



e s c u e l a
p o l i t é c n i c a
s u p e r i o r
d e h u e s c a



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Estudio comparativo de la morfometría espermática entre jabalí (*Sus scrofa scrofa*) y verraco (*Sus scrofa domestica*)

Autor

José M^a Ciria Ponce

Director

Jesús Yániz Pérez de Albeniz

Escuela Politécnica Superior
2015

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL	Nº DE PÁGINA
1.-RESUMEN	1
2.-ABSTRACT	2
3.-INTRODUCCIÓN	3
4.-OBJETIVOS	4
5.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
5.1.-Introducción	5
5.2.- El espermatozoide en mamíferos	6
5.2.1.- La cabeza del espermatozoide	7
5.2.2. -El núcleo espermático	9
5.2.3. -El acrosoma	10
5.2.4.-El flagelo del espermatozoide	12
5.3.-Evaluación de la calidad seminal	13
5.3.1.-Estudio del volumen y la concentración espermática	13
5.3.2.-Estudio de la movilidad	14
5.3.3.-Estudio de la morfología espermática	15
5.3.4.-Estudio de la morfometría espermática	17
5.3.4.1.-Evaluación morfométrica del núcleo y la cabeza espermática	17
5.3.4.2.-Evaluación morfométrica del acrosoma	19
6.-MATERIAL Y MÉTODOS	21
6.1.-Reactivos.....	21
6.2.- Manipulación del semen	21
6.2.1.-Concentración espermática	21
6.3.-Jabalí.....	22
6.3.1.-Recogida y obtención del semen	22
6.3.2.-Preparación de las muestras para la evaluación morfométrica del núcleo .	23
6.3.2.1.- Fresco	23
6.3.2.2.- Frotis sin fijar	23
6.3.2.3.- Frotis fijados con metanol y glutaraldehído	23
6.3.3.- Preparación de las muestras para la evaluación morfométrica del acrosoma	24
6.4.-Verraco	24

6.4.1.-Recogida y obtención del semen	24
6.4.2.-Preparación de las muestras para la evaluación morfométrica del núcleo .	24
6.4.3.- Preparación de las muestras para la evaluación morfométrica del acrosoma	25
6.5.- Imagen de fluorescencia.....	25
6.6.- Análisis estadístico.....	27
7.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
7.1.- Análisis morfométrico del núcleo espermático.....	28
7.1.1.- Efecto del procesado sobre la morfometría del núcleo en jabalí.....	28
7.1.2.- Comparación de la morfometría nuclear entre especies	30
7.1.2.1.- Parámetros primarios	30
7.1.2.2.- Parámetros secundarios	30
7.1.3.- Comparación de la morfometría nuclear entre machos.....	31
7.2.- Análisis morfométrico del acrosoma, núcleo y cabeza espermáticos	36
7.2.1.- Análisis morfométrico del acrosoma	36
7.2.2.- Análisis morfométrico del núcleo	36
7.2.3.- Análisis morfométrico de la cabeza espermática	37
7.2.4.- Comparación del área del acrosoma, núcleo y cabeza espermáticos entre machos	38
8.-CONCLUSIONES	42
9.-BIBLIOGRAFÍA	43

ÍNDICE DE TABLAS	Nº DE PÁGINA
Tabla 1. Valores normales de volumen y concentración descritos en la especie porcina (Gadea, 1997)	14
Tabla 2. Efecto del procesado sobre los parámetros primarios de la morfometría nuclear espermática.....	29
Tabla 3. Comparación de los parámetros primarios entre especies. Muestras fijadas con glutaraldehído	30
Tabla 4. Comparación de los parámetros secundarios entre especies. Muestras fijadas con glutaraldehído	40
Tabla 5. Parámetros primarios según especie y medida.....	40
Tabla 6. Parámetros secundarios según especie y medida.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS	Nº DE PÁGINA
Figura 1. Estructura del espermatozoide	7
Figura 2. Estructura de la cabeza espermática.....	8
Figura 3. Representación de la reacción acrosómica	10
Figura 3. Espermatozoides normales y algunas formas anormales. A-Sin acrosoma (forma común). B- Sin apenas acrosoma. C- Con cabeza piriforme cabeza. D- Con cabeza piriforme moderada. E- Con cabeza piriforme leve. F- Con vacuolas. G-Defectos en la membrana. H- Sin flagelo. I- Reflejo distal. J- Parte media rota. K- Parte media severamente doblada. L- Gota proximal. M- Gota distal. N- Teratoride grave. O-Teratoideo moderado. P-Espermatozoide normal (Barth y col., 1989).....	16
Figura 5. Parámetros morfométricos medidos en este estudio	19
Figura 6. Cámara Makler en posición para su visionado al microscopio.	21
Figura 7. Sistema CASA, microscopio óptico conectado a una cámara que a su vez se controla por un software de análisis de imágenes en el ordenador.	22
Figura 8. Extracción de semen de jabalí.....	22
Figura 9. Microscopio de epifluorescencia (DM4500B, Leica, Alemania), al que va acoplado una cámara Canon Eos 400D digital que se controlaba mediante un ordenador con el programa DSLR Remote Pro software (Sistemas de Breeze).....	26
Figura 10. Núcleos espermáticos capturados con el software Image J	28
Figura 11. Valores de área nuclear espermática (en μm^2) en los 35 jabalíes estudiados	32
Figura 12. Valores de área nuclear espermática (en μm^2) en los 35 verracos estudiados	32
Figura 13. Valores de perímetro nuclear espermático (en μm) en los 35 jabalíes estudiados...	33
Figura 14. Valores de perímetro nuclear espermático (en μm) en los 35 verracos estudiados .	33
Figura 15. Valores de longitud nuclear espermática (en μm) en los 35 jabalíes estudiados	34
Figura 16. Valores de longitud nuclear espermática (en μm) en los 35 verracos estudiados	34

Figura 17. Valores de anchura nuclear espermática (en μm) en los 35 jabalíes estudiados	35
Figura 18. Valores de anchura nuclear espermática (en μm) en los 35 verracos estudiados.....	35
Figura 19. Valores de área acrosómica espermática (en μm^2) en los 35 jabalíes estudiados....	39
Figura 20. Valores de área acrosómica espermática (en μm^2) en los 35 verracos estudiados ..	39
Figura 21. Valores de área nuclear espermática (en μm^2) en los 35 jabalíes estudiados.	40
Figura 22. Valores de área nuclear espermática (en μm^2) en los 35 verracos estudiados.	40
Figura 23. Valores de área de cabeza espermática (en μm^2) en los 35 jabalíes estudiados	41
Figura 24. Valores de área de cabeza espermática (en μm^2) en los 35 verracos estudiados	41

RESUMEN

ABSTRACT

1.-RESUMEN

Mucho se ha estudiado sobre el cerdo desde su domesticación. Es la especie que mayor impacto económico tiene en la producción final agraria. El jabalí tiene interés cinegético en España, además Huesca es la provincia donde más capturas de esta especie se registran. Ambas especies están íntimamente relacionadas, pues se ha demostrado que el jabalí es el antecesor del cerdo doméstico actual. Se ha estudiado mucho sobre la apariencia física del jabalí, no obstante, poco se sabe sobre su fisiología reproductiva. Este trabajo fin de grado tiene como objetivo principal comparar la morfometría espermática de la cabeza, núcleo y acrosoma espermáticos de ambas especies. El análisis de los parámetros morfométricos espermáticos en jabalí ha sido posible adaptando a esta especie el método CASMA-F, desarrollado por nuestro grupo anteriormente. El primer estudio trata sobre el efecto del procesado de las muestras en las dimensiones morfométricas nucleares del espermatozoide. Se realizaron 4 tipos de procesado de muestras para el jabalí (fresco, secado al aire, fijado con glutaraldehído y fijado con metanol). En el caso del cerdo únicamente se practicó la fijación con glutaraldehído. Todas las muestras fueron teñidas con el marcador fluorescente Hoechst 33342. En el segundo estudio se analizaron los parámetros morfométricos del acrosoma, núcleo y cabeza espermáticos para la posterior comparación entre ambas especies. Se realizó una fijación con etanol y posteriormente se incubaron las muestras para su tinción en una solución que contenía yoduro de propidio y PSA. En todos los estudios se realizó la captura de imágenes con un microscopio de fluorescencia y una cámara digital. Las imágenes obtenidas se procesaron con el software de análisis de imagen Image J. Se analizaron 35 machos de cada especie en todos los estudios, y un mínimo de 200 espermatozoides por cada macho. El secado de las muestras apenas tuvo efecto en las dimensiones morfométricas del núcleo espermático en el jabalí. Las fijaciones realizadas con glutaraldehído y metanol redujeron las dimensiones del núcleo espermático en ambos casos. En el estudio del núcleo, el jabalí presentó mayores dimensiones para los parámetros primarios, reportando un núcleo más elíptico y elongado. Dentro del segundo estudio el cerdo resultó tener mayor área acrosómica, mientras que las dimensiones nucleares fueron de nuevo mayores en el jabalí. No se observaron diferencias significativas en el área total de la cabeza.

2.-ABSTRACT

Much studies have been performed on the domestic pig since their domestication. It is the species that has greater economic impact in the final agrarian production. The wild boar has a hunting interest in Spain, Huesca is also the Spanish region where more catches of this species are recorded. Both species are closely related, as it has been shown that the wild boar is the predecessor of the current domestic pig. It has been studied much about the physical appearance of the wild boar, however, little is known about their reproductive physiology. This final grade work aims at comparing the sperm head, core and acrosome sperm of both species morphometry. In wild boar sperm morphometric parameters analysis has been possible due to adapt CASMA-F method to this species, developed by our group previously. The first study treats about the effect of the samples processing in the sperm nuclear morphometric dimensions. 4 types of processing of samples for wild boar (fresh, air-dried, fixed with glutaraldehyde and fixed with methanol) were performed. In the case of the pig was only practiced fixation with glutaraldehyde. All samples were stained with Hoechst 33342 fluorescent marker. In the second study the morphometric parameters of the acrosome, nucleus and head sperm were analyzed in order to compare the two species. After fixation in ethanol and samples were incubated for its staining in a solution composed of PSA and propidium iodide. In all studies images were captured with a fluorescence microscope and a digital camera. The images were processed with the software of image analysis Image J. 35 males of each species in all studies, and a minimum of 200 sperm for each male were analyzed. Drying of the samples had not effects on morphometric dimensions of the sperm nucleus in the wild boar. Fixations made with glutaraldehyde and methanol reduced the dimensions of the sperm nucleus in both cases. In the study of the nucleus, the wild boar presented larger values for the primary parameters, reporting a more elliptical and elongated shape. In the second study the pig proved to have greater acrosomal area, while the nuclear dimensions were again higher in wild boar. There were no significant differences in the total head area.

INTRODUCCIÓN

3.-INTRODUCCIÓN

El sector porcino es el de mayor relevancia económica de la ganadería española con una producción anual de más de 4.000 millones de euros al año, representando el 12,4% de la producción final agraria. Se trata de una especie muy conocida por el hombre ya que fue domesticada hace unos 8000 años. Por otro lado, el jabalí es una de las especies cinegéticas de mayor interés en nuestro país. A pesar de ser una especie de la que se conocen muchos datos sobre su apariencia física poco se ha estudiado sobre su biología reproductiva. Ambas especies han estado íntimamente ligadas ya que las investigaciones con ADN mitocondrial han demostrado que el jabalí es el antepasado del cerdo doméstico. El cruce entre ambos es fértil a pesar de tener un número de cromosomas distinto, 36 en el caso del jabalí y 38 en el del cerdo. En este proyecto se han estudiado las diferencias en la morfometría espermática entre el jabalí y el cerdo doméstico.

Para la evaluación de los parámetros morfométricos se desarrolló, en un trabajo anterior en nuestro grupo (Yániz *et al.*, 2012; Vicente-Fiel *et al.*, 2013), un método para el análisis morfométrico de la cabeza del espermatozoide (CASMA-F), basado en la utilización de un software libre y microscopía de fluorescencia. Este nuevo método permite un estudio objetivo de la morfometría de la cabeza del espermatozoide ya que reduce el procesado de las muestras y la variabilidad, aumentando la precisión y automatizando el proceso. Todo ello nos posibilitó la comparación morfométrica de ambas especies.

En este Trabajo Fin de Grado nos hemos centrado en realizar el análisis morfométrico del acrosoma, núcleo y cabeza espermática en ambas especies. Para ello se describió en un trabajo previo en ovino un método para la evaluación de estas estructuras combinando Ioduro de Propidio y PSA (Pisum sativum agglutininum) (Yániz *et al.*, 2014). Para poder realizar el mismo método en el jabalí será necesario ajustar el protocolo actual comparando los resultados obtenidos de la tinción simple con Hoechst 33342.

Para poder comprender mejor los procedimientos llevados a cabo y los resultados obtenidos, a continuación se explicarán los principios morfológicos y fisiológicos en los que se ha basado este estudio.

OBJETIVOS

4.-OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fin de grado es comparar la morfometría de la cabeza espermática y sus componentes entre cerdo y jabalí. Los objetivos específicos fueron los siguientes:

1. Adaptar los métodos de análisis morfométrico basados en el uso de software libre y microscopía de fluorescencia al jabalí.
2. Estudiar la influencia del procesado de muestras sobre la morfometría del núcleo espermático en jabalí.
3. Comparar la morfometría de la cabeza, núcleo y acrosoma espermáticos del jabalí y el cerdo doméstico.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

5 - REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

5.1.-Introducción

El jabalí (*Sus scrofa scrofa*) es un mamífero monogástrico del orden Artiodactyla, suborden Suiformes y familia Suidae, de aspecto similar al cerdo doméstico (*Sus scrofa domestica*). Ambos pertenecen ambos a la misma especie.

El jabalí se considera el antecesor del cerdo doméstico (Skewes, 2003). Evidencias como un elevado número de dientes, colmillos bien desarrollados y en continuo crecimiento, molares bunodontos, estómago de estructura sencilla y extremidades poco especializadas indican que se trata de un animal primitivo (Granados, 2015).

El cerdo doméstico tiene 38 cromosomas y el jabalí 36. El cruce resultante de ambos origina un mestizo que contiene 37 cromosomas. Además este mestizo es reproductivamente viable, pudiéndose cruzar con el jabalí o con el cerdo doméstico. Estos cruces originan individuos de 38 y 37 cromosomas respectivamente. Se han detectado cruces de jabalí con cerdos domésticos de la raza Duroc dando lugar a controversias sobre la autenticidad de la carne de jabalí (Skewes, 2006). El híbrido resultante tiene una carne muy similar a la del jabalí, pero con índices productivos y reproductivos mucho mejores (tasa de crecimiento, eficiencia de conversión, etc). Las hembras de Jabalí tienen un período de gestación de unos 115 días, similar al ciclo reproductivo del cerdo doméstico. Pueden realizar hasta dos pariciones al año, con camadas de 4 o 5 individuos por norma general, a diferencia de la cerda doméstica, que cicla durante todo el año y tiene camadas mucho más prolíficas.

El jabalí es una especie de indudable interés cinegético. También es considerada plaga por los daños que produce en sembrados, bosques y carreteras. El control se realiza mediante caza deportiva, siendo la caza en batidas de jabalí la actividad que, probablemente, más impacto produce sobre el medio. Como especie cinegética implica importantes ingresos para ayuntamientos y otras administraciones públicas. Es en la provincia de Huesca donde se registran más capturas, donde anualmente se cazan alrededor de 15.000 jabalíes (Bosch *et al.*, 2012).

Se trata de un animal de cuerpo macizo, patas cortas pero fuertes. Los jabalíes ibéricos son los más pequeños del continente europeo. Para los machos se encuentran pesos medios que varían entre 75 y 85 kg, mientras que las hembras se sitúan entre 55 y 65 kg. Son omnívoros. Los individuos silvestres se alimentan de lombrices, tubérculos, hongos, frutos, raíces y pequeños vertebrados (De la Vega, 2003).

Aunque existen claras diferencias morfológicas entre el jabalí y el cerdo doméstico actual, se conoce menos sobre las diferencias fisiológicas entre ambas especies. En este sentido, algunos parámetros de calidad seminal como la morfometría espermática se han aplicado en estudios de la biología evolutiva de diferentes especies. Ello ha permitido encontrar diferencias interespecíficas considerables en la morfología de la cabeza del espermatozoide entre especies íntimamente relacionadas, que incluso pueden ayudar a la identificación de especies crípticas (Sánchez *et al.*, 2013). En este proyecto hemos estudiado las diferencias entre los espermatozoides epididimarios de cerdo doméstico y jabalí. Para centrar el tema, haremos primero una descripción del espermatozoide y los métodos de evaluación de la calidad espermática, entre los que se incluye el análisis morfométrico.

