad reducida presentan alteraciones detectables mediante un examen rutinario del semen. No obstante, aunque es necesaria una buena calidad

seminal para alcanzar unos niveles de fertilidad aceptables, no todos los eyaculados con buena calidad seminal mantienen niveles de fertilidad dentro de la normalidad (Larsson, 1986; Berger y Parker, 1989; Martínez y cols., 1993), de ahí la importancia de la utilización del test de penetración *in vitro* homólogo.

La posibilidad de predecir la capacidad fecundante de un eyaculado mediante los análisis *in vitro* es un problema que hasta la fecha no ha sido resuelto adecuadamente (Hammerstedt, 1996). Algunos autores proponen como causa de la inconsistencia de los resultados conseguidos, la evaluación de un número relativamente reducido de células, la gran influencia de la subjetividad del observador y la alta variabilidad que presentan muchos análisis seminales (Graham y cols., 1980; Evenson y cols., 1994; Saacke y cols., 1994). Además, el número de espermatozoides aplicados en cada inseminación es un factor muy importante a la hora de evaluar la fertilidad y su relación con los parámetros de calidad seminal (Saacke, 1984; Saacke y cols., 1988). En las especies domésticas, las tasas de fertilidad y prolificidad se incrementan cuando se aumenta el número de espermatozoides en la dosis de inseminación, hasta llegar a un nivel en el que un incremento en el número de células no aumenta la proporción de ovocitos que se van a fecundar (Salisbury y Vandemark, 1961). Diversos autores han propuesto funciones matemáticas para describir la relación entre el número de espermatozoides y la tasa de fertilidad (Van Duin, 1964; Pace y cols., 1981; Schwartz y cols., 1981). Sin embargo, hay que tener en cuenta que hay algunas características del espermatozoide como son las aberraciones cromosómicas, los daños en el ADN o las alteraciones de la estructura de la cromatina (Evenson y cols., 1980; Ballachey y cols., 1988; Evenson y cols., 1994) que determinan la inviabilidad en el desarrollo embrionario aún cuando la fecundación del ovocito se haya producido. Las alteraciones de este tipo no pueden ser compensadas con un incremento del número de espermatozoides en la dosis de inseminación (Des Daas, 1992). Por este motivo, Saacke y cols. (1994) clasifican los parámetros seminales en dos categorías: compensables e incompensables. La mayoría de los parámetros clásicos evaluados en la contrastación seminal hace referencia a la capacidad del espermatozoide para alcanzar y fecundar el ovocito, de manera que las alteraciones

de estas características pueden ser compensadas aumentando el número de espermatozoides en la dosis de inseminación. Los factores compensables son cada vez menos importantes cuando se alcanzan valores próximos a la fertilidad máxima, ya que cuando se llega a estos niveles el incremento de la fertilidad ya no está limitado por el número de espermatozoides, sino que depende de la presencia de suficiente número de ovocitos en el momento adecuado para ser fecundados y de la calidad de los gametos que asegure un buen desarrollo embrionario (Woelders, 1991). Las dosis de inseminación artificial normalmente utilizadas en la especie porcina (3×10^9 espermatozoides) pueden estar próximas a los niveles de máxima fertilidad y quizás ésta sea la causa de que las correlaciones descritas entre las características seminales y la fertilidad sean bajas (Larsson, 1985).

2.2.- Estimación de la fertilidad *in vivo* mediante pruebas de campo

El mejor sistema de estimar la fertilidad de los verracos es la evaluación de los datos de la propia fecundación *in vivo* midiendo el número de partos y el tamaño de las camadas resultantes de la inseminación de un número suficiente de hembras (Foote, 1988). Hemos de tener en cuenta que en la fertilidad de la hembra influye un gran número de factores, entre los que se incluyen: la estación reproductiva, el nivel de nutrición de la cerda, el número de partos y la duración de la lactación (revisado por Clark y cols., 1989). La acción de todos estos factores supone que en los estudios de fertilidad haya una alta variabilidad atribuible a la hembra y por tanto es necesario inseminar un número elevado de animales para poder alcanzar niveles de significación adecuados (Amann, 1989). Esto hace que los ensayos *in vivo* lleven asociados largos tiempos de estudio hasta obtener resultados (Foote, 1988), que suponen un coste muy elevado por el mantenimiento de las reproductoras y que haya un retraso considerable en la obtención de la información. Durante este período de tiempo se pueden producir cambios substanciales en la fertilidad del macho motivados por diversos factores (revisado por Larsson, 1985).

Para reducir el tiempo de estudio necesario para medir la fertilidad se ha usado la evaluación de embriones recogidos después de unos días post-

inseminación (Obonyo y cols., 1992; Warberski y cols., 1994a; Garner y cols., 1996), el estudio ecográfico de las hembras que confirme la gestación (Martínez y cols., 1992b), o la tasa de no retorno al estro (Strzezek y Skaweta, 1984), en vez de las tasas de partos y el tamaño de la camada (Galli y Bosisio, 1988).

Los test de fertilidad heterospérmicos se desarrollan como una alternativa a los clásicos test homospérmicos a partir de los estudios realizados por Beatty en la década de los 50, primeramente en el conejo (Beatty, 1957 y 1960) y posteriormente en el ganado bovino (Beatty y cols., 1969), porcino (Pursel y cols., 1984; Berger y Parker, 1989; Berger y cols., 1996), ovino (Choudhry y cols., 1995) y caprino (Berger y cols., 1994). Este tipo de prueba se basa en la inseminación de una hembra con una dosis seminal heterospérmica, resultado de la suma de un mismo número de espermatozoides de dos o más reproductores. De esta manera, situamos a los espermatozoides en un sistema de competición donde sólo un espermatozoide, presumiblemente el procedente del eyaculado más fértil, fecundará el ovocito (Berger, 1995). Aún cuando el test heterospérmico requiere la inseminación de un número menor de reproductoras y en consecuencia menores costes de mantenimiento para obtener niveles de precisión similares, éste necesita de un tiempo de estudio equiparable al de los tests homospérmicos y en consecuencia sólo puede ser aplicado a un número reducido de verracos (Saacke, 1984).

2.3.- Estimación de la fertilidad *in vivo* mediante pruebas *in vitro*

Debido a los altos costes y los problemas que conllevan los test *in vivo*, se ha realizado y se continúa realizando un importante esfuerzo en el estudio de la célula espermática con el objetivo principal de encontrar una prueba *in vitro* de fácil realización y de coste reducido que permita predecir la fertilidad *in vivo* de un eyaculado con un cierto rigor.

El hecho de que se hayan desarrollado innumerables técnicas de análisis del semen indica que hasta el momento no se ha llegado a alcanzar una técnica con una precisión satisfactoria. En la mayoría de los casos estas técnicas únicamente

pueden explorar una faceta del proceso reproductivo, y esto sólo permite dar una información parcial del potencial del espermatozoide. Aun así, la información que nos reportan permite detectar eyaculados con baja calidad seminal que difícilmente tendrán una buena fertilidad, aunque no podemos asegurar que una buena calidad seminal esté siempre asociada a una buena fertilidad (Berger y Parker, 1989; Martínez y cols., 1993). Una alternativa interesante es la de utilizar pruebas *in vitro* combinadas que evalúan varias características seminales, al estudiar con mayor amplitud la viabilidad espermática, lo que puede ofrecer una mayor precisión (Graham y cols., 1980; Wilhelm y cols., 1996).

Las características seminales varían ampliamente tanto entre diferentes verracos como entre diferentes eyaculados de un mismo verraco (Clark y cols, 1989). Un número importante de factores puede influir en la producción espermática y provocar variaciones en la calidad seminal y en su capacidad fecundante. Entre estos destacamos la estación (Grabner y cols., 1986; Galli y cols., 1991; Gerfen y cols., 1994), el nivel de nutrición (Colenbrader y Kemp, 1990), la raza (Graham y cols., 1967; Galli y cols., 1991; Gerfen y cols., 1994), la edad (Larsson, 1986) y el estado sanitario (Philpott, 1993).

De acuerdo con Grillo (1991), las pruebas *in vitro* pueden ser clasificadas en tres grandes grupos: el espermiograma clásico y aquellos nuevos parámetros que lo complementan, los tests que evalúan la funcionalidad de los espermatozoides y las pruebas que analizan las interacciones entre el ovocito y el espermatozoide.

2.3.1.- El espermiograma clásico y aquellos nuevos parámetros que lo complementan

Durante mucho tiempo se ha realizado un análisis rutinario del semen como la única herramienta para valorar los eyaculados (Chan y cols., 1985). En este examen rutinario se incluye la valoración del número de células presentes en el eyaculado, el estudio de la motilidad y su morfología. Se caracteriza por la utilización de una serie de técnicas de simple ejecución y con un coste relativamente bajo, que ha permitido

su amplia difusión en los centros de inseminación artificial. Por contra, presenta unas tasas de correlación con la fertilidad generalmente bajas (McClure y Tom, 1991).

2.3.1.1. -Estudio del volumen y la concentración espermática

La posibilidad de estudiar adecuadamente la concentración espermática es un importante factor tanto en el ámbito de la investigación andrológica como en la aplicación en el campo de la inseminación artificial. Las técnicas más utilizadas son el recuento en cámaras hemocitométricas y la utilización de espectrofotómetros, ya que los contadores de partículas, los métodos fluorométricos y los sistemas de análisis de semen asistidos por ordenador son más complejos.

El primero de ellos es el más utilizado por su bajo coste y su alta precisión, ya que se realiza una medición directa del número de espermatozoides presentes en una cámara de volumen conocido. Aún siendo el método más preciso presenta elevados coeficientes de variación ($\pm 10\%$) entre replicados (Pace, 1980). Estas variaciones son debidas a distribuciones no homogéneas de las células dentro de la cámara y a imprecisiones en el proceso de dilución (Woelders, 1991).

El método espectrofotométrico es un derivado del anterior, mediante la correlación entre concentraciones y unidades de transmitancia. Es un método rápido y de fácil uso, que se ha extendido en gran medida en los grandes centros de inseminación artificial porcina, donde se procesa un gran número de muestras seminales. Sin embargo, para que sea preciso necesita de una curva de calibración para cada verraco, ya que la transmitancia varía de acuerdo a la concentración espermática pero también depende del tamaño del espermatozoide, de su forma y del índice de refracción, factores que presentan variaciones individuales. Por otra parte, Saiz y cols. (1994) describen las limitaciones que supone la opacidad variable del plasma seminal porcino y la proporción variable de proteínas hidroprecipitables que alteran las mediciones.

El contador de partículas y las técnicas de análisis automatizados de imagen permiten medir muy rápidamente un gran número de partículas por unidad de

volumen. Por contra, necesitan un instrumental caro que se debe calibrar adecuadamente para asegurar que el recuento de partículas sea correcto (Graham y cols., 1980). Otra técnica que se encuentra en desarrollo es la medición por técnicas fluorométricas del número de células cuantificando la cantidad de ADN. Es un método sencillo si se dispone del instrumental adecuado, ya que el ADN teñido específicamente con un fluorocromo (H33258) puede ser medido con gran precisión porque la cantidad de ADN presente en un espermatozoide es un valor constante (Woelders, 1991; Evenson y cols. 1993).

En la tabla 1 se indican los valores normales de volumen y concentración espermática descritos en la bibliografía.

Tabla 1. Valores normales de volumen y concentración descritos en la especie porcina.

Eyaculado	Volumen (ml)	Concentración (10⁶ espz/ml)	Fuente
Completo	218'8	540'37	Graham y cols., 1967
Completo	250 (150-500)	100 (25-300)	Mann y Lutwak-Mann, 1981
Completo	348'5	476'25	Hammitt y cols., 1989
Completo	223'42	224'74	Galli y cols., 1991
Completo	180	400-600	Xu y cols., 1996
Fracción rica	87'66	1212'32	Graham y cols., 1967
Fracción rica	80'7-87'3	764-770	Martínez y cols., 1986
Fracción rica	40-100	400-1300	Martínez y cols., 1992a
Fracción rica	108'36 ± 3'61	740 ± 21'92	Saiz y cols., 1994
Fracción rica	95±8'05	657'1±43'03	Gerfen y cols., 1994

La presencia de eyaculados de verracos con un bajo volumen y una escasa concentración está asociada a una baja fertilidad, hecho que puede derivarse de un defecto en la espermatogénesis o de una sobreutilización del macho (Larsson, 1986; Martínez y cols., 1992a). Hemos de tener en cuenta que la frecuencia de eyaculación tiene un efecto significativo tanto en la concentración como en el

volumen del eyaculado, así como en otros parámetros de calidad seminal (Colenbrander y Kemp, 1990).

2.3.1.2.- Estudios de la motilidad

La motilidad ha sido uno de los parámetros de la calidad seminal más estudiados en el espermatozoide al ser ésta una de las más importantes expresiones de la función espermática, que según algunos autores puede ser uno de los factores que mejor se correlacionan con la fertilidad (Shanis y cols., 1989).

La motilidad espermática es comúnmente usada como un indicador de la viabilidad celular que puede ser reflejo, entre otras cosas, de la integridad de la membrana y de la funcionalidad del metabolismo intracelular. Es necesaria una buena motilidad tanto para el transporte de un número suficiente de espermatozoides hasta el lugar de la fecundación (Hunter, 1980), como para el proceso de penetración de la zona pelúcida del ovocito (Yanagimachi, 1981).

El control y la regulación del movimiento del espermatozoide es un complejo sistema del que aún no se tiene un conocimiento preciso. En la actualidad, se conoce la importancia de ciertas sustancias en la regulación de la motilidad (heparina, adenosina, acetilcolina, etc.). Del mismo modo se conoce la implicación del calcio y el AMPc que junto a las modificaciones en el pH intracelular, determinarán la quiescencia, la activación o la hiperactivación del movimiento espermático (Lindemann y Kanous, 1989).

De manera rutinaria se hace una observación microscópica de una muestra y se valora el porcentaje de células que están en movimiento y qué tipo de movimiento presentan éstas. En todo caso es una estimación subjetiva del movimiento de un número reducido de células, por lo que puede haber grandes variaciones entre observadores y laboratorios (Hinting y cols., 1988) (Tabla 2). Para salvar este problema, se han desarrollado diversas técnicas que realizan una valoración de forma menos subjetiva. Entre éstos se encuentran estudios basados en técnicas

fotográficas y cinematográficas, efecto doppler, contadores electrónicos de partículas, hasta llegar a los modernos analizadores de imágenes computerizados que determinan multitud de parámetros que clasifican el movimiento. A pesar de las reconocidas ventajas de técnicas tan sofisticadas, la estimación subjetiva sigue teniendo vigencia por su bajo coste y rapidez (Woelders, 1991).

La relación de la motilidad con la fertilidad no está del todo aclarada. Un problema radica en que las condiciones experimentales en las que se han realizado los estudios son muy diferentes. Por ejemplo, se ha utilizado semen fresco, refrigerado y congelado; dosis de inseminación que varían entre los 2 y 4 x 10⁹ espermatozoides y diferentes métodos de valorar la motilidad y la fertilidad. Estas diferencias experimentales se traducen en unos resultados para los índices de correlación entre la motilidad y los parámetros reproductivos no concluyentes (Pursel y cols., 1984; Strzezek y Skaweta, 1984; Aalbers y cols., 1985; Martínez y cols., 1986; Berger y Horton, 1988; Galli y Bosisio, 1988; Hammitt y cols., 1989; Berger y Parker, 1989).

Tabla 2. Valores normales de motilidad descritos en la especie porcina.

Motilidad (%)	Fuente
87-91	Pursel y cols., 1984
74±4'9	Strzezek y Skaweta, 1984
81'4-82'5	Martínez y cols., 1986
78'5	Galli y cols., 1991
70-90	Martínez y cols., 1992a
83'68±0'91	Ivanova y Mollova, 1993
66-81*	Martínez y cols., 1993
80	Grant y cols., 1994
76'06 ±0'95	Saiz y cols., 1994
73-92'6	Waberski y cols., 1994a
85	Xu y cols., 1996

* Motilidad progresiva

2.3.1.3.-Estudio de la morfología espermática

Las formas anormales han sido clasificadas por diversos autores en alteraciones de la cabeza espermática, alteraciones de la cola y presencia de gotas citoplásmicas (Howard y Pace, 1988; Bonet, 1990). Sin embargo, la clasificación más interesante de las morfoanomalías es la división entre mayores y menores haciendo referencia a la alteración de la funcionalidad que éstas producen.

En el epidídimo del verraco las gotas citoplásmicas se desplazan desde una posición próxima al cuello del espermatozoide hasta una posición distal en la pieza intermedia. La presencia de células espermáticas con gotas citoplásmicas es de un 90% en la cabeza del epidídimo (Kaplan y cols., 1984), para ir disminuyendo a lo largo del tránsito epididimario (70% en la cola del epidídimo) y tener unos bajos niveles en el eyaculado (inferior al 15%). Por ello se ha utilizado la presencia de gotas citoplásmicas como una valoración de la madurez espermática. Sin embargo, hemos de tener en cuenta otros factores como la frecuencia de recogida o de la monta (de Vries y Colenbrander, 1990).

La presencia de colas en látigo y en ovillo es el resultado de una alteración en el tránsito por el epidídimo que imposibilita el movimiento del espermatozoide (Holt, 1982), mientras que las colas y cabezas sueltas suelen observarse como artefactos de la técnica (Bonet y Briz, 1991). Las alteraciones de la cabeza tales como la microcefalia o la macrocefalia, la presencia de colas dobles o cabezas dobles tiene su origen en una alteración de la espermatogénesis. Su importancia es menor ya que suponen un porcentaje muy reducido en el espermiograma de un verraco normal y se ha verificado que los espermatozoides con alteraciones en la forma o el tamaño de la cabeza manifiestan una buena motilidad y poseen un acrosoma normal (Tritt-Gibert y Johnson, 1980). La incidencia de los distintos tipos de formas anormales descritas para el eyaculado de verraco se muestra en la tabla 3.

Las primeras evidencias de la relación entre la morfología del espermatozoide y la fertilidad en las especies domésticas fueron presentadas por Williams y Savage en 1927 en el ganado vacuno (citado por Soderquist y cols., 1991a), quienes

determinaron como causa de infertilidad la tasa elevada de formas anormales. Posteriormente, Langerlof en 1934 (citado por Soderquist y cols., 1991a) demostró la relación existente entre la incidencia de morfoanomalías espermáticas y alteraciones histopatológicas encontradas en los testículos de toros con una baja fertilidad. Sin embargo, no todas las alteraciones de la morfología del espermatozoide tienen un origen testicular, ya que ciertas alteraciones de la cola parecen estar relacionadas con disfunciones durante el tránsito por el epidídimo.

En la mayoría de las especies se verifica que al aumentar la incidencia de teratospermia se reduce el potencial reproductivo (Howard y cols., 1991). Esta realidad puede ser debida a que el espermatozoide morfológicamente anormal está en desventaja frente al estructuralmente normal en el transporte a lo largo del tracto reproductivo femenino, su capacidad para completar la fecundación puede estar reducida y el riesgo de que se produzca una muerte embrionaria precoz es mayor en los embriones procedentes de un ovocito fecundado por un espermatozoide anormal (Saacke y cols., 1988). En la especie porcina, la relación entre en el número de morfoanomalías y los resultados reproductivos ha sido estudiada en varios ensayos, encontrando una relación inversa entre el aumento del número de formas anormales y la fertilidad (Larsson, 1985; Martínez y cols., 1986; Galli y Bosisio, 1988; Waberski y cols., 1990).

Tabla 3. Valores habituales descritos en la especie porcina para las morfoanomalías espermáticas.

GCP (%)	Alteraciones Cola (%)	Alteraciones Cabeza (%)	TOTAL (%)	Fuente
1-5	1-5	2-5		Larsson, 1986
2'2-9'4	4'7-10'5	1'5-1'7		Martínez y cols., 1986
5'95±1'28	6'46±1'62		21'70±2'43	Galli y Bosisio, 1988
7'70	11'16		16'79	Galli y cols., 1991
			5-10	Martínez y cols., 1992a
10'48±0'96	7'30±0'83		23'99±1'83	Saiz y cols., 1994
			8	Xu y cols., 1996

GCP: Gota citoplásmica proximal.

2.3.1.4.- Estudio del acrosoma

El estado del acrosoma tiene una significación especial en el estudio morfológico del espermatozoide. Consiste en una vesícula que se presenta en la porción anterior de la cabeza espermática y que contiene enzimas con actividad hidrolítica (de Vries y Colenbrander, 1990). Estos enzimas tienen un papel fundamental en el proceso de penetración del ovocito (Mann y Lutwak-Mann, 1981), de manera que la presencia de anomalías morfológicas de esta región está asociada a una reducción de la fertilidad (Hashizume y cols., 1990). Las alteraciones de la morfología del acrosoma son debidas a procesos fisiológicos asociados por un lado al envejecimiento de la célula espermática y por otro al proceso de fecundación (Yanagimachi, 1994). No obstante también se producen cambios en el acrosoma como consecuencia de shock por frío, en los procesos de congelación-descongelación, en los cambios de presión osmótica, por diluciones y por lavados y centrifugaciones repetidas (Mann y Lutwak-Mann, 1981).

La evaluación rutinaria del estado del acrosoma en el ganado porcino permite eliminar eyaculados que presentan baja calidad, para lo que se han utilizado diversos métodos. Las muestras pueden ser fijadas al aire y teñidas con tinciones simples con Giemsa (Niwa y cols., 1981); tinciones dobles como Tripán azul y Giemsa (Didion y cols., 1989), rojo Congo y Tripán azul (Kovacs y Foote, 1992) o bien con una triple tinción (TST) (Vázquez y cols., 1992). Las muestras también pueden ser observadas en contraste de fases después de la fijación en glutaraldehído (Pursel y Johnson, 1974), mientras que otras técnicas más laboriosas incluyen la utilización de anticuerpos y lectinas marcadas con fluorocromos (Berger, 1990; Vázquez y cols., 1993 y 1996) o bien técnicas de microscopía electrónica de transmisión (Hashizume y cols., 1990).

En la literatura se describen defectos específicos del acrosoma, como los denominados "knobbed", que están relacionados con verracos estériles o subfértiles (Revell y Chasey, 1988; Toyama e Itoh, 1993), aunque en estos casos no sólo se puede atribuir la falta de fertilidad a la alteración acrosómica ya que se presentan asociados a otras alteraciones morfológicas como la presencia de gotas citoplásmicas. En la tabla 4 se muestran valores normales de acrosomas descritos en la especie porcina.

Tabla 4. Valores de acrosomas normales descritos en la especie porcina.

NAR (%)	Fuente
86-91	Pursel y cols., 1984
90'1± 8'3	Strzezek y Skaweta, 1984
87'7±1'14	Galli y Bosisio, 1988
87'1-91'2	Bamba, 1988
95-98	Martínez y cols., 1992a
85-94	Martínez y cols., 1993
94'24±0'37	Ivanova y Mollova, 1993
96'2	Grant y cols., 1994
76-93'3	Waberski y cols., 1994a

NAR: acrosomas normales

La relación del estado del acrosoma con la fertilidad para algunos autores es poco importante (Pursel y cols., 1984, con test heterospérmico); por contra, otros describen correlaciones positivas entre el número de acrosomas normales y la fertilidad (Galli y Bosisio, 1988; Strzezek y Skaweta, 1984), o bien una consistente relación negativa entre el porcentaje de acrosomas alterados y el índice de fertilidad en un ensayo heterospérmico (Berger y Parker, 1989).

2.3.1.5.- Estudios bioquímicos

Los estudios bioquímicos del semen se desarrollaron con el fin de medir de forma objetiva la calidad del semen, pero tienen como limitación los requisitos de tiempo, de una instrumentación y de un personal especializado que los hacen costosos. Aún cuando estos ensayos son una medida más objetiva de la muestra seminal, las correlaciones con la fertilidad obtenidas hasta el momento no han sido muy consistentes (Graham y cols., 1980; Jeyendran y cols., 1989; Gerfen y cols., 1994), por lo que la utilización de estas técnicas ha quedado relegada a los estudios experimentales.

Se han estudiado los procesos metabólicos del semen, realizando análisis enzimáticos y cuantificado los constituyentes químicos del semen y del plasma seminal.

Estudios metabólicos

El nivel metabólico de la célula espermática ha sido valorado con parámetros como el índice de fructolisis, el consumo de oxígeno, el test de la reducción del azul de metileno o de la resazurina (Cooper y cols., 1996).

