

Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial

R. Muiño*, M. Fernández*, H. Areán*, J.L. Viana*, M. López*,
A. Fernández*, A.I. Peña**

*Centro de Selección y Reproducción Animal de Galicia. Xenética Fontao, S.A., Fontao-Esperante, Apdo 128. 27080 Lugo. E-mail: xeneticfontao.agri@xunta.es

**Departamento de Patología Animal. Reproducción y Obstetricia. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 27002 Lugo.

Resumen

La fertilidad potencial de una muestra de semen probablemente va a depender de que contenga un número suficiente de espermatozoides viables, morfológicamente normales y funcionalmente competentes, capaces de alcanzar el oviducto y de establecer un reservorio oviductal, de llevar a cabo la fecundación del ovocito, y de contribuir al desarrollo embrionario. La evaluación del semen mediante técnicas *in vitro*, si ha de tener algún valor predictivo de su capacidad fecundante *in vivo*, debería incluir el estudio de tantas características espermáticas como sea posible, especialmente cuando se trata de dosis de semen congelado o cuando se están evaluando nuevos métodos de criopreservación. Los nuevos sistemas computerizados para el análisis de la motilidad y de la morfometría espermática, junto con las tecnologías de fluorescencia, permiten adquirir, de forma rápida y objetiva, datos precisos sobre múltiples parámetros relativos a características estructurales y funcionales de los espermatozoides. Además, el uso de tests basados en la fecundación *in vitro* (FIV) permite obtener una valiosa información sobre la capacidad de los espermatozoides para reconocer e interactuar con los ovocitos.

En el presente artículo se revisan, aunque no de forma exhaustiva, algunas de las metodologías aplicables *in vitro* para valorar la capacidad fecundante del semen bovino, atendiendo al estudio de algunos atributos espermáticos que son útiles para valorar su capacidad funcional.

Palabras clave: Bovino, Semen, Motilidad, Morfología, Funcionalidad espermática

Summary

New technologies applied to processing and evaluation of bovine semen in artificial insemination centers

The potential fertility of a semen sample will probably depend on that a sufficient number of viable, morphologically normal and functionally competent spermatozoa reach the oviducts and establish an oviductal reservoir, accomplish normal fertilization, and contribute to sustain embryo development. *In vitro* sperm evaluation, to have any predictive value of its fertility potential *in vivo*, should include the assessment of as many morphological and functional sperm characteristics as possible, especially for the evaluation of frozen-thawed spermatozoa and of new methods for semen cryopreservation. The new computerized systems for sperm motility and morphometry analysis, and fluorescence technologies, enable multiple and objective measurements of structural and functional sperm parameters to be acquired in a short time. In addition, assays based on *in vitro* fertilization provide valuable information about the functional ability of spermatozoa when interacting with the oocytes.

In the present work some of the *in vitro* methods currently used for bovine sperm evaluation are reviewed, though not exhaustively, covering some attributes of the sperm cell that are useful in estimating its functional ability.

Key words: Bovine, Semen, Motility, Morphology, Sperm functionality

Introducción

Durante las últimas décadas, la inseminación artificial (IA) ha demostrado ser la tecnología reproductiva que más ha contribuido a acelerar el progreso genético de las diferentes especies ganaderas, especialmente del ganado vacuno de aptitud láctea; sin embargo, el éxito de esta tecnología depende de que el semen utilizado mantenga su poder fecundante tras ser diluido y congelado.

Uno de los objetivos prioritarios de la industria de la IA ha sido la predicción de la capacidad fecundante del semen comercializado; de esta forma se han ido sucediendo a lo largo del tiempo diferentes métodos diagnósticos, desde la evaluación de la motilidad, volumen, concentración y morfología espermática de los eyaculados hasta la contrastación de dosis de semen bovino congelado mediante sistemas de análisis computerizado, citometría de flujo y tests de funcionalidad espermática basados en la fecundación *in vitro*.

Entre los inconvenientes de las técnicas clásicas utilizadas para evaluar la calidad seminal se pueden citar por un lado, la subjetividad de las mismas, puesto que los resultados dependen en gran parte de la experiencia y habilidad del técnico, y además, el número de células analizadas en cada muestra suele ser pequeño y por tanto no representativo de la población espermática. Por otra parte, la mayoría de las tinciones para microscopía óptica empleadas tradicionalmente para la evaluación espermática, requieren el uso fijadores, como formaldehído o glutaraldehído, que suelen interferir con los diluyentes utilizados para la congelación, dificultando enormemente el análisis. Por tanto, estas técnicas no son adecuadas para la evaluación de semen congelado.

Aunque no existe ningún método que por sí mismo sea capaz predecir la capacidad

fecundante del semen (Rodríguez-Martínez et al., 1997), las modernas técnicas automatizadas son fiables, de fácil ejecución y elevada repetibilidad, por lo que permiten estandarizar y objetivar la contrastación espermática.

Evaluación del eyaculado bovino

Motilidad

Para que un espermatozoide sea capaz de fecundar a un ovocito ha de reunir una serie de requisitos, entre ellos, tener motilidad progresiva. Dicho parámetro ha sido y sigue siendo el más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis seminal. El movimiento activo de los espermatozoides es imprescindible para la colonización del oviducto durante la fase de transporte espermático sostenido en el tracto genital de la hembra, y para que tenga lugar la fecundación. Además, la motilidad es una manifestación de viabilidad espermática y de integridad celular. Un eyaculado con un porcentaje bajo de espermatozoides móviles, o ausencia de motilidad, automáticamente será descartado para el procesado posterior (Den Daas, 1992; Holt y Van Look, 2004).

La motilidad espermática normalmente se valora de forma subjetiva, mediante la observación de una muestra de semen con un microscopio de contraste de fases y platina a 37 °C. En el eyaculado de los rumiantes, dada su elevada concentración espermática, se puede valorar la motilidad masal, definida como el movimiento en remolinos del total de espermatozoides de la muestra. Normalmente la motilidad masal se valora de forma subjetiva en una escala de 0 a 5, con una puntuación de 5 cuando se observan oleadas o remolinos con movimiento rápido y vigoroso, y de 0 cuando no se observa movimiento en ondas. Tras la dilu-

ción del eyaculado, o la descongelación de dosis de semen congelado, se estima el porcentaje de espermatozoides individuales que están en movimiento y el tipo de movimiento que realizan (progresivo o no progresivo). Las dosis descongeladas con una motilidad progresiva inferior al 40% (NAAB, 1986) se descartan para la IA.

La valoración visual de la motilidad espermática es el método más simple, rápido y barato. Sin embargo, es altamente subjetivo puesto que los resultados obtenidos dependen en gran parte de la habilidad y experiencia del técnico que evalúa la muestra (Rodríguez-Martínez, 2000; Phillips et al., 2004), y además, si se trabaja con muestras muy concentradas se tiende a sobrestimar el porcentaje de espermatozoides móviles. Por tanto, no es un método que, de forma fiable y repetible, permita predecir la capacidad fecundante de una muestra de semen (Saacke y White, 1972; Linford et al., 1976). La valoración de la motilidad como único parámetro de calidad seminal no es suficiente para predecir la capacidad fecundante del semen (Liu y Foote, 1998), es sólo uno de los requisitos que ha de cumplirse, de ahí que la correlación existente entre la motilidad de una muestra de semen y su fertilidad real, aunque significativa, sea baja (Kjaestad et al., 1993).