5.2.- El espermatozoide en mamíferos

El espermatozoide es una célula haploide altamente especializada que se produce en los túbulos seminíferos de los testículos. Su principal función biológica es la de fecundar el oocito para la formación del cigoto. Dicha célula es el producto final de la gametogénesis en el macho, y contiene la información genética paterna.

La pubertad en el macho se produce cuando es capaz de producir un número suficiente de espermatozoides para fecundar a una hembra. En el verraco, por ejemplo, se puede definir como la edad del macho en la que el semen contenga 50×10^6 espermatozoides por eyaculado, con un mínimo del 10% móviles (Cunningham, 2003). A partir de entonces las células germinales masculinas reducen el número diploide de cromosomas, manteniendo los procesos de división y diferenciación de forma cíclica durante toda la vida. La reducción del número de cromosomas a la mitad es necesaria para que tras la fecundación se origine un cigoto diploide, pero además, durante la meiosis se produce el proceso de sobrecruzamiento cromosómico e intercambio de genes, lo que conlleva incrementar la diversidad genética (Benito, 2010).

Físico-químicamente están integrados por un 86% de agua; sustancias inorgánicas: sodio, potasio, calcio, magnesio, fósforo y otras; sustancias orgánicas: proteínas, hidratos de carbono (fructosa), ácido láctico y cítrico, vitaminas y, otros, en menor cuantía.

En cuanto a la morfología espermática podemos distinguir varias estructuras principales: la cabeza, que a su vez consta de acrosoma y núcleo, y la cola o flagelo, con la

pieza intermedia, la pieza principal y la pieza terminal (Fig. 1). A continuación describiremos cada una de sus partes.

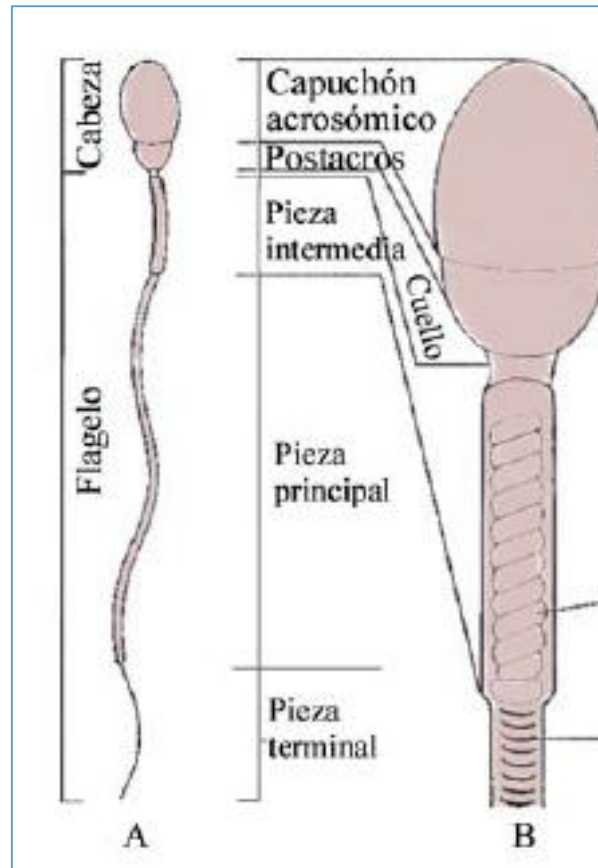


Figura 4. Estructura del espermatozoide

5.2.1.- La cabeza del espermatozoide

La cabeza del espermatozoide presenta variaciones en su forma según la especie. En el caso del verraco es ovoide y plana. El toro, morueco o el macho cabrío presentan esta misma morfología. En cuanto al tamaño existen diferencias considerables entre especies (Bhattacharyya *et al.*, 1982; Eddy *et al.*, 1988). Por ejemplo en el caso del cerdo las primeras investigaciones presentaban unos datos de 8 μm de largo y 5 μm de ancho (Cummins y Woowall, 1985). Otro estudio observó dimensiones de largo, ancho, y área de $8,0 \pm 0,29 \mu\text{m}$, $4,0 \pm 0,17 \mu\text{m}$, , respectivamente (Peña y Sarabia *et al.*, 2005); mientras que otros autores han reportado una media de $8,56 \pm 1,12$ y $4,62 \pm 0,95$ para la longitud y anchura en cerdos jóvenes y de fertilidad comprobada (Thurston *et al.*, 1999). Otro estudio concluyó afirmando que las dimensiones evolucionaban según la edad del verraco desde $8,84\mu\text{m}$ hasta $8,95\mu\text{m}$ de longitud alcanzados los 18 meses de edad (Quintero Moreno *et al.*, 2009). En anteriores trabajos del grupo ya se habían estudiado los parámetros morfométricos de la cabeza espermática del

verraco tanto en tratamiento en fresco como en frotis mediante el método CASMA-F. En el tratamiento en fresco se obtuvieron valores para el área, perímetro, longitud y anchura de $27,23 \pm 0,19 \mu\text{m}^2$, $21,85 \pm 0,10 \mu\text{m}$, $8,22 \pm 0,05 \mu\text{m}$ y $4,11 \pm 0,02 \mu\text{m}$, respectivamente. En el caso del tratamiento de fijación las medidas obtenidas fueron de $27,65 \pm 0,18 \mu\text{m}^2$, $22,00 \pm 0,08 \mu\text{m}$, $8,29 \pm 0,05 \mu\text{m}$ y $4,14 \pm 0,02 \mu\text{m}$ (Vicente-Fiel *et al.*, 2013b). Por otro lado en el caso del espermatozoide humano la Organización Mundial de la Salud establece unas dimensiones morfológicamente normales en 5-6 μm de longitud y 2,5-3,5 μm de ancho (WHO, 1999).

En la cabeza podemos localizar dos estructuras fundamentales: el acrosoma y el núcleo espermático además de pequeñas estructuras citoesqueléticas, un reducido citoplasma y la membrana plasmática (Fig. 2).

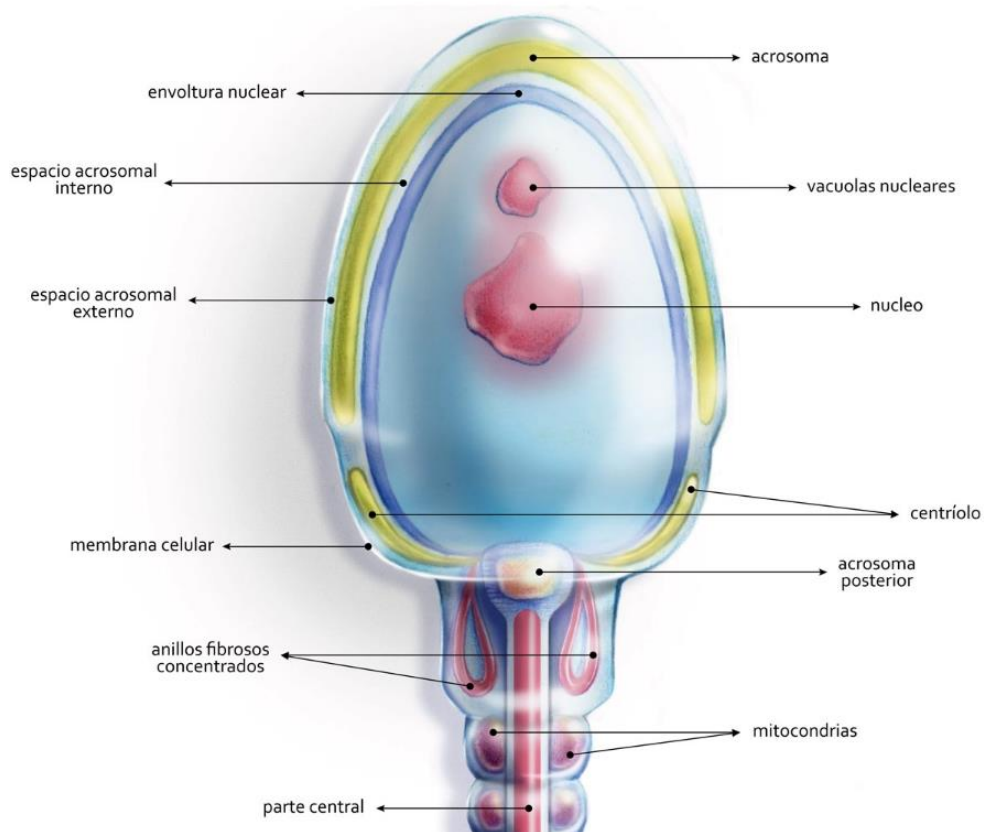


Figura 5. Estructura de la cabeza espermática

En un artículo de review reciente se contemplan datos de diversos autores en varias especies, entre las cuales encontramos la porcina. Estas medidas de los parámetros primarios están realizadas sobre la cabeza del espermatozoide. Las diferencias existentes pueden estar

debidas a la utilización de distintas tinciones (Yániz *et al.*, 2015). Por ejemplo, para el caso de la tinción doble de Eosina-Genciana encontramos valores de área 40,93 μm^2 y 27,43 μm^2 , longitud 9,36 μm y 7,93 μm y anchura 4,87 μm y 4,23 μm . (Kondracki *et al.*, 2005). Por otro lado también encontramos datos para la tinción con hematoxilina de Harris de área 25,06 μm^2 , perímetro 20,67 μm , longitud 7,61 μm y anchura 3,85 μm (García-Herreros *et al.*, 2006); frente a los aportados por Vicente-Fiel *et al.*, (2013b) de área 34,85 μm^2 , perímetro 23,93 μm , longitud 8,82 μm y anchura 4,59 μm .

5.2.2.- El núcleo espermático

El núcleo contiene un número haploide de cromosomas y nucleoproteínas, principalmente protaminas, y en menor cantidad estructuras del citoesqueleto. Todo ello rodeado por la membrana nuclear. Estas proteínas tienen funciones estructurales y enzimáticas. La cromatina espermática se encuentra altamente compactada, ocupando menos espacio que en las células somáticas, de forma que el empaquetamiento del ADN con las proteínas nucleares es tan estrecho que la transcripción resulta casi imposible. Durante la espermiogénesis ocurre una remodelación que conlleva a la producción de una célula altamente especializada pero con un núcleo transcripcionalmente inactivo y con la totalidad del citoplasma encapsulado en forma de cuerpo residual. Durante este proceso se produce una condensación progresiva de la cromatina que está asociada a modificaciones químicas en el ADN y proteínas nucleares, con una sustitución de las histonas por protaminas, proteínas pequeñas ricas en cisteína. Durante el tránsito epididimario se estabiliza este mecanismo de condensación con el incremento de puentes disulfuro a partir de los grupos tiol de los residuos de cisteína. La condensación de la cromatina disminuye el volumen del núcleo facilitando así la movilidad del espermatozoide y es fundamental para proteger el material genético del gameto masculino durante su exposición a ambientes agresivos como pueda ser la elevada acidez del tracto reproductor femenino. Cuando se ha producido la penetración del ovocito, el espermatozoide debe descondensar su cromatina para formar el pronúcleo masculino, reduciendo, como requisito, las uniones disulfuro del núcleo espermático. La capacidad fecundante del espermatozoide dependerá, entre otros factores, de la adecuada sucesión de estos tres eventos: condensación de la cromatina durante la espermatogénesis, estabilización durante la maduración espermática y descondensación dentro del ovocito para su fecundación. Cualquier daño del núcleo, dada su inercia metabólica sería imposible de reparar, lo que llevaría a una caída de la fertilidad (Sakkas *et al.*, 1995).

5.2.3.- El acrosoma

El acrosoma se localiza en la porción anterior del núcleo adaptado estrechamente al contorno de la parte anterior aguda del núcleo del espermatozoide. Se trata de una vesícula membranosa especializada en forma de capuchón que contiene enzimas hidrolíticas (como la acrosina, hialorunidasa y otras hidrolasas y esterasas), necesarias para la penetración de la zona pelúcida del ovocito en la fecundación. Posee una membrana externa limitante con la cara interna de la membrana plasmática y una membrana interna limitante con la membrana nuclear. Cuando la membrana acrosomal externa se fusiona con la membrana plasmática, los enzimas son liberados, conociéndose este proceso como reacción acrosómica (Fig.3) (Barros *et al.*, 1967). Dicha membrana plasmática es esencial para la función de los espermatozoides. Esta delicada e inestable capa proporciona protección física a la célula, actúa como una barrera selectiva para el paso de sustancias, y desempeña un papel fundamental en las interacciones con otras células, como las células epiteliales en el tracto genital de la hembra y los oocitos.

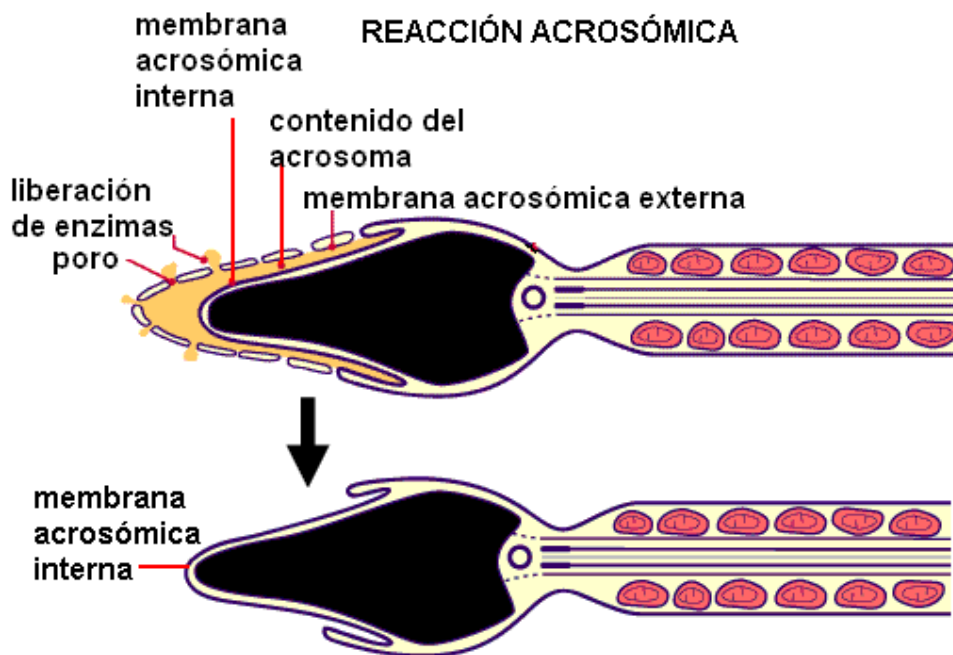


Figura 3. Representación de la reacción acrosómica.

La capacitación espermática es un fenómeno fisiológico importante e imprescindible para la fertilización del oocito (Cognie *et al.*, 1991) que tiene en parte lugar en el aparato genital femenino, y entre cuyas manifestaciones se encuentra la reacción del acrosoma

(Martínez *et al.*, 1989). Pero la reacción acrosómica puede verse alterada si se producen daños en la membrana plasmática o en el acrosoma ya que son irreversibles y pueden originarse por diversas causas entre las que se encuentran cambios osmóticos, shock térmico o cambios de pH. Todo ello puede causar una pérdida prematura del contenido acrosómico. Por tanto, la evaluación de la integridad del acrosoma constituye una prueba de valoración espermática muy importante dada la gran trascendencia de esta estructura para la funcionalidad del espermatozoide (Graham *et al.*, 1980), teniendo un gran valor predictivo de la fertilidad potencial del espermatozoide (Benoff *et al.*, 1993; Bielsa *et al.*, 1994). Asimismo, varios autores han obtenido una alta correlación entre el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro y la fertilidad (Saacke y White, 1972; Juneja *et al.*, 1990).

La evaluación de la integridad acrosómica puede realizarse mediante la fijación de las células y su observación con microscopía de contraste de fases (Söderquist *et al.*, 1997), con microscopía de fluorescencia (Johnson *et al.*, 1996) o con extensiones teñidas bajo iluminación en campo claro (Varner *et al.*, 1987).

Entre la bibliografía consultada existe una gran diversidad de técnicas de tinción con distintas sustancias. Por ejemplo, la tinción Wells-Awa, 1970, que consiste en la combinación de alcohol etílico, eosina y verde brillante para su posterior evaluación en el microscopio de luz convencional. Por otro lado encontramos la tinción triple (TST) basada en la combinación de tres colorantes, el azul Tripán (colorante vital), marrón Bismark (colorante postacrosómico) y rosa de Bengala (colorante acrosómico) (Talbot y Chacon, 1981). Esta triple tinción presenta la ventaja de que permite poder diferenciar de forma conjunta la integridad del acrosoma y la viabilidad de las células espermáticas. Aunque inicialmente se desarrolló para espermatozoides humanos, ha sido ajustada para aplicarla en otras especies como el verraco (Barrientos *et al.*, 2009), el ratón (Talbot y Chacon, 1981), toro (Didion y Graves, 1986), caballo (Varner *et al.*, 1987) y macho cabrío (Kusunoki *et al.*, 1989); (Vázquez *et al.*, 1992). Por último también encontramos entre las tinciones más utilizadas la combinación de eosina-nigrosina (Bamba *et al.*, 1988). En el caso de las preparaciones en las que no se utiliza ningún tipo de tinción, lo más frecuente es fijar las células con glutaraldehído o soluciones salinas formoladas (Memon y Ott, 1981), realizando su evaluación mediante contraste de fases.