También se ha analizado el contenido de ATP en el eyaculado como un índice de la actividad metabólica. El movimiento del espermatozoide es el proceso que más energía demanda, siendo la desfosforilización del ATP la fuente primaria de energía (Salisbury y cols., 1978). El ATP se produce en las mitocondrias de la porción

intermedia del espermatozoide y es transportado por los microtúbulos del flagelo. La energía obtenida es utilizada por la dineína para contraerse y en definitiva propulsar el espermatozoide, de manera que se espera que el contenido de ATP esté correlacionado con la motilidad espermática. Esta hipótesis ha sido confirmada en la especie humana (Calamera y cols., 1991; Chan y cols., 1990; Hofmann y cols., 1992), en el ganado vacuno (Söderquist y Larsson, 1985; Söderquist y Stalhammar, 1991; Söderquist y cols., 1991b) y del mismo modo Aalbers y cols. (1985) en el ganado porcino.

Los resultados en la relación entre los valores de ATP y la fertilidad en el ganado vacuno varían entre las correlaciones no significativas obtenida por Kähn (1986) con la tasa de no retorno, la correlación positiva (Wood y cols., 1986) o incluso una moderada correlación negativa con la fertilidad (Soderquist y cols. 1991b). En el ganado porcino, Aalbers y cols. (1985) encuentran una correlación entre el contenido de ATP en semen congelado y la fertilidad de $r=0.86$ ($p<0.05$). Sin embargo, esta relación no es significativa para el tamaño de camada, ni para la correlación entre la fertilidad y el contenido de ATP en semen fresco.

Análisis enzimáticos

Se han determinado las actividades enzimáticas presentes en el eyaculado buscando un marcador bioquímico que fuese indicador objetivo del estado de los espermatozoides. La presencia de actividad enzimática en el plasma está asociada con la secreción de las glándulas anejas y en consecuencia es una valoración de la funcionalidad de estas glándulas (ej.: fosfatasa ácida), con el daño celular en el espermatozoide (ej.: aspartato amino transferasa, ASAT) o bien la actividad enzimática puede ser un índice de la funcionalidad espermática (ej.: acrosina).

La relación entre las fosfatasas y otros parámetros de la calidad seminal como la concentración, la vitalidad y motilidad espermática ha sido estudiada en diferentes especies con resultados contradictorios (Graham y cols, 1967; Iyer y cols., 1988). La relación con la fertilidad en los casos analizados tampoco muestra buenos resultados, aunque Stallcup (1965) relacionó la actividad del enzima fosfatasa ácida

con la fertilidad en el ganado vacuno. Esta enzima es secretada en cantidades importantes por la próstata, junto con zinc, magnesio y ácido cítrico y de hecho se ha utilizado en la especie humana como un marcador de la actividad prostática (Upadhyaya y cols., 1986). En el plasma seminal del verraco se ha encontrado una elevada actividad fosfatasa alcalina que supera la actividad de la fosfatasa ácida (Graham y cols., 1967), estando igualmente asociada a la presencia de los iones zinc y magnesio (Iyer y cols., 1988).

La aspartato aminotransferasa (ASAT) es una enzima que se libera como consecuencia de una alteración de las membranas espermáticas (Ciereszko y cols., 1994). Por esta razón se ha utilizado la medición de la actividad de esta enzima como un marcador bioquímico de la calidad espermática. Diversos autores han descrito su utilidad en la valoración del daño celular que se produce en la conservación del semen mediante técnicas de congelación (Graham y Pace, 1967; Hammit y Martin, 1989) y han encontrado una buena correlación con los resultados reproductivos ($r = -0.50$ y -0.29 , $p < 0.01$) con la tasa de no retorno al estro y el tamaño de camada, respectivamente (Strzezek y Skaweta, 1984). Sin embargo, Hammit y cols. (1989) no encuentran correlaciones significativas con los índices de fertilidad, al igual que ha sido descrito en el ganado vacuno (revisado por Graham y cols., 1980). Una de las causas de estas diferencias para algunos autores podría residir en la baja estabilidad que presenta esta enzima (Ciereszko y cols., 1992) y en que hasta el momento no hay un método suficientemente sensible para la medición de la actividad ASAT en el semen, ya que en el eyaculado se producen oxidaciones espontáneas de NADH difíciles de controlar, que no aparecen en las mediciones enzimáticas del suero sanguíneo (Ciereszko y cols., 1994).

La acrosina es una proteinasa neutra que se encuentra en el acrosoma y que tiene una función muy importante en la penetración de la zona pelúcida. La teoría mantenida hasta ahora era que la acrosina era imprescindible en el paso de la zona pelúcida, de tal manera que si se inhibía la actividad de esta enzima no se producía la fecundación (Zanelved, 1976); sin embargo a la luz de los nuevos descubrimientos su función está siendo reevaluada (Baba y cols., 1994).

En la especie humana la relación de la acrosina con la fertilidad no ha llegado a ser concluyente (Liu y Baker, 1988), mientras que en la especie porcina, Hammit y cols. (1989) correlacionan el contenido de acrosina con la fertilidad, pero la información que aporta la medición de la acrosina es equivalente a la que se obtiene del estudio del estado del acrosoma, por lo que su utilidad queda muy limitada.

En la tabla 5 se muestran valores normales de actividad enzimática descritas en la especie porcina.

Tabla 5. Valores de actividad enzimática descritos en la especie porcina.

Enzima	Valor medio	Unidades	Fuente
Acrosina	2'54±0'07	mUI/10 ⁹ espz	Saiz y cols., 1994
ASAT	46'23±1'14	mUI/10 ⁹ espz	Saiz y cols., 1994
ASAT	44'3±2'95	mUI/10 ⁹ espz	Strzezek y Skaweta, 1984
ASAT	41'6±28'2	mUI/10 ⁹ espz	Ciereszko y cols., 1994
ASAT	20'9-50'1	mUI/10 ⁹ espz	Ciereszko y cols., 1992
Fosfatasa ácida	4163'08	UI/I	Graham y cols., 1967
Fosfatasa alcalina	9364'62	UI/I	Graham y cols., 1967
Fosfatasa alcalina	5014	UI/I	Iyer y cols., 1988

Constituyentes del plasma seminal

La funcionalidad del espermatozoide depende en gran medida del medio extracelular en el que éste se encuentra y entre los constituyentes del plasma seminal tiene particular importancia el balance iónico (Crabo y cols., 1976). Desde que Loeb en 1915 (citado por Graham y cols., 1967) descubriera que en ausencia de calcio extracelular no era posible la fecundación del erizo de mar, se han realizado un gran número de estudios sobre la importancia del contenido iónico en el proceso reproductivo. Los cationes se encuentran en el plasma seminal en forma libre o combinados con proteínas, con unos rangos de variación amplios y diferencias entre las distintas especies (Mann y Lutwak-Mann, 1981). Su medición se realiza de forma sencilla mediante un espectrofotómetro de absorción atómica. En la tabla 6 se

muestran valores normales en el plasma seminal descritos en la especie porcina. Entre los cationes estudiados se encuentran:

a.- Sodio. Este es el catión que se encuentra en mayor proporción en el medio extracelular del espermatozoide aún cuando se presenta en una proporción mucho menor que en el medio sanguíneo. Se conoce muy poco del mecanismo por medio del cual interviene en los diferentes procesos espermáticos (Fraser, 1995), aunque junto con el potasio tiene una gran importancia en el proceso de regulación de la motilidad espermática (Gatti y cols., 1993).

b.- Potasio. La secreción de las glándulas vesiculares porcinas es muy rica en potasio lo que permite equilibrar los altos contenidos en aniones (fundamentalmente citrato). Su función en el proceso de capacitación espermática parece no ser fundamental (Fraser, 1995). Sin embargo, las concentraciones de potasio en el tracto reproductivo de los mamíferos, tanto en el femenino (oviducto y útero) como en el masculino (epidídimo) son inusualmente altas comparadas con los valores sanguíneos (12-25 mM frente a 3-6 mM). Se ha demostrado en experiencias con ratones que es necesaria al menos una pequeña concentración de potasio para que se pueda producir la fecundación (Fraser, 1995), así mismo, Lee y cols. (1996) demuestran que es necesaria una concentración extracelular de potasio para que se produzca la penetración de los ovocitos en un sistema FIV con ovocitos porcinos madurados *in vitro*.

c.- Calcio. El ion calcio juega un papel fundamental en el proceso de la fecundación de la mayoría de los animales tanto vertebrados como invertebrados (Yanagimachi, 1981). Interviene de forma fundamental en el proceso de capacitación y reacción acrosómica y es necesario que se presente un adecuado nivel de calcio extracelular para que se produzca la hiperactivación de la motilidad (Fraser y cols., 1995).

d.- Magnesio. El magnesio se encuentra en mayores concentraciones en el interior del espermatozoide que en el plasma seminal (Mann y Lutwak-Mann, 1981). Aunque

se conoce muy poco de su función, participa como activador de la acrosina e incrementa la actividad de la fosfatasa alcalina (Parrish y Polakoski, 1981).

e.- Zinc. La función fisiológica del zinc en el plasma seminal no está totalmente aclarada, aunque se conoce su actividad en la estabilización de la cromatina, en las propiedades mecánicas de las fibras accesorias y en la motilidad del espermatozoide, así como en la regulación de la actividad de ciertas enzimas como la fosfatasa ácida y alcalina (Iyer y cols., 1988). En el ganado vacuno se ha encontrado una relación inversa entre el contenido en zinc en el plasma seminal y la fertilidad (Swarup y Sekhon, 1976).

En cuanto a la relación entre los constituyentes químicos del plasma seminal y la fertilidad, Jeyendran y cols. (1989) ponen de manifiesto una baja correlación en la especie humana, con unos niveles insuficientes para servir como factor predictivo de la fecundación.

Tabla 6. Valores en partes por millón de los diferentes iones presentes en el plasma seminal porcino.

Na	K	Ca	Mg	Zn	Fuente
2345	997'6	57'7			Nesmejanova, 1936
2374±55	737±15	64'1±3'5			Graham y cols., 1967
2824	1016'6				Crabo y cols., 1976
				45'5±1'9	Arver y Eliasson, 1980
2800-8400	690-3000	30-90	50-140		Mann y Lutwak-Mann, 1981
				23	Hiridoglou, 1984
4200 ± 525	844 ± 55				Petzoldt y Nehring, 1986
		11'09 ± 0'77	176'90 ± 5'85	26'68 ± 0'79	Saiz y cols., 1994

2.3.1.6.- Estudios del núcleo

En la última década se han desarrollado una serie de técnicas destinadas a la evaluación de la estructura y funcionalidad del núcleo del espermatozoide como una fase más en el espermiograma. En el estudio del núcleo espermático se han desarrollado técnicas destinadas a la valoración del estado del ADN y al estudio de las proteínas del núcleo.

Durante la espermatogénesis se producen cambios en la estructura de los cromosomas determinantes en la funcionalidad del núcleo espermático. Este proceso lleva a que la mayor parte de la cromatina esté en forma muy condensada de manera que el ADN llega a compactarse hasta seis veces más que en una célula somática.

Para estudiar el ADN se han utilizado técnicas fluorescentes como la tinción con naranja de acridina (Kosower y cols., 1992). Este fluorocromo se intercala entre

la doble hélice del ADN como un monómero, mientras que la unión con las cadenas simples de ADN la hace en forma de agregado. Esta diferencia se visualiza en forma de una emisión verde en el caso de ADN en doble cadena que se corresponde con una situación normal, mientras que en el caso de la cadena única de ADN se visualiza una emisión roja. Los eyaculados de un macho fértil cuentan con un mayor número de espermatozoides que presentan coloración verde después de un proceso que induce la desnaturalización, ya sea por calor (Evenson y cols., 1980) o por un tratamiento con ácido y alcohol que al mismo tiempo fija y desnaturaliza la muestra (Tejada y cols., 1984). Por ello, se ha descrito que la resistencia a la desnaturalización del ADN está directamente relacionada con la fertilidad (Evenson y cols., 1980 y Ballachey y cols., 1987 en vacuno; Tejada y cols., 1984 en la especie humana; Evenson y cols., 1994 en porcino).

En la especie humana se ha descrito una relación entre la alteración de la estructura de la cromatina y la infertilidad (Evenson y cols., 1980), así como en el ganado vacuno se han encontrado correlaciones significativas entre la evaluación de la estructura cromosómica y la fertilidad medida en una prueba de campo ($r=-0.58$; Ballachey y cols., 1987) y medida en un ensayo heterospérmico ($r=-0.94$, Ballachey y cols., 1988). En el ganado porcino, Evenson y cols. (1994) relacionan los resultados de fertilidad medida en un test heterospérmico y la estructura cromatínica consiguiendo discriminar adecuadamente verracos fértiles de subfértiles.

En el estudio de las proteínas se incluye la valoración de las protaminas, mediante técnicas de tinción como el azul de anilina (Terquem y Dadoune, 1983), que indica el grado de madurez nuclear y que se ha relacionado en la especie humana con otros parámetros seminales (Dadoune y cols., 1988) y con la fertilidad (Auger y cols., 1990). El estudio de las protaminas y su relación con la estabilidad de la estructura se realiza mediante la aplicación de diversos agentes reductores que transforman los grupos disulfuro a tioles, lo que permite la descondensación de la cabeza espermática (Mahi y Yanagimachi, 1975; Kvist, 1980).

2.3.2.- Pruebas que evalúan la funcionalidad de los espermatozoides.

2.3.2.1.- Integridad estructural de las membranas espermáticas.

La integridad de la membrana no sólo es importante para asegurar el metabolismo celular, sino que los cambios en las propiedades de la membrana son decisivos en el proceso de fecundación (Jeyendran y cols., 1984).

Tradicionalmente se han utilizado las tinciones vitales para estudiar la integridad estructural de las membranas espermáticas como una prueba de la viabilidad celular. Estas técnicas se basan en que las membranas intactas de una célula "viva" impiden el paso del colorante al interior de la misma, mientras que aquellas que tienen membranas estructuralmente dañadas permiten la penetración del colorante a su interior (Schrader y cols., 1986).

Desde las primeras técnicas de tinción descritas por Lasley y cols. en 1942 se han utilizado una gran variedad de métodos de tinción con el mismo propósito (revisado por García y cols., 1994). Todos ellos se caracterizan por un bajo coste, sencillez y rápida ejecución, lo que permite su utilización de forma rutinaria en el control del semen. Sin embargo, no presentan una buena correlación con la fertilidad (Berger y Parker, 1989). Entre los colorantes vitales han tenido una amplia difusión la tinción de eosina-nigrosina (Eliasson y Treichl, 1971; Bamba, 1988) y Tripán azul (Vázquez y cols., 1992).

Otro método para estudiar la membrana del espermatozoide está basado en la utilización de sustancias fluorescentes. Se utiliza una sustancia que es impermeable a la membrana espermática y que tiene afinidad por el ADN presente en el núcleo del espermatozoide, por lo que únicamente se verán teñidos aquellos espermatozoides con la membrana estructuralmente dañada. Como sustancia impermeable se ha utilizado ioduro de propidio (Garner y cols., 1986; Harrison y Vickers, 1990), así como bromuro de etidio (Jeulin y cols., 1982), y homodímero de etidio (Althouse y Hopkins, 1995) que tiñen el núcleo de las células alteradas.

2.3.2.2.- Integridad funcional de las membranas espermáticas

Las técnicas de tinción vital evalúan la integridad estructural de la membrana plasmática del espermatozoide, requisito indispensable para la buena funcionalidad de la misma. Sin embargo, no siempre la integridad estructural va unida a la funcionalidad de la membrana (Schrader y cols., 1986), siendo esta última la que juega un papel fundamental en la capacitación y la reacción acrosómica, en el mantenimiento del metabolismo espermático y en el proceso de unión a la superficie del ovocito (Check y cols., 1989).

Para analizar la funcionalidad de las membranas se han desarrollado diversas técnicas entre las que se encuentran la evaluación de la funcionalidad de la membrana con sustancias fluorescentes y el test de endósmosis o hiposmótico.

Test con fluorescencia de funcionalidad de la membrana

Para estudiar la funcionalidad de la membrana se han utilizado sustancias que son permeables a la membrana plasmática y en el interior de la célula las esterasas hidrolizan estas sustancias para liberar un derivado que presenta fluorescencia. La detección de esta fluorescencia se realiza mediante la utilización de técnicas de citometría de flujo (Garner y cols., 1986), o bien mediante la observación directa en el microscopio después de haber fijado la muestra espermática con una pequeña concentración de formaldehído (Harrison y Vickers, 1990) o sin necesidad de fijación (Althouse y Hopkins, 1995). Entre las sustancias utilizadas en el ganado porcino se encuentran el diacetato de carboxifluoresceína (Garner y cols., 1986; Clarke y Johnson, 1987 y Harrison y Vickers, 1990), y el calceín acetilmetil ester (Althouse y Hopkins, 1995).

También se han utilizado sustancias fluorescentes para evaluar la funcionalidad mitocondrial como la rodamina 123 que es una molécula catiónica y fluorescente que puede ser transportada a través de la membrana mitocondrial hasta el interior (Ericsson y cols., 1993).

La combinación de sustancias fluorescentes puede ser utilizada para el estudio simultáneo de diversos aspectos de la funcionalidad del espermatozoide, lo que permitiría mejorar la precisión del análisis. Se ha descrito la evaluación combinada de la viabilidad y la función mitocondrial (Garner y Johnson, 1995) y de la viabilidad y funcionalidad de la membrana plasmática (Harrison y Vickers, 1990).

Test de endósmosis o hipoosmótico (HOST)

La exposición del espermatozoide a un medio hipoosmótico supone una entrada de agua a través de la membrana espermática que da lugar a un aumento del volumen celular (Devrius y Ericsson, 1966). Este lleva asociado una expansión esférica de la membrana que cubre la cola y esto hace que el flagelo se enrolle, lo que lleva a un cambio morfológico muy evidente cuando se observa bajo contraste de fases (Chan y cols., 1985). El enrollamiento de la cola comienza en la zona distal y progresa hacia la porción intermedia y la cabeza del espermatozoide (Devrius y Ericsson, 1966; Jeyendran y cols., 1984). Los medios hipoosmóticos utilizados deben producir una diferencia osmótica suficiente para inducir un enrollamiento de la cola que pueda ser observado y no excesivamente elevada para no provocar la lisis de la membrana espermática (Jeyendran y cols., 1984).

Jeyendran y cols. (1984) fueron los primeros en evaluar la integridad de la membrana de espermatozoides de la especie humana utilizando el test hipoosmótico y posteriormente éste ha sido ampliamente estudiado y adaptado a las diferentes especies: bovino (Solanilla, 1993; Correa y Zavos, 1994, Revell y Mrode, 1994), morueco (García, 1992), perro (England y Plummer, 1993; Rodriguez y cols., 1994). En la especie porcina, Vázquez (1980) describe la reacción de los espermatozoides de verraco ante soluciones hiposmóticas. Vázquez y cols. (1997a) han adaptado la técnica y estandarizado las condiciones de realización, lo que permite por su sencillez y economía incluirla como una técnica más del espermiograma porcino. Los estudios que relacionan el test de endósmosis con la fertilidad no son concluyentes. En unos primeros estudios en la especie humana, Jeyendran y cols., (1984) determinan que el HOST es una buena herramienta clínica para detectar la

infertilidad, tras obtener una buena correlación con el ensayo de penetración espermática (SPA). Sin embargo, Chan y cols. (1985) aportan datos contradictorios en un estudio con un grupo más heterogéneo. El equipo de Jeyendran (Van der Ven y cols., 1986) reafirma la bondad del test hipoosmótico en un estudio de fecundación *in vitro*, mientras que otros autores aportan resultados diferentes (Liu y cols., 1988; Avery y cols., 1990).

2.3.2.3.- Test de resistencia osmótica (ORT)

Fue desarrollado a partir de los trabajos de Schilling y cols. (1984), como una prueba para determinar la diferente capacidad de conservación del semen porcino a las temperaturas de refrigeración. Esta técnica está basada en la determinación de la resistencia de las membranas acrosomales ante la incubación en condiciones hipoosmóticas. La técnica ha sido modificada con la utilización del MR-A como medio de dilución (García y cols., 1989) y determinando el porcentaje de acrosomas normales inmediatamente después de la adición del medio hipoosmótico (Martín y cols., 1990).

Mediante esta técnica se evalúa la calidad espermática, detectándose altas correlaciones con la motilidad y con el número de acrosomas normales tanto para muestras congeladas como refrigeradas (Schilling y cols, 1984). García y cols. (1989) demuestran que los verracos cuyos eyaculados presentan porcentajes más altos en el ORT ofrecen niveles superiores de fertilidad y prolificidad.

Además existen otros ensayos *in vitro* que miden la funcionalidad de la célula espermática como son las pruebas de capacitación y reacción acrosómica (Berger, 1990; Vázquez y cols. 1993; Harrison y cols., 1993; Wang y cols., 1995; Vázquez y cols., 1996; Mattioli y cols., 1996; Matás, 1996), las de penetración del mucus cervical (Gwatkin y cols., 1990; Galli y cols., 1991), o de una columna de Sephadex (Hammit y Martin, 1989; Obonyo y cols.,1992).

2.3.3.- Análisis de la interacción ovocito-espermatozoide

Sólo los métodos que incluyen el estudio de la interacción con ovocitos vivos pueden proporcionar una información inequívoca de la capacidad fecundante de los espermatozoides (Bavister, 1990).

2.3.3.1.- Tests de unión a zona pelúcida

El reconocimiento bioquímico y la unión entre las membranas espermáticas y los receptores de la zona pelúcida son pasos necesarios previos a la penetración del ovocito (Yanagimachi, 1981), de manera que el estudio de los procesos de unión puede explicar una fase muy importante del proceso de fecundación. Berger y cols. (1989) optimizan las condiciones del ensayo y detectan variaciones en el número de espermatozoides unidos a la zona entre distintos verracos y entre eyaculados de un mismo verraco. Ivanova y Mollova (1993) encuentran diferencias significativas en el número de espermatozoides unidos a la zona entre grupos de verracos fértiles y subfértiles.

El test de hemizona es una variante del test de unión a la zona y del mismo modo que éste fue desarrollado como una herramienta diagnóstica de la capacidad fecundante de los espermatozoides en la especie humana (Burkman y cols., 1988). En esta técnica se obtienen dos hemizonas por microsección del ovocito lo que permite disponer de dos superficies con una funcionalidad equivalente a la zona pelúcida intacta. Esta metodología ha sido utilizada con espermatozoides de la especie humana (Coddington y cols., 1990), de caballo (Fazeli y cols., 1993) y de verraco (Fazeli y cols., 1995).

Tanto Coddington y cols. (1991) en la especie humana, como Fazeli y cols. (1993) en el caballo, describen cómo el número de espermatozoides unidos a la zona es superior en los individuos fértiles que en los subfértiles. Esta técnica permite la utilización de ovocitos que no fueron fecundados en los programas de fecundación

in vitro y que pueden conservarse en refrigeración hasta el momento del análisis en una solución salina.

2.3.3.2.- Test FIV heteroespecíficos. Test de penetración de ovocitos de hámster libres de zona pelúcida (SPA)

El test de penetración espermática introducido por Yanagimachi en 1972 mide la capacidad de los espermatozoides para penetrar un ovocito de hámster libre de zona pelúcida y llevar a cabo el proceso de descondensación nuclear. Este test se ha utilizado ampliamente en la especie humana (Rogers, 1985) debido a las implicaciones éticas que supone la utilización de ovocitos humanos en los test homoespecíficos. Del mismo modo se ha adaptado a un número importante de especies: roedores (Hanada y Chan, 1976), conejo (Hanada y Chan, 1978), porcino (Imai y cols., 1980), vacuno (Brackett y cols., 1982), equino (Brackett y cols., 1982; Wilhelm y cols., 1996), caprino (Kim y cols., 1980; Berger y cols., 1994), ovino (Pavolk y cols., 1983; Choudhry y cols., 1995) y felinos (Andrews y cols., 1992).