Volumen y concentración

El cálculo del volumen y de la concentración de espermatozoides del eyaculado debe hacerse de forma precisa, ya que de estos dos parámetros va a depender el número de dosis seminales que pueden elaborarse a partir de un eyaculado. El volumen debe calcularse mediante pesada y transformación posterior de este valor mediante el factor de densidad correspondiente (Van Camp, 1997; Howard y Pace, 1998). La comprobación del volumen directamente en un

tubo graduado, aunque de uso frecuente, suele inducir a error, bien por la presencia de burbujas de aire, que dificultan la observación o por la inexactitud de la propia escala del tubo.

El método más preciso para evaluar la concentración espermática del eyaculado es el recuento de espermatozoides en un hemocitómetro. Este método, para uso rutinario en centros de IA, donde cada día se evalúan un gran número de eyaculados y es necesario agilizar el trabajo, se hace laborioso y lleva tiempo (Boixo, 1996). En estos casos, normalmente se opta por el uso de un espectrofotómetro, que permite estimar de forma indirecta la concentración espermática basándose en la absorción o dispersión de la luz provocada por los espermatozoides en suspensión. La determinación de la concentración espermática mediante un espectrofotómetro es un método rápido y facilita resultados con un margen de error asumible (Catena y Cabodevilla, 1999). El uso del hemocitómetro ha quedado relegado a un segundo plano, empleándose fundamentalmente para obtener la curva de calibración del espectrofotómetro, o en laboratorios en los que se evalúa un reducido número de muestras de semen o bien cuando este proceso se realiza de forma ocasional (Garner, 1997).

En la producción comercial de semen bovino congelado, el número mínimo de espermatozoides por pajuela necesario para obtener la máxima capacidad fecundante se ha establecido en 15 millones, con al menos el 50% de motilidad progresiva post-descongelación (Van Lieshout, 1995). No obstante, las dosis seminales producidas por muchos centros de IA exceden este número mínimo establecido, intentando garantizar la presencia de al menos 10 millones de espermatozoides vivos y con motilidad progresiva en cada dosis seminal. Este número mínimo, para algunos sementales excepcio-

nales, probablemente pueda ser reducido hasta 5 ó 6 millones de espermatozoides vivos por dosis sin un descenso significativo en la fertilidad (Januskaukas et al., 1996), pero estos individuos tendrían que ser identificados. A partir de ese mínimo establecido, por mucho que se incremente la concentración espermática de las dosis seminales no se va a reflejar en un aumento de la fertilidad (Amann y Hammerstedt, 2002).

Morfología

Para una interacción normal del espermatozoide con el microambiente del tracto genital femenino y con las envolturas del ovocito, además de tener motilidad progresiva, los espermatozoides han de ser morfológicamente normales. Cualquier anomalía que afecte a algún atributo del espermatozoide puede dificultar su migración en el tracto genital de la hembra impidiendo la unión con el ovocito (Rodríguez-Martínez, 1999). A medida que aumenta la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, desciende la capacidad fecundante del mismo (Howard y Pace, 1998). Por tanto, se ha de tener muy presente que las muestras de semen con un porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales inferior al 70% (Barth y Oko, 1989) han de descartarse para la congelación.

Se han establecido distintas clasificaciones de las anomalías espermáticas atendiendo a distintos criterios: a) dependiendo de si se originan en el testículo (anomalías mayores) o a lo largo del tránsito epididimal o tras la eyaculación (anomalías menores) (Bloom, 1977; Barth y Oko, 1989); b) de si están asociadas a infertilidad o no (primarias o secundarias, respectivamente) (Milovanov, 1938; Bloom, 1977); o c) de la región espermática implicada (anomalías de la cabeza, de la pieza intermedia o de la pieza principal). Cualquier anomalía, primaria o secundaria,

si afecta a un número elevado de espermatozoides, puede llegar a comprometer la fertilidad del semen. Por ejemplo, si una dosis seminal tiene una motilidad espermática individual entorno al 50%, y contiene un 30% de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales, la alta incidencia de esta morfoanomalía repercutirá negativamente en la fertilidad de esa muestra pese a la buena motilidad del eyaculado. Este defecto es muy común en sementales jóvenes y normalmente su incidencia va disminuyendo a medida que el toro crece y maduran sus órganos sexuales (Amann et al., 2000). Otra anomalía relativamente frecuente son los espermatozoides con la cabeza de forma piriforme. Los espermatozoides con este defecto se observó que presentaban menor capacidad de unión y de penetración de la zona pelúcida, y si conseguían fecundar a algún ovocito, los cigotos resultantes tenían menor capacidad para iniciar su desarrollo y degeneraban a las pocas horas (Thundathil et al., 1999).

Un grupo de anomalías de especial importancia son las que afectan al acrosoma, y entre las más frecuentes se han descrito el acrosoma nudoso y la membrana acrosomal aplanada. Los espermatozoides con acrosoma nudoso se encontraron en el eyaculado de sementales frisonos cuya espermatogénesis estaba alterada y se cree que es un defecto de origen congénito y hereditario (Barth y Oko, 1989). Los eyaculados que contienen espermatozoides con el acrosoma nudoso suelen presentar también otras anomalías espermáticas, lo que compromete aun más la fertilidad del semental (Gran y Dott, 1976). Si el porcentaje de espermatozoides con acrosoma nudoso es elevado, se podría decir que el semental es virtualmente estéril, puesto que los espermatozoides con esta alteración se comprobó que no eran capaces de atravesar las membranas que rodean al ovocito (Thundathil et al.,

2000; 2002). Además, se cree que es un defecto no compensable, es decir, los espermatozoides normales presentes en el mismo eyaculado también tenían menor capacidad fecundante.

Otra anomalía acrosómica es la membrana acrosomal aplanada, que se describió por primera vez en eyaculados de toros frisonos. Se observó que los espermatozoides procedentes de eyaculados bovinos con alta incidencia de esta anomalía podían unirse normalmente a la zona pelúcida del ovocito, y su matriz acrosomal permanecía funcional (Thundathil et al., 2001; Meyer y Barth, 2001). No obstante, no se investigó si los embriones eran viables o por el contrario degeneraban a los pocos días.

Las anomalías que afectan al núcleo espermático, como las vacuolas nucleares, suelen tener una menor incidencia. Thundathil et al. (1998) demostraron que los espermatozoides que presentaban este defecto nuclear se unían con dificultad a la zona pelúcida pero eran capaces de penetrar el citoplasma del ovocito y fertilizarlo, y el embrión formado continuaba su desarrollo hasta la fase de blastocisto.