A pesar de que las tinciones anteriormente nombradas han sido las más utilizadas se han ido desarrollando en los últimos años numerosas técnicas basadas en el empleo de fluorocromos o sustancias fluorescentes, aprovechando su propiedad de atravesar o no las membranas espermáticas en función del estado funcional de las mismas. Se han descrito

tinciones simples o dobles, como por ejemplo los siguientes fluorocromos: diacetato de carboxifluorosceína, yoduro de propidio (IP), Hoechst 33342, Hoechst 33258, SYBR-14, y naranja de acridina entre otros, para determinar la viabilidad de la célula espermática (Cardona Maya *et al.*, 2006; Fernández *et al.* 1998; Graham *et al.*, 1980; Johnson *et al.*, 1996).

Actualmente, el empleo de citometría de flujo y fluorocromos específicos, como el pisum sativum agglutinin lectin (PSA), permiten evaluar de forma precisa las alteraciones acrosómicas del espermatozoide, gracias a la coloración de un color u otro de la membrana externa acrosómica dependiendo de si está dañada (permeable) o no (impermeable) (Ericsson *et al.*, 1990).

5.2.4.- El flagelo del espermatozoide

Es el responsable del movimiento y lo constituyen tres regiones: la pieza intermedia, la pieza principal y la pieza terminal, que es la estructura que le confiere el movimiento. El axonema está formado por una serie de microtúbulos agrupados en dobletes y se distribuyen en uno central y nueve periféricos. Podemos distinguir tres partes diferencias en su estructura:

- Pieza intermedia: Se caracteriza por la presencia de una doble hélice de mitocondrias. Se disponen alrededor de 9 pares de fibras longitudinales denominadas “fibras densas”, que rodean al axonema. Debido a su composición de proteínas ricas en cisteína, que presentan grupos sulfhidrido (-SH) lo que da lugar a la formación de puentes disulfuro (-S-S-) durante la maduración espermática y que podrían conferir propiedades elásticas y facilitar así la propagación del movimiento ondulatorio a través del flagelo (Soler *et al.*, 1994).
- Pieza principal: Ocupa la mayor parte de la cola. Formada por las 9 fibras densas y el axonema que se continúan desde la zona intermedia. Las fibras van reduciendo su tamaño hasta desaparecer al final de esta región. Su función principal es la de proporcionar movilidad al espermatozoide (Pesch y Bergmann, 2006).
- Pieza terminal: Constituye el final del flagelo. Está formada por el axonema, sin vaina fibrosa.

5.3.-Evaluación de la calidad seminal

Tradicionalmente la calidad de los eyaculados ha sido evaluada mediante el espermiograma clásico. Este análisis rutinario se ha utilizado durante mucho tiempo como única herramienta para valorar los eyaculados (Chan *et al.*, 1985). Este análisis está basado en la ejecución de distintas pruebas que incluyen un análisis macroscópico que permite el estudio del volumen y la concentración, entre otros, y un análisis microscopio que mide la motilidad, el estado del acrosoma y las morfoanomalías espermáticas. Aunque son técnicas simples y con un coste relativamente bajo, presentan unas tasas de correlación con la fertilidad generalmente bajas (McClure *et al.*, 1991; Hidalgo, 2002). Por ello se han desarrollado los sistemas de análisis de semen asistido por ordenador (CASA, computer assisted sperm analysis) (Davis *et al.*, 1992; Kruger *et al.*, 1993). Los sistemas CASA proporcionan una serie de parámetros de movilidad y morfométricos de manera objetiva que facilitan la evaluación del espermatozoide. Los principales limitantes de esta técnica son que requiere mucho tiempo en lo referente a la evaluación morfométrica y que el coste es mayor. Estos sistemas constan de varias unidades interdependientes: un microscopio conectado a una cámara de vídeo, que envía la imagen desde el microscopio a un ordenador, donde un analizador digital de imagen captura varias fotografías seriadas de cada campo microscópico seleccionado, normalmente en menos de 1 segundo.

5.3.1.-Estudio del volumen y la concentración espermática

Es importante realizar una correcta evaluación de la concentración espermática ya que podemos encontrar grandes diferencias de concentración entre un eyaculado y otro, siendo interesante conocer el número de espermatozoides que existe en cada uno de ellos ya que de este parámetro dependerá el número de hembras a inseminar. Entre las técnicas más utilizadas para la evaluación de la concentración espermática encontramos la espectrofometría, la colorimetría, la citometría de flujo y el uso de la cámara de recuento (Quintero, 2003), ya que los contadores de partículas, los métodos fluorométricos y los sistemas de análisis de semen asistidos por ordenador son más complejos.

El recuento en cámara 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. Tradicionalmente, la cámara de Neubauer ha sido la más utilizada ya que ha sido recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), aunque se producen variaciones debido a distribuciones no homogéneas de las células dentro de la cámara y a imprecisiones en el proceso de dilución (Woelders, 1991). Para aumentar la precisión del

procedimiento y la reproducibilidad de los resultados se han creado nuevas cámaras que utilizan la muestra sin diluir (Cardona Maya *et al.*, 2008), como la cámara Makler® (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel), Microcell (Concepcion Technologies, Natick, MA, EE.UU.), Horwell® (Horwell Ltd, Londres, Reino Unido), Blaubrand®, Bürker®, ISAS® y Cámara de recuento Leja®, para determinar la concentración de espermatozoides.

En cuanto al estudio del volumen se realiza directamente tras la recogida del semen en el tubo colector evitando el error producido al pasar el eyaculado de un recipiente a otro para su valoración (Maxwell y Evans, 1990). En el caso del verraco el volumen de eyaculado es elevado en comparación con otras especies pero encontramos variabilidad entre los autores (Tabla 1).

Tabla 1. Valores normales de volumen y concentración descritos en la especie porcina (Gadea, 1997)

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

5.3.2.-Estudio de la movilidad

Este parámetro ha sido uno de los más estudiados ya que algunos autores afirman que puede ser uno de los factores que mejor se correlaciona con la fertilidad (Shanis *et al.*, 1989). Sin embargo, los resultados están limitados tanto por la subjetividad de la prueba como por la elevada sensibilidad de esta variable a la manipulación necesaria para su valoración (Boixo, 1994). Dicho parámetro depende de factores intrínsecos como son la estructura del flagelo y la

actividad enzimática de la dineína, así como de factores extrínsecos como por ejemplo la composición bioquímica del medio extracelular en que se encuentra el espermatozoide.

Su evaluación se realiza tradicionalmente de manera subjetiva con una gota de semen diluido en una solución isosmótica mediante un microscopio óptico, determinando el porcentaje de espermatozoides móviles y el tipo de movimiento que describen (Maxwell y Evans, 1990). Esta evaluación subjetiva ha pasado a un segundo plano a favor de los actuales sistemas de análisis de imagen asistidos por ordenador, (sistemas CASA) nombrados anteriormente, que son capaces de determinar, de manera objetiva, toda una serie de parámetros de velocidad y angularidad que colaboran en el establecimiento de un grado de calidad de movimiento (Burkman, 1995). 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 (Muiño, 2007).

En el análisis se pueden identificar distintos tipos de movimientos: movilidad progresiva rápida, movilidad progresiva lenta o lineal, movilidad no progresiva y espermatozoides inmóviles (Padrón *et al.*, 1998), siendo el más importante el movimiento rectilíneo progresivo ya que es fundamental para la fecundación permitiendo a los espermatozoides llegar en pocos minutos a las trompas uterinas.

5.3.3.-Estudio de la morfología espermática

La identificación de espermatozoides morfológicamente anormales presentes en los eyaculados es una tarea importante ya que su capacidad de completar la fecundación puede verse reducida y el riesgo de muerte precoz embrionaria aumenta. La presencia de un alto porcentaje de formas anormales puede estar relacionada con procesos degenerativos y patológicos o con una inmadurez sexual (Smith y Sherman, 1994). La evaluación de este parámetro se ha visto afectada por numerosos factores como el tipo de tinción utilizada, la forma de realizar la extensión, la subjetividad del observador, el campo del porta que se observa etc.

La morfología espermática tradicionalmente se ha evaluado mediante observación visual al microscopio de muestras teñidas con diversas técnicas. Actualmente para realizar un estudio básico se siguen dos criterios: el criterio estricto de Kruger (Kruger *et al.*, 1993; Menkveld *et al.*, 1990), basándose en las diversas anomalías morfológicas o el recomendado por la OMS (WHO, 1999) basado en la definición del espermatozoide normal.

Entre las anomalías más comunes asociadas con fertilidad reducida podemos encontrar cabezas anormales, espermatozoides decapitados, anomalías de la pieza intermedia y colas dobladas o enrolladas en espiral, así como determinadas anomalías heredables (Dresdner y Katz, 1981) (Fig.4). Cualquiera de estas anomalías si afecta a un número elevado de espermatozoides, puede llegar a comprometer la fertilidad del semen. Otra anomalía relativamente frecuente son los espermatozoides con la cabeza de forma piriforme. Los espermatozoides con este defecto presentan menor capacidad de unión y de penetración de la zona pelúcida, y si consiguen fecundar a algún ovocito, los cigotos resultantes tenían menor capacidad para iniciar su desarrollo y degeneraban a las pocas horas (Thundathil et al., 1999).

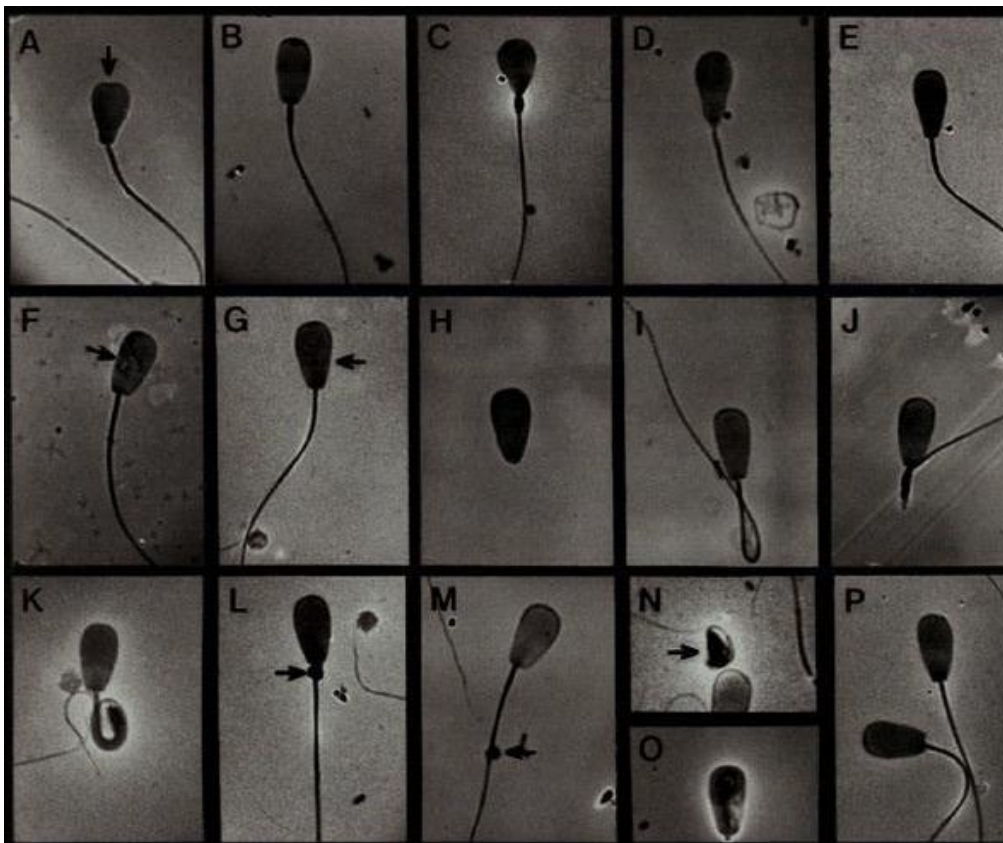


Figura 6. Espermatozoides normales y algunas formas anormales. A-Sin acrosoma (forma común). B- Sin apenas acrosoma. C- Con cabeza piriforme cabeza. D- Con cabeza piriforme moderada. E- Con cabeza piriforme leve. F- Con vacuolas. G-Defectos en la membrana. H- Sin flagelo. I- Reflejo distal. J- Parte media rota. K- Parte media severamente doblada. L- Gota proximal. M- Gota distal. N- Teratozoide grave. O-Teratozoide moderado. P-Espermatozoide normal (Barth *et al.*, 1989).

5.3.4.-Estudio de la morfometría espermática

5.3.4.1.- Evaluación morfométrica del núcleo y la cabeza espermática

La valoración de la calidad seminal mediante las técnicas convencionales se ve condicionada por la subjetividad del análisis. Para conseguir unos resultados más fiables y su consecuente repetitividad se desarrollaron los primeros sistemas semi-automáticos para el análisis por imagen de la morfología espermática (Jago *et al.*, 1986; Moruzzi *et al.*, 1988).

A finales de los años 90 aparecieron en el mercado los primeros sistemas ASMA (Automatic Semen Morphometry Analysis) o CASMA (Computer Automatic Semen Morphometry Analysis). Esto ha sido un gran avance para acabar con la subjetividad de los análisis consiguiendo realizar análisis objetivos y precisos. Inicialmente la técnica fue validada para el espermatozoide humano (Davis *et al.*, 1992; Kruger *et al.*, 1993) adaptándose en otras especies posteriormente (Gravance *et al.*, 1996; Sancho *et al.*, 1998; Iguer-Ouada y Verstegen, 2002). Es interesante disponer de estos datos morfométricos para intentar mejorar la capacidad fecundante in vivo de las dosis seminales, puesto que se ha comprobado que la morfometría anormal de las cabezas espermáticas influye negativamente en la fertilidad de los sementales bovinos (Gravance *et al.*, 1996).

Estos sistemas se componen de un microscopio que a través de una cámara de vídeo incorporada transmite imágenes procedentes de extensiones de muestras de espermatozoides previamente teñidas, hacia una tarjeta capturadora ubicada en el ordenador. La imagen microscópica digitalizada es procesada por el software de análisis, informando de forma individualizada acerca de las características morfométricas de los espermatozoides capturados (Hidalgo *et al.*, 2002).

La eficacia de estos sistemas depende de la estandarización en cada especie de una serie de variables analíticas que intervienen en el análisis, (Davis y Gravance, 1993; Gravance *et al.*, 1995; Gago *et al.*, 1998; Hidalgo *et al.*, 2002), y que afectan tanto a la preparación de la muestra (lavado, fijación y tinción) y captura de imágenes con microscopio bajo condiciones adecuadas de iluminación, como al análisis de las mismas. En el caso de la especie porcina Hirai *et al.*, (2001), encontraron relaciones significativas entre las dimensiones espermáticas determinadas por el sistema CASMA y las tasas de fertilidad.

En un trabajo reciente se estandarizó y desarrolló un nuevo método para evaluar la morfometría del núcleo espermático (CASMA-F), basado en la utilización de un software libre y microscopía de fluorescencia (Yániz *et al.*, 2012). Este método, basado en el estudio del núcleo

espermático, principal constituyente de la cabeza del espermatozoide, permite la determinación automática del núcleo espermático, lo que facilita su uso en el análisis del semen de rutina. Las preparaciones de las muestras se basan en el marcaje de ADN con el Hoechst 33342, un fluorocromo permeable, que permite la tinción de muestras frescas y de frotis. La tinción fluorescente del ADN mejora el contraste entre la cabeza del espermatozoide y el fondo, en comparación con los métodos de tinción tradicionales y marca, específicamente, la cabeza del espermatozoide. Un buen contraste entre la cabeza del espermatozoide y el fondo permite una selección más precisa de los límites de la cabeza del espermatozoide, y facilita la automatización. Esta técnica llamada CASMA-F ha sido estandarizada para diversas especies como por ejemplo el toro, el verraco y el macho cabrío (Vicente Fiel *et al.*, 2013).