Este test estudia una parte muy importante de los procesos que llevan a la fecundación de los ovocitos, como son la inducción de la capacitación espermática y la reacción acrosómica con la liberación de enzimas hidrolíticas, el proceso de unión a la membrana plasmática del ovocito, así como el fenómeno de la descondensación de la cabeza espermática (Yanagimachi, 1984). No obstante, en la utilización de este test se obvian dos procesos igualmente determinantes: el reconocimiento y fijación a la membrana y el proceso de penetración de la zona pelúcida. Esta última fase parece ser una de las barreras más difíciles que el espermatozoide debe atravesar antes de conseguir la penetración del ovocito, por lo que se sugiere que aquel espermatozoide que atraviesa esta zona será probablemente fértil (Codde y Berger, 1995).

En la especie porcina, Imai y cols. (1977) describen por primera vez la penetración de ovocitos de hámster con espermatozoides de verraco; posteriormente Clarke y Johnson (1987) analizan la relación con la calidad seminal,

pero son los trabajos de Berger los que establecen las condiciones óptimas para la realización del test (Berger y Horton, 1988) y demuestran una buena correlación con la fertilidad *in vivo* medida con un test heterospérmico, que alcanzan valores de $r=0'89$ ($p<0'003$) para el número de ovocitos penetrados y $r=0'78$ ($p<0'03$) para el número de espermatozoides por ovocito penetrado (Berger y Parker, 1989). Por otra parte, Hammitt y cols. (1989), utilizando semen congelado en un ensayo heterospérmico, encuentran una correlación significativa entre el índice de fertilidad, el número de espermatozoides unidos a la zona ($r=0'64$) y el porcentaje de ovocitos penetrados ($r=0'75$), aunque no encuentran relación con el número de espermatozoides por ovocito.

2.3.3.3. Test de fecundación *in vitro* homoespecíficos

La utilización de ovocitos y espermatozoides homoespecíficos en un sistema artificial permite analizar con gran detalle todas las fases del proceso de fecundación, por lo que se ha sugerido que sería un método muy adecuado para poder predecir la capacidad fecundante de los espermatozoides (Howard y cols., 1991).

En estos ensayos se pueden evaluar los procesos de unión y penetración de la zona pelúcida, en la que tiene una destacable importancia la hiperactivación de la motilidad. Ésta se produce en el lugar de fecundación y se caracteriza por un patrón de movimiento específico del flagelo, que se traduce en un desplazamiento rápido del espermatozoide (Yanagimachi, 1994). Este fenómeno está relacionado con diversas funciones entre las que se han descrito el facilitar el encuentro con el ovocito en la luz oviductal, favorecer el paso entre sustancias viscosas, como las secreciones mucosas presentes en el oviducto y la matriz del cumulus oophorus, y favorecer la penetración de la zona pelúcida (Stauss y cols., 1995).

La técnica de fecundación *in vitro* presenta una amplia variabilidad entre los diferentes laboratorios, por lo que es necesario la estandarización y simplificación de los métodos para posibilitar la amplia utilización de la misma.

Uno de los problemas a resolver es la preparación de los espermatozoides, ya que éstos son incapaces de fecundar un ovocito inmediatamente después de la eyaculación (Austin, 1951). Se han desarrollado diversos métodos para conseguir la capacitación de los espermatozoides *in vitro* (revisado por Nagai, 1994 y 1996), entre ellos la utilización de altas concentraciones de espermatozoides (Nagai y cols., 1988), altos niveles de calcio, lavados repetidos y una preincubación antes del cocultivo (Cheng, 1985), la centrifugación del semen en un gradiente de Percoll (Mattioli y cols., 1989; Grant y cols., 1994), mientras que Martínez y cols. (1996) proponen un método simple de capacitación sin necesidad de preincubación y sucesivos lavados que permite obtener altas tasas de penetración, ya que el proceso de capacitación y reacción acrosómica verdadera se produce durante el cocultivo. La utilización de semen no tratado reduce la variabilidad entre análisis (Matás y cols., 1996) y no modifica el tiempo de cocultivo necesario para que se produzca la penetración espermática (Martínez y cols., 1996).

De igual importancia es el método de preparación de los espermatozoides como el tipo de ovocito utilizado en los sistemas de fecundación *in vitro*. La posibilidad de penetración de los ovocitos inmaduros permite reducir los costes y el tiempo necesario para llevar a cabo los estudios de fecundación *in vitro*. Mattioli y cols. (1990) demuestran que los ovocitos inmaduros pueden ser penetrados con niveles similares a los obtenidos con ovocitos madurados *in vitro*, y Martínez y cols. (1993) demuestran niveles de penetración equivalentes a los obtenidos con ovocitos maduros *in vivo*. La única diferencia sustancial es la imposibilidad que tiene el espermatozoide que ha penetrado en el ovocito inmaduro para descondensar su material nuclear, como consecuencia de la inmadurez del citoplasma del ovocito.

Para mejorar la precisión de estos test de penetración se han ido optimizando otros factores que pueden influir en los resultados como son la fracción del eyaculado utilizada (Xu y cols., 1996), el número de espermatozoides utilizados (Foxcroft y cols., 1995), la presencia de células del cumulus (Matás y cols., 1996), el tiempo de cocultivo (Martínez y cols., 1996) o el tamaño (Matás y cols., 1996) y la madurez de los ovocitos utilizados (Roca y cols., 1997).

En el ganado vacuno se han descrito diferencias en las tasas de penetración asociadas a diferencias individuales (Iritani y cols., 1978), lo que ha permitido analizar la correlación entre las tasas de fecundación *in vitro* e *in vivo* con unos resultados muy interesantes (Marquant-Le Guienne y cols., 1990; Graule y cols., 1995).

En el ganado porcino se ha estudiado la influencia individual sobre los resultados de fecundación en distintos trabajos; así Berger y Parker (1989), utilizando el SPA y el test heterospérmico, detectan diferencias individuales, así como Nagai y cols. (1988) utilizando semen congelado. En sistemas de fecundación de ovocitos madurados *in vitro* se describen diferencias entre verracos tanto en las tasas de penetración (Wang y cols., 1995) como en las tasas de polispermia (Foxcroft y cols., 1995). Del mismo modo se han descrito diferencias entre las fracciones del eyaculado de un mismo verraco (Xu y cols., 1996). En un sistema basado en la utilización de ovocitos inmaduros Martínez y cols., (1993) demuestran cómo las diferencias en las tasas de penetración están basadas en el efecto del verraco, sin que se detecten diferencias en las características de la calidad seminal ni en el porcentaje de reacciones acrosómicas verdaderas en el cocultivo (Vázquez y cols., 1993).

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

El desarrollo del trabajo experimental se efectuó en una fase única. Sobre un mismo eyaculado se realizaron las mediciones clásicas del espermiograma, las pruebas bioquímicas, los ensayos de la funcionalidad del espermatozoide y se valoró la capacidad de penetración de ovocitos homólogos en un sistema *in vitro*. Los resultados de la valoración *in vitro* del semen fueron contrastados con los resultados reproductivos (fertilidad y prolificidad) obtenidos en un ensayo *in vivo* con inseminaciones homospérmicas con dosis seminales de igual número de espermatozoides.

3.1.- Obtención del semen, dilución y preparación de dosis seminales

Para realizar este estudio se utilizaron 60 eyaculados procedentes de 4 verracos de raza Pietrain, pertenecientes al centro de inseminación que la empresa Dalland Hybrid España tiene en Murcia. Los animales estuvieron alojados en parques individuales, bajo condiciones higiénico-sanitarias y de alimentación comunes al resto de los animales del centro. Los reproductores, al comenzar la experiencia, tenían una edad aproximada de 18 meses.

Los verracos fueron sometidos a un ritmo de recogida de un salto semanal, realizándose la experiencia durante las estaciones de invierno y primavera, teniendo ésta una duración aproximada de 6 meses. Cada día de la experiencia los animales fueron conducidos desde los parques individuales a la sala de recogida, donde se realizó la limpieza de la zona prepucial. La extracción de semen se realizó por el método manual, recogiendo únicamente la fracción rica del eyaculado sobre un vaso de precipitado que se encontraba localizado en el interior de un termo debidamente atemperado a 37°C y cubierto con una gasa estéril para filtrar las partículas contaminantes y las secreciones de la glándula de Cowper.

Tras la recogida se transportó el semen obtenido al laboratorio adjunto para realizar una primera valoración, la dilución y la preparación de las dosis seminales. La

fracción rica del eyaculado se filtró de nuevo en el laboratorio a través de una gasa estéril y se depositó en una probeta graduada que se mantuvo en un baño termostático a 37°C. Posteriormente se valoró el color, el volumen del eyaculado y la concentración espermática para calcular el número total de espermatozoides en el eyaculado.

Del total del volumen seminal se tomó una muestra de 10 ml y se transportó a los laboratorios de la Facultad de Veterinaria de Murcia; la mitad fue destinada a la obtención de plasma seminal, donde se midió el contenido de iones, mientras que con la mitad restante se valoró la concentración de ATP. El volumen de semen puro restante se diluyó en un preparado comercial (MR-A) (Martín, 1984). Este proceso se realizó manteniendo el diluyente y el semen a la misma temperatura, con un grado de dilución inferior a 1:15 para obtener dosis con una concentración final de 3×10^7 espermatozoides/ml. Del total de dosis se tomó una muestra de 100 ml que se utilizó posteriormente en las valoraciones seminales y en el test de penetración de ovocitos homólogos. El transporte de las muestras de semen puro y diluido hasta el laboratorio de la Facultad de Veterinaria de Murcia se realizó en una estufa de temperatura controlada (22 °C) y en el plazo de una hora desde su recogida. Con las dosis seminales restantes se procedió a la inseminación de las hembras reproductoras para poder evaluar los resultados de fertilidad y prolificidad (Fig. 1).

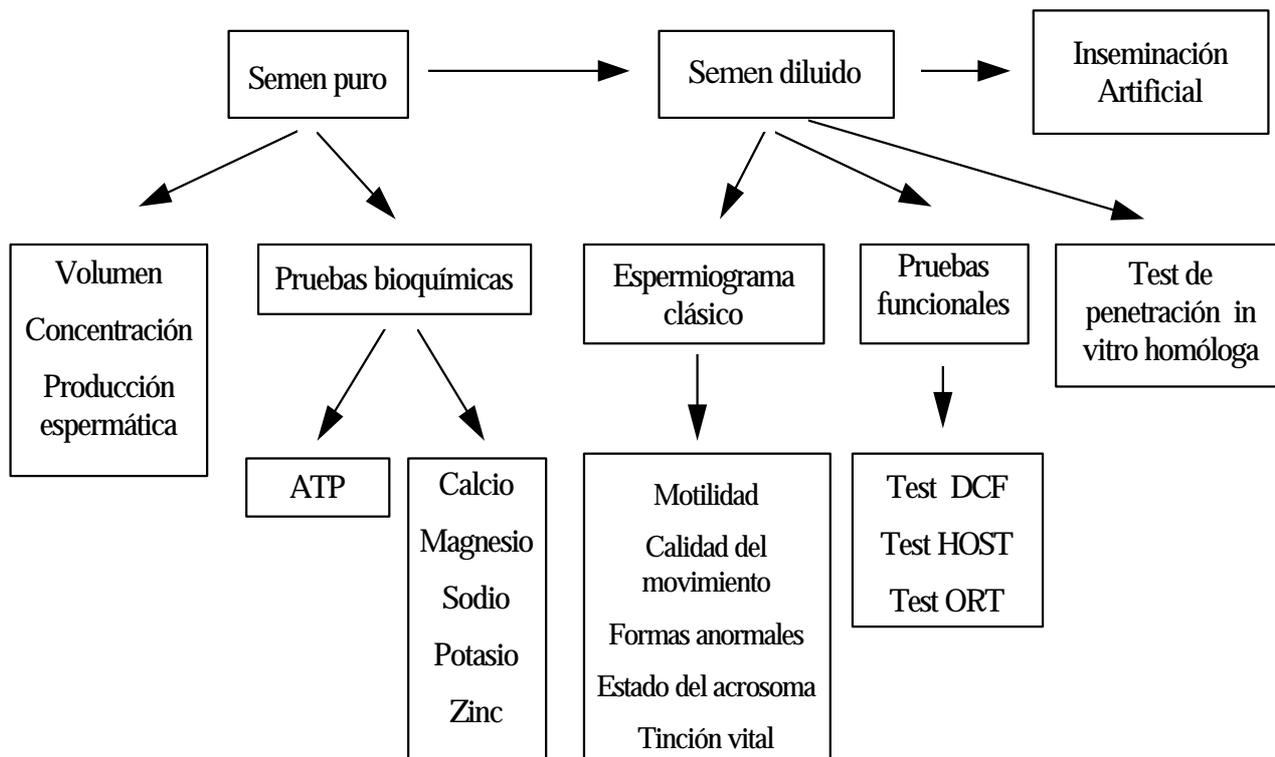


Figura 1. Esquema básico del trabajo experimental

3.2.- Pruebas *in vitro*

3.2.1.- Espermograma clásico

3.2.1.1.- *Concentración espermática*

Para calcular la concentración espermática se utilizó una cámara hemocitométrica de Bürker. El semen puro previamente fue diluido en una proporción 1:100 (v/v) en una solución salina (0'9 % p/v) con formaldehído a una concentración de 0'3 %. Se hizo el recuento del número de espermatozoides en una doble muestra, utilizando un microscopio en campo claro a 400 aumentos. Los resultados se expresaron como el número de espermatozoides/mm³.

3.2.1.2.- Motilidad y calidad de movimiento

La motilidad se evaluó mediante la observación en un microscopio de campo claro a 100 aumentos de una doble muestra de 10 µl de semen depositado sobre un portaobjetos precalentado en una placa termostatzada a 39°C. Se valoró el porcentaje de espermatozoides con movimiento (0-100) y el tipo de movimiento rectilíneo, progresivo y rápido en una escala de 0 a 5.

3.2.1.3.- Formas anormales

La morfología de las células espermáticas se analizó en una muestra fijada, para lo que se diluyó un volumen de 250 µl de semen en 1 ml de una solución al 2% de glutaraldehído en PBS. Se observó una muestra de 10 µl en un microscopio de contraste de fases a 1000 aumentos con objetivo de inmersión, evaluando la morfología de al menos 200 células espermáticas.

Las morfoanomalías se clasificaron de acuerdo con Howard y Pace (1988) en:

- Presencia de gota citoplásmica proximal.
- Colas en látigo.
- Colas en ovillo.
- Otras (alteraciones de la cabeza, colas y cabezas sueltas, colas dobles, etc.)

Los resultados se expresaron en porcentajes para cada uno de los grupos de morfoanomalías así como en el porcentaje total de morfoanomalías.

3.2.1.4.- Estado del acrosoma

Para determinar el estado de los acrosomas se utilizó la misma muestra fijada que para las formas anormales. Se observaron al menos 200 espermatozoides, clasificando como acrosomas normales aquellos que presentaban espermatozoides

con bordes apicales bien definidos y nítidos en forma de semiluna oscura (Pursel y Johnson, 1974). Los resultados se expresaron en porcentaje de acrosomas normales.

3.2.1.5.- Tinción vital de eosina-nigrosina

Se estimó la vitalidad espermática por la tinción de eosina-nigrosina descrita por Eliasson y Treichl (1971). Una muestra de semen y un volumen igual de una solución de eosina-nigrosina (5 % (p/v) de eosina amarilla, 10 % (p/v) de nigrosina en una solución salina) fueron depositados sobre un portaobjetos, se homogeneizó la mezcla y se prepararon extensiones en capa fina. Tras el secado al aire de la extensión, se observaron bajo microscopía de campo claro a 400 aumentos al menos 200 células, diferenciando aquellas que estaban parcial o totalmente teñidas de las que no habían permitido el paso del colorante. El resultado se expresó como el porcentaje de espermatozoides no teñidos.

3.2.2.- Pruebas bioquímicas

3.2.2.1.-Contenido de ATP

Para medir el contenido de ATP en el semen puro se utilizó un kit de determinación cuantitativa de ATP (Sigma 366-UV) basado en el procedimiento descrito por Adams (1963).

En este proceso la enzima fosfoglicerato fosfoquinasa (PGK) cataliza la reacción siguiente:



Mientras que una segunda reacción es catalizada por la enzima gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPD) :



El contenido de ATP puede ser estimado mediante la determinación del descenso de absorbancia media a 340 nm que corresponde a la oxidación de NADH a NAD.

Los reactivos utilizados fueron:

- Ácido tricloroacético (TCA) (solución 12% p/v).
- NADH (sal disódica, viales con 0'3 mg).
- Solución tampón de ácido 3-fosfoglicérico (PGA) (18 mM/l), magnesio y EDTA.
- Enzimas GAPD y PGK. Suspensión en sulfato de amonio de 800 UI/ml de GAPD (músculo de conejo) y 450 UI/ml de PGK (levaduras).
- Patrón de ATP (sal disódica, 100 mg).

Se depositó 1 ml de semen puro en un tubo al que se le añadió 1 ml de ácido tricloroacético (12% p/v), se homogeneizó la mezcla y se mantuvo en baño de hielo unos 5 minutos.

Posteriormente se centrifugó a 1200g durante 5 minutos para recoger el sobrenadante, despreciando aquellas muestras que presentaron turbidez.

Sobre un vial que contenía NADH, se añadió 1 ml de la solución tampón de PGA, 1'5 ml de agua bidestilada y desionizada y 0'5 ml del sobrenadante antes obtenido. Tras homogeneizar la mezcla se depositó en una cubeta y se midió la absorbancia a 340 nm (absorbancia inicial). Después de la lectura se añadieron 0'04 ml de la solución enzimática (GAPD y PGK) se agitó hasta conseguir una mezcla homogénea y se volvió a medir la absorbancia hasta que alcanzó el nivel mínimo (absorbancia final) en unos 5-10 minutos.

La concentración de ATP se expresó en nmol / 10^8 células espermáticas y se calculó:

$$(\text{ATP}) = (\text{Absorbancia final} - \text{inicial}) \times 1950 / \text{concentración}$$

La concentración se expresa en unidades de 10^8 espz/ml, donde el factor 1950 deriva de:

$$1950 = 3'04 / (6'22 \times 10^{-3}) \times 0'25$$

Siendo:

- 3'04 : Volumen de líquido en la cubeta (ml)
6'22 x 10^{-3} : Absorbancia nanomolar de NADH a 340 nm
0'25 : Volumen de muestra (ml)

3.2.2.2.- Contenido en cationes del plasma seminal

El contenido en iones en el plasma seminal se midió en un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer 3100). El plasma seminal fue obtenido después de una doble centrifugación (800g x 10 minutos) del semen puro, comprobando que se producía la correcta separación. Para realizar las mediciones fue necesario preparar diluciones en agua bidestilada, desionizada y purificada en diferentes grados según el ion analizado:

- Calcio: 1:10 en solución de cloruro de lantano 1 mg/ml
- Magnesio: 1:200 en solución de cloruro de lantano 1 mg/ml
- Sodio: 1:3200 en agua
- Potasio: 1:1600 en agua
- Zinc: 1:40 en agua

Se realizó la medición de una doble muestra en las condiciones especificadas por el fabricante y los resultados se expresaron en $\mu\text{g/l}$ o partes por millón (p/v).

3.2.3.- Pruebas funcionales

3.2.3.1.- Test con diacetato de carboxifluoresceína (DCF)

Mediante la técnica de diacetato de carboxifluoresceína se estimó la integridad funcional de las membranas espermáticas. A 1 ml de semen diluido con una concentración de 10^7 espz/ml se le añadieron 20 μ l de una solución de diacetato de carboxifluoresceína (0'46 mg/ml en dimetil sulfóxido) y 10 μ l de una solución stock de formaldehído (12'5 μ l de formaldehído al 37% en 1 ml de agua), de acuerdo a la técnica descrita por Harrison y Vickers (1990). La suspensión se incubó 10 minutos a una temperatura de 37°C, para posteriormente tomar una muestra de 5 μ l que se observó bajo microscopía de fluorescencia a 400 aumentos con un filtro G-2A, con excitación a 580 nm. Se visualizaron al menos 200 espermatozoides y se clasificaron en espermatozoides funcionales que presentaron fluorescencia instensa verde en toda su extensión y espermatozoides alterados, que no presentaron fluorescencia o únicamente lo hicieron de manera parcial. Los resultados se expresan en porcentaje de espermatozoides clasificados como intactos.

3.2.3.2.- Test de endósmosis (HOST)

Se valoró el porcentaje de espermatozoides que presentaron una alteración morfológica de enrollamiento de la cola tras la incubación en un medio hiposmótico. Se realizó a partir de una muestra de semen diluido por lo que fue necesario un paso previo de concentración mediante la centrifugación de 10 ml de semen diluido (800 g x 3 minutos) (Vázquez y cols., 1997a).

Se siguió el método descrito por Jeyendran y cols. (1984) y adaptado a la especie porcina por Vázquez y cols. (1997a). Para ello se incubaron en un baño termostatzado a 37°C, 100 μ l de semen en 1 ml de una solución hiposmótica (150 mOsm/Kg) obtenida por dilución del diluyente comercial MR-A (Martín, 1984) que presenta una osmolaridad aproximada de 300 mOsm/Kg (Johnson y cols., 1988). Tras una hora de incubación se fijó una muestra en una solución al 2% de glutaraldehído en

cacodilato sódico (325 mOsm/Kg) y se observaron en microscopía de contraste de fases a 400 aumentos un mínimo de 200 espermatozoides valorando el enrollamiento de la cola. El resultado se expresó como el porcentaje de células que reaccionaron tras el proceso de incubación.

3.2.3.3.- Test de resistencia osmótica (ORT)

Este test se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Schilling y Vengust (1987) y modificada por Martín y cols. (1990). Se incubaron en un baño termostatzado a 39°C, 200 µl de semen concentrado a partir de la dosis seminal en 3 ml de una solución de MR-A hipoosmótica (150 mOsm/Kg) y 200 µl de este mismo semen en 3 ml de una solución a 300 mOsm/Kg. La suspensión hipoosmótica se incubó durante dos horas mientras que la suspensión isoosmótica se incubó durante 15 minutos. Transcurridos estos tiempos se valoró el número de espermatozoides con acrosoma normal en cada suspensión por el método descrito anteriormente. Los resultados se expresaron como la media aritmética de los porcentajes de acrosomas normales en ambas soluciones.

3.2.4.- Test de penetración *in vitro* homóloga

3.2.4.1.- Preparación de medios de cultivo

Para la preparación de los medios se utilizó agua bidestilada y purificada (Elgastat UHQ PS, Elga). En todo momento se trabajó en condiciones de esterilidad, utilizando material de un solo uso o bien material tratado en autoclave. En la preparación se trabajó en cámara de flujo laminar (Telstar) y se procedió al filtrado final de los medios a través de membranas de 0'22 mm de diámetro de poro (Nalgene).

Para el transporte de los ovarios, la obtención y el lavado de los ovocitos se utilizó una solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco modificada (PBSDm) con la adición de albúmina sérica bovina al 0'4% (p/v) (Fracción V, Sigma), 0'34 mM de

piruvato sódico (Merck), 5'5 mM de glucosa (Merck) y 70 mg/ml de kanamicina (Sigma); finalmente se ajustó el pH a 7'4 (Mattioli y cols., 1988).

El medio utilizado para la suspensión de los espermatozoides fue el TCM 199 (Sigma) con sales de Earle a un pH de 7'8, que fue suplementado con un suero de ternera fetal inactivado (Sigma) al 12 %, 0'91 mM de piruvato sódico (Merck), 3'05 mM de glucosa (Merck), 2'92 mM de lactato cálcico (Merck), 50 UI/ml de penicilina G y 30 mg/ml de sulfato de estreptomicina (Sigma).

Como medio de coincubación se utilizó este mismo, pero adicionando 2 mM de cafeína y 5'4 mM de lactato cálcico (Merck) para finalmente ajustarlo a un pH de 7'4. Este medio se distribuyó en placas de Petri (Nunclon, 35 x 10) que se dispusieron en el incubador (Hareus) en una atmósfera del 5% de CO₂ en aire, a una temperatura de 39 °C y saturada de humedad. Las placas con el medio se mantuvieron al menos una hora en el incubador antes de introducir los ovocitos.

3.2.4.2.- Preparación de los espermatozoides

La preparación de los espermatozoides para la penetración *in vitro* se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Martínez y cols. (1996). El proceso comenzó con una primera centrifugación (50 g x 3 minutos) de la muestra de semen diluido, que durante 24 horas se mantuvieron conservadas en una cámara de refrigeración a 15°C, de la cual se recogió el sobrenadante, de manera que se eliminó el sedimento para desechar partículas extrañas y espermatozoides muertos. Seguidamente se procedió a una segunda centrifugación (1200 g x 3 minutos) de donde se recogió el pellet para eliminar el sobrenadante. El pellet se diluyó en el medio de resuspensión espermática y se ajustó a una concentración final de 2×10^8 espermatozoides/ml, con el que se procedió inmediatamente a la inseminación de los ovocitos.