Otras anomalías más frecuentes en semen bovino, como las colas enrolladas o los plegamientos de la pieza intermedia, si son abundantes en el eyaculado, pueden comprometer la fertilidad del toro, ya que los espermatozoides defectuosos no poseen una motilidad normal y por tanto no van poder alcanzar las proximidades del ovocito (Nothling y Arndt, 1995).

Siempre que aparezcan anomalías en un eyaculado la fertilidad del semental puede verse comprometida, pero realmente no se sabe cuál es el porcentaje máximo de morfoanomalías espermáticas que puede ser compatible con una fertilidad normal. Lo que está demostrado es que existe una correlación negativa entre el número de formas

anormales y la fertilidad del semental (Barth y Oko, 1989; Januskaukas y Žilinskas, 2002).

Contrastación de semen bovino congelado

El método más fiable para determinar la capacidad fecundante de una dosis de semen, o para determinar si un protocolo de congelación funciona bien o no, es, obviamente, la inseminación de un gran número de vacas (Amann, 1989). Sin embargo, las pruebas de fertilidad tienen muchos inconvenientes: son muy costosas, si se utilizan pocas hembras tienen una sensibilidad muy baja, y en situaciones de fertilidad reducida resulta muy difícil identificar cuál es la función espermática afectada. Además, las diferencias cuantitativas suelen estar enmascaradas porque las dosis seminales normalmente contienen mayor número de espermatozoides del que sería necesario para poder observar una respuesta lineal en la fertilidad (Amann y Hammerstedt, 1993, 2002; Saacke, 1982; Saacke et al., 1994). Por otra parte, no hay muchas dudas de que el análisis objetivo, riguroso y simultáneo, de varios parámetros relativos a las características funcionales y morfológicas de los espermatozoides, permite estimar razonablemente bien el potencial fecundante de una muestra de semen (Amann, 1989). Por tanto, no es sorprendente que no se hayan escatimado esfuerzos para el desarrollo de nuevas tecnologías *in vitro*, destinadas al estudio de múltiples características funcionales y morfológicas de los espermatozoides, para intentar predecir la capacidad fecundante del semen de la forma más objetiva posible.

Sistemas de Análisis Computerizado

Desde hace varias décadas numerosos investigadores (Glover, 1968; Katz y Dott, 1975; Amann y Hammerstedt, 1980; Katz y Overs-

treet, 1981; O'Connor et al., 1981) han dedicado mucho trabajo y recursos para intentar eliminar la subjetividad inherente a la evaluación microscópica de la calidad del semen. Fruto de estas investigaciones fue el desarrollo de los sistemas computerizados para el análisis de la motilidad espermática. Desde que se introdujeron en el mercado a principios de los años 80, originalmente para la evaluación de semen humano, los sistemas CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) se han ido perfeccionando y modernizando, a la vez que su precio se fue haciendo más asequible. En consecuencia, comenzaron a utilizarse cada vez con más frecuencia en veterinaria, especialmente en la especie bovina, tanto en el ámbito de la investigación como en el de la industria, en centros de IA.

Un sistema CASA consta de varias unidades interdependientes: un microscopio de contraste de fases conectado a una cámara de vídeo, que envía la imagen desde el microscopio a un monitor de TV. Posteriormente, la imagen es enviada desde el monitor a un ordenador, donde un analizador digital de imagen captura varias fotografías seriadas de cada campo microscópico seleccionado, normalmente en menos de 1 segundo. El software discrimina a los espermatozoides de otras partículas que puedan aparecer en la imagen por su tamaño, y analiza la trayectoria recorrida por cada espermatozoide individual durante esa fracción de segundo. Los programas diseñados para estos equipos incluyen una serie de parámetros descriptores del movimiento espermático que son comunes a todos los CASA (Boyers et al., 1989; Farrell et al., 1995), como por ejemplo:

- **Análisis de motilidad:** Establece una clasificación entre espermatozoides estáticos y móviles, y a su vez los móviles los clasifica según su trayectoria en progresivos y no progresivos (Tuli et al., 1992; Cseh et al., 2004).



- **VCL (Velocidad Curvilínea):** distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real por unidad de tiempo.

- **VSL (Velocidad rectilínea):** distancia recorrida por el espermatozoide entre el primer punto y el último de su trayectoria por unidad de tiempo.

- **VAP (Velocidad Media):** distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de la trayectoria media.

- **LIN (Índice de Linealidad):** es la relación porcentual entre la Velocidad Rectilínea y la Velocidad Curvilínea.

$$\text{LIN} : (\text{VSL} / \text{VCL}) \times 100$$

- **STR (Índice de Rectitud):** es la relación porcentual entre la Velocidad Rectilínea y la Velocidad Lineal.

$$\text{STR} : (\text{VSL} / \text{VAP}) \times 100$$

- **WOB (Índice de Oscilación):** es la relación porcentual entre la Velocidad Lineal y la Velocidad Rectilínea.

$$\text{WOB} : (\text{VAP} / \text{VCL}) \times 100$$

Al final del proceso, el CASA proporciona toda una serie de datos relativos a la velocidad y trayectoria de cada espermatozoide individual, con lo que permite obtener información precisa, objetiva y repetible, sobre el porcentaje de células móviles presentes en la muestra y la calidad media de ese movimiento (Amann, 1989; Anzar et al., 1991). Pero además, permite identificar la existencia de subpoblaciones de espermatozoides con distintos patrones de movimiento que coexisten en la misma muestra de semen (Davis et al., 1995; Holt, 1996; Abai-gar et al., 1999), lo cuál es una visión más real que la motilidad media de la muestra,

puesto que una muestra de semen contiene una población heterogénea de espermatozoides. Esto explicaría, al menos en parte, que no se haya observado correlación entre parámetros medios (por ejemplo VCL, VSL, LIN o ALH) y la fertilidad in vivo de una dosis seminal (Holt y Van Look, 2004).

Además de un estudio minucioso de la motilidad, los sistemas computerizados, también permiten realizar medidas de las dimensiones de la cabeza espermática. Se conocen como sistemas ASMA (Assisted Sperm Morphology Analysis), y están diseñados para realizar medidas del área, perímetro, longitud y anchura de las cabezas espermáticas presentes en una extensión de semen fijada y teñida. Es interesante disponer de los datos morfométricos de las dosis seminales, puesto que se ha comprobado que la morfometría anormal de las cabezas espermáticas influye negativamente en la fertilidad de los seminales bovinos (Gravance et al., 1996).

El uso de sistemas computerizados para la contrastación rutinaria de las dosis seminales ofrece notables ventajas, pero también posee algunos inconvenientes:

- No existe una estandarización y optimización de los equipos y procedimientos empleados en los análisis (Verstegen et al., 2002). Cada laboratorio trabaja con distintos equipos y los "set up" también difieren mucho de unos equipos a otros, lo cual provoca que los resultados facilitados por los distintos centros para los mismos parámetros sean muy dispares. Esto significa que cada laboratorio debe estandarizar su propio equipo y establecer su protocolo de trabajo, teniendo en cuenta que dichos resultados serán únicamente aplicables a las muestras evaluadas con ese equipo en cuestión.