Por otro lado, aunque se haya mejorado la objetividad del análisis, existen factores externos relacionados con la influencia del medio ambiente o el procesamiento de la muestra, e internos, como la edad, madurez sexual, la raza y factores genéticos que pueden influir en dicho análisis y que han sido revisados recientemente en distintas especies (Yániz *et al.*, 2015). Para la especie porcina se han estudiado las diferencias morfométricas entre espermatozoides de distintas razas de cerdos (Saravia *et al.*, 2007) al igual que se han descrito las posibles diferencias causadas por la edad y la madurez sexual (Kondracki *et al.*, 2005). También se ha evaluado en otros casos el efecto de la fijación, tinción y secado de las muestras (Ball y Mohammed, 1995) en general y también utilizando el método CASMA-F, siendo en este último caso menos importante su efecto de lo que se suponía anteriormente (Vicente Fiel *et al.*, 2013a). Debido a ello el método CASMA-F nos permite utilizar la misma tinción en varias especies, permitiendo así la comparación directa entre ellas (Vicente Fiel *et al.*, 2013a, b).

En el análisis morfométrico, los parámetros que se suelen medir en la cabeza del espermatozoide son el área (A, en μm^2 , como la suma de toda el área de píxeles contenidos dentro de los límites), el perímetro (P, en μm , como la suma de las fronteras exteriores), la anchura (W) y la longitud (L) (en μm , los valores máximo y mínimo, respectivamente, de los diámetros de la núcleo, es decir, la proyección del núcleo del espermatozoide en el eje horizontal, medido en ángulo de rotación de 0, 30, 60, 90, 120 y 150 grados, longitud y anchura no son necesariamente ortogonales) (Fig.5), que se denominan parámetros primarios. Además, con estas cuatro parámetros obtienen otros cuatro derivados de estos que también son de interés para este tipo de análisis: la elipticidad (L / W), grado de circularidad), rugosidad ($4\pi A/P^2$), estrías del borde del núcleo espermático), elongación ($[(L - W) / (L + W)]$), proporción entre la longitud y la anchura, alargamiento), y regularidad ($\pi LW / 4A$, uniformidad) (Fig.5), denominados parámetros secundarios.

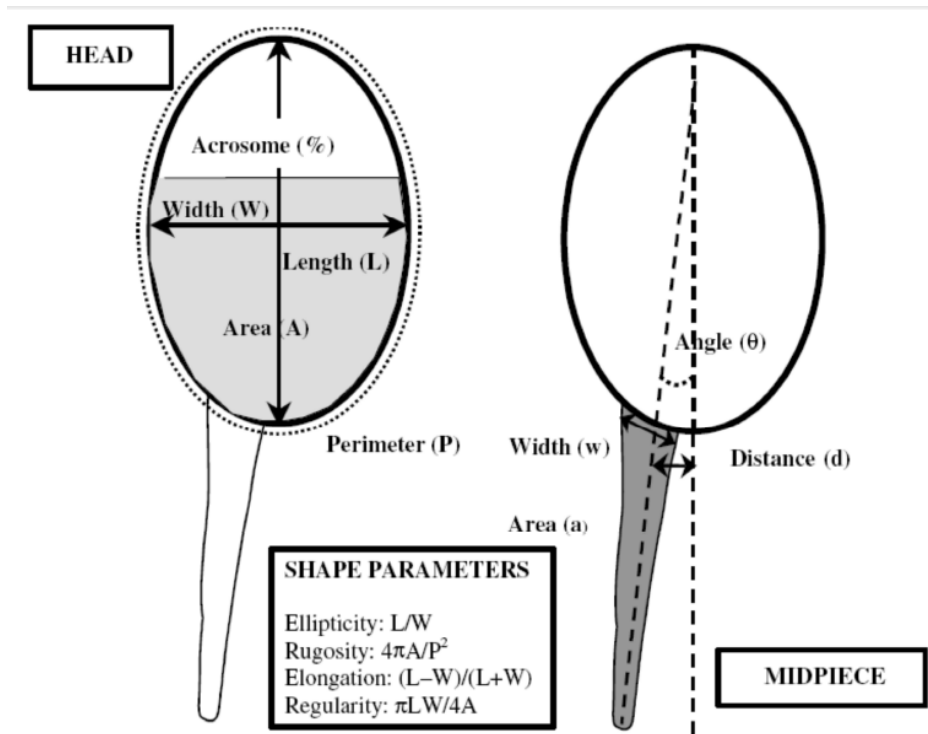


Figura 5: Parámetros morfométricos medidos en este estudio

5.3.4.2.-Evaluación morfométrica del acrosoma

El acrosoma desempeña un papel vital en cuanto a la funcionalidad del espermatozoide ya que para atravesar la zona pelúcida tiene que efectuarse la reacción acrosómica correctamente. Por ello su evaluación es un proceso muy importante. Liu y Baker (1988) y Menkveld *et al.*, (1996) demostraron que la morfología normal del acrosoma se correlaciona significativamente con la unión del espermatozoide a la zona pelúcida, mientras que Franken *et al.*, (1997) demostraron que existe una fuerte relación entre la morfología espermática normal y la capacidad de inducir la reacción acrosómica.

La evaluación de la morfometría del acrosoma requiere una tinción diferencial de los espermatozoides, solamente conseguida de manera que permita el análisis morfométrico en algunas especies, como la humana y canina. Una técnica de tinción debe causar el menor cambio a las dimensiones y forma de los espermatozoides; a fin de evaluar de forma fiable las características morfométricas. Los métodos tradicionales tales como el CASMA y las tinciones clásicas solo han permitido la evaluación morfométrica del acrosoma en la especie humana (Soler *et al.*, 2003; Falzone *et al.*, 2011; Menkveld *et al.*, 2003; Maree *et al.*, 2010; Lampiao *et*

al., 2006) y canina (Núñez-Martínez *et al.*, 2005). En el resto de especies no se consiguió un contraste suficiente como para estudiar el acrosoma de manera clara, por lo que se tuvieron que desarrollar nuevos protocolos para solucionar este problema. Esto llevo a que se desarrollara una nueva metodología basada en un microscopio de contraste de fases y varios protocolos de tinción que permitieron evaluar simultáneamente la cabeza, el núcleo y el acrosoma en el morueco (Yániz *et al.*, 2014).

Este ha sido el primer método capaz de discriminar la morfometría de los componentes de la cabeza del espermatozoide por separada en mamíferos. Permite un estudio más detallado, más rápido y más preciso de los diferentes componentes de la cabeza espermática, con la ventaja adicional de estar basado en el uso de software libre de código abierto.

MATERIAL Y MÉTODOS

6.-MATERIAL Y MÉTODOS

6.1.-Reactivos

A menos que se indique lo contrario, todos los productos químicos utilizados se obtuvieron de Sigma-Chemical Company (Alcobendas, Madrid, España) y los diluyentes se prepararon con agua Mili-Q (Milipore Ibérica S.A., Barcelona, España).

6.2.-Manipulación del semen

Anterior al análisis de la morfometría se procedió a comprobar el estado de las muestras para homogeneizarlas.

6.2.1.-Concentración espermática

Se incubaron en la estufa a 37°C 995 μ l de PBS a los que se añadieron 5 μ l de semen y 5 μ l de formaldehído para fijar la muestra. Se vertió una gota en una cámara Makler (Fig. 1) y se observó al microscopio a 100X (Olympus BX40, Olympus Optical Co., Ltd., Japón). Se tomaron 8 imágenes de campos diferentes utilizando un analizador de espermatozoides asistido por ordenador (CASA, ISAS[®], Versión 1.0, PROISER, Valencia, España) (Fig. 2), con el módulo de concentración utilizando el objetivo de fases negativo (10/x0,30) anotando la concentración resultante. A continuación se ajustó la concentración para obtener 200 millones de espermatozoides/ml. En la mayoría de los casos para obtener una concentración de 200 millones de espermatozoides/ml se diluyeron 15 μ l de semen en 485 μ l de PBS.

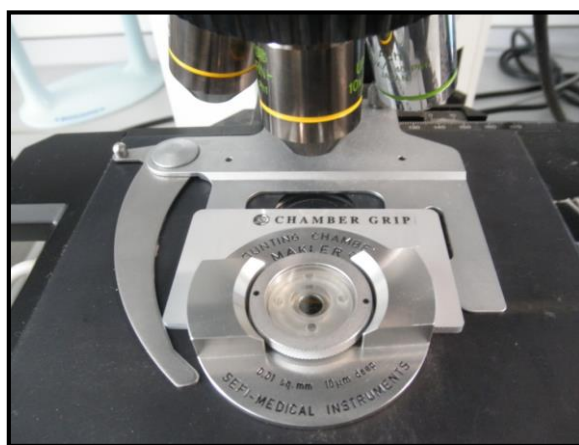


Figura 6. Cámara Makler en posición para su visionado al microscopio.

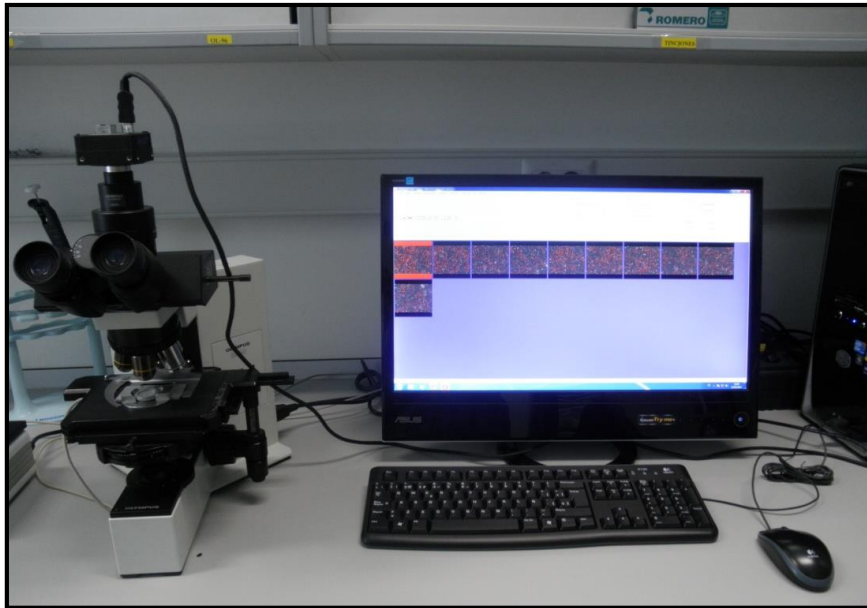


Figura 7. Sistema CASA, microscopio óptico conectado a una cámara que a su vez se controla por un software de análisis de imágenes en el ordenador.

6.3.- Jabalí

6.3.1.-Recogida y obtención del semen

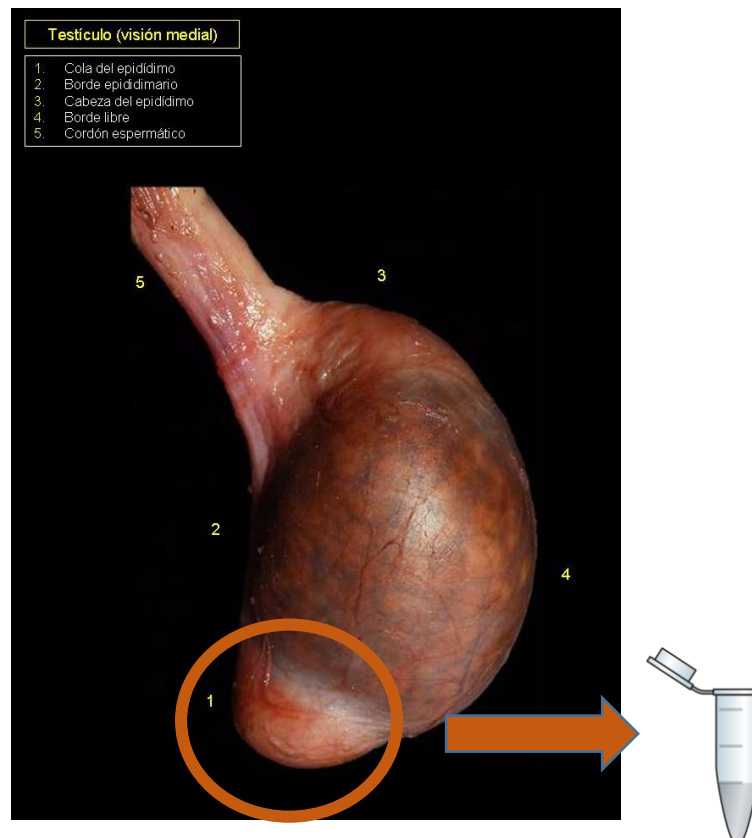


Figura 8. Extracción de semen de jabalí

Los testículos de jabalí llegaron al laboratorio de Producción Animal donde se procedió a su posterior limpieza, fotografiado y pesado en la báscula de precisión.

Para extraer el semen de los testículos se realizaba una punción con una aguja en la cola del epidídimo y se recogía en un eppendorf (Fig. 3).

6.3.2.-Preparación de las muestras para la evaluación morfométrica del núcleo espermático

Para su análisis se realizaron cuatro tratamientos distintos que detallaremos a continuación.

6.3.2.1 Fresco

Se tomaron en un eppendorf de 1,5 ml, 50 μ l de semen de la muestra ya diluida y se le añadió 1 μ l de Hoechst 33342 (marcador fluorescente con afinidad específica por el ADN que permite marcar los espermatozoides de cualquier especie de manera semejante). Esta muestra se incubó en al estufa durante 20 minutos a 37°C.

Posteriormente se añadieron 5 μ l de formaldehído a una concentración de 0,005%, para inmovilizar los espermatozoides. Por último, se añadieron dos gotas de 5 μ l a un portaobjetos y se tapó con dos cubres para ser observado en el microscopio.

6.3.2.2 Frotis sin fijar

En un portaobjetos se extendía una gota de 5 μ l de semen de la muestra dejando secar como mínimo 24 horas. Se realizaron 3 frotis de cada macho.

Posteriormente se preparó una solución que contenía 20 μ l de H342 diluidos en 480 μ l de diluyente TRIS (tampón biológico cuya misión es mantener el pH de una solución estable). Una vez secados los frotis se añadían dos gotas de esta solución al porta, cubriendo con un cubreobjetos, se dejaron incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo, se retiraron los cubres y se lavaron las muestras primero con agua y luego con agua destilada. Una vez secas se procedió al fotografiado de imágenes.

6.3.2.3 Frotis fijados con metanol y glutaraldehído

Se prepararon como mínimo 5 frotis procediendo de igual manera que en el apartado 6.3.2.2.

Una vez secos, se sumergieron durante 3 minutos por un lado los fijados con metanol en un recipiente que contenía 50% de metanol en PBS, y para los fijados con glutaraldehído en un recipiente que contenía 2% de glutaraldehído en PBS. Pasado este tiempo se secaron y se lavaron con agua destilada para parar la acción de los fijadores. Posteriormente se procedió a su tinción con H342 de la misma manera que en los frotis sin fijar.

6.3.3.- Preparación de las muestras para la evaluación morfométrica del acrosoma

Se realizaron un mínimo de 5 frotis extendiendo 5 μ l de la muestra de semen en un portaobjetos dejándose secar durante 24 horas como mínimo. Posteriormente se fijaron las muestras con etanol al 96% durante 15 minutos.

A continuación se preparó una solución 90 μ l de PBS con 10 μ l de PSA y 2 μ l de yoduro de propidio, en la que se incubaron las preparaciones durante 10 minutos a temperatura ambiente resguardadas de la luz. A continuación se lavaron las muestras con agua destilada. Una vez secas se procedió a la captura de imágenes.

6.4.-Verraco

6.4.1.- Recogida y obtención del semen

Se trabajó con la raza Pietrain. El semen fue extraído mediante el método de recogida manual y aprovechando solo la fracción rica de espermatozoides en una Granja Comercial en Huesca (cercana a Walqa). En todos los casos los machos siguieron una alimentación estándar y un manejo regular de extracciones seminales.

Las muestras llegaron refrigeradas al laboratorio de Producción Animal y diluidas en un diluyente comercial.

6.4.2.- Preparación de las muestras para la evaluación morfométrica del núcleo espermático

Se realizaron un mínimo de 3 frotis por macho extendiendo 5 μ l de la muestra de semen y dejándose secar durante 24 horas.

Cuando los frotis estuvieron secos, se sumergieron durante 3 minutos en una solución de 2% de glutaraldehído en PBS, transcurrido el tiempo se secaron y se lavaron con agua destilada para detener la acción del fijador. Posteriormente se preparó una solución que contenía 20 μ l de H342 diluidos en 480 μ l de diluyente TRIS, añadiéndose dos gotas de esta

solución al porta, cubriendo con un cubreobjetos. Se dejaron incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Al pasar dicho tiempo se lavaron con agua destilada, se secaron y se procedió a la captura de imágenes.