3.2.4.3.- Obtención de los ovocitos

Los ovocitos fueron obtenidos a partir de ovarios procedentes del sacrificio de cerdas híbridas comerciales de unos 90-100 Kg de peso vivo, en el matadero Industrias Fuertes S.A. Una vez obtenidos los ovarios fueron transportados al laboratorio en una solución PBSdM atemperada a 30°C en un breve periodo de tiempo (inferior a una hora). Los ovarios fueron seleccionados en el laboratorio, desechando aquellos que no tenían una morfología normal o presentaban formaciones quísticas o cuerpos lúteos.

Los ovarios seleccionados presentaban folículos de tamaño comprendido entre 3 y 5 mm de diámetro; estos fueron seccionados con un bisturí para recoger el contenido folicular que se dispuso en placas de petri con PBSdM atemperado a 39°C.

Bajo el estereomicroscopio (Nikon) se seleccionaron los ovocitos que presentaban una morfología normal y mediante una pipeta Pasteur con el extremo adelgazado se traspasaron a otras placas donde se lavaron en sucesivos pases en PBSdM para, posteriormente, depositar de 15 a 20 ovocitos en una placa de petri de 35 mm de diámetro que contenía 2 ml del medio de coincubación previamente atemperado y equilibrado en el incubador de CO₂.

3.2.4.4.- Coincubación, fijación, tinción y valoración de resultados.

Sobre las placas que contenían los ovocitos se depositaron 100 µl de la solución espermática, alcanzando una concentración final de 10⁷ espermatozoides/ml de medio (Martínez y cols.,1993). Se coincubaron durante 18 horas en condiciones de 39°C de temperatura y 5% de CO₂ en aire.

Tras el periodo de coincubación los ovocitos fueron lavados en PBSdM, eliminándose de forma mecánica los espermatozoides adheridos a la superficie del ovocito y las células del cumulus oophorus. Para ello, se realizaron sucesivos pases a través de una pipeta automática de 1 ml de volumen.

Los ovocitos fueron fijados en una solución de alcohol y acético (3:1 v/v) durante al menos 24 horas, para después ser teñidos con una solución de Lacmoid al 1% y observados en microscopía de contraste de fases a 400 aumentos (Chang, 1952).

Se consideró que un ovocito había sido penetrado cuando presentaba en su interior espermatozoides compactos y refringentes, o bien ligeramente descondensados, ambos con un grado superior de tinción que los espermatozoides adheridos en el exterior del ovocito (Mattioli y cols., 1988). Se valoró el número de ovocitos penetrados y el número de espermatozoides por ovocito penetrado.

En la figura 2 se muestra un esquema del método utilizado en el test de penetración *in vitro*.

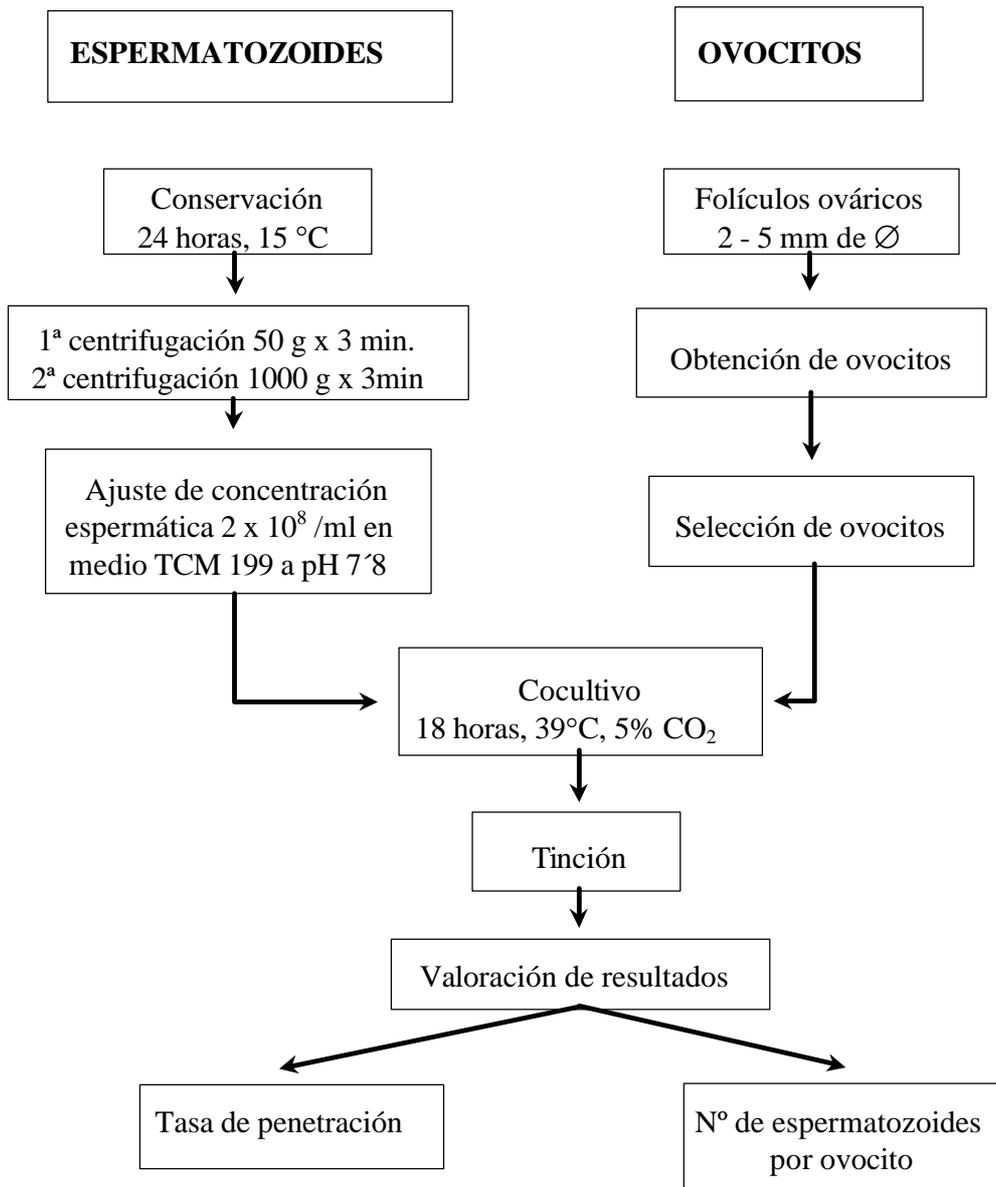


Fig. 2. Sistema de penetración *in vitro*.

3.3.- Ensayo *in vivo*

3.3.1.- Inseminación artificial

Se utilizaron un total de 300 cerdas híbridas comerciales Landrace x Large White, que siguieron a lo largo de la experiencia el mismo programa sanitario y de alimentación que el resto de la explotación. Para la detección del celo, las cerdas estuvieron alojadas en grupos de 2-5 animales en contacto visual y olfatorio con un verraco adulto. El diagnóstico del celo se realizó a primera hora de la mañana observando la inmovilidad de la reproductora ante los estímulos de un macho y el aspecto que presentaba la vulva, para pasar a ser alojada en una jaula individual donde permaneció hasta el final de la gestación.

Con las dosis seminales preparadas a partir de cada eyaculado se procedió a la inseminación de 5 cerdas inmediatamente después de la detección del celo, aplicando una primera dosis seminal de 100 ml de volumen y una concentración de 3×10^7 espermatozoides/ml. La aplicación de la dosis seminal atemperada se realizó en un tiempo medio de 5 minutos, evitando que se produjeran reflujos. A las 24 horas siguientes se procedió a reinseminar a las cerdas con semen diluido procedente del mismo eyaculado, que fue conservado en un refrigerador a temperatura de 15°C (Martínez y cols., 1984).

3.3.2.- Diagnóstico de gestación

Transcurridos 23-25 días tras la primera inseminación, se realizó un estudio ecográfico de cada una de las reproductoras para lo que se utilizó un equipo de ultrasonografía en tiempo real (Fukuda) dotado de una sonda de 3'5 Mhz.

Tras la limpieza de la zona y la deposición de gel se aplicó la sonda ecográfica en la región ventral, entre las dos últimas mamas, realizando un barrido por la zona, valorando la presencia de vesículas embrionarias, que corresponden con áreas intensamente ecogénicas (Martínez y cols., 1992b).

3.3.3.- Evaluación de los parámetros reproductivos

Se controló la gestación y el parto de cada una de las reproductoras inseminadas y se anotó el número de lechones nacidos vivos, muertos y totales. La fecundidad fue determinada como el porcentaje de cerdas que tuvieron un diagnóstico de gestación positivo del total de inseminadas. La fertilidad fue determinada para cada eyaculado como el porcentaje de cerdas que llevaron a término la gestación en relación al total de reproductoras inseminadas y por último la prolificidad fue definida como la media del tamaño de camada de las reproductoras que parieron.

En la figura 3 se muestra un esquema del proceso de evaluación de la fertilidad y prolificidad.

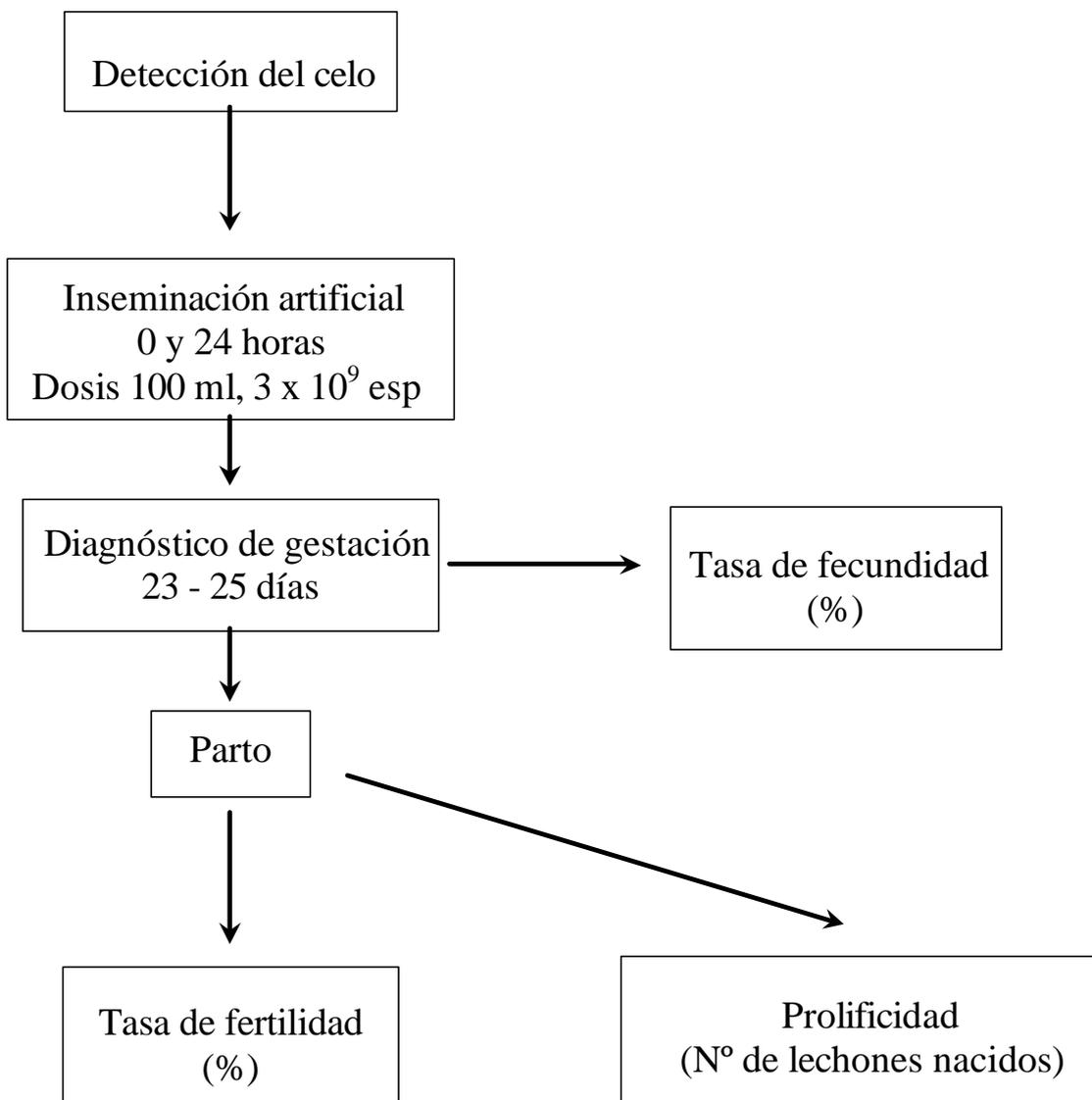


Fig. 3. Esquema del ensayo de fertilidad *in vivo*.

3.4.- Análisis estadístico

Los eyaculados fueron clasificados de acuerdo a la fertilidad o a la prolificidad a la que dieron lugar en el ensayo *in vivo*. Los valores obtenidos en las diferentes pruebas se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Posteriormente, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía para cada uno de los parámetros de calidad seminal, considerando como efecto fijo el grupo de fertilidad o prolificidad. Cuando el análisis de la varianza detectaba diferencias

significativas se utilizó el test de Tukey para comparar los valores entre grupos. Se consideraron diferencias significativas aquellas que alcanzaron niveles de probabilidad $p < 0.01$ (Steel y Torrei, 1980).

Para estudiar el grado de asociación y correlación entre los diferentes parámetros seminales se realizó un análisis de correlaciones de Pearson (Steel y Torrei, 1980).

Para el tratamiento de los datos se utilizó la hoja de cálculo Excel (v 4.0) y para realizar los análisis se hizo uso del paquete estadístico Systat (v 5.0) (Wilkinson y Howe, 1992).

4.- RESULTADOS

Aún cuando estos resultados son consecuencia de un proceso experimental único, el análisis de los mismos se ha realizado en tres fases para facilitar su exposición.

4.1.- Estudio de la fertilidad

En esta primera fase se analizaron las diferencias en la calidad seminal de eyaculados fértiles y subfértiles. Para ello, los 60 eyaculados estudiados fueron agrupados de acuerdo a la tasa de fertilidad resultante de la inseminación de 300 reproductoras. De manera que 10 eyaculados dieron lugar a una fertilidad inferior al 20% (a los que denominaremos eyaculados del Tipo I), 19 eyaculados dieron lugar a fertilidades comprendidas entre 40 y el 60% y finalmente 31 de los eyaculados dieron lugar a una fertilidad superior al 80% (eyaculados del Tipo III).

En la figura 4 se muestran los valores medios y el error estándar de la media de la tasa de fecundidad (%) y fertilidad (%) para los diferentes grupos anteriormente descritos. Se detectaron diferencias significativas entre los grupos estudiados tanto para la fecundidad como para la fertilidad ($p < 0.01$), pero no se obtuvieron diferencias entre ambos parámetros dentro de cada grupo (10 vs 8, 56.84 vs 52.63 y 89.67 vs 89.03%). El número de cerdas inseminadas en cada grupo fue de 50, 95 y 155, respectivamente.

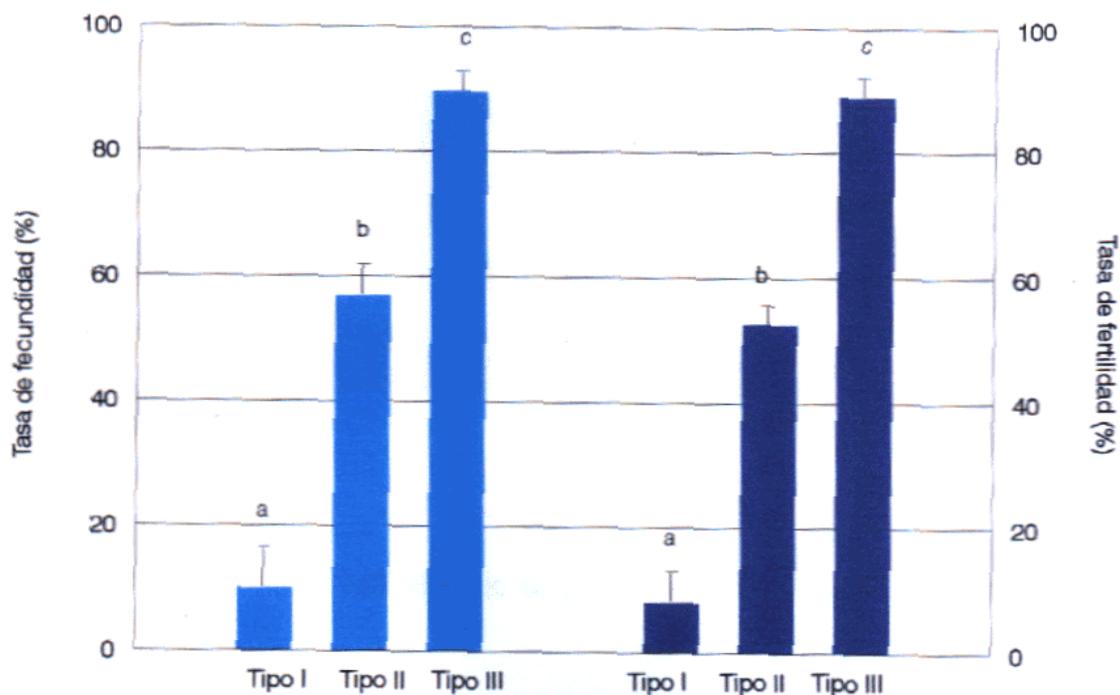


Figura 4. Media y error estándar de la media de los parámetros de fecundidad y fertilidad en tres tipos de eyaculados.

Tipo I: eyaculados que dieron lugar a fertilidades inferiores al 20% (n = 10).

Tipo II: eyaculados que dieron lugar a fertilidades entre el 40 y 60% (n = 19).

Tipo III: eyaculados que dieron lugar a fertilidades superiores al 80% (n = 31).

^{a,b,c}: superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.01$).

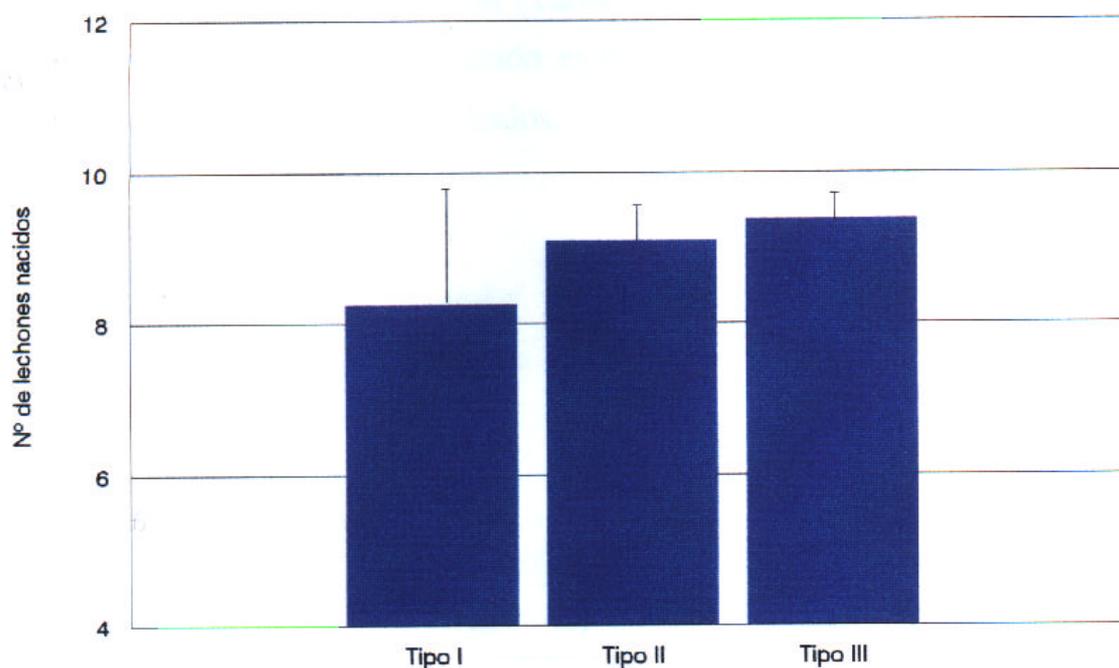


Figura 5. Media y error estándar de la prolificidad (lechones nacidos totales) en tres tipos de eyaculados.

Tipo I: eyaculados que dieron lugar a fertilidades inferiores al 20% (n = 10).

Tipo II: eyaculados que dieron lugar a fertilidades entre el 40 y 60% (n = 19).

Tipo III: eyaculados que dieron lugar a fertilidades superiores al 80% (n = 31).

Sin embargo, al analizar la prolificidad en los distintos grupos de eyaculados (Figura 5) no se encuentran diferencias significativas, aun cuando corresponden los mayores tamaños de camada con los grupos de mayor fertilidad.

Cuando se analizan los valores de los parámetros clásicos de contrastación seminal en los distintos grupos de fertilidad (Tabla 7), se observa que el volumen de la fracción rica del eyaculado y la concentración espermática no difieren significativamente en los distintos tipos de eyaculados estudiados.

Tabla 7. Media y error estándar de la media para los distintos parámetros del espermiograma clásico en tres tipos de eyaculados. Entre paréntesis se muestran los valores mínimos y máximos.

	TIPO I (n = 10)	TIPO II (n = 19)	TIPO III (n = 31)
Volumen de la fracción rica del eyaculado (ml)	113'9 ± 7'11 (79 - 148)	101'68 ± 8'7 (58 - 164)	120'87 ± 6'91 (54 - 184)
Concentración espermática (x10 ³ espz / mm ³)	428 ± 47'37 (250 - 670)	574'73 ± 43'55 (260 - 870)	527'74 ± 30'64 (260 - 930)
Número total de espermatozoides (x10 ⁹)	48'10 ± 5'27 (19'75 - 83'08)	53'76 ± 3'65 (25'16 - 97'6)	59'10 ± 2'42 (40'12 - 92'96)
Motilidad (%)	58'33 ± 1'66 ^a (50 - 65)	68'82 ± 2'76 ^b (30 - 80)	73'26 ± 0'87 ^b (60 - 80)
Calidad de movimiento (0 - 5)	2'38 ± 0'11 ^a (2 - 3)	3'06 ± 0'15 ^b (2 - 4)	3'17 ± 0'07 ^b (2 - 4)

Tipo I: eyaculados que dieron lugar a fertilidades inferiores al 20% (n = 10).

Tipo II: eyaculados que dieron lugar a fertilidades entre el 40 y 60% (n = 19).

Tipo III: eyaculados que dieron lugar a fertilidades superiores al 80% (n = 31).

^{a,b}: superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (p<0'01).

Con relación al número total de espermatozoides por eyaculado, éste alcanza valores mayores en los tipos de eyaculados con una mayor fertilidad, aunque las diferencias no llegan a ser significativas. Sin embargo, los parámetros de motilidad (individual y calidad de movimiento) son significativamente superiores en los tipos de mayor fertilidad, pero no se observan diferencias entre los tipos II y III (68'82 vs 73'26 y 3'06 vs 3'17).

Las morfoanomalías espermáticas totales son significativamente inferiores en los eyaculados con mayor fertilidad (Figura 6), aunque no se encuentran diferencias entre el tipo II y III. Cuando se analizan las morfoanomalías espermáticas de forma individualizada (Tabla 8), se observa que las diferencias antes mencionadas están debidas a la presencia de espermatozoides con gota citoplasmática proximal y colas en látigo con una frecuencia significativamente mayor en el tipo de menor fertilidad (tipo I). Sin embargo, la presencia de colas en ovillo y otro tipo de morfoanomalías no difiere en los distintos tipos de eyaculados estudiados y realmente influyen muy poco en el número total de morfoanomalías ya que ambas suponen respectivamente un 2'30, 5'99 y 7'99% de las morfoanomalías totales.