- Los sistemas CASA permiten determinar la concentración espermática de la muestra a analizar. Sin embargo, Verstegen et al. (2002) comprobaron, utilizando muestras de

semen de distintas especies animales, que los CASA tienden a sobreestimar la concentración de espermatozoides de la muestra. Dichos autores atribuyen el error a que, debido a las colisiones espermáticas, el mismo espermatozoide puede ser contabilizado varias veces. Cuanto mayor es la tasa de dilución del semen, los problemas de sobreestimación de la concentración tienden a disminuir puesto que la posibilidad de colisión disminuye.

Citometría de flujo: métodos aplicados al análisis de espermatozoides bovinos

La citometría de flujo es una técnica que permite identificar, cuantificar y separar las distintas subpoblaciones celulares presentes en una muestra de células en suspensión, en función de los distintos patrones de tinción adquiridos tras el marcaje con diferentes colorantes fluorescentes, que se unen a estructuras celulares específicas o se acumulan selectivamente en compartimentos intracelulares.

A lo largo de las dos últimas décadas, la citometría de flujo se ha convertido en una herramienta de gran utilidad para la investigación de poblaciones espermáticas. Se han desarrollado muchos métodos de tinción y combinaciones de fluorocromos, se han comercializado muchos fluorógenos nuevos, que permiten analizar una gran variedad de funciones espermáticas, y como resultado, hoy en día, el uso de esta técnica ofrece la posibilidad de analizar múltiples características espermáticas, simultáneamente en la misma muestra de semen, de una forma rápida, precisa y objetiva. Debido al creciente número de parámetros analizables y al desarrollo de citómetros a un coste accesible, se ha extendido su uso tanto en laboratorios de investigación como en centros de IA.

Entre las características espermáticas más frecuentemente analizadas para el control de calidad del semen bovino se incluyen el estudio de la viabilidad espermática, de la integridad acrosomal y de la funcionalidad mitocondrial, así como la investigación del estado de capacitación de los espermatozoides. Además, la citometría de flujo también permite obtener muestras de espermatozoides sexados, bien para uso en IA o en fecundación *in vitro* (Garner et al., 1983; Pinkel et al., 1985; Johnson et al., 1989).

Análisis de la viabilidad espermática

El estudio de la viabilidad espermática normalmente se basa en el análisis de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides, mediante el uso de dos fluorocromos combinados: uno de ellos sólo es capaz de atravesar las membranas plasmáticas dañadas o degeneradas, y por tanto permite identificar las células muertas o en proceso de degeneración, mientras que el otro es capaz de atravesar membranas celulares intactas y por tanto permite identificar la población de células viables (Garner, 1997).

Uno de los fluorocromos más utilizados para identificar células muertas es el Ioduro de propidio (PI). Este compuesto entra en espermatozoides con la membrana plasmática dañada, se une al núcleo y, al ser excitado por la longitud de onda apropiada (510-560 nm), emite fluorescencia roja. Además del PI, existen otros marcadores fluorescentes específicos para células muertas cuyo mecanismo de acción es similar, como por ejemplo, el Hoechst 33258 (Keeler et al., 1983; Pintado et al., 2000), el bromuro de etidio (Evenson et al., 1982) o la hidroetidina (HED) (Ericsson et al., 1989), entre otros.

Entre los fluorocromos más utilizados para identificar la población de células vivas se encuentra el grupo de las carboxifluoresceínas:

CFDA: diacetato de carboxifluoresceína, (Garner et al., 1988; Harrison y Vickers, 1990), CMFDA: diacetato de carboximetilfluoresceína, (Garner et al., 1986) o CDMFDA: diacetato de carboxidimetilfluoresceína (Ericsson et al., 1990), que son compuestos no fluorescentes capaces de atravesar membranas celulares intactas. En el interior de las células, debido a la acción de esterasas intracelulares, se convierten en carboxifluoresceína, molécula que al ser excitada a una longitud de onda de 488 nm emite fluorescencia verde, quedando retenida intracelularmente por membranas celulares intactas.

Otro fluorocromo ampliamente utilizado para identificar espermatozoides vivos es el SYBR-14, que es capaz de atravesar membranas intactas y de unirse al ADN de los espermatozoides (Garner et al., 1988; Garner y Johnson, 1995). Presenta algunas ventajas con respecto a los fluorocromos basados en la actividad esterasa intracelular: es una molécula más estable, no tiene que sufrir una transformación enzimática para poder actuar, y se une específicamente al ADN del espermatozoide, lo que supone que toda partícula que no contenga dicho material genético no se va a marcar, y por tanto quedará descartada del análisis. El SYBR-14 suele utilizarse en combinación con PI (Garner et al., 1988), y de esta forma se pueden distinguir dos poblaciones espermáticas: una de ellas constituida por células muertas o en estado de degeneración, cuyas membranas plasmáticas son permeables al PI, y por tanto emiten fluorescencia roja; y la otra constituida por espermatozoides viables, cuyas membranas intactas son impermeables al PI pero dejan entrar el SYBR-14, y por tanto emiten fluorescencia verde.

Un fluorocromo con un mecanismo de acción similar al del SYBR-14, capaz de identificar espermatozoides vivos, es el Hoechst 33342. Este compuesto también entra en células vivas y se une al ADN espermático,

sin embargo, su uso está limitado por la longitud de onda de su espectro de excitación, que está en el rango UV. La mayoría de los citómetros disponen de un láser con una longitud de onda de 488 nm, y para evaluar las muestras marcadas con Hoechst 33342, es preciso disponer de un láser de menor longitud de onda.

Con respecto a la correlación entre la viabilidad espermática y la capacidad fecundante de las dosis seminales hay discrepancia entre los autores. Decuadro et al. (2002) y Christensen et al. (2004) hablan de una correlación elevada entre la viabilidad espermática y capacidad fecundante de las dosis, siempre que se respete una concentración espermática mínima por pajuela. Sin embargo, Graham (2001) observó que la viabilidad espermática apenas se correlacionaba con la fertilidad. Los marcadores para viabilidad espermática pueden usarse en combinación con otros fluorocromos que permiten valorar otras estructuras del espermatozoide, como la integridad de la membrana acrosomal o la funcionalidad mitocondrial.