6.4.3.- Preparación de las muestras para la evaluación morfométrica del acrosoma

En este caso se procedió de la misma manera que para la evaluación morfométrica del acrosoma en jabalí, detallado en el apartado 6.2.3.

6.5.-Imagen de fluorescencia

En el caso de la captura de imágenes para la evaluación morfométrica del núcleo espermático, las imágenes digitalizadas de los espermatozoides marcados con fluorescencia se registraron con una instalación compuesta de un microscopio de epifluorescencia (DM4500B, Leica, Alemania), con un objetivo de 63X plan de apocromáticos y los juegos de filtros apropiados, y se fotografiaron con una cámara Canon Eos 400D digital (Fig. 9). La cámara se controlaba mediante un ordenador con DSLR Remote Pro software (Sistemas de Breeze). El tamaño de los núcleos de los espermatozoides obtenidos por microscopía de epifluorescencia puede ser alterado mediante la modificación de la intensidad de fluorescencia. Para evitar esta variación, antes de iniciar la captura de las imágenes para cada muestra, se tomaron algunas fotografías y se procesaron mediante el software Image J libre (versión 1,45e, disponibles en línea en <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) para determinar la intensidad de fluorescencia en la cabeza del espermatozoide. Esta intensidad se ajustó, cuando fue necesario, modificando el tiempo de exposición de la cámara, pero la intensidad de la lámpara se fijó al 17%.

Las imágenes digitalizadas obtenidas eran de 2.493.568 píxeles y 256 niveles de gris. La resolución de la imagen fue de 0,081 m/píxel en los ejes horizontal y vertical. De cada imagen, las cabezas de los espermatozoides se capturaron automáticamente y se analizaron con el programa Image J, con un macro creado para este fin. En cada macro quedó definido el método de valor umbral (Thersholding Methods), los píxeles y valores máximos y mínimos a los que iba va a trabajar. El método de selección para la captura automática se realizó en base a la observación de los bordes de los espermatozoides capturados utilizando el zoom, y mediante la comparación de las mediciones morfométricas obtenidas con los distintos macros creados y la medida realizada manualmente en las mismas imágenes. Después de crear una macro y un acceso directo, los núcleos fueron capturados pulsado solamente una tecla.

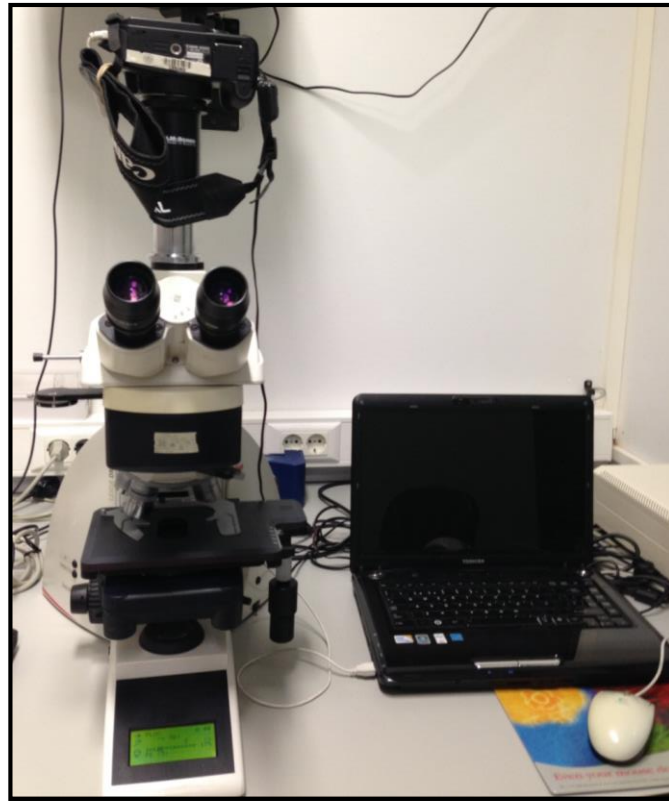


Figura 9: Microscopio de epifluorescencia (DM4500B, Leica, Alemania), al que va acoplado una cámara Canon Eos 400D digital que se controlaba mediante un ordenador con el programa DSLR Remote Pro software (Sistemas de Breeze).

Los espermatozoides se mostraron en el monitor con un brillo equivalente para todas las mediciones. Las cabezas de los espermatozoides que no se superpusieron y los espermatozoides que no presentaron anomalías fueron los que se consideraron para el análisis. De cada muestra se capturaron y analizaron 200 cabezas.

En cada espermatozoide se determinaron cuatro parámetros primarios: el área del núcleo (A , en μm^2 , como la suma de toda el área de píxeles contenidos dentro de los límites), el perímetro (P , en μm , como la suma de las fronteras exteriores), longitud (L) y anchura (W) (en μm , los valores máximo y mínimo, respectivamente, de los diámetros de la núcleo, es decir, la proyección del núcleo del espermatozoide en el eje horizontal, medido en ángulo de rotación de 0, 30, 60, 90, 120 y 150 grados, longitud y anchura no son necesariamente ortogonales) y cuatro parámetros derivados de la forma de la cabeza, que denominaremos

parámetros secundarios: elipticidad (L/W), rugosidad ($4\pi A/P^2$), elongación ($(L - W)/(L + W)$) y regularidad ($\pi LW/4A$).

En el caso de la evaluación morfométrica del acrosoma, el equipo utilizado fue el mismo que el descrito para la morfometría del núcleo espermático. Se analizaron en el programa Image J 200-espermatozoides, tomando para el mismo espermatozoide las medidas para el acrosoma, el núcleo espermático y el acrosoma + núcleo espermático (cabeza), de los parámetros primarios y secundarios, descritos anteriormente.

6.6.- Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS, versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.). El nivel de significación estadística se fijó en $P < 0,05$. Todos los valores se expresaron como media \pm error típico de la media.

La normalidad de las distribuciones y la homogeneidad de las varianzas de los valores medios para cada prueba fueron verificadas por la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Como todos los datos siguieron distribución normal, se utilizaron pruebas paramétricas para su análisis. En todos los casos, las diferencias en los parámetros morfométricos del núcleo del espermatozoide fueron examinadas a través del análisis de varianza (ANOVA) mediante modelos lineales generalizados. Para las comparaciones múltiples se realizó el test de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo, se ha realizado una comparación de la morfometría espermática en cerdo doméstico y jabalí por primera vez. Esta comparación fue posible gracias a un método previamente desarrollado (Yániz *et al.*, 2012; Yániz *et al.*, 2014) basado en la tinción fluorescente (CASMA-F). El análisis de imagen con el programa IMAGE-J permitió una adecuada selección automática de los núcleos espermáticos (Figura 10).

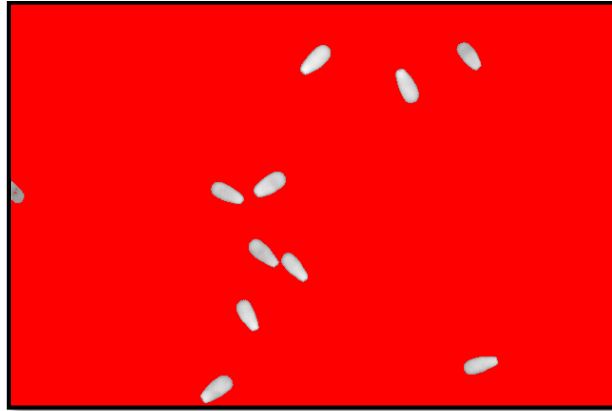


Figura 10. Núcleos espermáticos capturados con el software IMAGE J.

7.1-Análisis morfométrico del núcleo espermático.

En este apartado se compararon los parámetros primarios y secundarios del núcleo espermático en las diferentes fases del procesado de las muestras en jabalí. En la especie porcina no se realizó este análisis porque ya se describió en un trabajo previo del grupo. Se compararon también los parámetros obtenidos para las 2 especies estudiadas (únicamente muestras provenientes de frotis fijados con glutaraldehído).

7.1.1-Efecto del procesado sobre la morfometría del núcleo en jabalí.

Hemos evaluado el efecto de los distintos procesados en la morfometría nuclear espermática en jabalí. Generalmente se asume que secado y fijación reducen las dimensiones del espermatozoide, aunque sólo unos pocos estudios han evaluado este aspecto (Yániz *et al.*, 2015).

El secado de los frotis tuvo muy poco efecto sobre los parámetros morfométricos primarios (Tabla 2), mientras que las fijaciones con glutaraldehído y metanol sí que tuvieron efecto, obteniendo valores significativamente menores para todos los parámetros

morfométricos primarios, siendo los valores obtenidos de la fijación con glutaraldehído los más pequeños en todos los parámetros morfométricos primarios.

Tabla 2. Efecto del procesado sobre los parámetros primarios de la morfometría nuclear espermática.

TRATAMIENTO	ÁREA (μm^2)	PERÍMETRO(μm)	LONGITUD(μm)	ANCHURA (μm)
DRY	29,008±0,032 ^c	22,409±0,014 ^b	8,418±0,005 ^b	4,230±0,003 ^c
FRESCO	29,013±0,032 ^c	22,558±0,012 ^c	8,420±0,005 ^b	4,226±0,003 ^c
GLUT	28,505±0,025 ^a	22,215±0,009 ^a	8,363±0,004 ^a	4,168±0,002 ^a
MET	28,679±0,026 ^b	22,251±0,010 ^a	8,377±0,004 ^a	4,190±0,002 ^b

Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamiento (P<0,05)

En resumen, el secado al aire apenas tuvo efecto sobre los parámetros morfométricos, al igual que se observó en los cerdos en un trabajo previo (Vicente-Fiel *et al.*, 2013). Esta peculiaridad podría asociarse al alto grado de condensación de la cromatina en estas especies (Enciso *et al.*, 2011). La posterior fijación de los frotis seminales produjo una disminución de todos los parámetros, algo más marcada cuando se tiñeron con glutaraldehído que con metanol. En estudios previos, la fijación produjo un efecto variable según la especie, aunque en ningún caso se observó una disminución del tamaño nuclear comparado con el frotis seco (Vicente-Fiel *et al.*, 2013). El proceso de fijación incluye la exposición de los espermatozoides en un medio líquido, donde el esperma es rehidratado. En algunos casos, el fijador puede ayudar a conseguir el mejor mantenimiento de dimensiones de espermatozoide después del segundo secado (Yániz *et al.*, 2012), aunque en el jabalí no hemos observado este fenómeno. En estudios previos de otros autores el secado y la fijación provocó una reducción en el tamaño de la cabeza del espermatozoide de aproximadamente 20% de longitud y de 13% de anchura en caballos (Ball and Mohammed, 1995) y de un 14% en longitud, 16% en anchura, 15% en perímetro y en el 30% del área en hombres (Katz *et al.*, 1986). Esta reducción fue sustancialmente más alta que la observada en el presente estudio. Sin embargo, los resultados del presente estudio se sitúan en un rango próximo a los obtenidos previamente en varias especies usando métodos similares (Yániz *et al.*, 2012; Vicente-Fiel *et al.*, 2013). Esta discrepancia podría atribuirse a la utilización de diferentes métodos y al hecho de que la

reducción del tamaño del núcleo del espermatozoide puede ser menor que la de la cabeza del espermatozoide en su conjunto.

7.1.2-Comparación de la morfometría nuclear entre especies

Se comparó la morfometría nuclear del espermatozoide del cerdo y jabalí en muestras fijadas con glutaraldehído, que se consideró como el tratamiento de referencia por haberse estandarizado en trabajos previos en diversas especies (Yániz *et al.*, 2012; Vicente-Fiel *et al.*, 2013).

7.1.2.1.-Parámetros primarios

En lo que respecta a los parámetros primarios (Tabla 3), el jabalí obtuvo mayores valores para todos los parámetros. La diferencia en el área del núcleo espermático fue muy significativa. En el parámetro longitud se observó una gran diferencia, lo que indica que el núcleo espermático del jabalí es más elíptico y elongado que en el caso del verraco (Tablas 3-4).

Tabla 3. Comparación de los parámetros primarios entre especies. Muestras fijadas con glutaraldehído.

ESPECIE	ÁREA (μm^2)	PERÍMETRO (μm)	LONGITUD(μm)	ANCHURA(μm)
JABALÍ	28,505±0,025 ^b	22,215±0,009 ^b	8,363±0,004 ^b	4,168±0,002 ^b
VERRACO	27,745±0,023 ^a	21,786±0,009 ^a	8,247±0,004 ^a	4,148±0,002 ^a

Letras distintas indican diferencias significativas entre especies (P<0,05).

7.1.2.2.-Parámetros secundarios

Las diferencias observadas entre especies fueron significativas para todos los parámetros, presentando el jabalí un núcleo más elíptico y elongado, debido a una longitud significativamente mayor, como se ha explicado en el apartado anterior (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de los parámetros secundarios entre especies. Muestras fijadas con glutaraldehído.

ESPECIE	ELIPTICIDAD	RUGOSIDAD	ELONGACIÓN	REGULARIDAD
JABALÍ	2,010±0,001 ^b	0,725±0,000 ^a	0,334±0,000 ^b	0,961±0,000 ^a
VERRACO	1,992±0,001 ^a	0,734±0,000 ^b	0,330±0,000 ^a	0,968±0,000 ^b

Letras distintas indican diferencias significativas entre especies (P<0,05)

El rango de valores de las dimensiones nucleares espermáticas en el cerdo en el presente estudio fueron conformes a las descritas en un trabajo previo (Vicente-Fiel *et al.*, 2013). Si comparamos estos valores con lo obtenidos por otros autores para el conjunto de la cabeza, observamos similitudes y discrepancias dependiendo de los trabajos y el método empleado (Yániz *et al.*, 2015). Estos resultados no fueron sorprendentes, ya que trabajos previos han demostrado que la variación en el procesamiento de semen de sólo una variable (por ejemplo, la fijación o tinción) causó importantes diferencias en los resultados morfométricos de la cabeza espermática. Lógicamente van a aparecer diferencias cuando todos los procedimientos, incluyendo la tinción fluorescente en lugar de tinción tradicional y el software utilizado, son diferentes (Vicente-Fiel *et al.*, 2013).

7.1.3-Comparación de la morfometría nuclear entre machos

Se obtuvieron diferencias significativas entre machos dentro de una misma especie para todos los parámetros primarios, que presentaron una gran dispersión entre individuos (Fig.11-18). En general, el jabalí presentó una menor dispersión que el verraco en los parámetros morfométricos analizados.

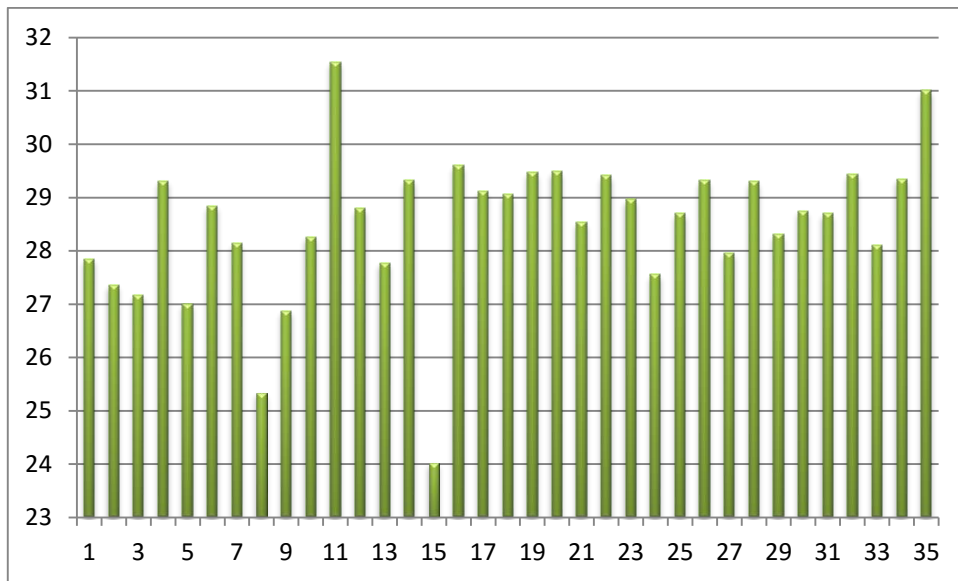


Figura 11. Valores de área nuclear espermática (en μm^2) en los 35 jabalíes estudiados.