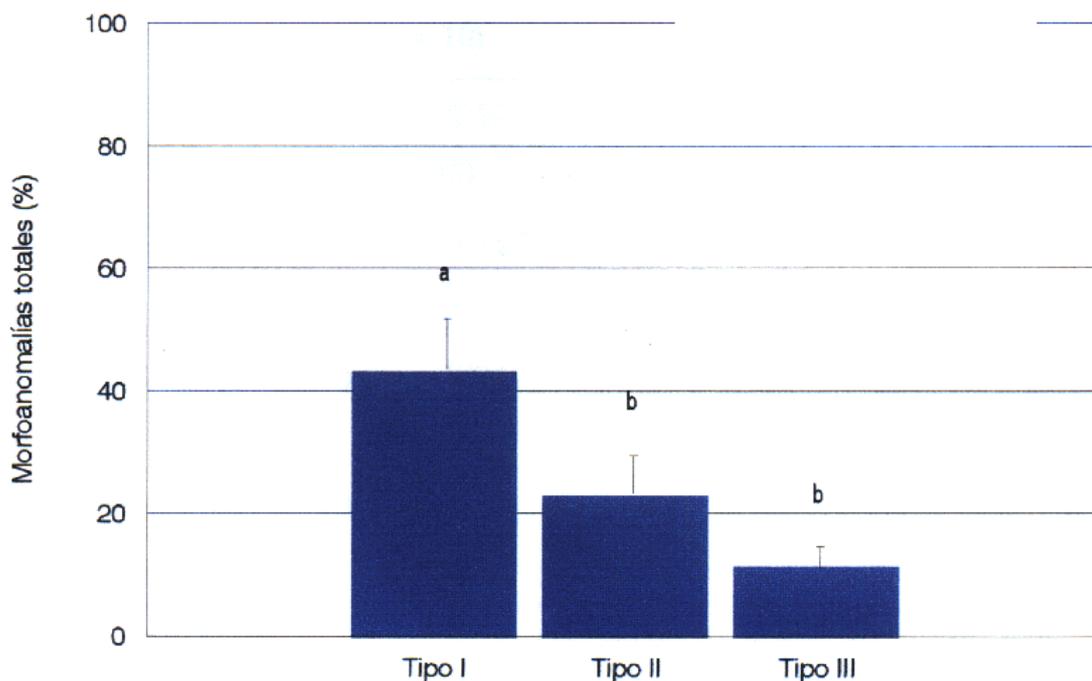


Figura 6. Media y error estándar de la media de las morfoanomalías totales en tres tipos de eyaculados.

Tipo I: eyaculados que dieron lugar a fertilidades inferiores al 20% (n = 10).

Tipo II: eyaculados que dieron lugar a fertilidades entre el 40 y 60% (n = 19).

Tipo III: eyaculados que dieron lugar a fertilidades superiores al 80% (n = 31).

^{a,b}: superíndices diferentes indican diferencias significativas (p<0'01).

Tabla 8. Media y error estándar de la media para las distintas morfoanomalías espermáticas en tres tipos de eyaculados. Entre paréntesis se muestran los valores mínimos y máximos.

	TIPO I (n = 10)	TIPO II (n = 19)	TIPO III (n = 31)
Gota citoplásmica proximal (%)	26'77 ± 5'59 ^a (4 - 45)	14'17 ± 3'36 ^{ab} (2 - 49)	6'15 ± 1'22 ^b (0 - 21)
Cola en látigo (%)	15'22 ± 2'14 ^a (3 - 24)	7'17 ± 1'46 ^b (0 - 18)	4'04 ± 1'00 ^b (0 - 23)
Cola en ovillo (%)	0'55 ± 0'24 (0 - 2)	0'71 ± 0'18 (0 - 2)	0'46 ± 0'11 (0 - 2)
Otras morfoanomalías (%)	0'44 ± 0'33 (0 - 3)	0'65 ± 0'21 (0 - 3)	0'42 ± 0'12 (0 - 2)

Tipo I: eyaculados que dieron lugar a fertilidades inferiores al 20% (n = 10).

Tipo II: eyaculados que dieron lugar a fertilidades entre el 40 y 60% (n = 19).

Tipo III: eyaculados que dieron lugar a fertilidades superiores al 80% (n = 31).

^{a,b}: superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0'01$).

Tras el análisis con diversas técnicas del estado de las membranas del espermatozoide, se observa que para todas las técnicas utilizadas (Tabla 9) los resultados son mejores en los grupos de mayor fertilidad. Sin embargo, la significación estadística entre los resultados por tipo de eyaculado para cada técnica es diferente. Así, el número de acrosomas normales, el valor ORT y carboxifluoresceína difieren ($p < 0'01$) entre los tipos I y III (85'11 vs 91'15, 67'14 vs 78'00 y 61'12 vs 71'08, respectivamente), aunque no se encuentran diferencias con el tipo II. El número de espermatozoides que reaccionan en el test de endósmosis es significativamente diferente en el grupo I frente al II y III, aunque no se detectan estas diferencias entre estos últimos grupos. Y finalmente, el número de células espermáticas con capacidad

de excluir la tinción de eosina-nigrosina no difiere en los tres tipos de eyaculados analizados.

Tabla 9. Media y error estándar de la media para los distintos análisis de las membranas espermáticas en tres tipos de eyaculados. Entre paréntesis se muestran los valores mínimos y máximos.

	TIPO I (n = 10)	TIPO II (n = 19)	TIPO III (n = 31)
Acrosomas normales (%)	85'11 ± 1'07 ^a (83 - 90)	87 ± 1'68 ^{ab} (73 - 97)	91'15 ± 0'68 ^b (82 - 98)
Test de endósmosis (HOST)(%)	34'85 ± 3'14 ^a (24 - 51)	49'71 ± 2'62 ^b (28 - 65)	51'65 ± 1'61 ^b (30 - 63)
Test de resistencia osmótica (ORT) (%)	67'14 ± 2'62 ^a (59'5 - 78)	75'39 ± 2'44 ^{ab} (58'5 - 90)	78 ± 1'27 ^b (69 - 92'5)
Tinción de eosina - nigrosina (%)	80'77 ± 2'02 (67 - 88)	83'41 ± 1'61 (73 - 95)	86'15 ± 1'25 (73 - 95)
Carboxifluoresceína (%)	61'12 ± 2'91 ^a (53 - 74)	66 ± 1'75 ^{ab} (59 - 79)	71'08 ± 1'16 ^b (61 - 83)

Tipo I: eyaculados que dieron lugar a fertilidades inferiores al 20% (n = 10).

Tipo II: eyaculados que dieron lugar a fertilidades entre el 40 y 60% (n = 19).

Tipo III: eyaculados que dieron lugar a fertilidades superiores al 80% (n = 31).

^{a,b}: superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0'01$).

La evaluación de los parámetros bioquímicos del eyaculado (Tabla 10) no muestra diferencias significativas en ninguno de los componentes estudiados entre los diferentes grupos de eyaculados. Sin embargo, hemos de destacar que se detectan valores superiores de sodio, potasio y zinc en el plasma seminal en los grupos de mayor fertilidad mientras que la situación es inversa para los niveles de magnesio. Por contra, los niveles de ATP y calcio no muestran estas tendencias.

Tabla 10. Media y error estándar de la media para los distintos parámetros químicos en tres tipos de eyaculados. Entre paréntesis se muestran los valores mínimos y máximos.

	TIPO I (n = 10)	TIPO II (n = 19)	TIPO III (n = 31)
ATP (nmol/10 ⁸ espermatozoides)	19'78 ± 2'19 (14'04 - 28'10)	18'10 ± 1'84 (6'07 - 28'10)	21'39 ± 1'28 (12'48 - 40'44)
Calcio (ppm)	21'28 ± 2'45 (17'35 - 25'8)	19'88 ± 1'04 (14'5 - 24'25)	24'25 ± 1'61 (19'6 - 32'2)
Sodio (ppm)	2117'33 ± 227'84 (1664 - 2384)	2595'2 ± 235'37 (1856 - 3840)	2582'85 ± 281'66 (1424 - 3264)
Potasio (ppm)	741'33 ± 125'41 (608 - 992)	983'2 ± 55'21 (712 - 1288)	942'85 ± 98'83 (552 - 1256)
Magnesio (ppm)	228 ± 30'78 (168 - 270)	134'25 ± 20'16 (64 - 252)	158'42 ± 12'26 (110 - 201)
Zinc (ppm)	19'53 ± 2'53 (14'6 - 23)	21'64 ± 1'53 (14'8 - 28'4)	25'42 ± 2'49 (18'6 - 38'8)

Tipo I: eyaculados que dieron lugar a fertilidades inferiores al 20% (n = 10).

Tipo II: eyaculados que dieron lugar a fertilidades entre el 40 y 60% (n = 19).

Tipo III: eyaculados que dieron lugar a fertilidades superiores al 80% (n = 31).

En la figura 7 se muestran los valores de tasa de penetración de ovocitos y número medio de espermatozoides por ovocito penetrado obtenidos en un sistema de fecundación *in vitro* homólogo con ovocitos inmaduros para los distintos tipos de eyaculados. Observamos cómo las diferencias para ambos valores son muy significativas ($p < 0.01$), correspondiéndose altos niveles en los porcentajes de penetración (10'24 vs 55'13 vs 84'72) y espermatozoides por ovocito penetrado (1'29 vs 11'29 vs 25'85) con los tipos de mayor fertilidad.

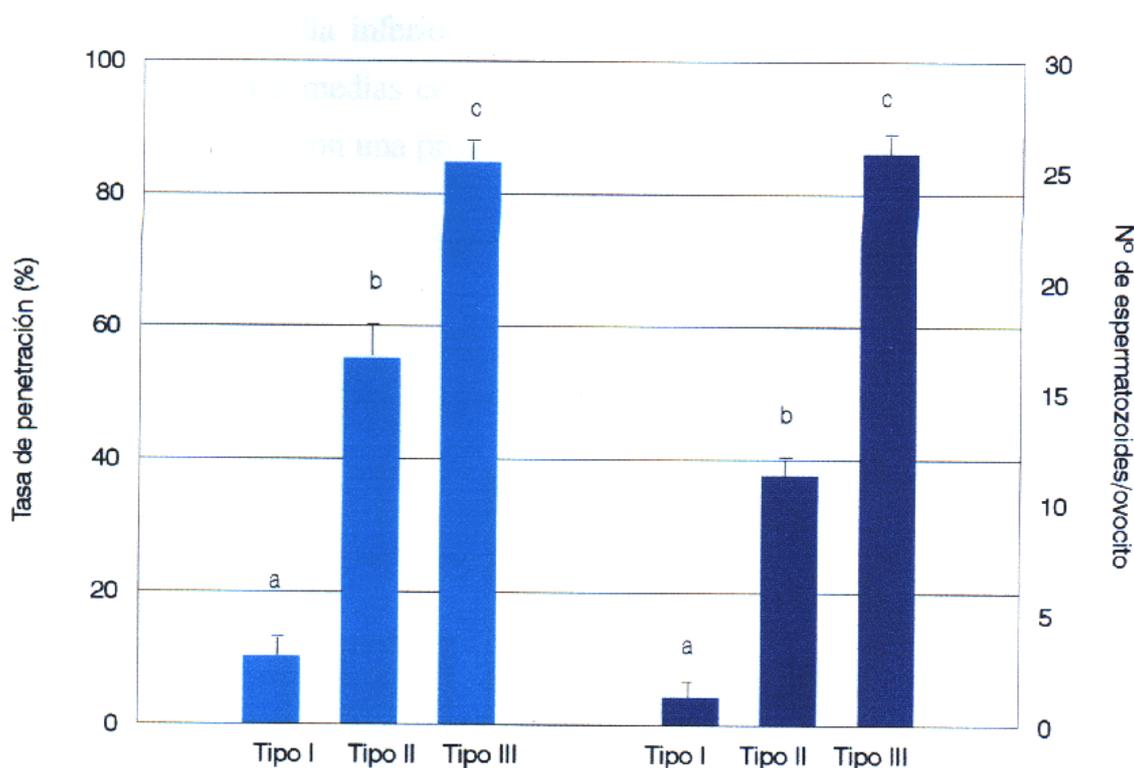


Figura 7. Media y error estándar de la media de los parámetros de tasa de penetración de ovocitos y nº medio de espermatozoides por ovocito penetrado en tres tipos de eyaculados. Se utilizaron en cada grupo 958, 1432 y 2336 ovocitos respectivamente y una concentración de 10^7 espz/ml.

Tipo I: eyaculados que dieron lugar a fertilidades inferiores al 20% (n = 10).

Tipo II: eyaculados que dieron lugar a fertilidades entre el 40 y 60% (n = 19).

Tipo III: eyaculados que dieron lugar a fertilidades superiores al 80% (n = 31).

^{a,b,c}: superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.01$).

4.2. Estudio de la prolificidad

Se estudiaron las diferencias en la calidad seminal de los eyaculados que dieron lugar a prolificidades elevadas, moderadas o reducidas. De los 60 eyaculados estudiados, 6 de ellos no dieron lugar al nacimiento de ningún lechón. Los eyaculados restantes (n=54) fueron clasificados de acuerdo al número medio de lechones nacidos en las cerdas que parieron. De esta manera, 9 eyaculados fueron clasificados como tipo A al dar lugar a una prolificidad media inferior a 8 lechones nacidos totales, 28 eyaculados se asociaron con prolificidades medias comprendidas entre 8 y 10 lechones (Tipo B) y los 17 eyaculados restantes tuvieron una prolificidad superior a 10 lechones (Tipo C).

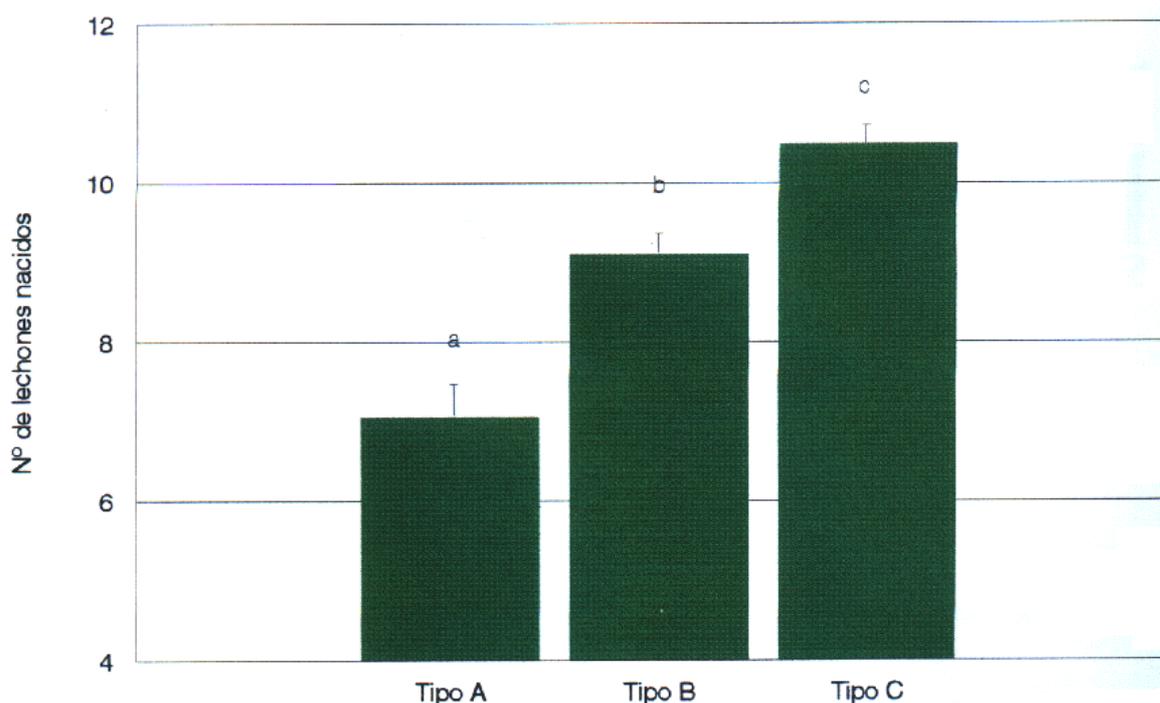


Figura 8. Media y error estándar de la media para el número de lechones nacidos en tres tipos de eyaculados.

Tipo A: eyaculados que dieron lugar a prolificidad menor de 8 (n=9).

Tipo B: eyaculados que dieron lugar a prolificidad mayor de 8 y menor de 10 (n=28).

Tipo C: eyaculados que dieron lugar a prolificidad mayor de 10 (n=17).

^{a,b,c} superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.01$).

En la figura 8 se puede observar cómo las diferencias de prolificidad entre los grupos analizados fueron estadísticamente significativas para el número medio de lechones totales nacidos ($p < 0'01$). Sin embargo, al analizar los parámetros de fecundidad y fertilidad (Figura 9) con esta nueva clasificación, se observa que no se alcanzan diferencias significativas entre los grupos de eyaculados agrupados por su prolificidad.

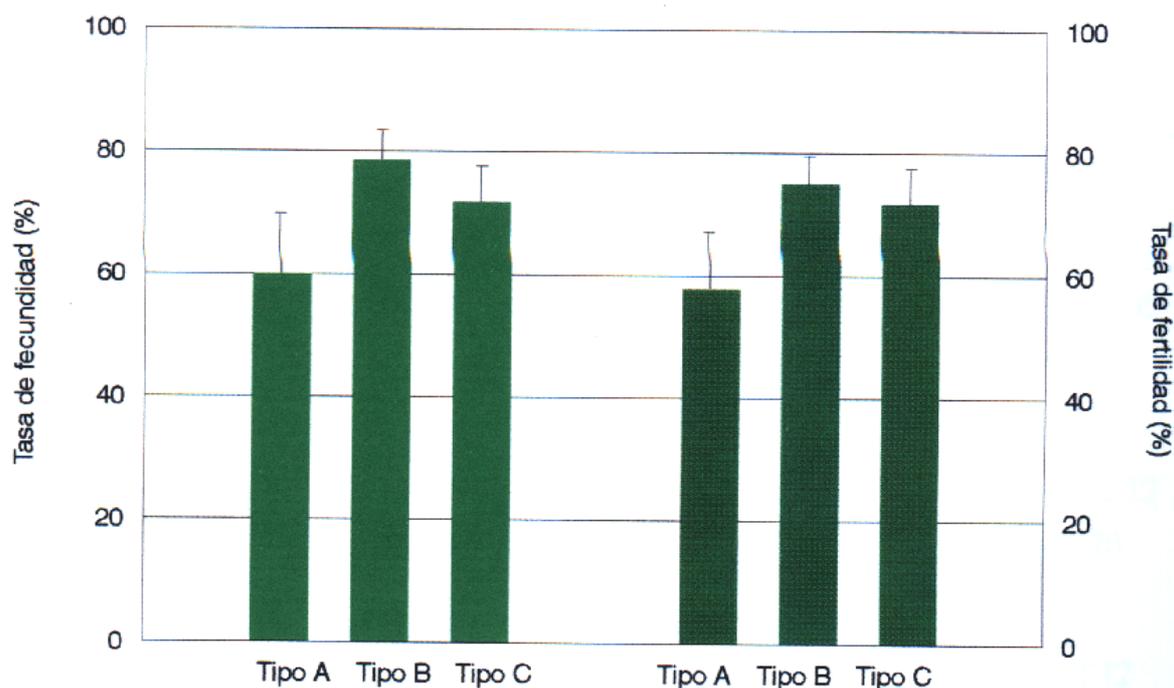


Figura 9. Media y error estándar de la media de los parámetros de fecundidad y fertilidad en tres tipos de eyaculados.

Tipo A: eyaculados que dieron lugar a prolificidad menor de 8 ($n=9$).

Tipo B: eyaculados que dieron lugar a prolificidad mayor de 8 y menor de 10 ($n=28$).

Tipo C: eyaculados que dieron lugar a prolificidad mayor de 10 ($n=17$).

Al estudiar el espermograma de estos eyaculados se observa que para todos los parámetros estudiados no existen diferencias significativas ($p > 0'01$) entre los grupos de eyaculados clasificados por su prolificidad (Tablas 11, 12, 13 y 14).

Tabla 11. Media y error estándar de la media para distintos parámetros del espermiograma clásico en tres tipos de eyaculados. Entre paréntesis se muestran los valores mínimos y máximos.

	TIPO A (n = 9)	TIPO B (n = 28)	TIPO C (n = 17)
Volumen de la fracción rica del eyaculado (ml)	98'66 ± 12'32 (58 - 164)	105'1 ± 6'03 (54 - 166)	133'94 ± 10'05 (58 - 184)
Concentración espermática (x10 ³ espz/ mm ³)	565'55 ± 46'46 (360 - 770)	558'92 ± 36'22 (250 - 930)	499'41 ± 42'12 (260 - 870)
Número total de espermatozoides (x10 ⁹)	52'81 ± 5'29 (39'06 - 83'08)	55'45 ± 3'10 (19'75 - 97'6)	61'2 ± 3'12 (43'5 - 92'96)
Motilidad (%)	68'75 ± 2'26 (60-75)	70'41 ± 2'10 (30 - 80)	72'85 ± 1'13 (65 - 80)
Calidad de movimiento (0 - 5)	2'75 ± 0'16 (2 - 3'5)	3'06 ± 0'10 (2 - 4)	3'35 ± 0'09 (3 - 4)

Tipo A: eyaculados que dieron lugar a prolificidad menor de 8 (n=9).

Tipo B: eyaculados que dieron lugar a prolificidad mayor de 8 y menor de 10 (n=28).

Tipo C: eyaculados que dieron lugar a prolificidad mayor de 10 (n=17).

Tabla 12. Media y error estándar de la media para las distintas morfoanomalías espermáticas en tres tipos de eyaculados. Entre paréntesis se muestran los valores mínimos y máximos.

	TIPO A (n = 9)	TIPO B (n = 28)	TIPO C (n = 17)
Gota citoplásmica proximal (%)	14'62 ± 5'56 (1 - 49)	10'70 ± 2'50 (0 - 45)	6'07 ± 1'68 (1 - 20)
Cola en látigo (%)	10'25 ± 2'01 (2 - 16)	5'29 ± 1'23 (0 - 23)	3'21 ± 0'79 (0 - 11)
Cola en ovrillo (%)	0'87 ± 0'29 (0 - 2)	0'58 ± 0'13 (0 - 2)	0'42 ± 0'17 (0 - 2)
Otras morfoanomalías (%)	0'37 ± 0'18 (0 - 1)	0'58 ± 0'15 (0 - 3)	0'57 ± 0'27 (0 - 3)

Tipo A: eyaculados que dieron lugar a prolificidad menor de 8 (n=9).

Tipo B: eyaculados que dieron lugar a prolificidad mayor de 8 y menor de 10 (n=28).

Tipo C: eyaculados que dieron lugar a prolificidad mayor de 10 (n=17).

Tabla 13. Media y error estándar de la media para los distintos análisis de las membranas espermáticas en tres tipos de eyaculados. Entre paréntesis se muestran los valores mínimos y máximos.

	TIPO A (n = 9)	TIPO B (n = 28)	TIPO C (n = 17)
Acrosomas normales (%)	86'37 ± 2'89 (76 - 98)	89'58 ± 1'01 (73 - 95)	90'28 ± 1'07 (83 - 97)
Test de endósmosis (HOST) (%)	47'71 ± 3'30 (33 -57)	50'85 ± 2'25 (28 - 65)	49'83 ± 2'48 (37 - 62)
Test de resistencia osmótica (ORT) (%)	73 ± 4'49 (58'5 - 92'5)	75'63 ± 1'57 (59 - 85)	78'75 ± 2'01 (69 - 90)
Tinción de eosina - nigrosina (%)	83'5 ± 2'71 (74 - 95)	84.04 ± 1'58 (67 - 95)	86'14 ± 1'26 (78 - 95)
Carboxifluoresceína (%)	66'37 ± 3'08 (56 - 83)	69'86 ± 1'41 (60 - 82)	68 ± 1'72 (59 - 77)

Tipo A: eyaculados que dieron lugar a prolificidad menor de 8 (n=9).

Tipo B: eyaculados que dieron lugar a prolificidad mayor de 8 y menor de 10 (n=28).

Tipo C: eyaculados que dieron lugar a prolificidad mayor de 10 (n=17).

Tabla 14. Media y error estándar de la media para los distintos parámetros químicos en tres tipos de eyaculados. Entre paréntesis se muestran los valores mínimos y máximos.