Análisis de la funcionalidad mitocondrial

El fluorocromo Rodamina 123 fue el primero que se utilizó para evaluar la funcionalidad mitocondrial en espermatozoides humanos, y posteriormente en los de otras especies domésticas (Evenson et al., 1982; Anger et al., 1989; Graham et al., 1990). Este fluorocromo penetra en mitocondrias con actividad respiratoria y se acumula en su interior. Al incidir la luz del láser sobre espermatozoides teñidos con Rodamina 123, la pieza intermedia de los espermatozoides con mitocondrias activas emite una intensa fluorescencia verde (Ericsson et al., 1993). La Rodamina 123 suele utilizarse en combinación con PI, que tiñe de rojo los espermatozoides degenerados y por tanto sin actividad mitocondrial. Aunque la Rodamina

123 permite cuantificar la población de espermatozoides con mitocondrias activas, no permite diferenciar el grado de actividad respiratoria de las células (Graham, 2001). Evaluando dosis de semen bovino congelado, Gillan et al. (2005) observaron una elevada correlación entre el porcentaje de espermatozoides positivos a Rodamina 123 y el porcentaje de espermatozoides positivos a SYBR-14, lo que indica que los espermatozoides vivos en la mayor parte de los casos tienen funcionalidad mitocondrial.

Thomas et al. (1998) y Garner y Cheryl (1999) desarrollaron una nueva tinción mitocondrial utilizando el fluorocromo JC-1, que permite diferenciar entre espermatozoides con baja y alta actividad respiratoria. El JC-1 se acumula en el interior de las mitocondrias, si la actividad respiratoria es elevada forma agregados intramitocondriales que emiten fluorescencia naranja, y si la actividad respiratoria es baja, el JC-1 no llega a formar agregados y emite fluorescencia verde.

Análisis de la integridad acrosomal

La integridad acrosomal puede ser valorada por numerosos procedimientos (Cross y Meizel, 1989), pero cuando se utiliza citometría de flujo como método de análisis, el más común es el uso de una lectina conjugada con un fluorocromo (Graham et al., 1990; Cheryl et al., 1997; Maxwell et al., 1997). Entre todas las lectinas disponibles comercialmente, las más frecuentemente utilizadas son la PNA (peanut agglutinin), que se une específicamente a la membrana acrosomal interna de los espermatozoides (Cross y Watson, 1994), y la PSA (pisum sativum agglutinin), que se une a la matriz acrosomal y a la membrana acrosomal externa (Cross et al., 1986; Way et al., 1995). El uso de lectinas conjugadas con un fluorocromo, como por ejemplo fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE), permite detectar aquellos

espermatozoides que tienen la membrana acrosomal dañada, lo cual posibilita el paso de la lectina, y por tanto del fluorógeno, al interior del compartimento acrosomal (Graham et al., 1990; Nolan et al., 1992).

Cross et al. (1986) y otros (Centola et al., 1990; Mendoza et al., 1992) describieron el uso de PSA marcada con FITC para detectar acrosomas intactos en lugar de acrosomas dañados, en espermatozoides humanos, utilizando microscopía de fluorescencia. En estos estudios, los espermatozoides tenían que ser fijados y sus membranas permeabilizadas con etanol para permitir el acceso de la lectina al contenido acrosomal. Este método se adaptó con éxito al estudio de espermatozoides de diversas especies domésticas (Berger, 1990; Mattioli et al., 1996; Sukardi et al., 1997). Sin embargo, el tratamiento de los espermatozoides con etanol no es recomendable cuando se va a utilizar citometría de flujo para el análisis de las muestras, puesto que puede causar precipitación de sales presentes en el medio extracelular y aglutinación celular (Crissman y Steinkamp, 1990), y además, dificulta el análisis simultáneo de la viabilidad espermática y de la integridad acrosomal. Por tanto, este método se utiliza más frecuentemente en combinación con microscopía de fluorescencia, mientras que con citometría de flujo, lo más común es el uso de espermatozoides vivos no permeabilizados, y por tanto la lectina detectará los acrosomas dañados.

Otra posibilidad para identificar la presencia de alteraciones acrosomales es el uso de anticuerpos monoclonales, marcados con un fluorocromo, frente a moléculas específicas del contenido acrosomal (Palencia et al., 1996; Thomas et al., 1996).

Para valorar simultáneamente el estado del acrosoma y la viabilidad espermática se pueden combinar tres fluorocromos. Por

ejemplo, Nagy et al. (2003) desarrollaron una triple tinción para espermatozoides bovinos, en la que combinaban el uso de SYBR-14 y PI, para evaluar la viabilidad espermática, con la lectina PNA marcada con ficoeritrina (PE-PNA), que tiñe en naranja los acrosomas dañados. Esta triple tinción genera la aparición de cuatro poblaciones espermáticas: 1) espermatozoides vivos con el acrosoma intacto (positivos a SYBR-14 y negativos a PE-PNA), 2) espermatozoides vivos con el acrosoma dañado (positivos a SYBR-14 y positivos a PE-PNA), 3) espermatozoides muertos con el acrosoma intacto (positivos a PI y negativos a PE-PNA) y 4) espermatozoides muertos con el acrosoma dañado (positivos a PI y a PE-PNA). Durante las primeras horas tras la descongelación de las muestras, los espermatozoides vivos apenas tienen el acrosoma dañado, es decir, la segunda población espermática está ausente, sin embargo, esta población puede aparecer tras varias horas de incubación a 37 °C. Se ha demostrado que existe una correlación positiva entre la integridad acrosomal y la capacidad fecundante de los espermatozoides (Thomas et al., 1996).

Tests de funcionalidad espermática basados en la FIV

Se han diseñado numerosos tests para evaluar *in vitro* la funcionalidad de los espermatozoides, especialmente de dosis congeladas, en relación a su capacidad para interactuar con el ovocito. Estos tests evalúan las distintas fases del proceso de fecundación, como la capacidad espermática de reconocimiento y unión a la zona pelúcida (ZP), la penetración de ovocitos homólogos o heterólogos (libres de zona pelúcida), o la inducción del desarrollo embrionario. Muchos de estos tests se han adaptado a la especie bovina y su utilidad ha sido evaluada por diversos autores (Brackett et al., 1982; Davis et al., 1987; Fazeli et al., 1993;

Lonergan, 1994; Shamsuddin et al., 1996; Zhang et al., 1995; Ward et al., 2002, 2003).

• **Tests de unión a la zona pelúcida:** Este test se diseñó con el objetivo de cuantificar el número de espermatozoides capacitados que son capaces de unirse selectivamente a la zona pelúcida de ovocitos homólogos. Los resultados de este test, en la especie humana, son altamente predictivos del resultado de la FIV (Franken et al., 1989, 1993). En algunas especies domésticas se ha intentado establecer una correlación entre los resultados del test de unión a la zona y la fertilidad *in vivo* del semen. Mientras que algunos autores encontraron una correlación positiva (Fazeli et al., 1993, 1997), otros no observaron correlación alguna (Codde y Berger, 1995; Berger, 1996; Braundmeier et al., 2002).

• **Tests de hemizona:** Es una variante del test de unión a la zona, que consiste en la microsección de un ovocito para obtener dos hemizonas con una funcionalidad equivalente a la de la zona pelúcida intacta. Ello permite comparar la capacidad de unión a la zona de espermatozoides procedentes de individuos fértiles, que funcionan como control, con la de muestras espermáticas cuya fertilidad se desconoce (Franken et al., 1993). El test de hemizona es más complejo y laborioso que el test de unión a la zona, aunque éste último exige disponer de un mayor número de ovocitos (Zhang et al., 1995).