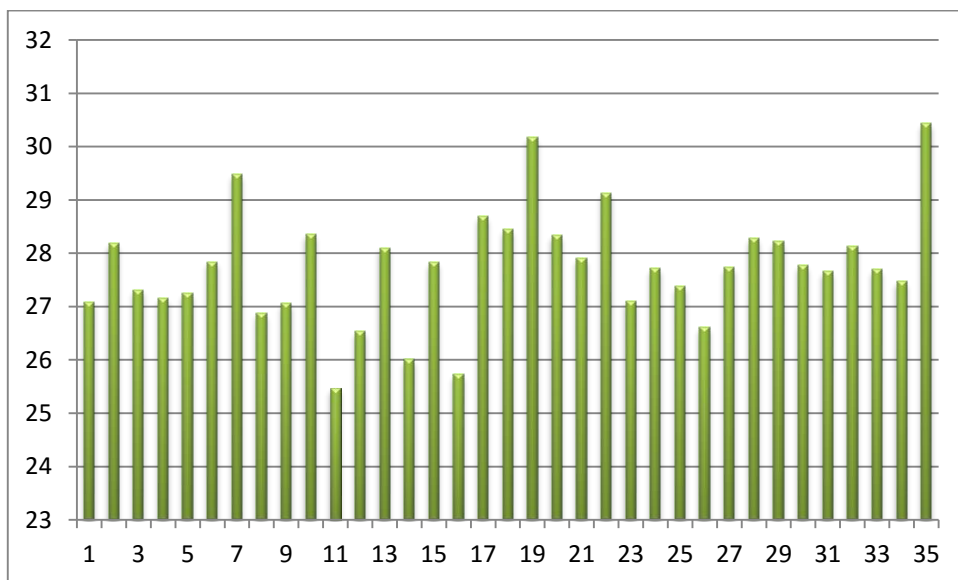


Figura 12. Valores de área nuclear espermática (en μm^2) en los 35 verracos estudiados.

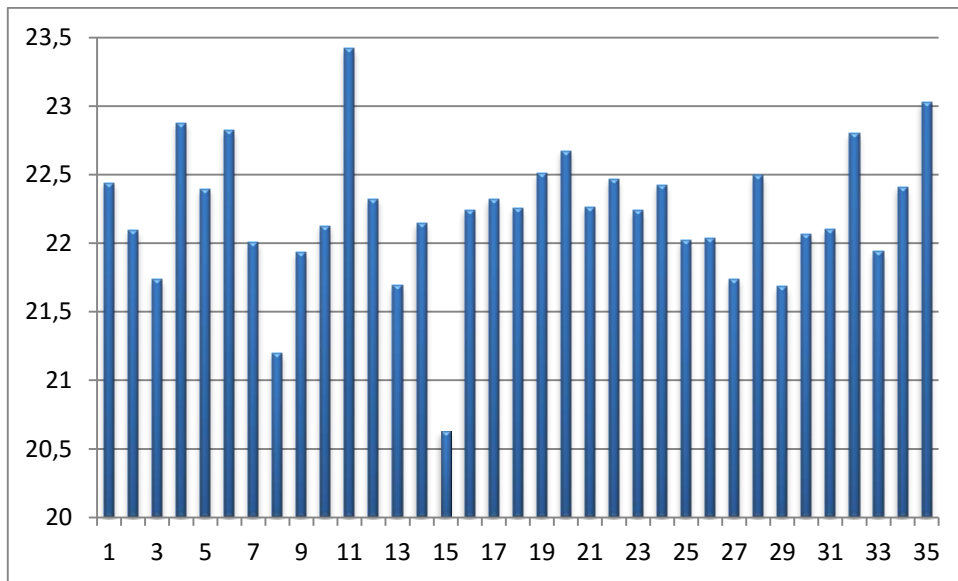


Figura 13. Valores de perímetro nuclear espermático (en μm) en los 35 jabañes estudiados.

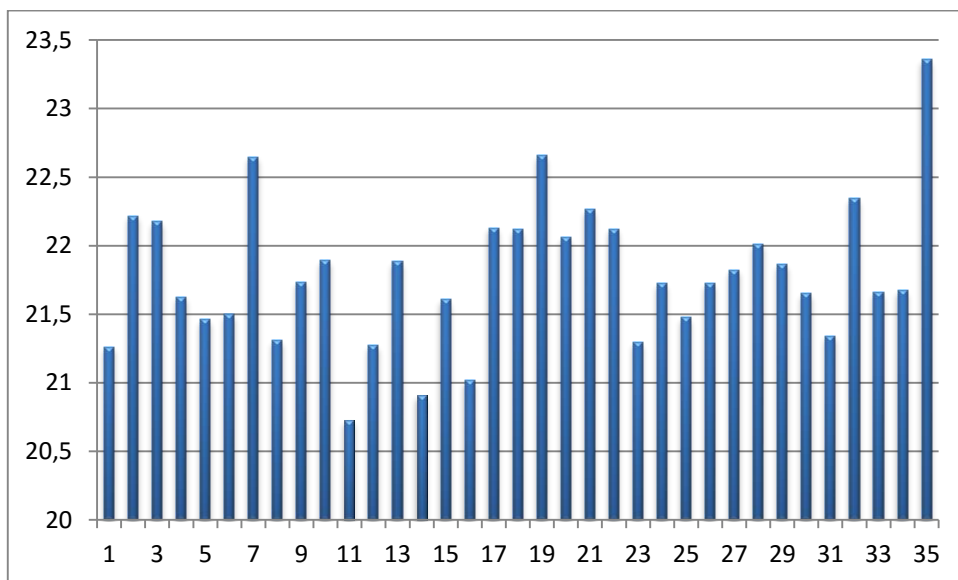


Figura 14. Valores de perímetro nuclear espermático (en μm) en los 35 verracos estudiados.

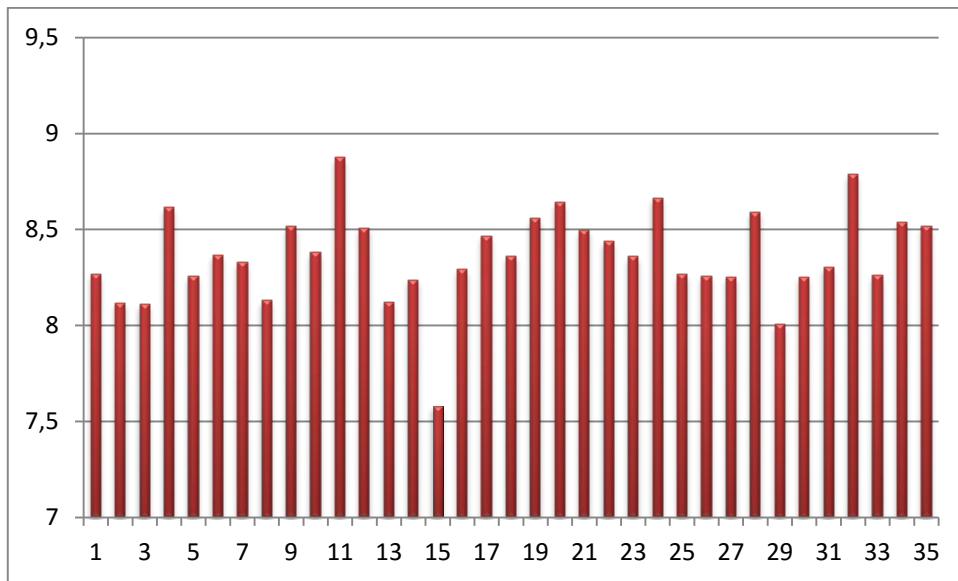


Figura 15. Valores de longitud nuclear espermática (en μm) en los 35 jabalíes estudiados.

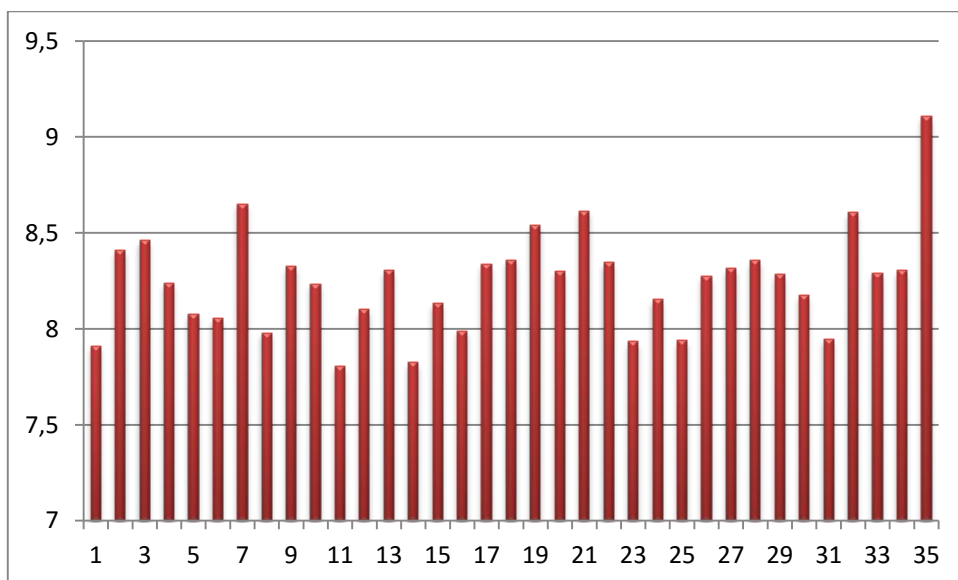


Figura 16. Valores de longitud nuclear espermática (en μm) en los 35 verracos estudiados.

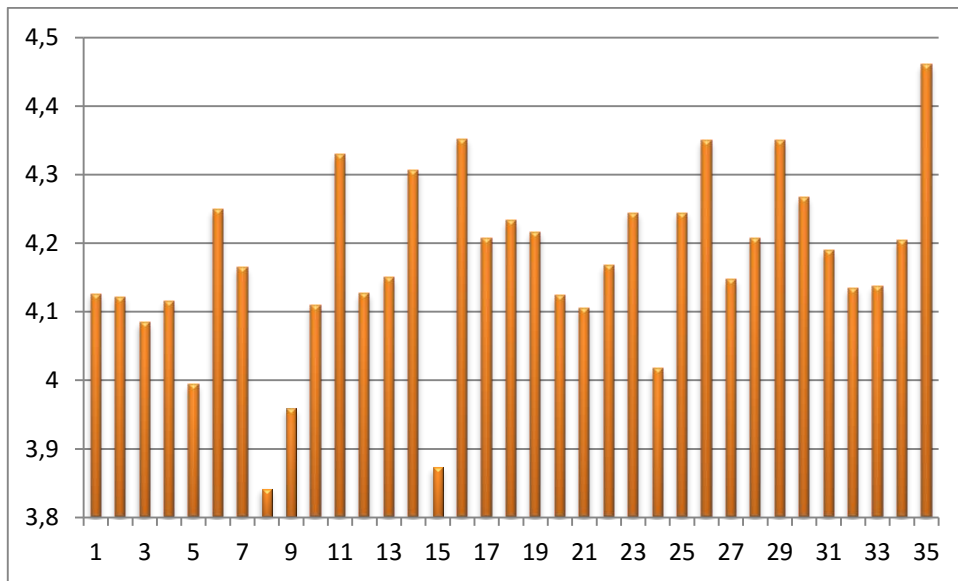


Figura 17. Valores de anchura nuclear espermática (en μm) en los 35 jabalíes estudiados.

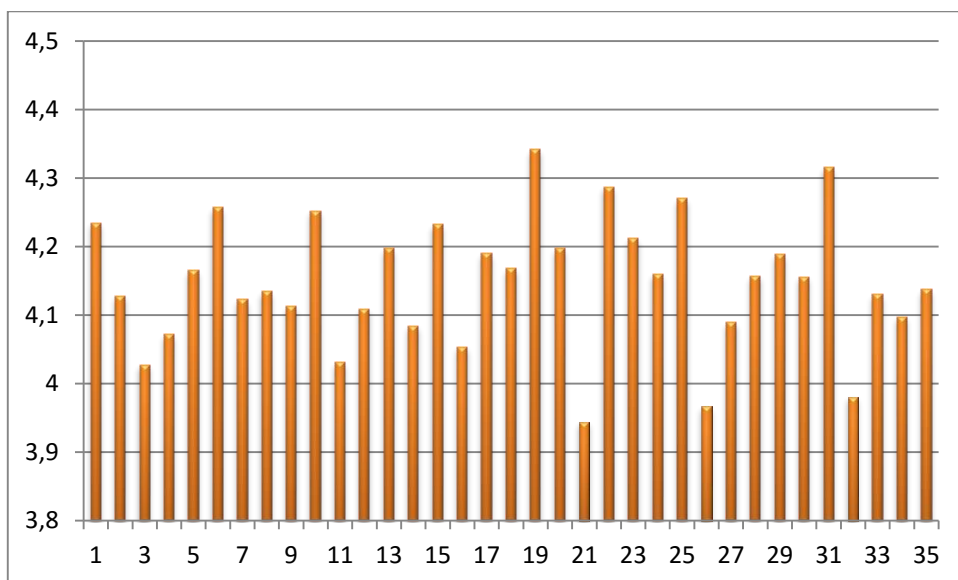


Figura 18. Valores de anchura nuclear espermática (en μm) en los 35 verracos estudiados.

7.2-Análisis morfométrico del acrosoma, núcleo y cabeza espermáticos.

En este trabajo se ha realizado también por primera vez una descripción y comparación morfométrica de la cabeza del espermatozoide, nuclear y acrosómica entre el cerdo y jabalí. Los métodos clásicos de tinción y CASMA sólo han permitido la evaluación de la morfometría acrosómica en algunas especies, como humanos (Soler et al., 2003; Falzone *et al.*, 2011) y perros (Nunez-Martinez *et al.*, 2005), pero no en especies artiodáctilos. Esto es debido a que la mayoría de estas técnicas de procesamiento de todas las partes del espermatozoide, el fondo y algunos componentes intercelulares. Esta tinción inespecífica dificulta el estudio separado de los componentes del espermatozoide. Para evitar esta dificultad, recientemente se aplicó el método de CASMA-F, con los fluorocromos de PI/PSA, en el morueco, lo que permite una evaluación precisa de espermata morfometría cabeza, núcleo y acrosoma (Yániz *et al.*, 2014). En este estudio, el método ha sido adaptado para cerdo y jabalí, permitiendo la comparación entre especies.

En el presente apartado se detallan los resultados obtenidos del análisis morfométrico del acrosoma, núcleo y cabeza espermáticos, haciendo hincapié en las diferencias observadas entre especies.

7.2.1-Análisis morfométrico del acrosoma

En lo que respecta al análisis morfométrico del acrosoma, sólo se tuvieron en cuenta los parámetros de área, el porcentaje del área de la cabeza del espermatozoide que ocupa el acrosoma y el perímetro. Para el área del acrosoma fue el verraco el que obtuvo mayor valor (Tabla 5), por contra, en el caso de la longitud del acrosoma resultó ser mayor en el jabalí, aunque en este caso las diferencias no fueron significativas. El porcentaje de área de la cabeza que ocupa el acrosoma fue mayor en el caso del verraco.

7.2.2- Análisis morfométrico del núcleo

En este estudio el núcleo del jabalí obtuvo mayor valor para el área (Tabla 5), sin embargo las diferencias entre especies fueron menores que en el apartado 7.1.1. En este caso, el jabalí también presentó mayor valor para la longitud, aunque en esta ocasión fue acompañada de una mayor anchura, lo que hace que en este estudio el núcleo espermático del verraco sea más elíptico y elongado. En cuanto a los parámetros de contorno, fue el núcleo del verraco el más rugoso e irregular.

7.2.3- Análisis morfométrico de la cabeza espermática

En el caso de la cabeza del espermatozoide no se encontraron diferencias significativas en el área, longitud y anchura (Tabla 5). El perímetro si obtuvo diferencias significativas, siendo mayor en la cabeza espermática del verraco. En cuanto a los parámetros secundarios, la cabeza espermática del jabalí resultó ser más rugosa.

Tabla 5. Parámetros primarios según especie y medida.

ESPECIE	MEDIDA	ÁREA (μm^2)	%ÁREA Cabeza	PERÍMETRO (μm)	LONGITUD (μm)	ANCHURA (μm)
JABALÍ	Acrosoma	23,086±0,030 ^a	61,338±0,071 ^a	24,704±0,022 ^a	-	-
VERRACO	Acrosoma	24,712±0,028 ^b	65,911±0,082 ^b	24,650±0,019 ^a	-	-
JABALÍ	Núcleo	27,934±0,030 ^a	-	22,278±0,147 ^a	8,344±0,005 ^a	4,256±0,003 ^a
VERRACO	Núcleo	27,515±0,029 ^b	-	21,765±0,013 ^b	8,169±0,005 ^b	4,149±0,003 ^b
JABALÍ	Cabeza	37,663±0,029 ^a	-	27,384±0,025 ^a	9,862±0,009 ^a	5,243±0,003 ^a
VERRACO	Cabeza	37,612±0,030 ^a	-	27,984±0,026 ^b	9,857±0,011 ^a	5,242±0,004 ^a

Letras distintas indican diferencias significativas entre especies (P<0,05)

Tabla 6. Parámetros secundarios según especie y medida.