	TIPO A (n = 9)	TIPO B (n = 28)	TIPO C (n = 17)
ATP (nmol/10 ⁸ espz)	15'34 ± 2'01 (6'07 - 19'93)	19'66 ± 1'26 (12'43 - 28'10)	22'49 ± 2'09 (13'65 - 40'44)
Calcio (ppm)	19'45 ± 1'46 (14'5 - 22'35)	21'92 ± 2'05 (17'35 - 32'20)	23'14 ± 1'04 (20'1 - 25'85)
Sodio (ppm)	2160 ± 161'69 (1424 - 2608)	2946'28 ± 322'62 (1664 - 3840)	2422'4 ± 306'74 (1856 - 3264)
Potasio (ppm)	1098'66 ± 48'33 (928 - 1256)	808 ± 82'54 (552 - 1200)	961'6 ± 92'62 (768 - 1288)
Magnesio (ppm)	116'64 ± 17'83 (64 - 165)	174 ± 18'18 (93 - 252)	140'30 ± 24'07 (64 - 210)
Zinc (ppm)	25'83 ± 2'92 (16'8 - 38'8)	20'22 ± 1'88 (14'6 - 28'2)	22'48 ± 2'16 (16'6 - 28'4)

Tipo A: eyaculados que dieron lugar a prolificidad menor de 8 (n=9).

Tipo B: eyaculados que dieron lugar a prolificidad mayor de 8 y menor de 10 (n=28).

Tipo C: eyaculados que dieron lugar a prolificidad mayor de 10 (n=17).

En relación a las tasas de penetración y al número de espermatozoides por ovocito penetrado (Figura 10) observamos como las diferencias entre grupos de eyaculados A y B frente al C, alcanzan niveles significativos.

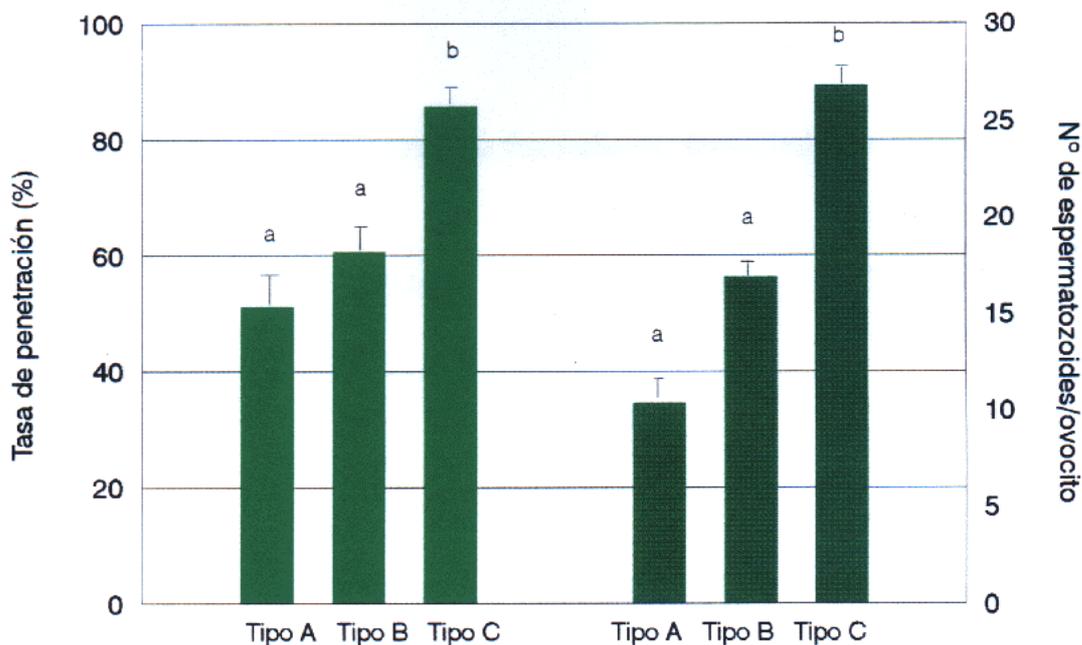


Fig. 10. Media y error estándar de la media de los parámetros de tasa de penetración de ovocitos y nº medio de espermatozoides por ovocito penetrado en tres tipos de eyaculados. Se utilizaron en cada grupo 555, 2297 y 1272 ovocitos respectivamente y una concentración de 10^7 espz/ml.

Tipo A: eyaculados que dieron lugar a prolificidad menor de 8 (n=9).

Tipo B: eyaculados que dieron lugar a prolificidad mayor de 8 y menor de 10 (n=28).

Tipo C: eyaculados que dieron lugar a prolificidad mayor de 10 (n=17).

^{a,b}, superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.01$).

4.3.- Correlaciones entre los distintos parametros seminales

Analizando las correlaciones de Pearson entre los valores de fecundidad, fertilidad y prolificidad, observamos (Tabla 15) que la relación entre la fertilidad y la fecundidad es muy estrecha ($r=0'982$), sin embargo las relaciones de estas con la prolificidad son pequeñas y no alcanzan significación estadística.

Tabla 15. Correlaciones entre las tasas de fecundidad, fertilidad y prolificidad.

	FECUNDIDAD (%)	FERTILIDAD (%)	PROLIFICIDAD (Nº LNT)
Fecundidad (%)	1 (0'000)	- -	- -
Fertilidad (%)	0'982 (0'000)	1 (0'000)	- -
Prolificidad (nº de lechones nacidos)	0'129 (0'354)	0'197 (0'154)	1 (0'000)

Entre paréntesis se indica la probabilidad

En esta fase se estudió la relación entre los diferentes parámetros que evalúan la calidad seminal. En la tabla 16, se muestran las correlaciones de Pearson obtenidas para los parámetros del espermigrama clásico, del estudio de la funcionalidad de las membranas, de los valores bioquímicos y del test de penetración *in vitro*.

	VOL	CONC	N ESP	MOT	CALI	FA	ACRO	HOS	ORT	E-N	CARB	ATP	Ca	Na	K	Mg	Zn	PEN	EO
ATP	0'328 (0'034)	-0'309 (0'046)	-0'022 (0'892)	0'314 (0'043)	0'296 (0'057)	-0'254 (0'105)	0'361 (0'019)	0'195 (0'217)	0'435 (0'005)	0'222 (0'157)	0'259 (0'097)	1							
Ca	0'149 (0'531)	-0'230 (0'329)	0'017 (0'944)	0'189 (0'424)	0'218 (0'355)	-0'413 (0'071)	0'245 (0'298)	-0'038 (0'890)	0'471 (0'066)	0'475 (0'034)	0'403 (0'078)	0'231 (0'388)	1						
Na	-0'183 (0'441)	0'457 (0'043)	0'224 (0'343)	0'177 (0'455)	0'110 (0'644)	-0'248 (0'291)	0'186 (0'432)	0'353 (0'180)	0'041 (0'881)	0'089 (0'709)	0'060 (0'803)	-0'040 (0'882)	0'017 (0'942)	1					
K	0'178 (0'453)	0'109 (0'648)	0'314 (0'178)	0'166 (0'483)	0'160 (0'501)	-0'267 (0'254)	0'302 (0'196)	0'446 (0'083)	0'411 (0'114)	0'339 (0'143)	0'352 (0'128)	-0'044 (0'873)	-0'156 (0'512)	-0'120 (0'615)	1				
Mg	0'199 (0'399)	-0'418 (0'067)	-0'179 (0'451)	-0'424 (0'062)	-0'377 (0'101)	0'247 (0'294)	-0'039 (0'871)	-0'304 (0'253)	-0'173 (0'522)	0'048 (0'840)	-0'205 (0'385)	0'404 (0'120)	0'502 (0'024)	-0'184 (0'438)	-0'439 (0'053)	1			
Zn	-0'104 (0'662)	0'176 (0'457)	0'130 (0'585)	0'314 (0'177)	0'192 (0'416)	-0'476 (0'034)	0'308 (0'187)	0'371 (0'157)	0'680 (0'004)	0'444 (0'050)	0'694 (0'001)	0'302 (0'255)	0'280 (0'232)	0'097 (0'683)	0'393 (0'087)	-0'195 (0'410)	1		
PEN	0'244 (0'095)	-0'016 (0'912)	0'223 (0'128)	0'780 (0'000)	0'738 (0'000)	-0'823 (0'000)	0'547 (0'000)	0'582 (0'000)	0'608 (0'000)	0'366 (0'011)	0'566 (0'000)	0'379 (0'019)	0'462 (0'071)	0'149 (0'583)	0'400 (0'124)	-0'439 (0'089)	0'429 (0'097)	1	
EO	0'295 (0'135)	-0'286 (0'154)	0'413 (0'159)	0'515 (0'000)	0'403 (0'005)	-0'580 (0'000)	0'360 (0'014)	0'118 (0'479)	0'411 (0'011)	0'092 (0'541)	0'208 (0'185)	0'366 (0'028)	0'356 (0'176)	-0'011 (0'968)	0'146 (0'589)	-0'221 (0'412)	0'098 (0'717)	0'715 (0'000)	1

Tabla 16. Correlaciones de Pearson entre los distintos parámetros de valoración seminal. VOL: Volumen; CONC: Concentración; N ESP: Nº total de espermatoides; MOT: Motilidad; CAL: Calidad del movimiento; FA: Total morfonamólas; ACRO: Acrosomas normales; HOS: Test de endósmosis; ORT: Índice ORT; EN: Tinción vital; CARB: Carboxifluoresceína; ATP: Concentración ATP; Ca: Calcio; Na: Sodio; K: Potasio; Mg: Magnesio; Zn: Zinc; PEN: Tasa de penetración; EO: Espermatozoides por ovocito penetrado. Entre paréntesis se indica la significación estadística

5.- DISCUSIÓN

Nuestros resultados confirman una correlación muy alta entre el diagnóstico de gestación (tasa de fecundidad) y la fertilidad, de tal manera que llega a alcanzar un valor de r próximo a la unidad (0'982). Estos valores indican que el método de diagnóstico de gestación mediante técnicas ecográficas ofrece una gran exactitud y fiabilidad. Los datos obtenidos coinciden con los descritos por Martínez y cols. (1992b) quienes llegan a alcanzar valores de exactitud próximos al 95 % y con unos niveles de sensibilidad que alcanzan el 100 % cuando el diagnóstico se realiza a partir de los 23 días post inseminación. Los falsos negativos que se presentan al utilizar esta técnica pueden ser debidos a problemas en la detección de gestaciones con tamaños de camada pequeños, o bien a la mortalidad del total de los embriones y la consiguiente reabsorción embrionaria.

Sin embargo, cuando se analiza la relación entre la fertilidad y la prolificidad observamos que éstas no se encuentran correlacionadas ($r=0'197$ $p>0'15$), de tal manera que no se detectan diferencias en el tamaño de camada entre los diferentes grupos de fertilidad establecidos en este trabajo ni diferencias en la fertilidad cuando los eyaculados son agrupados por la prolificidad. En las especies politocas como la porcina, la prolificidad está fuertemente influenciada por un gran número de factores que afectan a la hembra tales como el potencial genético, la raza, la tasa de ovulación, el tiempo transcurrido entre el momento de la ovulación y la inseminación, las pérdidas embrionarias, etc. (revisado por Dziuk, 1994). En relación a este último punto, Blasco y cols. (1996) encuentran una baja correlación ($r=0'19$) entre el número de cuerpos lúteos y el número de lechones nacidos y una alta correlación ($r=0'82$) entre la tasa de supervivencia prenatal y el tamaño de la camada.

5.1.- Relación de la fertilidad con diferentes parámetros seminales

Una de las prioridades de los laboratorios de andrología es la investigación de los métodos de análisis espermáticos con el objetivo de detectar las alteraciones de las características seminales que puedan poner en evidencia estados de infertilidad o de fertilidad reducida (Hammerstedt, 1996).

Los valores de volumen y concentración espermática de la fracción rica del eyaculado obtenidos en este estudio se encuentran dentro del rango de los valores descritos como normales (Graham y cols., 1967; Saiz y cols., 1994) y no se han encontrado diferencias entre los diferentes grupos de fertilidad. Estos resultados coinciden con los descritos por otros autores. Así, Martínez y cols. (1986) no encuentran diferencias en las mediciones del volumen y la concentración espermática al comparar semen de verracos con fertilidad óptima frente a verracos de fertilidad reducida. Del mismo modo, Hammitt y cols. (1989) en un estudio con semen congelado no encuentran correlación significativa entre los índices de fertilidad y el volumen, la concentración y el total de espermatozoides por eyaculado. Por el contrario, otros autores han relacionado la presencia de eyaculados con volumen reducido y baja concentración con casos de fertilidad reducida. Sin embargo, estos eyaculados también presentaban un espermiograma caracterizado por la presencia de numerosas formas anormales, siendo la manifestación de un proceso de espermatogénesis alterado (Larsson, 1986).

En lo que a la motilidad espermática se refiere, nuestros resultados indican diferencias significativas entre los distintos grupos de fertilidad. De manera que los eyaculados que dan lugar a una fertilidad más baja (tipo I) presentan una motilidad sensiblemente inferior a la presentada por los de fertilidad tipo II y III, aunque no hay diferencias entre estos últimos. Estos resultados indican que la motilidad es un parámetro que podría ser utilizado para discriminar eyaculados de escasa fertilidad. Sin embargo, no es posible discriminar mediante esta característica seminal eyaculados que van a dar lugar a una fertilidad superior al 40%.

La relación entre la motilidad y la fertilidad está sumida en una continua controversia (Pursel y cols., 1984; Strezezek y Skaweta, 1984; Aalbers y cols., 1985; Martínez y cols., 1986; Berger y Horton, 1988; Galli y Bosisio, 1988; Hammitt y Martin, 1989; Berger y Parker, 1989; Gerfen y cols., 1994; Waberski y cols., 1994a). Una posible causa de la discrepancia en los resultados se basa en que los estudios se realizan en condiciones experimentales con diferentes métodos de valoración de la motilidad, diferentes tratamientos de conservación del semen (fresco, diluido y congelado) y con diferencias en el número de espermatozoides en las dosis con las que se inseminan las reproductoras. Estas mismas diferencias en los resultados han sido obtenidas en el ganado vacuno donde la relación entre la motilidad y la fertilidad varía en los diferentes estudios entre un valor de r próximo a cero hasta valores de 0'6 (Graham y cols., 1980).

Existen diferencias entre los porcentajes de morfoanomalías totales entre el grupo de menor fertilidad (Tipo I) y los restantes (Tipos II y III). Estos resultados coinciden con los descritos por Larsson (1985) que demuestra como causa de infertilidad la presencia de un número elevado de formas anormales; del mismo modo Waberski y cols. (1990) encuentran útil la medición del total de formas anormales para seleccionar verracos en los centros de inseminación artificial, donde de forma rutinaria se eliminan los eyaculados que presentan un número elevado de formas anormales. Sin embargo, las diferencias obtenidas no alcanzan significación estadística entre el grupo de mayor fertilidad (tipo III) frente a los de fertilidad tipo II, como ocurre con la motilidad. Esta situación puede atribuirse al hecho de que ambos parámetros como todos los del espermograma clásico son del tipo compensable (Saacke y cols., 1994), de tal modo que con la concentración espermática utilizada en este ensayo, que es la misma que se utiliza en condiciones prácticas, se puede estar cerca de los niveles máximos de fertilidad (Larsson, 1985). De manera que cambios importantes en el número de espermatozoides normales no dan lugar más que a ligeros incrementos de la fertilidad estadísticamente no significativos.

Al analizar los diferentes tipos de morfoanomalías, la presencia de gotas citoplásmicas proximales y colas en látigo son las únicas que difieren entre los distintos grupos de fertilidad, siendo estos resultados similares a los descritos por Martínez y cols. (1986).

El estudio de las membranas espermáticas es de gran importancia ya que éstas intervienen en el metabolismo del espermatozoide y regulan los intercambios de metabolitos con el medio que le rodea. Del mismo modo, se necesita una membrana funcional para poder desarrollar los procesos de capacitación, reacción acrosómica y de la unión del espermatozoide a la superficie del ovocito. Por ello, al menos teóricamente el estudio de la membrana puede ser una buena vía para predecir la capacidad fecundante de los espermatozoides (Correa y Zavos, 1994).

Cuando se analiza la integridad estructural de la membrana plasmática mediante la técnica de tinción vital no se llegan a detectar diferencias significativas entre los diversos grupos de fertilidad, alcanzando en los tres grupos estudiados valores medios superiores al 80%. Una de las posibles causas de esta falta de relación entre la vitalidad espermática y la fertilidad es que mediante esta técnica únicamente se valora la integridad estructural de la membrana espermática, que es un requisito indispensable para la funcionalidad espermática pero no siempre es equivalente. En este sentido, tanto con el test de endósmosis (HOST) como con el test DCF se obtienen diferencias entre los eyaculados de fertilidad tipo I frente a los de fertilidad tipo III, aunque ninguna de las dos técnicas permite discriminar los grupos de fertilidad II y III.

Cuando se comparan los resultados obtenidos mediante la técnica de exclusión de eosina-nigrosina, la carboxifluoresceína y el test de endósmosis para los diferentes grupos de fertilidad detectamos unas diferencias considerables (80'77 vs 61'12 vs 34'85; 83'41 vs 66 vs 49'71; 86'15 vs 71'08 vs 51'65). Estos resultados están en la misma línea que los descritos por Vázquez y cols. (1997a). Los porcentajes de células reaccionantes al test de endósmosis son sensiblemente inferiores al número de espermatozoides que emiten fluorescencia al teñirlos con DCF y ambos a su vez son

inferiores al porcentaje de células que excluyen el colorante al teñirlos con eosina-nigrosina. Estas diferencias pueden ser debidas a que en cada uno de los test se están midiendo diferentes aspectos de la membrana espermática. El HOST y el DCF valoran la capacidad funcional de la membrana plasmática basada en las propiedades osmóticas de la misma y la capacidad de reesterificación de las esterasas no específicas presentes en el interior de la célula, mientras que la tinción con eosina-nigrosina está basada en la exclusión del colorante debido a que la estructura de la membrana impide el paso del mismo. De manera que una membrana dañada estructuralmente no podrá tener funcionalidad, pero no todas las membranas estructuralmente íntegras pueden ser funcionales. Las diferencias en los porcentajes de espermatozoides reaccionantes en el test HOST y DCF pueden ser debidas a que valoran diferentes zonas de la membrana espermática, de manera que el HOST valora fundamentalmente la funcionalidad de la membrana de la cola mientras que el DCF valora principalmente la membrana de la cabeza.

Como sucede con los parámetros antes descritos, se encuentran diferencias entre el grupo de fertilidad tipo I frente al de fertilidad tipo III, tanto para los valores de acrosomas como para el índice ORT. Diversos autores han descrito cómo la presencia de un gran número de acrosomas anormales en el espermiograma está asociada con problemas de fertilidad, aunque las correlaciones encontradas con ésta no son muy elevadas (Pursel y cols., 1984; Galli y Bosisio, 1988; Hammitt y cols., 1989). Asimismo, García y cols. (1989) demuestran que los verracos cuyos eyaculados presentan porcentajes más altos en el ORT, presentan niveles superiores en la fertilidad y la prolificidad. Nuestros resultados se dirigen en esta línea, al encontrar diferencias significativas entre el grupo de fertilidad tipo I y el de tipo III, aunque dichos parámetros tampoco son capaces de discriminar los grupos de fertilidad II y III.

Los resultados obtenidos para el contenido de ATP están dentro de los rangos descritos en la literatura, aunque Aalbers y cols. (1985) encuentran que los resultados en la medición del contenido en ATP del eyaculado están fuertemente influenciados por el método de extracción (en medio ácido, por tratamiento térmico) y de medición del contenido en ATP (técnicas colorimétricas y de bioluminiscencia).

En nuestra experiencia no encontramos diferencias para los valores de ATP entre los diferentes grupos de fertilidad, con unos resultados similares a los obtenidos por Aalbers y cols. (1985). Sin embargo, las referencias sobre la relación con la fertilidad en el ganado vacuno son contradictorias (Kahn, 1986; Wood y cols., 1986; Soderquist y cols., 1991b).

En cuanto a la relación entre los constituyentes iónicos del plasma seminal y la fertilidad, no encontramos diferencias significativas para los distintos cationes analizados para los distintos grupos de fertilidad. Jeyendran y cols. (1989) ponen de manifiesto una baja correlación en la especie humana entre los constituyentes del plasma seminal y la fertilidad, con unos niveles de significación insuficientes como para servir de factor predictivo de la fecundación.

5.2.- Relación de la fertilidad con el test de penetración *in vitro* homólogo

La posibilidad de estudiar las diversas fases del proceso de la fecundación en un sistema *in vitro* parece ser la manera más objetiva de estudiar la capacidad fecundante que podrá tener un eyaculado, de tal manera que Bavister (1990) llegó a afirmar que sólo los métodos que incluyen el estudio de la interacción con ovocitos vivos pueden proporcionar una información inequívoca de la capacidad fecundante de los espermatozoides.

En la especie porcina, son los trabajos de Berger los que establecen las condiciones óptimas para la realización del test de penetración (SPA) con ovocitos de hámster libres de zona pelúcida (Berger y Horton, 1988) y demuestran una buena correlación con la fertilidad *in vivo* (Berger y Parker, 1989), tanto para el número de ovocitos penetrados como para el número de espermatozoides por ovocito penetrado. Unos resultados similares se obtienen utilizando semen porcino congelado (Hammit y cols., 1989) y coinciden con los obtenidos en el ganado vacuno (Bousquet y Brackett, 1981 y 1982; Bousquet y cols., 1983; Graham y Foote,

1987; Eaglesome y Miller, 1989), en la especie caprina (Berger y cols., 1994) y en el ganado ovino (Choudhry y cols., 1995).

Aunque los resultados obtenidos con los sistemas heterólogos son muy alentadores, estos no evalúan los procesos en los que interviene la zona pelúcida, que es una de las barreras más importantes que el espermatozoide debe superar para lograr la penetración del ovocito. La utilización de ovocitos homólogos, donde la zona pelúcida se encuentra intacta, puede proporcionar una buena información de la funcionalidad espermática (Codde y Berger, 1995). Aún así, los test *in vitro* sólo evalúan una parte del complejo proceso que lleva a la instauración de la gestación, ya que por razones obvias no pueden predecir otras fases igualmente importantes en este sistema, como son por ejemplo el proceso de transporte espermático hasta el lugar de fecundación (Soede y cols., 1993), el transporte del ovocito a lo largo del tracto reproductor, el proceso de implantación y el desarrollo embrionario (Berger, 1996).

Los resultados obtenidos en nuestro sistema de penetración *in vitro* de ovocitos homólogos muestran diferencias significativas entre los tres grupos de fertilidad, tanto para las tasas de penetración de ovocitos (10'24 vs 55'13 vs 84'72 %) como para el número medio de espermatozoides por ovocito penetrado (1'29 vs 11'29 vs 25'85). Estos resultados están en concordancia con los descritos en la especie bovina por Marquant-LeGuienne y cols. (1990) quienes detectan una correlación entre las tasas de penetración y la fertilidad medida como la tasa de no retorno al estro de 0'83. Del mismo modo en la especie bovina Graule y cols. (1995) encuentran diferencias en las tasas de penetración (75'9 vs 20'4%) que presentan dos grupos de reproductores agrupados por la tasa de no retorno al estro (73'06 vs 42'48%). En la especie porcina se han demostrado diferencias en las tasas de penetración entre diferentes verracos (Martínez y cols., 1993; Sirard y cols., 1993; Xu y cols., 1996). Sin embargo, hasta ahora sólo se había demostrado una relación con la fertilidad *in vivo* en un ensayo con ovocitos de hámster libres de zona (Berger y Parker, 1989; Hammitt y cols., 1989).

El estudio de los parámetros de motilidad, morfología, acrosomas y de los test de funcionalidad de la membrana puede ser una herramienta útil, en un primer término,

para desechar eyaculados de baja calidad, aunque estas técnicas no alcanzan la sensibilidad suficiente para dar un resultado satisfactorio en la predicción de la fertilidad (Woelders, 1991). Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que el test de penetración *in vitro* es la única técnica de las estudiadas capaz de discriminar adecuadamente los eyaculados que darán lugar a los distintos grupos de fertilidad.