• **Tests de penetración de ovocitos de hámster libres de zona pelúcida:** Este test, desarrollado por Yanagimachi y Rogers (1976), permite valorar la capacidad de los espermatozoides para penetrar un ovocito de hámster libre de zona pelúcida. Se utiliza fundamentalmente en la especie humana para valorar la fertilidad espermática (Rogers, 1985), debido a las restricciones legales o éticas que existen en algunos paí-

ses para el uso de ovocitos humanos. Este test se ha desarrollado con éxito en la especie bovina (Brackett et al., 1982) pero su aplicación es muy escasa, puesto que es más sencillo obtener ovocitos bovinos a partir de ovarios de matadero que obtener ovocitos de hámster para luego extraerles la zona pelúcida.

• **Tests de FIV:** La fecundación *in vitro* de ovocitos homólogos es, sin lugar a dudas, el test más completo para evaluar la funcionalidad espermática, ya que permite valorar todas las fases del proceso de fecundación, desde el estado de capacitación espermática hasta la fusión con la membrana vitelina del ovocito o el inicio del desarrollo embrionario (Lonergan, 1994; Shamsuddin et al., 1996; Ward et al., 2002). Aunque en algunos estudios se ha encontrado una elevada correlación con la fertilidad *in vivo* de los toros (Hillery et al., 1990; Marquant-Le Guienne et al., 1990; Zhang et al., 1997; Ward et al., 2003), todavía se necesita una mayor estandarización de los métodos a la hora de aplicar dicha técnica, puesto que existe considerable variabilidad entre los resultados de FIV obtenidos para un mismo toro, debido a factores de variación como por ejemplo el método de selección de los espermatozoides (percoll o swim-up) (Parrish et al., 1995), de capacitación espermática *in vitro* (Saeki et al., 1995) o el número de espermatozoides utilizado para la inseminación de los ovocitos (Kroetsch y Stubbings, 1992).

Como hemos mencionado anteriormente, pocos parámetros individuales indicadores de viabilidad espermática tienen una correlación significativa con la fertilidad de la muestra de semen, y si la tienen, dicha correlación es baja (Amann y Hammerstedt, 1993). Sin embargo, la combinación de varios parámetros espermáticos, determinados objetivamente y de forma simultánea, en un análisis de regresión múltiple permite

obtener una correlación elevada con la fertilidad de los toros evaluados (Farrell *et al.*, 1998; Wood *et al.*, 1986). Este análisis estadístico se ha utilizado para obtener valores predictivos de la fertilidad, como la tasa de no retorno, antes de poder conocer la fertilidad de campo de dichos reproductores. Este procedimiento indica que es posible el uso de una combinación de tests de laboratorio para determinar la calidad seminal y para predecir la fertilidad potencial de un toro, especialmente para diferenciar machos infértiles o subfértiles, de sementales con fertilidad promedio elevada. Amann y Hammerstedt (2002), sin embargo, sugieren que intentar establecer correlaciones entre pruebas *in vitro* y fertilidad *in vivo* carece de validez, y que los resultados obtenidos a partir de la evaluación *in vitro* del semen deberían utilizarse para predecir machos o muestras subfértiles, mientras que los datos de fertilidad deberían utilizarse para comprobar el grado de corrección de esas predicciones.

Bibliografía

- Abaigar T, Holt WV, Harrison RAP, Del Barrio G, 1999. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol. Reprod.*, 60, 32-41.
- Amann RP, Hammerstedt RH, 1980. Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biol. Reprod.*, 23, 647-656.
- Amann RP, 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.*, 2 (10), 89-98.
- Amann RP, Hammerstedt RH, 1993. *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. *J. Androl.*, 14, 397-405.
- Amann RP, Seidel GE, Mortimer RG, 2000. Fertilizing potencial *in vitro* of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. *Theriogenology*, 54 (9), 1499-515.
- Amann RP, Hammerstedt RH, 2002. Detection of differences in fertility. *J. Androl.*, 23 (3), 317-325.
- Anger J, Ronot X, Dadoune JP, 1989. Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. *J. Androl.*, 10, 439-448.
- Anzar M, Hassan MM, Graham EF, Deyo RCM, Singh G, 1991. Efficacy of the Hamilton Thorn motility analyzer (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen. *Theriogenology*, 2 (36), 307-317.
- Barth AD, Oko RJ, 1989. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. Iowa State University Press.
- Berger T, 1990. Pisum sativum agglutinin used as acrosomal stain of porcine and caprine sperm. *Theriogenology*, 33, 689-695.
- Berger T, 1996. Fertilization in ungulates. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 351-360.
- Bloom E, 1977. Sperm morphology with reference to bull infertility. First All-India Symp. *Anim. Reprod.*, pp: 61-81.
- Boixo JC, 1996. Valoración Laboratorial de la calidad seminal. Correlación con la fertilidad. *Inform. Vet.*, pp: 33-37.
- Boyers SP, Davis R, Katz DF, 1989. Automated semen analysis. *Curr. Probl. Obstet. Gynecol. Fertil*, 12, 172-200.
- Brackett BG, Cofone MA, Boice ML, Bousquet D, 1982. Use of zona-free hamster ova to assess fertilizing ability of bull and stallion. *Gamete Res.*, 5, 217-227.
- Braundmeier AG, Demers JM, Shanks RD, Saacke RG, Miller DJ, 2002. Examination of the binding ability of bovine spermatozoa to the zona pellucida as an indicator of fertility. *J. Androl.*, 23, 645-651.
- Catena M, Cabodevilla J, 1999. Evaluación del semen bovino congelado. *Taurus*, 1 (3), 18-31.
- Centola GM, Mattox JH, Burde S, Leary JF, 1990. Assessment of the viability and acrosome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single wavelength fluorescence microscopy. *Mol. Reprod., Dev.*, 27, 130-135.
- Cheryl AT, Garner DL, Dejarnette JM, Clifton EM, 1997. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 56, 991-998.
- Christensen P, Stenvang JP, Godfrey W, 2004. A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian semen. *J. Androl.*, 25 (2), 255-64.
- Codde JM, 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.
- Crissman HA, Steinkamp JA, 1990. Cytochemical techniques for multivariate analysis of DNA and other cellular constituents. En: Melamed MR, Lindmo T, Mendelson ML (eds), *Flow cytometry and sorting*, 2nd ed. Wiley-Liss, New York, pp. 227-247.
- Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW, 1986. Two simple methods for detecting acrosome-reacting human sperm. *Gamete Res.* 15, 213-226.
- Cross NL, Meizel S, 1989. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol. Reprod.*, 41, 635-641.
- Cross NL, Watson SK, 1994. Assessing acrosomal status of bovine sperm using fluoresceinated lectins. *Theriogenology*, 42, 89-98.
- Cseh S, Polichronopoulos T, Solti L, 2004. Prediction of bull fertility by computer assisted semen analysis. *Reprod. Fertil. Dev.*, 16 (2), 128-129.
- Davis AP, Graham JK, Foote RH, 1987. Homospermic versus heterospermic insemination of zona-free hamster eggs to assess fertility of fluorochrome labeled acrosome reacted bull spermatozoa. *Gamete Res.*, 17, 343-354.
- Davis RO, Drobnis EZ, Overstreet JW, 1995. Applications of multivariate cluster, discriminant function and stepwise regression analysis to variable selection and predictive modeling of sperm cryosurvival. *Fertil. Steril.*, 63, 1051-1057.
- Decuadro H, Camus A, Guy D, 2002. Assessment of bull semen characteristics by flow cytometry and their relation with non return rates: a preliminary study in France. 14th Meeting European A.I VETS. pp: 105-108.
- Den Daas N, 1992. Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim. Reprod. Sci.*, 28, 87-94.
- Ericsson SA, Garner DL, Redelman D, Ahmad K, 1989. Assessment of the viability and fertilizing potential of cryopreserved bovine spermatozoa using dual fluorescent staining and two-flow cytometric systems. *Gamete Res.*, 22, 355-368.
- Ericsson SA, Garner DL, Johnson LA, Redelman D, Ahmad K, 1990. Flow cytometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa processed using new antibiotic combinations. *Theriogenology* 33: 1211-1220.
- Ericsson SA, Garner DL, Thomas CA, Downing TW, Marshall CE, 1993. Interrelationships among fluorometric analysis of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 39, 1009-1024.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR, 1982. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J. Histochem. Cytochem.* 30, 279-280.
- Farrell PB, Trouern-Trend V, Foote RH, Douglas Hamilton D, 1995. Repeatability of measurements on human, rabbit, and bull sperm by computer-assisted sperm analysis when comparing individual fields and means of 12 fields. *Fertil. Steril.*, 64 (1), 208-10.
- Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH, 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm

- analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, 49, 871-879.
- Fazeli AR, Steenweg W, Beyers MM, 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 AR, Zhang BR, Steenweg W, Larsson B, Beyers MM, Van den Broek J, Rodríguez-Martínez H, Colenbrander B, 1997. Relationship between sperm-zona pellucida binding assays and the 56-day nonreturn rate of cattle inseminated with frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 48, 853-863.
- Franken DR, Oehninger SC, Burkman LJ, Coddington CC, Kruger TF, Rosenwaks Z, Acosta AA, Hodgen GD, 1989. The hemizona assay (HZA): a predictor of human sperm fertilizing potential in *in vitro* fertilization (IVF) treatment. *J. IVF/ET* 6, 44-49.
- Franken DR, Kruger TF, Lombard CJ, Oehninger SC, Acosta AA, Hodgen GD, 1993. The ability of the hemizona assay to predict human fertilization *in vitro* in different IVF/GIFT cycles. *Hum. Reprod.*, 8, 1240-1244.
- Garner DL, Gledhill BL, Pinkel D, Lake S, Stephenson D, Van Dilla MA, Johnson LA, 1983. Quantification of the X and Y chromosome bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biol. Reprod.*, 28, 312-321.
- Garner DL, Pinkel D, Johnson LA, Pace MM, 1986. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol. Reprod.*, 34, 127-138.
- Garner DL, Johnson LA, Allen CH, 1988. Fluorometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa extended in egg yolk and milk. *Theriogenology*, 30, 369-378.
- Garner DL, Johnson LA, 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol. Reprod.*, vol 53, 276-284.
- Garner DL, 1997. Ancillary tests of bull semen quality. *Bull Infertility Veterinary clinics of north america: Food Animal Practice*, vol 13(2), 313-330.
- Garner DL, Cheryl AT, 1999. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, 53, 222-229.
- Gillian L, Evans G, Maxwell WMC, 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63(2), 445-57.
- Glover FA, 1968. Physical method of measuring the mobility of bull sperm. *Nature*, 219, 1263.
- Graham JK, Kunze E, Hammerstedt RH, 1990. Analysis of Sperm Cell Viability, acrosomal Integrity, and Mitochondrial Function using flow cytometry. *Biol. Reprod.*, 43, 55-64.
- Graham JK, 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim. Reprod. Sci.*, 68, 239-247.
- Gran DG, Dott HM, 1976. The ultrastructure of knobbed bull spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 47 (2), 407-408.
- Gravance CG, Vishwanath R, Pitt C, Casey PJ, 1996. Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. *Theriogenology*, 46, 1205-1215.
- Harrison RAP, Vickers SE, 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 88, 343-352.
- Hillery FL, Parrish JJ, First NL, 1990. Bull specific effect on fertilization and embryo development *in vitro*. *Theriogenology* 33, 249.
- Holt WV, 1996. Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. *Reprod. Dom. Anim.*, 31, 17-24.
- Holt WV, Van Look JW, 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. *Reproduction* 127, 527-535.
- Howard TH, Pace MM, 1998. Seminal evaluation and artificial insemination: Fertility and Infertility in *Veterinary Practice*. Eds: Laing JA,

- Morgan WJ, Wagner WC, Bailliere Tindall. London. U.K., 39-51.
- Januskaukas A, Söderquist L, Haard MG, Haard MCH, Lundeheim N, Rodríguez-Martínez H, 1996. Influence of sperm number per straw on the post-thaw sperm viability and fertility of the Swedish Red and White AI bulls. *Acta vet. Scand.* 37: 461-470.
- Januskaukas A., Žilinskas H, 2002. Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. *Veterinarija ir Zootechnika* 17 (39).
- Johnson LA, Flook JP, Hawk HW, 1989. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol. Reprod.*, 41, 199.
- Katz DF, Dott HM, 1975. Methods of measuring swimming speed of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 45, 263.
- Katz DF, Overstreet JW, 1981. Sperm motility assessment by video-micrography. *Fertil. Steril.*, 35, 188.
- Keeler KD, Mackenzie NM, Dresser DW, 1983. Flow microfluorometric analysis of living spermatozoa stained with Hoechst 33342. *J. Reprod. Fert.*, 68, 205-212.
- Kjaestad H, Ropstad E, Berg KA, 1993. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Vet. Scand.*, 34, 299-303.
- Kroestch TG, Stubbings RB, 1992. Sire and insemination dose does effect *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 37, 240.
- Linford E, Glover FA, Bishop C, Stewart DL, 1976. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *J. Reprod. Fertil.*, 47 (2), 283-291.
- Liu Z, Foote RH, 1998. Bull Sperm Motility and Membrane Integrity in Media Varying in Osmolality. *J. Dairy Sci.*, 81, 1868-73.
- Lonergan P, 1994. The application of *in vitro* fertilization techniques to the prediction of bull fertility. *Reprod. Dom. Anim.*, 9, 489-496.
- Marquant-Le Guienne B, Humblot P, Thibier M, Thibault C, 1990. Evaluation of bull semen fertility by homologous *in vitro* fertilization tests. *Reprod. Nutr. Dev.* 30, 259-266.
- Mattioli M, Barboni B, Lucidi P, Seren E, 1996. Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. *Theriogenology*, 45, 373-381.
- Maxwell WMC, Welch GR, Johnson LA, 1997. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod. Reprod. Fertil. Dev.*, 8, 1165-1178.
- Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tesarik J, 1992. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using Pisum sativum agglutinin. *J. Reprod. Fertil.*, 95, 755-763.
- Meyer RA, Barth AD, 2001. Effect of acrosomal defects on fertility of bulls used in artificial insemination and natural breeding. *Can. Vet. J.*, 42 (8), 630-4.
- Milovanov VK, 1938. The artificial insemination of farm animals. *Seljhozgiz, Moscow*.
- NAAB (National Association of Animal Breeders) Technical conference proceedings 1986. p: 102.
- Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM, 2003. A Triple stain flow cytometric method to assess plasma-and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol. Reprod.*, 68, 1828-1835.
- Nolan JP, Graham JK, Hammerstedt RH, 1992. Artificial induction of exocytosis in bull sperm. *Arch. Biochem. Biophys.* 292, 311-322.
- Nothling JO, Arndt EP, 1995. Fertility of two bulls with poor sperm morphology. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 66 (2), 74-6.
- O'Connor MT, Amann RP, Saacke RG, 1981. Comparisons of computer evaluations of spermatozoal motility with Standard laboratory tests and their use for predicting fertility. *J. Anim. Sci.*, 53 (5), 1368-1376.