ESPECIE	MEDIDA	ELIPTICIDAD	RUGOSIDAD	ELONGACIÓN	REGULARIDAD
JABALÍ	Acrosoma	-	-	-	-
VERRACO	Acrosoma	-	-	-	-
JABALÍ	Núcleo	1,966±0,001 ^a	0,709±0,000 ^a	0,324±0,000 ^a	1,002±0,001 ^a
VERRACO	Núcleo	1,976±0,001 ^b	0,730±0,000 ^b	0,326±0,000 ^b	0,969±0,000 ^b
JABALÍ	Cabeza	1,885±0,001 ^a	0,639±0,001 ^a	0,304±0,000 ^a	1,078±0,001 ^a
VERRACO	Cabeza	1,883±0,001 ^a	0,612±0,001 ^b	0,304±0,000 ^a	1,081±0,001 ^a

Letras distintas indican diferencias significativas entre especies (P<0,05)

El rango de valores de las dimensiones espermáticas en el cerdo en el presente estudio fueron conformes a las descritas en un trabajo previo (Vicente-Fiel *et al.*, 2013). Si comparamos estos valores con lo obtenidos por otros autores, observamos similitudes y discrepancias dependiendo de los trabajos y el método empleado (Yániz *et al.*, 2015). Estos resultados no fueron sorprendentes, ya que trabajos previos han demostrado que la variación en el procesamiento de semen de sólo una variable (por ejemplo, la fijación o tinción) causó importantes diferencias en los resultados morfométricos de la cabeza espermática. Lógicamente, las diferencias son esperables cuando todos los procedimientos, incluyendo la tinción fluorescente en lugar de tinción tradicional y el software utilizado, son diferentes (Vicente-Fiel *et al.*, 2013).

7.2.4-Comparación del área del acrosoma, núcleo y cabeza espermáticos entre machos

Las diferencias entre machos fueron significativas en todos los casos. Se observó una gran dispersión de resultados para el acrosoma, núcleo y cabeza espermáticos (Fig. 15-20). Por norma general fue el verraco el que presentó menor dispersión de resultados.

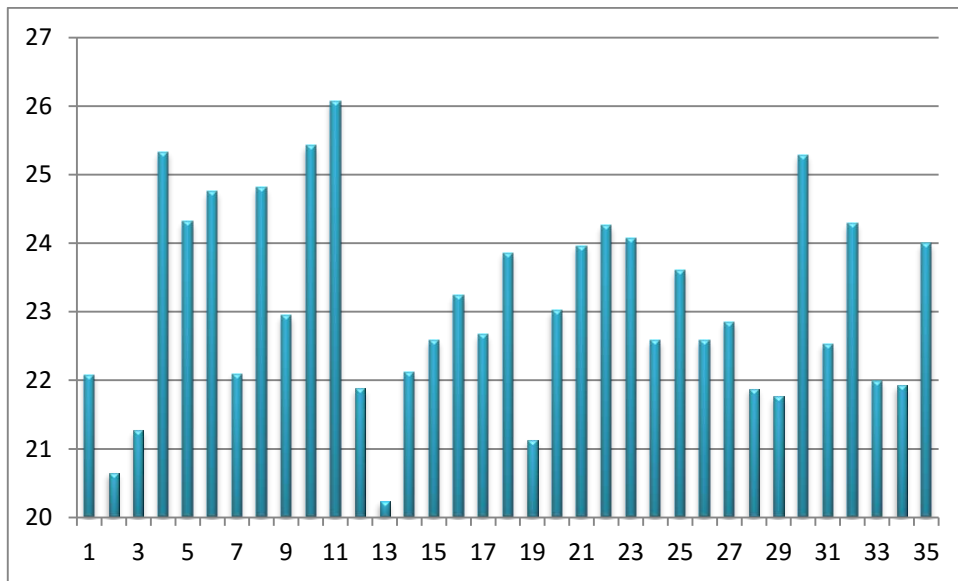


Figura 19. Valores de área acrosómica espermática (en μm^2) en los 35 jabalíes estudiados.

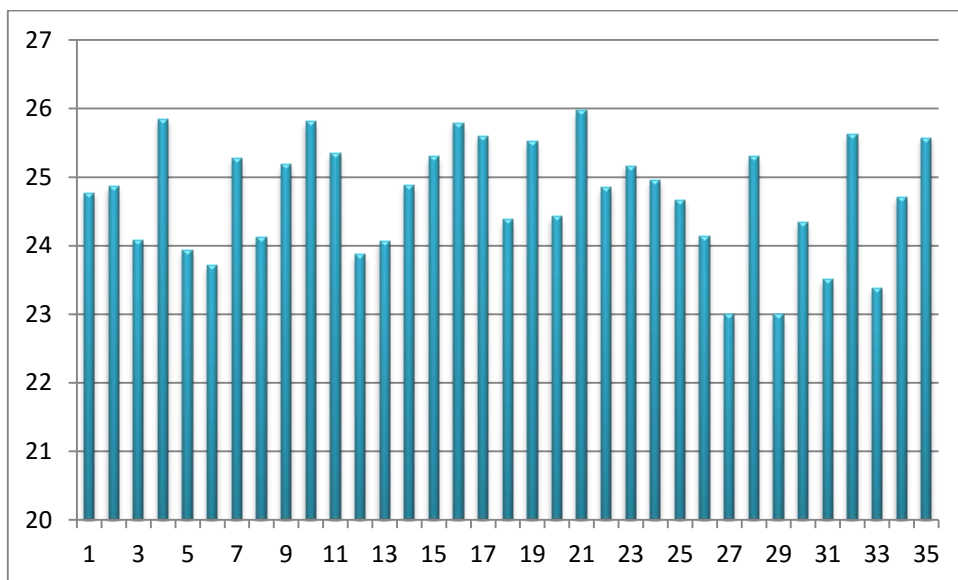


Figura 20. Valores de área acrosómica espermática (en μm^2) en los 35 verracos estudiados.

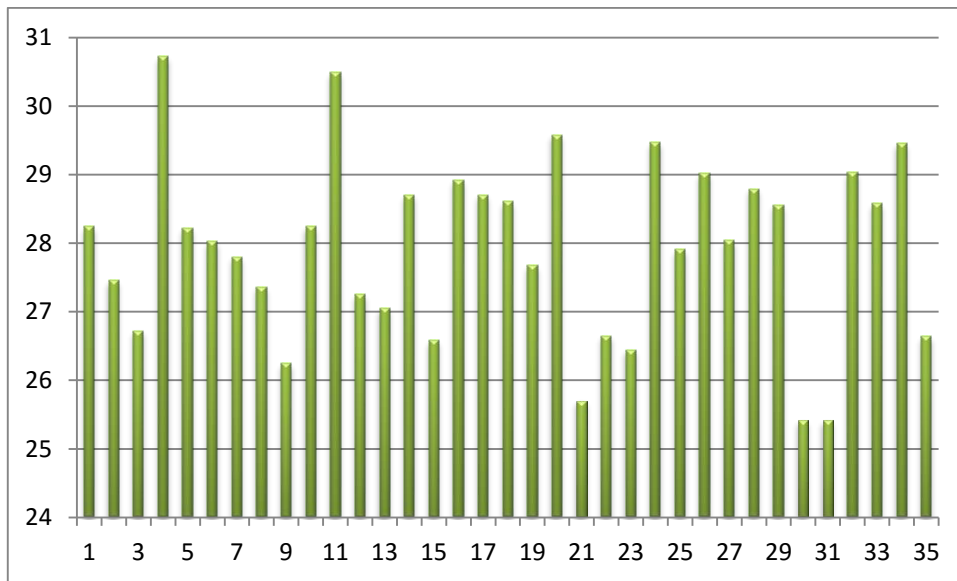


Figura 21. Valores de área nuclear espermática (en μm^2) en los 35 jabalíes estudiados.

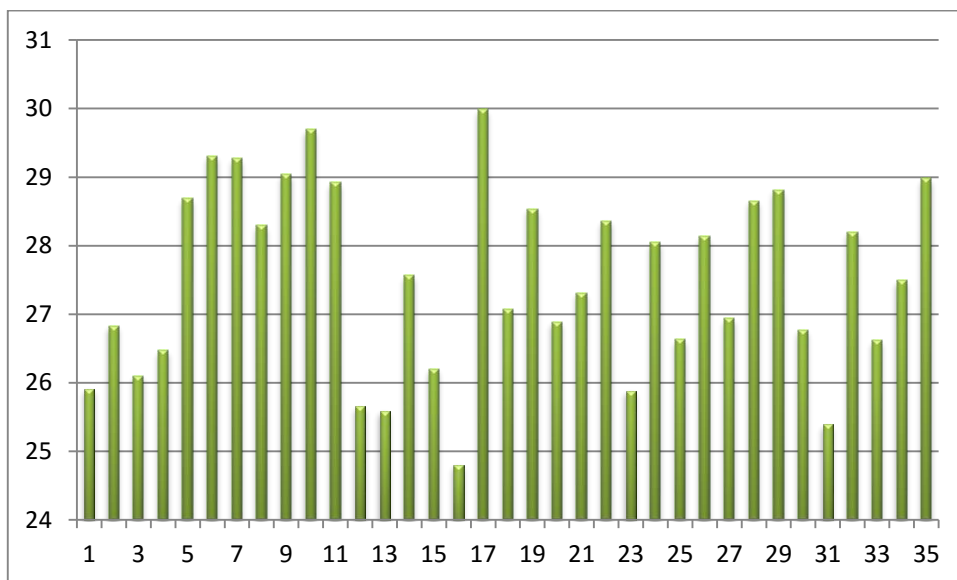


Figura 22. Valores de área nuclear espermática (en μm^2) en los 35 verracos estudiados.

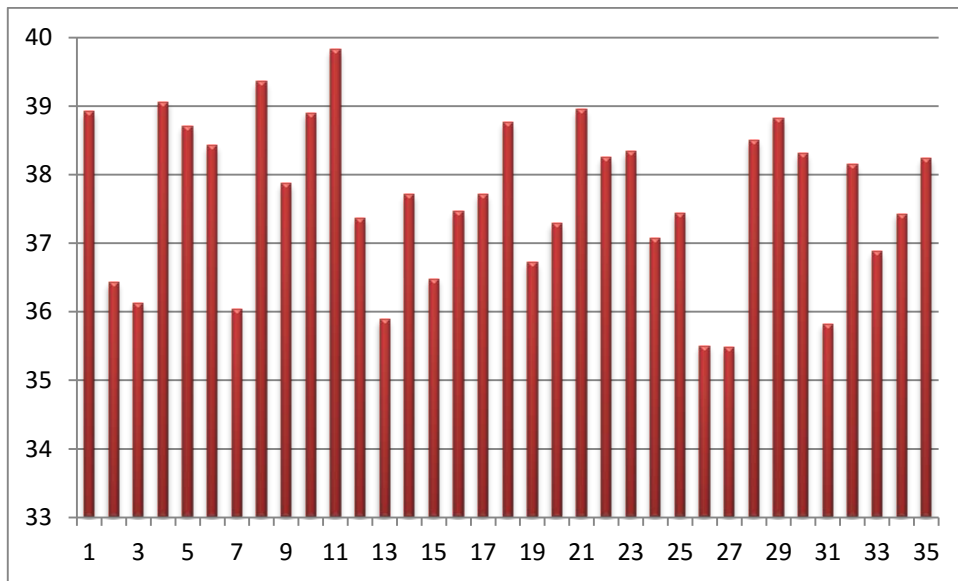


Figura 23. Valores de área de cabeza espermática (en μm^2) en los 35 jabalíes estudiados.

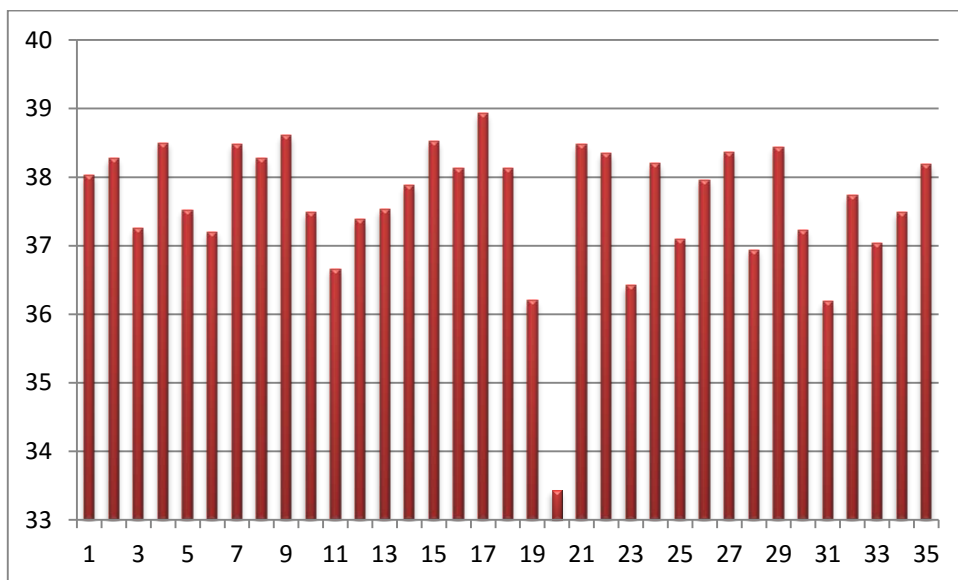


Figura 24. Valores de área de cabeza espermática (en μm^2) en los 35 verracos estudiados.

CONCLUSIONES

8.-CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente Trabajo Fin de Grado, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El método CASMA-F permite evaluar la morfometría de la cabeza, núcleo y acrosoma espermáticos de jabalí y verraco, permitiendo la comparación entre estas dos especies.
2. Comparando las diferentes fases del procesado de las muestras, se puede afirmar que la fijación con glutaraldehído o metanol reduce las dimensiones de los parámetros primarios en jabalí.
3. El secado de los frotis no tuvo efecto sobre las dimensiones morfométricas en jabalí.
4. A pesar de ser dos especies evolutivamente próximas, el acrosoma del verraco obtuvo mayores dimensiones que en el jabalí, mientras que el núcleo espermático la relación fue inversa. No se observaron diferencias significativas para las dimensiones de la cabeza.

BIBLIOGRAFÍA

9.-BIBLIOGRAFÍA

Ball, H.O.; Mohammed. (1995). *Morphometry of stallion spermatozoa by computer-assisted image analysis*. Theriogenology 44 (1995) 367–377.

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

Barrientos Morales, M., Juárez Mosqueda, M. D. L., Trujillo Ortega, M. E., & Montiel Palacios, F. (2009). *Alterations in the integrity of the acrosome and perinuclear theca in cryopreserved boar spermatozoa*. Zootecnia Tropical, 27(1), 17-24.

Barros, C., Bedford, J., Franklin, L., Austin, C. (1967). *Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction*. J Cell Biol 34, C1-5.

Barth, A.D., Oko, R.J.(1989). *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. ☒

Benito, R. (2010). *Desarrollo de un método de referencia basado en la microscopía de fluorescencia y el análisis de imagen para evaluación morfométrica de la cabeza del espermatozoide en mamíferos*. [Proyecto de fin de carrera]. Universidad de Zaragoza.

Benoff, S., Hurley, I., Cooper, G. W., Mandel, F. S., Rosenfeld, D. L., & Hershlag, A. (1993). *Head-specific mannose-ligand receptor expression in human spermatozoa is dependent on capacitation-associated membrane cholesterol loss*. Human reproduction (Oxford, England), 8(12), 2141-2154.

Bhattacharyya, A. K., Zaneveld, L.J. (1982). *The sperma head., En: Biochemistry of mammalian reproduction. I. Gamets and genital tract fluids., Zaneveld, L.J. and Chatterton, R.T. Wiley & Sons INC., New York.*

Bielsa, M. A., Andolz, P., Gris, J. M., Martínez, P., & Egozcue, J. (1994). *Andrology: Which semen parameters have a predictive value for pregnancy in infertile couples*. Human Reproduction, 9(10), 1887-1890.

Boixo, J. C. (1994). *Valoración laboratorial de la calidad seminal. Correlación con la fertilidad. 7ª Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, Murcia, España, 61-69.*

Bosch, J., Peris, S., Fonseca, C., Martínez, M., De la Torre, A., Iglesias, I., Muñoz, M. J. (2012). *Distribution, abundance and density of the wilds boar on the Iberian Peninsula, based on the*

CORINE program and hunting statistics. Folia Zoologica 61 (2): 138-151.