En nuestro estudio, hemos obtenido para el grupo de mayor fertilidad (Tipo III) altas tasas de penetración que van acompañadas de un número elevado de espermatozoides por ovocito, de tal manera que se alcanza una correlación entre ambos parámetros muy elevada ($r=0.715$); unos valores similares obtienen Hammit y Martin (1989) en un sistema SPA ($r=0.72$). El número de espermatozoides por ovocito depende fundamentalmente de la concentración de espermatozoides con la que se realiza la incubación (Rath, 1992; Coy y cols., 1993; Martínez y cols., 1993; Foxcroft y cols., 1995; Xu y cols., 1996). En nuestras condiciones experimentales la concentración espermática utilizada (10^7 espz/ml) permite predecir la capacidad fecundante mediante los dos parámetros: tasa de penetración y número de espermatozoides penetrados. No obstante, deberán desarrollarse ensayos a mayor escala que incluyan un número mayor de reproductores que confirme los resultados obtenidos en estos estudios preliminares.

5.3.- Relación de la prolificidad con diferentes parámetros seminales

Al estudiar los parámetros seminales para los distintos grupos de prolificidad encontramos que ninguno de los estudiados es capaz de diferenciar la prolificidad de los eyaculados. Estos resultados coinciden con Galli y Bosisio (1988) quienes no encuentran correlación entre los parámetros del espermiograma clásico y la prolificidad. Sin embargo, el test de penetración muestra diferencias significativas entre los eyaculados de menor prolificidad (Tipo A y B) frente a los de mayor prolificidad (Tipo C), tanto mediante la tasa de penetración (51'21 vs 60'56 vs 85'76%) como con el número de espermatozoides penetrados por ovocito (10'38 vs 16'87 vs 26'78). La prolificidad depende de la capacidad fecundante de un verraco y de un gran número de factores que afectan a la hembra (revisado por Dziuk, 1994), por lo que sólo las

técnicas de análisis seminal más precisas son capaces de discriminar los eyaculados que van a dar lugar a un tamaño de camada más elevado.

5.4.- Correlaciones entre los parámetros seminales

En la especie porcina son poco numerosos los estudios sobre la relación entre los diferentes test *in vitro* de la calidad seminal (Crabo y Graham, 1972; Clarke y Johnson, 1987; Hammit y Martin, 1989; Saiz y cols., 1994; Sánchez y cols., 1996)

El número total de espermatozoides en el eyaculado es el resultado de la combinación de concentración y volumen, y consecuentemente estos tres parámetros están relacionados entre sí. La dependencia entre la concentración y el volumen es inversamente proporcional y, como cabría esperar, la correlación obtenida es de carácter negativo $r=-0'654$. Sánchez y cols. (1996) obtienen un resultado similar ($r=-0'7694$, $p<0'05$) mientras que Saiz y cols. (1994) y Graham y cols. (1967) obtienen una correlación ligeramente inferior ($r=-0'47$, $p<0'01$).

Encontramos que una serie de parámetros se encuentran correlacionados entre sí. Estos son los que determinan la motilidad, las características morfológicas, el acrosoma y la membrana espermática. Estos resultados coinciden con los descritos por Harrison y Vickers (1990) quienes encuentran unos resultados similares para el número de espermatozoides con la membrana funcional medida con DCF y la proporción de acrosomas intactos. Sánchez y cols. (1996) también encuentran que la relación entre las formas anormales y los acrosomas normales, como en nuestros resultados, es inversa y significativa.

Se ha sugerido que el ensayo de ORT evalúa de forma global la calidad espermática, ya que se han descrito altas correlaciones entre el ORT con la motilidad y el número de acrosomas normales tanto para muestras congeladas como refrigeradas (Schilling y cols., 1984). En nuestras condiciones experimentales la relación de el ORT con la motilidad ($r=0'498$), calidad del movimiento ($r=0'507$) y acrosomas normales ($r=0'637$) es manifiesta. Sánchez y cols. (1996) detectan también

correlaciones mayores entre la ORT y los acrosomas normales ($r=0'844$), con la calidad del movimiento ($0'829$). Sin embargo, con la motilidad no encuentran correlaciones significativas. Rigau y cols. (1996) encuentran del mismo modo una buena correlación con el porcentaje de células viables, la motilidad, el número de acrosomas alterados y el índice de producción de L- Lactato.

El movimiento del espermatozoide es el proceso que más energía demanda, siendo la desfosforilización del ATP la fuente primaria de energía (Salisbury y cols., 1978), de manera que se espera que el contenido de ATP esté correlacionado con la motilidad espermática. Esta hipótesis ha sido confirmada en diversas especies. Así, en la especie humana (Calamera, 1982 y 1991; Chan, 1990; Hofmann, 1992), Söderquist y Larsson (1985) y Söderquist y Stalhammar (1991) en el ganado vacuno y Aalbers y cols. (1985) en el ganado porcino han descrito una correlación positiva entre motilidad y contenido de ATP. Kordan y Strzezek (1992) valoran cómo los cambios en los niveles de ATP y AMPc modulan la motilidad y la inhibición de la misma en el espermatozoide de verraco.

5.5.- Correlación entre los parámetros de calidad seminal y el test de penetración *in vitro*

En cuanto a la relación entre parámetros del espermiograma clásico y los resultados de la penetración *in vitro* nuestros resultados muestran que la motilidad, la morfología y el estado del acrosoma de los espermatozoides están muy relacionados con los resultados de la penetración *in vitro*, tanto para el valor del porcentaje de penetración como para el número de espermatozoides por ovocito. Estos resultados coinciden con los descritos en la especie humana por Kruger y cols. (1986) quienes encuentran una relación directa entre el éxito de la fecundación con la morfología y la motilidad espermática, o con los estudios descritos por Jeulin y cols. (1986), quienes encuentran tasas de correlación significativas con el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto ($r=0'69$) y la morfología ($r=0'71$), que son unos resultados con unos niveles similares a los obtenidos en nuestra experiencia ($r=0'547$ y $r=0'823$ respectivamente). Sin embargo, Mashlach y cols. (1992) no encuentran diferencias en

el espermiograma clásico entre dos grupos de eyaculados que mostraron grandes diferencias en los resultados del sistema FIV.

En la especie porcina, en un sistema SPA, Clarke y Johnson (1987) describen bajas correlaciones entre las tasas de penetración y los parámetros de motilidad, acrosomas e integridad funcional de las membranas, mientras que Hammit y Martin (1989), solo encuentran una correlación positiva con la motilidad. Sin embargo, Ivanova y Mollova (1993) aseguran que la tasa de penetración está íntimamente relacionada con el estado acrosomal. En cuanto a los tests que utilizan ovocitos homólogos, Martínez y cols. (1993) describen diferencias significativas en las tasas de penetración de dos verracos que no se corresponden con diferencias en los parámetros de calidad seminal y del mismo modo Vázquez y cols. (1993) no encuentran correlaciones entre la tasa de penetración y el porcentaje de espermatozoides reaccionantes medidos con una triple tinción. Un resultado similar obtiene Wang y cols. (1995) utilizando la clortetraclina para valorar la reacción acrosómica, aunque estos describen una correlación positiva entre las tasas de penetración, la motilidad y la vitalidad.

6.- CONCLUSIONES

1.- La valoración del volumen del eyaculado, la concentración espermática, los parámetros bioquímicos del semen y el estudio de la integridad estructural de la membrana no permite discriminar entre eyaculados fértiles y subfértiles.

2.- El análisis de la motilidad, de las morfoanomalías, del estado del acrosoma y las pruebas que valoran la funcionalidad espermática permite predecir los eyaculados que dan lugar a una fertilidad inferior al 40 %, estando todas las pruebas mencionadas muy relacionadas entre sí.

3.- En nuestras condiciones experimentales, el test de penetración *in vitro* homóloga es la única prueba laboratorial capaz de diferenciar eyaculados de diferente fertilidad y prolificidad.

7.-BIBLIOGRAFÍA

AALBERS, J.G.; JOHNSON, L.A.; AALBERTS-SMIT, E.A.; RADEMAKER, J.H.M. (1985) ATP content of fresh and frozen-thawed boar semen and its relationship to sperm concentration and fertility. En: *Deep Freezing of Boar Semen*. Eds.: Johnson, L.A.; Larsson, K. Swedish Univ. Agric. Sci., Uppsala. 259-264.

ADAMS, H. (1963) Adenosine 5'-Triphosphate determination with phosphoglycerate kinase. En: *Methods of enzymatic analysis*. Ed.: Bergmeyer, H., Academic Press, New York. 539-543.

ALTHOUSE, G.C.; HOPKINS, S.M. (1995) Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluorophores. *Theriogenology* 43:595-603.

AMANN, R.P. (1989) Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately?. *J. Androl.* 10:89-98.

ANDREWS, J.C.; HOWARD, J.G.; BAVISTER, B.D.; WILDT, D.E. (1992) Sperm capacitation in the domestic cat (*Felis catus*) and leopard cat (*Felis bengalensis*) as studied with a salt-stored zone pellucida penetration assay. *Mol. Reprod. Devel.* 31:200-207.

ARVER, S.; ELIASSON, R. (1980) Zinc and magnesium in bull and boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 60:481.

AUGER, J.; MESBAH, M.; HUBER, C.; DADOUNE, P. (1990) Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int. J. Androl.* 13:452-462.

AUSTIN, C.R. (1951) Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res.* 4: 581-589.

AVELLA, L.; SANZ, J.; TORRES, A. (1992) La ganadería valenciana en la CEE. Análisis sectorial. Ed.: *Servicio de estudios agrarios y comunitarios*. Generalitat Valenciana.

AVERY, S.; BOLTON, V.N.; MASON, B.A. (1990) An evaluation of the hypo-osmotic sperm swelling test as a predictor of fertilizing capacity in vitro. *Int. J. Androl.* 13:93-99.

BABA, T.; AZUMA, S.; KASHIWABARA, S.; TOYODA, Y. (1994) Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J. Biol. Chem.* 269:31845-31849.

BALLACHEY, B.E.; HOHENBOKEN, W.D.; EVENSON, D.P. (1987) Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to fertility of bulls. *Biol. Reprod.* 36:915-925.

BALLACHEY, B.E.; EVENSON, D.P.; SAACKE, R.G. (1988) The sperm chromatin structure assay: Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *J. Androl.* 9:109-115.

BAMBA, K. (1988) Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology* 29:1245-1251.

BARBONI, B. (1994) Methods for the assessment of capacitation. *Zygote* 2:367-369.

BAVISTER, B.D. (1990) Test of sperm fertilizing ability. En: *Gamete Physiology*. Ed. Asch, R.H.; Balmaceda J.P.; Johnston, I. 77-105.

BEATTY, R.A. (1957) A pilot experiment with heterospermic insemination in the rabbit. *J. Genet.* 55:325-347.

BEATTY, R.A. (1960) Fertility of mixed semen from different rabbits. *J. Reprod. Fertil.* 1:52-60.

BEATTY, R.A.; BENNETT, G.H.; HALL, J.G.; HANCOCK, J.L.; STEWART, D.L. (1969) An experiment with heterospermic insemination in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 19:491-502.

BERGER, T. (1990) Pisum sativum agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine sperm. *Theriogenology* 33:689-695.

BERGER, T. (1995) Proportion of males with lower fertility spermatozoa estimated from heterospermic insemination. *Theriogenology* 43:769-775.

BERGER, T. (1996) Fertilization in ungulates. *Anim. Reprod. Sci.* 42:351-360.

BERGER, T.; HORTON, M.B. (1988) Evaluation of assay conditions for the zona free hamster ova bioassay of boar sperm fertility. *Gamete Res.* 19:101-111.

BERGER, T.; PARKER, K. (1989) Modification of the zona free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlation with in vivo fertility. *Gamete Res.* 22:385-397.

BERGER, T.; DAVIS, A.; WARDSHIP, N.J.; HEDRICK, J.L. (1989) Sperm binding to the porcine zona pellucida and inhibition of binding by solubilized components of the zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* 86:559-565.

BERGER, T.; DROBNIS, E.Z.; FOLEY, L.; METZLER, J.K.; HORTON, M. (1994) Evaluation of relative fertility of cryopreserved goat sperm. *Theriogenology* 41:711-717.

BERGER, T.; ANDERSON, D.L.; PENEDO, M.C.T. (1996) Porcine sperm fertilizing potential in relationship to sperm functional capacities. *Anim. Reprod. Sci.* 44:231-239.

BLASCO, A.; GOGUE, J.; BIDANEL, J.P. (1996) Relationships between ovulation rate, prenatal survival and litter size in French-Large-White pigs. *Anim. Sci.* 63:143-148.

BONET, S. (1990) Immature and aberrant spermatozoa in the ejaculate of *Sus domesticus*. *Anim. Reprod. Sci.* 22:67-80.

BONET, S.; BRIZ, M.D. (1991) New data on aberrant spermatozoa in the ejaculate of *Sus domesticus*. *Theriogenology* 35:725-730.

BRACKETT, B.G.; COFONE, M.A.; BOICE, M.L.; BOUSQUET, D. (1982) Use of zona-free hamster ova to assess fertilizing ability of bull and stallion. *Gamete Res.* 5: 217- 227.

BURKMANN, L.J.; KRUGER, T.F.; CODDINGTON, C.C.; ROSENWAKS, Z; FRANKEN, D.R.; HODGEN, G.D. (1988) The hemizona assay (HZA). development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertil. Steril.* 49:688-697.

BWANGA, C.O. (1991) Cryopreservation of boar semen. *Acta vet. scand.* 32:431-453.

CALAMERA, J.C.; QUIROS, M.C.; BRUGO, S.; NICHOLSON, R.F. (1991) Comparison between swim-up and glass bead column techniques for the separation of human spermatozoa. *Andrologia* 23:259-261.

CHANG, M.C. (1952) Fertilizability of rabbit ova and the effects of temperature in vitro on their subsequent fertilization and activation in vivo. *J. Exp. Zool.* 121:351-381.

CHAN, S.Y.; FOX, E.J.; CHAN, M.M.; TSOI, W.; WANG, C.; TANG, L.C.; TANG, G.W.; HO, P. (1985) The relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test, routine semen analysis, and the human sperm zona-free hamster ovum penetration assay. *Fertil. Steril.* 44:668-672.

CHAN, S.Y.; CHAN, Y.M.; TUCKER, M.J.; LEONG, M.K.; LEUNG, C.K. (1990) The diagnostic value of seminal adenosine triphosphate (ATP) in an in vitro fertilization (IVF) program. *Andrologia* 22:531-537.

CHECK, J.H.; EPSTEIN, R.; NOWROOZI, K.; SHANIS, B.S.; WU, C.H.; BOLLENDORF, A. (1989) The hypoosmotic swelling test as a useful adjunct to the semen analysis to predict fertility potential. *Fertil. Steril.* 52:159-161.

CHENG, W.T.K. (1985) In vitro fertilization of farm animal oocytes. Ph. D. Thesis. Council for National Academic Awards, Cambridge.

CHOUDHRY, T.M.; BERGER, T.; DALLY, M. (1995) In vitro fertility evaluation of cryopreserved ram semen and its correlation with relative in vivo fertility. *Theriogenology* 43:1195-1200.

CIERESZKO, A.; GLOGOWSKI, J.; STRZEZEK, J.; DEMIANOWICZ, W. (1992) Low stability of aspartate aminotransferase activity in boar semen. *Theriogenology* 37:1269-1281.

CIERESZKO, A.; GLOGOWSKI, J.; DEMIANOWICZ, W.; STRZEZEK, J. (1994) Stimulation of aspartate aminotransferase from farm animal semen by pyridoxal 5' phosphate. *Anim. Reprod. Sci.* 34:327-341.

CLARK, L.K.; SCHINCKEL, A.P.; SINGLETON, W.L.; EINSTEIN, M.E.; TECLAW, R.F. (1989) Use of farrowing rate as a measure of fertility of boars. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 194:239-243.

CLARKE, R.N.; JOHNSON, L.A. (1987) Effect of liquid storage and cryopreservation of boar spermatozoa on acrosomal integrity and the penetration of zona free hamster ova in vitro. *Gamete Res.* 16:193-204.

CODDE, J.M.; BERGER, T. (1995) In vivo fertility of rams in relation to sperm zona pellucida binding and sperm zona pellucida penetration of ovine oocytes. *Theriogenology.* 44:901-906.

CODDINGTON, C.C.; JOHNSON, D.; FULGHAM, D.L.; HERR, J.C.; ALEXANDER, N.J.; HODGEN, G. (1990) Sperm bound to zona pellucida in hemizona assay demonstrate acrosome reaction when stained with T-6 antibody. *Fertil. Steril.* 54:504-508.

CODDINGTON, C.C.; FRANKEN, D.R.; BURKMANN, L.J.; KRUGER, T.F.; HODGEN, G.D. (1991) Functional aspects of human sperm binding to the zona pellucida using the hemizona assay. *J. Androl.* 12:1-8.

COLENBRANDER, B.; KEMP, B. (1990) Factors influencing semen quality in pigs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 40:105-115.

COLENBRANDER, B.; FEITDMAN, H.; GROOTEN, H.J. (1993) Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 48:207-215.

COOPER, T.A.; WANG, S.; LIU, Y.; BUNCH, T.D.; HOLYOAK, G.R. (1996) A new method to evaluate the viability of cryopreserved ram semen using a resazuring reduction assay. *Theriogenology* 45:113.

CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. (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.

COY, P.; MARTINEZ, E.; RUIZ, S.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; MATAS, C. (1993) Sperm concentration influences fertilization and male pronuclear formation in vitro in pigs. *Theriogenology* 40:539-546.

CRABO, B.G.; GRAHAM, E.F. (1972) Correlation between some laboratory methods for evaluation of boar semen after freezing. *7th Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I., Munich*. 2:1639-1641.

CRABO, B.G.; ZIMMERMAN, K.J.; MOORE, R.; THORNBURGH, F.H. (1976) Movement of sodium and potassium into ejaculated boar spermatozoa suspended in seminal plasma and a biological salt solutions. *Bioch. Biophys. Acta*. 144:875-885.

DADOUNE, J.P.; MAYAUX, M.J.; GUIHARD-MOSCATO, M.L. (1988) Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia* 20:211-217.

DE VRIES, A.C.J.; COLENBRANDER, B. (1990) Isolation and characterisation of boar spermatozoa with and without a cytoplasmic droplet. *Int. J. Biochem.* 22:519-524.

DES DAAS, N. (1992) Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim. Reprod. Sci.* 28:87-94.

DEVRIUS, L.O.; ERICSSON, H. (1966) Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp. Cell. Res.* 42:136-156.

DIDION, B.A.; DOBRINSKY, J.R.; GILES, J.R.; GRAVES, C.N. (1989) Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res.* 22:51-57.

DZIUK, P.J. (1994) Physiological limits to litter size. *13th IPVS Congress, Bangkok*. 15-18.

EAGLESOME, M.D.; MILLER, S.A. (1989) Prediction of fertility of bovine semen: preliminary studies with the hamster egg penetration test. *Theriogenology* 31:643-651.

ELIASSON, R.; TREICHL, L. (1971) Supravital staining of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 22:134-137.

ENGLAND, G.C.W.; PLUMMER, J.M. (1993) Hypoosmotic swelling of dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Supp.* 47:261-270.

ERICSSON, S.A.; GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; DOWNING, T.W.; MARSHALL, C.E. (1993) Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology* 39:1009-1024.

EVENSON, D.P.; DARZNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. (1980) Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 240:1131-1134.

EVENSON, D.P.; PARKS, J.E.; KAPROTH, M.T.; JOST, L. (1993) Rapid determination of sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry. *J. Dairy Sci.* 76:86-94.

EVENSON, D.P.; THOMPSON, L.; JOST, L. (1994) Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* 41:637-651.

FAZELI, A.R.; STEENWEG, W.; BEVERS, M.M.; BRACHER, V.; PARLECLIET, J.; COLENBRANDER, B. (1993) Use of sperm binding to homologous hemizona pellucida to predict stallion fertility. *Equine Vet. J. Suppl.* 15:57-59.

FAZELI, A.R.; HOLT, C.; STEENWEG, W.; BEVERS, M.M.; HOLT, W.V.; COLENBRANDER, B. (1995) Development of a sperm hemizona binding assay for boar semen. *Theriogenology* 43:17-27.

FLOWERS, W.L.; ESBENSHADE, K.L. (1993) Optimizing management of natural and artificial mating in swine. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 48: 217-228.

FOOTE, R.H. (1988) Preservation and fertility prediction of spermatozoa. *11th Int. Congr. Anim. Reprod & A.I.* 5:127-134.

FOXCROFT, G.R.; XU, X.; SETH, P.C.; HARBISON, D.S.; CHEUNG, A.P. (1995) Semen dilution for assessment of boar ejaculate quality in pig IVM and IVF systems. *Theriogenology* 53(1):212.

FRASER, L.R. (1995) Ionic control of sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7:905-925.

FRASER, L.R.; ABEYDEERA, L.R.; NIWA, K. (1995) Ca²⁺ Regulating mechanism that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol. Reprod. Dev.* 40:233-241.

GALLI, A.; BASETTI, M.; BALDUZZI, D.; MARTIGNONI, M.; BORNAGHI; MAFFII, M. (1991) Frozen bovine semen quality and bovine cervical mucus penetration test. *Theriogenology.* 35:837-844.

GALLI; A.; BOSISIO, M. (1988) Quality of semen stored at +15/16 °C is related to fertility of artificially inseminated swine. *Theriogenology.* 30:1185-1190.

GARCÍA, C. (1992) Viabilidad del semen congelado de morueco. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

GARCIA, C.; BERROCAL, F.; ANDUGAR, J.; SANCHEZ, R.; GARCIA, P.; MARTIN, S. (1989) Fertility results between ORT groups using mixed boar semen. *3th Int. Conf. Pig Reprod.* 26. Abstract.

GARCIA, C.; FONTANILLAS, J.C.; PEREZ, J.; GARCIA, Y.; MARTIN, S.; PEREZ, T. (1994) Técnicas de tinción espermática. En "Técnicas de contrastación seminal". *Porci* 24:11-18.

GARNER, D.L.; PINKER, D.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. (1986) Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol. Reprod.* 34:127-138.

GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A. (1995) Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol. Reprod.* 53:276-284.

GARNER, D.L.; DOBRINSKY, J.R.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. (1996) Porcine sperm viability, oocyte fertilization and embryo development after staining spermatozoa with SYBR-14. *Theriogenology* 45:1103-1113.

GATTI, J.L.; CHEVRIER, C.; PAQUIGNON, M.; DACHEUX, J.L. (1993) External ionic conditions, internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 98:439-449.

GERFEN, R.W.; WHITE, B.R.; COTTA, M.A.; WHEELER, M.B. (1994) Comparison of the semen characteristics of Fengjing, Meishan and Yorkshire boars. *Theriogenology* 41:461-469.

GRABNER, R.; ELZE, K.; MOLZAHN, E. (1986) Studies into effects of season and average outdoor temperature on productivity and sperm quality of insemination boars. *Mh. Vet. Med.* 41:737-741.

GRAHAM, E.F.; SCHMEHL, M.K.L.; NELSON, D.S. (1980) Problems with laboratory assays. *8th NAAB Tech. Conf AI Reprod.* 1-8.

GRAHAM, E.F.; PACE, M.M. (1967) Some biochemical changes in spermatozoa due to freezing. *Cryobiology.* 4:75-84.

GRAHAM, E.F.; THOMPSON, L.; NEVILLE, W. (1967) Physical, physico-chemical and chemical characteristics of boar semen. University of Minnesota. 3-11.

GRANT, S.A.; LONG, S.E.; PARKINSON, T.J. (1994) Fertilizability and structural properties of boar spermatozoa prepared by Percoll gradient centrifugation. *J. Reprod. Fertil.* 100:477-483.

GRAULE, B.; BRAUN, J.; STOLLA, R. (1995) Binding of spermatozoa to bovine oocytes and their penetration rates in a homologous IVF system. *Theriogenology* 53:224. Abstract.

GRILLO, J.M. (1991) Fecondance du esperme. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.* 20:19-25.

GWATKIN, R.B.L.; COLLINS, J.A.; JARRELL, J.F.; KOHUT, J. y MILNER, R.A. (1990) The value of semen analysis and sperm function assays in predicting pregnancy among infertile couples. *Fert. Steril.* 53:693-699.

HAMMERSTEDT, R.H. (1996) Evaluation of sperm quality: Identification of the subfertile male and courses of action. *Anim. Reprod. Sci.* 42:77-87.