- Palencia DD, Garner DL, Hudig D, Holcombe DW, Burner CA, Redelman D, Fernández GCJ, Abuelyaman AS, Kam CM, Powes JC, 1996. Determinación of activable proacrosin/acrosin in bovine sperm using an irreversible isocoumarin serine proteasa inhibitor. *Biol. Reprod.*, 55, 536-542.
- Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL, 1995. Effects of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 44, 859-869.
- Phillips NJ, Evans G, McGowan MR, 2004. Measures used to assess frozen-thawed semen in Australian livestock semen processing centres. *Aust Vet J*, 82 (5), 309-310.
- Pinkel D, Garner DL, Gledhill BL, Lake S, Stephenson D, Johnson LA, 1985. Flow cytometric determination of the proportions of X and Y chromosome bearing sperm in samples of purportedly separated bull sperm. *J. Anim. Sci.*, 60, 1303-1307.
- Pintado B, De la Fuente J, Roldan ERS, 2000. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258 or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *J. Reprod. Fertil.*, 118, 145-152.
- Rodríguez-Martínez H, Larsson B, Zhang BR, Söderquist L, 1997. *In vitro* assessment of viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. *J. Reprod. Dev.*, 43, 1-11.
- Rodríguez-Martínez H, 1999. Nuevas técnicas de evaluación de la fertilidad en el macho. II Congreso Ibérico de Reproducción Animal., pp: 302-316.
- Rodríguez-Martínez H, 2000. Evaluación del semen congelado: Métodos tradicionales y de actualidad. Topics in Bull Fertility. Chenoweth P.J. International Veterinary Information Service. Ithaca, New York. USA.
- Rogers BJ, 1985. The sperm penetration assay: Its usefulness reevaluated. *Fertil. Steril.*, 43, 821.
- Saacke RG, White JM, 1972. Semen quality tests and their relationship to fertility. *Proc. 4th NAAB Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod.*, pp: 22.
- Saacke RG, 1982. Components of semen quality. *J. Anim. Sci.*, 55 (2), 1-13.
- Saacke RG, Nadir S, Nebel RL, 1994. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization and embryo quality in ruminants. *Theriogenology*, 41, 45-50.
- Saeki K, Nagao Y, Hoshi M, Nagai M, 1995. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on *in vitro* fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium. *Theriogenology* 43, 751-759.
- Shamsuddin M, Niwa K, Larsson B, Rodríguez-Martínez H, 1996. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Reprod. Dom. Anim.*, 31, 613-622.
- Sukardi S, Curry MR, Watson PF, 1997. Simultaneous detection of acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. *Anim. Reprod. Sci.*, 46, 89-96.
- Thomas CA, Garner DL, Cormick MC, 1996. Immunomagnetic selection of acrosome-reacted bovine spermatozoa using anti-acrosin antibodies. *Reprod. Dom. Anim.*, 31, 373-378.
- Thomas CA, Garner DL, Dejarnette JM, Marshall CE, 1998. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.*, 58, 786-793.
- Thundathil J, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft RJ, 1998. Fertilization characteristics and *in vitro* embryo production with bovine sperm containing multiple nuclear vacuoles. *Mol. Reprod. Dev.*, 50 (3), 328-33.
- Thundathil J, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft RJ, 1999. An investigation of the fertilizing characteristics of pyriform shaped bovine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 57 (1-2), 35-50.
- Thundathil J, Meyer R, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft RJ, 2000. Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production. *Theriogenology*, 54 (6), 921-34.

- Thundathil J, Palomino J, Barth A, Mapletoft R, Barros C, 2001. Fertilizing characteristics of bovine sperm with flattened or indented. *Anim. Reprod. Sci.*, 67 (3-4), 231-43.
- Thundathil J, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft R, 2002. Plasma membrane and acrosomal integrity in bovine spermatozoa with the knobbed acrosome defect. *Theriogenology*, 58 (1), 87-102.
- Tuli RK, Schmidt-Baulain R, Holtz W, 1992. Computer assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen-thawed semen of the bull, boar and goat. *Theriogenology*, 487-490.
- Van Camp SD, 1997. Common causes of infertility in the bull. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 13 (2), 203-31.
- Van Lieshout JAH, 1995. Report on the AI qualivet group. *Proc. 7th European AI vets Meet.*, The Netherlands, 1-40.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K, 2002. Computer assisted semen analyzer in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57, 149-179.
- Ward F, Enright B, Rizos D, Boland MP, Lonergan P, 2002. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*, 57, 2105-2117.
- Ward F, Rizos D, Boland MP, Lonergan P, 2003. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress. *Theriogenology*, 59, 1575-1584.
- Way AL, Henault MA, Killiam GJ, 1995. Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Theriogenology*, 43 (8), 1301-1316.
- Wood PDP, Foulkes JA, Shaw RC, Melrose DR, 1986. Semen assessment fertility and the selection of Hereford bulls for use in A.I. *J. Reprod. Fertil.*, 76, 783-795.
- Yanagimachi RH, Rogers BJ, 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.
- Zhang BR, Larsson B, Rodríguez Martínez H, 1995. Influence of batches of bovine oocytes on the outcome of an intact zona pelucida binding assay and *in vitro* fertilization. *Int. J. Androl.*, 18, 213-220.
- Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Rodríguez Martínez H, 1997. Relationship between embryo development *in vitro* and 56 day non-return rates of cows inseminated with frozen-thawed semen from dairy bulls. *Theriogenology*, 48, 221-231.

(Aceptado para publicación el 18 de abril de 2005)