Burkman RT Jr. *The role of oral contraceptives in the treatment of hyperandrogenic disorders*. Am J Med. 1995 Jan 16;98(1A):130S-136S

Cardona Maya, W., Olivera Ángel, M., Cadavid, A.P.(2006) *Evaluación de la reacción acrosomal inducida por el ionóforo de calcio: una aproximación más real de la capacidad fecundante del espermatozoide..* Andrología Arch. Esp. Urol., 59, 5 (501-510), 2006

Cardona-Maya, W., Berdugo, J., & Cadavid, A. (2008). *Comparación de la concentración espermática usando la cámara de Makler y la cámara de Neubauer. Actas urológicas españolas, 32(4), 443-445.*

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.

Cognie, Y., Chemineau, P., Guerin, Y., Orgeur, P., Vallet, J.C. (1991). *Training manual on artificial insemination in sheep and goats*. Food and agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 222 pp.

Cummins, J.M., Woodwall, P.F. (1985). *On mammalian sperm dimensions*. J Reprod fertile, 75: 153-175.

Cunningham, James G. (2003). *Fisiología veterinaria*. El Sevier. ESPAÑA. ISBN: 9788490223178

Davis, R.O., Bain, D.E., Siemers, R.J., Thal, D.M., Adrew, J.B., Gravance, C.G. (1992). *Accuracy and precision of the CellForm-Human automated sperm morphometry system*. Fertil Steril 58, (1992) 763-769.

Davis, R.O., and Gravance, C.G. (1993) *Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis*. Fertil. Steril. 59, 412-417.

De La Vega, J. 2003. *Las otras carnes en Chile: características y consumo*. Fundación para la Innovación Agraria – FIA. Universidad Austral de Chile. Valdivia – Chile. p. 286.

Didion, B., C. Graves. (1986). *In vivo capacitation and acrosome reaction of bovine sperm in estrous and diestrous cows*. J. Anim. Sci. 62: 1029-1033.

- Dresdner, R. D. & Katz, D. F. (1981) *Relationships of mammalian sperm motility and morphology to hydrodynamic aspects of cell function*. Biol. Reprod. 25, 920–930
- Eddy, E. M., O'Brien, D. A. (1988). *The spermatozoon*, En: The Physiology of Reproduction, Knobil, E., Neill, J.D., Greenwald, G. S. and Markert, C. L. Raven Press, Ltd., New York.
- Enciso, M., Johnston, S.D., Gosalvez, J., 2011. *Differential resistance of mammalian sperm chromatin to oxidative stress as assessed by a two-tailed comet assay*. Reproduction Fertility and Development 23, 633-637.
- Ericsson, S.A., Garner, D.L., Johnson, L.A., Redelman, D., Ahmad, K. (1990): *Flow cytometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa processed using a new antibiotic combination*. Theriogenology 33:121
- Falzone, N., Huyser, C., Becker, P., Leszczynski, D., Franken, D.R. (2011). *The effect of pulsed 900-MHz GSM mobile phone radiation on the acrosome reaction, head morphometry and zona binding of human spermatozoa*. International Journal of Andrology. Volume 34, Issue 1, pages 20–26, February 2011.
- Fernández, F., Saravia, A., Santa María, M.V. (1998). *Utilización de lectina Pisum sativum y yoduro de propidio para la evaluación rápida de integridad de acrosoma en espermatozoides caprinos*. Depto. de Ciencias Pecuarias, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Concepción, Casilla 537, Chillán, Chile. Arch. med. vet. v.30 n.1 Valdivia 1998
- Franken, D., Oehninger, S., Mahony, M., Özgür, K., Kolm, P., Kruger, T. (1997). *Clinical significance of human sperm-zona pellucida binding*. Fertility and sterility, 67(6), 1121-1127.
- Gadea-Mateos, J. (1997). *Predicción de la fertilidad "in vivo" de los eyaculados de verraco mediante parámetros rutinarios de contrastación seminal, pruebas bioquímicas y el test homólogo de penetración "in vitro"*. [Tesis doctoral]. Universidad de Murcia.
- Gago C., Pérez-Sánchez, F., Yeung, C.H., Tablado, L., Cooper, T.G., and Soler, C. (1998). *Standardization of sampling and staining methods for the morphometric evaluation of sperm heads in the cynomolgus monkey (Macaca fascicularis) using computer-assisted image analysis*. Int. J. Androl, 21: 169–176.
- 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.

- García-Herreros, M., Aparicio, I.M., Baron, F.J., García-Marín, L.J., Gil, M.C. (2006). *Standardization of simple preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa*. Int J Androl, 29: 553-63.
- 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.
- Graham, E.F.; Thompson, L.; Neville, W. (1967). *Physical, physico-chemical and chemical characteristics of boar semen*. University of Minnesota. 3-11.
- Graham, E.F., Schmehl, M.K.H., Nelson, D.S. (1980). *Problems with laboratory assays*. 8th NAAB Tech. Conf. Reprod. & AI, Milwaukee, USA, 67-70.
- Granados, E. (2015). *Anomalías dentarias de dos subpoblaciones de jabalí Sus scrofa L. 1758 de Aragón*. [Trabajo Fin de Grado]. Universidad de Zaragoza.
- Gravance C. G.; Lewis K. M.; Casey P. J. (1995). *Computer automated sperm head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa*. Theriogenology 44 (1995) 989- 1002.
- Gravance C. G.; Vishwanath R.; Pitt C.; Casey P. J. (1996). *Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads*. Theriogenology 46 (1996) 1205-1215.
- Hammit, 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.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Pérez, C., Dorado, M., Sánchez, M. (2002). *Parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide de macho cabrío*. Jornadas Internacionales de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Valencia, España, (2002). 1053-1058.
- Hirai M, Boersma A, Hoeflich A, Wolf E, Foll J, Aumüller TR, Braun J. (2001). *Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (Sus scrofa): relation to fertility and seminal plasma growth factors*. J Androl. 2001 Jan-Feb;22(1):104-10.
- Jagoe, J.R., Washbrook, N.P., and Hudson, E.A. (1986). *Morphometry of spermatozoa using semiautomatic image analysis*. J. Clin. Pathol, 39: 1347-1352.
- Johnson, D.E., Confino, E., Jeyendran, R.S. (1996). *Glass wool column filtration versus mini-Percoll gradient for processing poor quality semen samples*. Fertil. Steril, 66:459-62.

Juneja, R., Gupta, I., Wali, A. (1990). *Verapamil stimulates Ca²⁺ Uptake and Ca²⁺ ATPase in plasma membrane vesicles of guinea pig spermatozoa*. *Contraception*, 41, 419–42.

Katz, D.F., Overstreet, J.W., Samuels, S.J., Niswander, P.W., Bloom, T.D., Lewis, E.L., 1986. *Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male-fertility*. *J. Androl.* 7, 203-210.

Kondracki, S., Banaszewska, D., Mielnicka, C. (2005). *The effect of age on the morphometric sperm traits of domestic pigs (Sus scrofa domestica)*. *Cell Mol. Biol. Lett.* 10, 3–13.

Kruger, T.F., Du Toit, T.C., Franken, D.R., Acosta, A.A., Oehninger, S.C., Menkveld, R. and Lombard, C.J. (1993). *A new computerized method of reading sperm morphology (strict criteria) is as efficient as technician reading*. *Fertil. Steril*, 59: 202– 209.

Kusonoki, H., Sakaue, M., Kato, S., Kanda, S. (1989). *Induction of the acrosome reaction in ejaculated goat spermatozoa by preincubation in chemically defined medium*. *J. Exp. Zool.* 249:322-328

Lampiao F., Strijdom H., Du Plessis S.S. (2006). *Direct nitric oxide measurement in human spermatozoa: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein*. *International Journal of Andrology*. Volume 29, Issue 5, pages 564–567, October 2006.

Liu D.Y., Baker H.W.G. (1988). *Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro*. *Reproduction and Fertility*. 1988, 94 71- 84.

Mann, T.; Lutwak-mann, C. (1981) *Male reproductive function and semen*. Ed: Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York.

Maree L., Du Plessis, S.S., Menkveld, R., Van Der Horst, G. (2010). *Morphometric dimensions of the human sperm head depend on the staining method used*. *Human Reproduction*, Vol.25, No.6 pp. 1369–1382.

Martínez, E.; Ruiz, S.; Sebastián, J.; Sánchez, R.; García, C.; Martín, S. (1986). *Factores que afectan a la inseminación artificial porcina*. *An. Vet. (Murcia)*. 2:115-120.

Martínez, E., Ruiz, S., Roca, J., y Vázquez, J.M. (1989). *Fecundación "in vitro" en los animales de granja*. Ed: Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Murcia, Murcia

Martínez, E.; Ruiz, S.; Roca, J.; Vázquez, J.M.; Coy, P. (1992). *Nuevas técnicas en contrastación*

seminal porcina. Med. Vet. 9:71-83.

Maxwell, W.M.C., Evans, G. (1990). *Inseminación Artificial de ovejas y cabra*. ☒

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

Memon, M. A., Ott, R. S. (1981). *Methods of semen preservation and artificial insemination in sheep and goats*. World Rev. Anim. Prod, 17, 19-25.

Menkveld, R., Stander, F.S.H., Kotze, T., Jv. W., Kruger, T.F., and van Zil, J.A. (1990). *The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria*. Hum. Reprod, 5: 586-592.

Menkveld, R., Rhemrev, J. P., Franken, D. R., Vermeiden, J. P., & Kruger, T. F. (1996). *Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis: relation with acrosin activity, morphology (strict criteria), and fertilization in vitro*. Fertility and sterility, 65(3), 637-644.

Menkveld R., Ph.D., Thinus F Kruger, M.D., Sergio Oehninger, M.D., Daniel R Franken, Ph.D. *Relationship between zona pellucida–induced acrosome reaction, sperm morphology, sperm–zona pellucida binding, and in vitro fertilization*. Fertility and Sterility. Volume 79, Issue 1, January 2003, Pages 49–55.

Moruzzi, J.F., Wyrobek, A.J., Mayal, B.H. and Gledhill, B.L. (1988). *Quantification and classification of human sperm morphology by computer-assisted image analysis*. Fertil. Steril, 50: 142-152.

Muiño, R. (2007). *Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas*. [Tesis doctoral] Universidad Santiago de Compostela, Facultad de Veterinaria.

Núñez-Martínez, I., Moran J.M., Peña F.J. *Do computer-assisted, morphometric-derived sperm characteristics reflect DNA status in canine spermatozoa*. Reprod Domest Anim , 2005;40:537-43.

Padrón-Durán, R.S., Fernández-López, G. M., Gallardo-Ríos, M. (1998). *Interpretación del análisis seminal*. Rev Cubana Endocrinol 1998; 9(1):81-90

Peña, F.J., Saravia, F., García-Herreros, M., Núñez-martínez, I., Tapia, J.A., Johannisson, A.,

Wallgren, M., Rodríguez-Martínez, H. (2005). *Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality*. J Androl, 26: 716-23.

Pesch, S., Bergmann, M. (2006). *Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation*. Micron 37, 597-612.

Quintero, R.A. (2003). *Treatment of previable premature ruptured membranes*. Clinics in perinatology, 30(3):573-589.

Quintero-Moreno, A., González-Villalobos, D., López-Brea, J. J. G., Estes, M. C., Fernández-Santos, M. R., Carvalho-Crociata, J. L., León-Atencio, G. (2009). *Valoración morfométrica de la cabeza del espermatozoide del cerdo doméstico según su edad*. Revista Científica, 19(2), 153-158.

Saacke R.G., Marshall, C.E. (1972). *Observations on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa*. J Reprod Fertil, 16:511-14.

Saiz, F.; De Alba, C.; Marigorta, P.; Corcuera, B.D.; Martín, S. (1994). *Estudio de la calidad del semen del verraco a través de la evaluación de parámetros bioquímicos*. En: "Técnicas de contrastación seminal". Porcino 24. 57-76.

Sakkas, D., Manicardi, G., Bianchi, P.G., Bizarro D., Bianchi, U. (1995). *Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa*. Biol. Reprod, 52:1149-1155.

Sanchez, M.V., Bastir, M., Roldan, E.R.S. (2013). *Geometric morphometrics of rodent sperm head shape*. PLOS ONE, 8.

Sancho M.; Pérez-Sánchez F.; Tablado L. ; Monserrat J. J.; Soler C. (1998). *Computer assisted morphometric analysis of ram sperm heads: evaluation of different fixative techniques*. Theriogenology 50 (1998) 27-37.

Saravia, F., Núñez-Martínez, I., Moran, J.M., Soler, C., Muriel, A., Rodríguez-Martínez, H., Peña, F.J. (2007). *Differences in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity*. Theriogenology 68, 196-203.

Shanis, B.S., Check, J.H., Bollendorf, A. (1989). *Interpretation and misinterpretation of semen*

parameters. Arch. Androl, 23: 213-217.

Skewes, O. (2003). *La carne de jabalí*. Revista Proveedores y Alimentos 1(3):19-22.

Skewes, O. (2006). *Manual de producción de jabalí Europeo en sistema de crianza al aire libre*.

Smith, M. C. (1994). e Sherman DM Goat Medicine. *Lea & Febiger*.

Soler, C., Yeung, C.H., Cooper, T.G. (1994). *Development of sperm motility patterns in the murine epididymis*. Int. J. Androl, 17:271-278.

Soler, C., De Monserrat, J.J., Gutiérrez, R., Núñez, J., Núñez, M., Sancho, M., Pérez-Sánchez, F., Cooper, T.G. (2003). *Use of the Sperm-Class Analyser for objective assessment of human sperm morphology*. Int J Androl. 2003 Oct;26(5):262-70.

Söderquist, J., Wijma, K., & Wijma, B. (1997). *Posttraumatic stress disorder after childbirth: a cross sectional study*. Journal of anxiety disorders, 11(6), 587-597.

Talbot, P., Chacon, R. S. (1981). *A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm*. Journal of Experimental Zoology, 215(2), 201-208.

Thundathil, J., Palasz, A.T., Barth, A.D., Mapletoft, R.J., (1999). *An investigation of the fertilizing characteristics of pyriform shaped bovine spermatozoa*. Anim. Reprod. Sci. 57 (1-2), 35-50.

Thurston, L.M., Watson, P.F., Holt, W.V. (1999). *Sources of variation in the morphological characteristics of sperm subpopulations assessed objectively by a novel automated sperm morphology analysis system*. J Reprod Fertil, 117, 271-80.

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.

Vázquez, J.M., Martínez, 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. ☒

Vicente-Fiel, S., Palacín, I., Santolaria, P., Hidalgo C.O., Silvestre, M.A., Arrebola, F., Yániz J.L. (2013a). *A comparative study of the sperm nuclear morphometry in cattle, goat, sheep, and pigs using a new computer-assisted method (CASMA-F)*. Theriogenology 79, 436-442.

Vicente-Fiel, S., Palacín, I., Santolaria, P., Yaniz, J.L. (2013b). *A comparative study of sperm*

morphometric subpopulations in cattle, goat, sheep and pigs using a computer-assisted fluorescence method (CASMA-F). Anim. Reprod. Sci. 139, 182-189.

Wells, M.E.; Awa, O.A. *New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa*. J. Dairy Sci. 53: 227-232. 1970.

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.

WHO. World Health Organization. (1999). *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*. Cambridge University Press, New York. Cambridge.

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.

Yániz J.L., Vicente-Fiel, S., Capistros, S., Palacín, I., Santolaria, P. (2012). *Automatic evaluation of ram sperm morphometry*. Theriogenology 77: 1341-50

Yániz, J., Capistrós, S., Vicente-Fiel, S., Soler, C., Núñez de Murga, M., Santolaria, P. (2013). *Use of relief contrast objective to improve sperm morphometric analysis by isas casa system in the ram*. Reprod. Domest. Anim. 48, 1019–1024.

Yániz, J.L., Capistros, S., Vicente-Fiel, S., Soler, C., Núñez de Murga, J., Santolaria, P. (2014). *Study of nuclear and acrosomal sperm morphometry in ram using a computer-assisted sperm morphometry analysis fluorescence (CASMA-F) method*. Theriogenology 82, 921-924.

Yániz, J. L., Soler, C., & Santolaria, P. (2015). *Computer assisted sperm morphometry in mammals: A review*. Animal reproduction science, 156, 1-12.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

No podía terminar este trabajo sin acordarme de las personas que me han acompañado durante esta etapa de mi vida.

A mi director de proyecto, Jesús Yániz, por aconsejarme y guiarme durante la realización de este trabajo. Por lo todo lo que he aprendido. Muchas gracias.

A mi familia, pues hasta que no llegas al final no eres consciente de todo lo que han hecho por ti. Muchas gracias.

A esa mano tendida y entendida, a todas horas (que pesado he sido estos meses), mi novia Leyre. Muchas gracias.

A los amigos de Lupi, que sin esa hora de ocio al acabar el día uno acabaría loco. Muchas gracias.

A las maravillosas peronas que me he encontrado durante este grado. A Sarroca y a Ricky. Muchas gracias ;)