HAMMITT, D.G.; MARTIN, P.A. (1989) Correlations among assays of porcine semen quality following cryopreservation. *Theriogenology* 32:369-384.

HAMMITT, D.G.; MARTIN, P.A.; CALLANAN, T. (1989) Correlations between heterospermic fertility and assays of porcine seminal quality before and after cryopreservation. *Theriogenology* 32:385-399.

HANADA, A.; CHANG, M.C. (1976) Penetration of hamster and rabbit zona-free eggs by rat and mouse spermatozoa with special reference to sperm capacitation. *J. Reprod. Fertil.* 46:239-241.

HANADA, A.; CHANG, M.C. (1978) Penetration of zona-free or intact eggs by foreign spermatozoa and the fertilization of deer mouse eggs in vitro. *J. Exp. Zool.* 203:277-285.

HARRISON, R.A.P. (1996) Capacitation mechanisms and role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 8:581-594.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. (1990) Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 88: 343-352.

HARRISON, R.A.P.; MAIRET, B.; MILLER, N.G.A. (1993) Flow cytometric studies of bicarbonate-mediated Ca^{2+} influx in boar sperm populations. *Mol. Reprod. Dev.* 35:197-208.

HASHIZUME, T.; TANIMURA, I.; KANEMATSU, S. (1990) Morphological changes of the acrosome in boar spermatozoa during and after cell death. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 36:35-39.

HIDIROGLOU, M. (1984) Zinc in mammalian sperm: A review. *J. Dairy Sci.* 67:1147-1156.

HINTING, A.; SCHOONJANS, F.; COMHAIRE, F. (1988) Validation of a single-step procedure for the objective assessment of sperm motility characteristics. *Int. J. Androl.* 11:277-287.

HOFMANN, R.; LEHMER, A.; GURSTER, E. y HARTUNG, R. (1992) Adenosine triphosphate and adenosin diphosphate in human semen: correlation with sperm count and motility. *Urol. Int.* 48:391-394.

HOLT, W. (1982) Epididymal origin of a coiled-tail sperm defect in a boar. *J. Reprod. Fert.* 64:485-489.

HOWARD, J.; BUSH, M.; WILDT, D.E. (1991) Teratospermia in domestic cats compromises penetration of zona free hamster ova and cat zonae pellucidae. *J. Androl.* 12:36-45.

HOWARD, T.H. ; PACE, M.M. (1988). Seminal evaluation and artificial insemination. En: *Fertility and infertility in veterinary practice*. Eds.: Laing, J.A., Morgan, W.J., Wagner, W.C.. Baillière Tindall. London. U.K. 39-51.

HUNTER, R.H.F. (1980) Mating, sperm transport in the female genital tract and artificial insemination. En: *Physiology and technology of reproduction in female domestic animals*. Eds.: Hafez, E.S.E., Academic Press Inc., London 122-126.

HURTGEN, J.P. (1986) Mating systems and boar management. En: *Current therapy in theriogenology*. Eds.: Morrow, D.A. 978-980.

IMAI, H.; NIWA, K.; IRITANI, A. (1977) Penetration in vitro of zona free hamster eggs by ejaculated boar spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 51:495-497.

IMAI, H.; NIWA, K. IRITANI, A. (1980) Ultrastructural observations of boar spermatozoa penetrating zona-free hamster eggs. *Biol Reprod.* 23:481-486.

IRITANI, A.; NIWA, K.; IMAI, H. (1978) Sperm penetration in vivo of follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.* 54:379-383.

IVANOVA, M.; MOLLOVA, M. (1993) Zona-penetration in vitro test for evaluating boar sperm fertility. *Theriogenology* 40:397-410.

IYER, S.K.; DARON, H.H.; AULL, J.L. (1988) Purification and properties of alkaline phosphatase from boar seminal plasma. *J. Reprod. Fert.* 82:657-664.

JEULIN, J.; FENEUX, D.; SERRES, C.; JOUNNET, P.; GUILLET-ROSSO, F.; BELAISCH-ALLART, J.; FRYDMAN, R.; TESTART, J. (1986) Sperm factors related to failure of human in vitro fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 76:735-744.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PÉREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J.D. (1984). Development of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.* 70: 219-228.

JEYENDRAN, R.S., VAN DER VEN, H.H.; ROSECRNAS, R.; PÉREZ-PELAEZ, M., AL-HASANI, S.; ZANEVELD, L.J.D. (1989) Chemical constituents of human seminal plasma: Relationship to fertility. *Andrologia* 21(5).423-428.

JOHNSON, L.A.; AALBERS, J.G.; GROOTEN, H.J.G. (1988) Artificial insemination of swine: Fecundity of boar semen stored in Beltsville TS (BTS), Modified Modena (MM), or MR-A and insemination on one, three and four days after collection. *Zuchthyg.* 23:49-55.

KÄHN, W. (1986) A biochemical methodology of semen analysis- the determination of ATP, ADP and AMP by the bioluminiscent procedure. *Proc. Int. Congr. "Fertility laboratory techniques II", Bergamo*, 125-130.

KAPLAN, M.; RUSSELL, L.D.; PETERSON, R.N.; MARTAN, J. (1984) Boar sperm cytoplasmic droplets: their ultrastructure, their numbers in the epididymis and at ejaculation and their removal during isolation of sperm plasma membranes. *Tissue Cell* 16:455-468.

KORDAN, W.; STRZEZEK, J. (1992) The influence of the sperm motility inhibiting factor (SMIF) from boar seminal on the ATP and cAMP contents in spermatozoa. *Applied Biol. Communications*. 2:285-292.

KOSOWER, N.S.; KATAYOSE, H.; YANAGIMACHI, R. (1992) Thiol-disulfide and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J. Androl* 13:342-348.

KOVACS, A.; FOOTE, R.H. (1992) Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotechnic & Histochem.* 67:119-124.

KRUGER, T.F.; MENKVELD, R.; LOMBARD, C.J.; VAN der MERWE, J.P.; VAN ZYL, J.A.; SMITH, K. (1986) Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 46:1118-1123.

KVIST, U. (1980) Sperm nuclear chromatin decondensation ability. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 486.

LARSSON, K. (1985) Boar sperm viability after freezing and thawing. En: *Deep Freezing of Boar Semen*. Eds.: Johnson, L.A. y Larsson, K. Swedish Univ. Agric. Sci., Uppsala. 177-188.

LARSSON, K. (1986) Evaluation of boar semen. En: *Current therapy in theriogenology*. Eds.: Morrow, D.A.. 972-975.

LASLEY, J.. ESALEY, G.T. y MCKENZIE, F.F. (1942) A staining method for the differentiation of live and dead spermatozoa. *Anat. Rec.* 82:167.

LEE, H.T.; LIM, J.G.; CHUNG, B.H.; KIM, N.H.; CHUNG, K.S. (1996) Effects of extracellular potassium concentration on acrosome reaction, polyspermy and pronuclear formation during in vitro fertilization in the pig. *13th Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I.* P8-14.

LINDEMANN, C.B.; KANOUS, K.S. (1989) Regulation of mammalian sperm motility. *Archives of Andrology* 23:1-22.

LIU, D.Y.; BAKER, H.W.G. (1988) Relationships between human sperm acrosin, acrosomes, morphology and fertilization in vitro. *Human Reprod.* 5:298-303.

MAHI, C.A.; YANAGIMACHI, R. (1975) Induction of nuclear decondensation of mammalian spermatozoa in vitro. *J. Reprod. Fert.* 44:293-296.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. (1981) Male reproductive function and semen. Ed: Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York.

MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P.; THIBIER, M.; THIBAUT, C. (1990) Evaluation of bull semen fertility by homologous in vitro fertilization test. *Reprod. Nutr. Dev.* 30:259-266.

MARTIN, S. (1984) How AI is progressing in Spain. *Pig Int.* May: 24-28.

MARTIN, S.; SANCHEZ, R.; SAIZ, F.; PEREZ, C.; GARCIA, P.; ALIAS, E. (1990) Correlation of the osmotic resistance test (ORT) with a simplified osmotic test of boar spermatozoa. *11th IPVS Congress, Lausanne* 483.

MARTINEZ, E.; ANDUGAR, J.; MARTIN, S. (1984) Puesta en marcha de la I.A. en una granja con 3.000 reproductoras. Estudio comparativo con la monta natural. *Anaporc* 20:17-24.

MARTINEZ, E.; RUIZ, S.; SEBASTIAN, J.; SANCHEZ, R.; GARCIA, C.; MARTIN, S. (1986) Factores que afectan a la inseminación artificial porcina. *An. Vet. (Murcia)*. 2:115-120.

MARTINEZ, E.; RUIZ, S.; ROCA, J.; VAZQUEZ, J.M.; COY, P. (1992a) Nuevas técnicas en contrastación seminal porcina. *Med. Vet.* 9:71-83.

MARTINEZ, E.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; RUIZ, S. (1992b) Use of real-time ultrasonic scanning for the detection of reproductive failure in pig herds. *Anim. Reprod. Sci.* 29:53-59.

MARTINEZ, E.; VAZQUEZ, J.M.; MATAS, C.; ROCA, J.; GADEA, J.; COY, P. (1993) Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Theriogenology* 40:547-557.

MARTINEZ, E.; VAZQUEZ, J.M.; MATAS, C.; GADEA, J.; ALONSO, I.; ROCA, J. (1996) Oocyte penetration by fresh or stored diluted boar spermatozoa before and after in vitro capacitation treatments. *Biol. Reprod.* 55:134-140.

MASHIACH, R.; FISCH, B.; ESLTES, F.; TADIR, Y.; OVADIA, J.; BARTOOV, B. (1992) The relationship between sperm ultrastructural features and fertilizing capacity in vitro. *Fertil. Steril.* 57:1052-1057.

MATAS, C. (1996) Analisis mediante citometría de flujo de la respuesta de los espermatozoides de verraco a diferentes medios de incubación. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.

MATAS, C.; MARTINEZ, E.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; GADEA, J. (1996) In vitro penetration assay of boar sperm fertility: effect of various factors on the penetrability of immature pig oocytes. *Theriogenology* 46:503-513.

MATTIOLI, M.; GALEATI, G.; BACCI, M.L.; SEREN, E. (1988) Follicular factors influence oocyte fertilizability by modulating the intercellular cooperation between cumulus cells and oocytes. *Gamete Res.* 21:223-232.

MATTIOLI, M.; GALEATI, G.; BACCI, M.L. Y SEREN, E. (1989) Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 31:1201-1207.

MATTIOLI, M.; GALEATI, G.; SEREN, E. (1990) Use of stored zonae pellucidae for the assessment of the fertilizing capacity of boar sperm. *11th IPVS Congr., Lausanne* 48. Abstract.

MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; LUCIDI, P.; SEREN, E. (1996) Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. *Theriogenology* 45:373-381.

McCLURE, R.D.; TOM, R. (1991) Human sperm hypo-osmotic swelling test: Relationship to sperm fertilizing ability. *Int. J. Fertil.* 36:360-366.

NAGAI, T. (1994) Current status and perspectives in IVM-IVF of porcine oocytes *Theriogenology* 41: 73-78.

NAGAI, T. (1996) In vitro maturation and fertilization of pig oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 42:153-163.

NAGAI, T.; TAKAHASHI T.; MASUDA, H.; SHIOYA, Y.; KUWAYAMA, M., FUKUSHIMA, M. IWASAKI, S.; HANADA, A. (1988) In vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 84:585-591

NEMESJANOVA, T.N. (1936) The potassium, sodium, calcium of semen and accessory secretions of the boar. Citado por Graham y cols. 1967.

NIWA, T.; ITO, K.; LOO, L. HASHIZUME, T. (1981) Studies on the deep freezing storage of boar semen by pelleting method. *Bull Lab Iwate Univ.* 1:68-84.

OBONYO, M.; LOSETH, K.J.; CRABO, B.G. (1992) Relation between the fertility of frozen boar semen and semen quality measured as sperm motility and with glass wool/Sephadex filters. *12th Int. Congr. Anim. Reprod.* 505-507.

PACE, M.M. (1980) Fundamentals of assay of spermatozoa. *Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I., Madrid,* 1:133-146.

PACE, M.M., SULLIVAN, J.J. , ELLIOTT, F.I., GRAHAM, E.F.; COULTER, G.H. (1981) Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal

quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 0'5 ml. french straws. *J. Anim. Sci.* 53: 693-701.

PARRISH, R.F.; POLAKOSKI, K.L. (1981) Stimulation of proteolytic activity of boar sperm acrosin by divalent metal ions. *J. Reprod. Fertil.* 62:417-422.

PETZOLDT, R.; NEHRING, H. (1986) Ion levels in spermatozoa and seminal plasma of boar and ram. *Arch. exper. Vet. med., Leipzig* 40: 469-477.

PHILPOTT, M. (1993) The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Br. vet. J.* 149:339-369.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. (1974). Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology* 1: 638-641.

PURSEL, V.G.; REXROAD, C.E.; WALL, R.J. (1984) Relationship of competitive fertility to quality of boar semen. *Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem.* 2:63-65.

QUINTÍN, F.J. (1997) Estudio in vitro de la calidad de semen bovino congelado y conservado durante amplios periodos de tiempo. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.

REVELL, S.G.; CHASEY, S. (1988) Morphological defects of acrosome in boar spermatozoa. *Res. Vet. Sci.* 45:149-151.

REVELL, S.G.; MRODE, R.A. (1994) An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36:77-86.

ROCA, J.; MARTINEZ, E.; VAZQUEZ, J.M.; CAMPOS, Y.; LUCAS, X. (1997) Suitability of the brilliant cresyl blue test for the selection of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assays. *Theriogenology* (en prensa).

RODRIGUEZ, J.E.; MONSERRAT, A.; RIGAU, T. (1994) Efectos de la ouabaina sobre la respuesta en un medio hipoosmótico de espermatozoides de perro y verraco. *7^{as} Jornadas Int. Reprod. Anim., Murcia.* 130.

ROGERS, B.J. (1985) The sperm penetration assay: its usefulness re-evaluated. *Fertil. Steril.* 43:821-840.

ROSENBUSCH, B.; STERZIK, K. (1991) Sperm chromosome and habitual abortion. *Fertil. Steril.* 56:370-372.

SAACKE, R.G. (1984). Semen quality: Importance of and influencing factors. *Proc. 10th Tech. Conf. A.I. Reprod.* 30-36.

SAACKE, R.G.; MARSHALL, C.E.; VINSON, W.E.; O'CONNOR, M.L.; CHANDLER, J.E.; MULLINS, K.J.; AMANN, R.P. (1980) Semen quality and

heterospermic insemination in cattle. *Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem.* 5:75-78.

SAACKE, R.G.; NEBEL, R.L.; KARABINUS, D.S.; BAME, J.H.; MULLINS, J. (1988). Sperm transport and accessory sperm evaluation. *Proc. 12th Tech. Conf. A.I. Reprod.* 7-14.

SAACKE, R.G., NADIR, S.; NEBEL, R.L. (1994) Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization and embryo quality in ruminants. *Theriogenology* 41:45-50.

SAIZ, F.; DE ALBA, C.; MARIGORTA, P.; CORCUERA, B.D.; MARTIN, S. (1994) Estudio de la calidad del semen del verraco a través de la evaluación de parámetros bioquímicos. En: "*Técnicas de contrastación seminal*". Porci nº 24. 57-76.

SALISBURY, G.W.; VANDEMARK, N.L. (1961) Physiology of reproduction and artificial insemination in cattle. Ed: Freeman, W.H.. San Francisco. 361.

SALISBURY, G.W.; VAN DEMARK, N.L.; LODGE, J.R. (1978) Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. Freeman & Company, San Francisco, 313

SANCHEZ, J.; GONZALEZ, J.; ILLERA, M.J.; LORENZO, P.L., ORENSANZ, L.M. (1996) (H³) Heparin binding in boar spermatozoa: Characterization and correlation with routine semen quality parameters. *Biol. Reprod.* 55:860-867.

SCHRADER, S.M.; PLATEK, S.F.; ZANEVELD, L.J.D.; PEREZ-PELAEZ, M.; JEYENDRAN, R.S. (1986) Sperm viability: A comparison of analytical methods. *Andrologia* 18:530-538.

SCHILLING, E.; VENGUST, M; SMIDT, D. (1984) ORT A new test to predict the freezability and storage of boar spermatozoa. *8th IPVS Congr.* 296. Abstract.

SCHILLING, E.; VENGUST, M. (1987) Frequency of semen collection in boars and quality of ejaculates as evaluated by the osmotic resistance of acrosomal membranes. *Anim. Reprod. Sci.* 12:283-290.

SCHWARTZ, D., MCDONALD, P.D.M.; HEUCHTEL, V. (1981) On the relationship between the number of spermatozoa and the probability of conception. *Reprod. Nutr. Devel.* 21: 979-988.

SHANIS, B.S.; CHECK, J.H.; BOLLENDORF, A. (1989) Interpretation and misinterpretation of semen parameters. *Archives of Andrology.* 23:213-217.

SIRARD, M.A.; DUBUC, A.; BOLAMBA, D.; ZHENG, Y.; COENEN, K. (1993) Follicle-oocyte-sperm interactions in vivo and in vitro in pigs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 48:3-16.

SÖDERQUIST, L.; LARSSON, K. (1985) Relationship between ATP content and post thaw motility in bull semen. *Acta vet. scand.* 26:308-312.

SÖDERQUIST, L.; STALHAMMAR, E.M. (1991) Relation between ATP content and motility in bovine spermatozoa with reference to the effects of the bull and the A.I. centre. *Acta vet. scand.* 32:353-359.

SÖDERQUIST, L.; JANSON, L.; LARSSON, K.; EINARSSON, S. (1991a) Sperm morphology and fertility in A.I. Bulls. *J. Vet. Med.* 38:534-543.

SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. y JANSON, L. (1991b) Post-thaw motility, ATP content and cytochrome c oxidase activity of A.I. bull spermatozoa in relation to fertility. *J. Vet. Med. A.* 38:165-174.

SOEDE, N.M.; WETZELS, C.C.H.; ZONDAG, W.; de KONING, M.A.I.; KEMP, B. (1995) Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. *J. Reprod. Fert.* 104:99-106.

SOLANILLA, E. (1992) Variaciones estacionarias de la calidad seminal, valorada a través del test de endósmosis (hypoosmotic swelling test), en sementales bovinos. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

STALLCUP, O.T. (1965) Acid and alkaline phosphatase activity in bovine semen as related to fertility. *J. Dairy. Sci.* 48:752-754.

STAUSS, C.R.; VOTTA, T.J.; SUAREZ, S.S. (1995) Sperm motility hiperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol. Reprod.* 53:1280-1285.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. (1980). Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. Ed. McGraw-Hill. New York.

STRZEZEK, J.; SKAWETA, R. (1984) Application of chosen biochemical indexes for biological quality of boar semen stored at 15-18 C. *10th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Urbana, IL* 2:67-69.

SWARUP, D.; SEKHON, H. (1976) Correlation of vitamin A and zinc concentration of seminal plasma to fertility to bovine semen. *Nutr. Reprod. Int.* 13:37.

TALBOT, P.; CHACON, R.S. (1980) A new procedure for rapidly scoring acrosome reaction of human sperm. *Gamete Res.* 3: 211- 216.

TEJADA, R.I.; MITCHELL, J.C.; NORMAN, A.; MARIK, J.J.; FRIEDMAN, S. (1984) A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange fluorescence. *Fert. Steril.* 42:87-91.

TERQUEM, A.; DADOUNE, J.P. (1983) Aniline blue staining of human spermatozoon chromatin. Evaluation of nuclear maturation. En: *The sperm cell*. Ed: J. André. Martinus Nijhoff Publishers. La Haya. 249-252.

TOYAMA, Y.; ITOH, Y. (1993) Ultrastructural features and pathogenesis of knobbed spermatozoa in a boar. *Am. J. Vet. Res.* 54:743-749.

TRUITT-GIBERT, A.J.; JOHNSON, L.A. (1980) The crater defect in boar spermatozoa : a correlative study with transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, and light microscopy. *Gamete Res.* 3:259-266.

UPADHAYAYA, M.; HIBBARD, B.M.; WALKER, S.M. (1986) Seminal acid phosphatase in relation to fertility. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 65:49-52.

VAN DER VEN, H.H.; JEYENDRAN, R.S.; AL-HASANI, S.; PÉREZ-PELAEZ, M.; DIETRICH, K.; ZANEVELD, L.J.D. (1986) Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (Hypoosmotic swelling Test) and in vitro fertilization. *J.Androl.* 7:196.

VAN DUIJN, C. (1964) Relationship between spermatozoon numbers and fertility. *Int. J. Fert.* 9:609-612.

VARNER, D.D.; WARD, C.R.; STOREY, B.T.; KENNEY, R.M. (1987) Induction and characterization of acrosome reaction in equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 48:1383-1389.

VAZQUEZ, I. (1980) Nuevos métodos de valoración del semen en reproductores ovinos y porcinos. Tesis Doctoral. Universidad de León.

VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.; ROCA, J.; COY, P.; RUIZ, S. (1992) Use of triple stain technique for simultaneous assessment of vitality and acrosomal status in boar spermatozoa. *Theriogenology* 38:843-852.

VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.; ROCA, J.; COY, P.; PASTOR, L.M. (1993) Acrosome reaction of boar spermatozoa in homologous in vitro fertilization. *Mol. Reprod. Develop.* 36:84-88.

VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.; PASTOR, L.M.; ROCA, J.; MATAS, C.; 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 histochem. (Jena)* 98:93-100.

VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.; MARTINEZ, P.; ROCA, J. (1997a) Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa and its relation to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology* 47:913-922.

VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.; MATAS, C.; ROCA, J. (1997b) Effect of progesterone on unwashed and non-preincubated boar spermatozoa in homologous in vitro fertilization. *Theriogenology* 47:263. Abstract.

WABERSKI, D.; DIRKSEN, G.; WEITZE, K.F.; LEIDING, C.; HANG, R. (1990) Effect of sperm motility and morphology on the fertility of AI boars in a field trial. *Tierärztl. Prax.* 18:591-594.

WABERSKI, D.; WEITZE, K.F.; LIETMANN, C.; LÜBBER zur LAGE, W.; BORTOLOZZO, F.P.; WILLMEN, T.; PETZOLDT, R. (1994a) The initial fertilizing capacity of long-term-stored liquid boar semen following pre- and post-ovulatory insemination. *Theriogenology* 41:1367-1377.

WABERSKI, D.; WEITZE, K.F.; GLEUMES, T.; SCHWARZ, M.; WILLMEN, T.; PETZOLDT, R. (1994b) Effect of time of insemination relative to ovulation on the fertility with liquid and frozen boar semen. *Theriogenology* 42:831-840.

WANG, W.H.; ABEYDEERA, L.R.; FRASER, L.R.; NIWA, K. (1995) Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J. Reprod. Fert.* 104:305-313.

WILHELM, K.M.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. (1996) Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. *Theriogenology* 46:559-578.

WILKINSON, H.; HOWE, P. (1992) Systat for Windows 5.0. Evanston, IL: SYSTAT, Inc.

WOELDERS, H. (1991) Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. En: *Boar semen preservation II*. Eds.: Johnson, L.A. y Rath, D. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg. 145-164.

WOOD, P.D.; FOULKES, J.A.; SHAW, R.C.; MELROSE, D.R. (1986) Semen assessment, fertility and the selection of Hereford bulls for use in artificial insemination. *J. Reprod. Fertil.* 76:783-795.

XU, X.; DING, J.; SETH, P.C.; HARBISON, D.S.; FOXCROFT, G.R. (1996) In vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes: effects of boar and ejaculate fraction. *Theriogenology* 45:745-755.

YANAGIMACHI, R. (1981) Mechanisms of fertilization in mammals. En: *Fertilization and embryonic development in vitro*. Ed.: Mastroianni, L.; Biggers, J.D. Plenum Press, New York. 81-182.

YANAGIMACHI, R. (1984) Zona free hamster eggs: their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gamete Res.* 10: 187-232.

YANAGIMACHI, R. (1994) Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 2:371-372.

YANAGIMACHI, R.; YANAGIMACHI, H.; ROGERS, B.J. (1976) The use of zona free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 15:471-476.

ZANEVELD, L.J.D. (1976) Sperm enzyme inhibitors as antifertility agents. En: *Human semen and fertility regulation in men*. Ed: Hafez, E.S.E.. C.V. Mosby Co, St Louis, 570-582.