

DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD FECUNDANTE DEL SEMEN DESCONGELADO DE TOROS DE LA RAZA RUBIA GALLEGA

In vitro Assessment of the Fertilizing Capacity of Frozen-Thawed Semen from Rubia Gallega Bulls

Ninoska Madrid-Bury¹, Sonia Pérez-Garnelo², María Oter², Alfonso Gutierrez Adar² y Julio de la Fuente Martínez²

¹Facultad de Agronomía, Apartado 15206. Universidad del Zulia, Maracaibo 4005-A, Edo Zulia, Venezuela.

²Departamento de Reproducción Animal y Recursos Zootécnicos. INIA, España.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar la relación entre los test de rutina de evaluación seminal *in vitro* y algunas pruebas complementarias que evalúan la capacidad funcional del espermatozoide, con el propósito de determinar el poder de algunas pruebas de laboratorio para predecir la capacidad fecundante de una muestra de semen descongelado. Se consideraron como pruebas de rutina, la movilidad progresiva (%MOV), porcentaje de espermatozoides vivos (%EVIT) y el porcentaje de espermatozoides con formas normales (%ENOR y %GNOR) y como pruebas complementarias: el test de endósmosis (%ENDO), la integridad del acrosoma (%GNAR), la movilidad (%MOVS) y concentración (CONS) después del swim-up, el porcentaje de ovocitos penetrados (%P), embriones divididos (%D) y el de blastocistos (%B) formados tras 7 - 9 días de cultivo *in vitro*. Se utilizaron 8 pajuelas de un mismo eyaculado de 7 toros de la raza Rubia Gallega; Los espermatozoides de 3 pajuelas fueron sometidos a swim-up y se utilizaron para fecundación *in vitro* (FIV) sobre 2.567 ovocitos. Para todas las variables analizadas se observaron diferencias entre toros ($P < 0,05$). Ninguna de las pruebas de rutina mostró correlación con la FIV, sin embargo, se observó una correlación significativa entre %ENOR y %GNOR, entre %EVIT y %ENDO, %ENOR, %MOV y CONS, entre %GNAR y %MOV, %P, %D, %MOVS y CONS; entre %P y %D; y entre %ENDO y %ENOR, %P, %D, %MOVS, CONS. El análisis conjunto de las pruebas complementarias y rutinarias permitió clasificar a los toros en niveles de fecundidad alto, medio y bajo. Los resultados permiten recomendar la inclusión de las pruebas complementarias de funcionalidad de los espermatozoides en la evaluación ruti-

naria del semen ya que proporcionan información adicional sobre la capacidad fecundante de las muestras seminales.

Palabras clave: Espermatozoides, características seminales, fecundación *in vitro*, toros Rubia Gallega.

ABSTRACT

With the purpose of assessing the discriminative power of the tests for the evaluation of the fertilization capacity of post-thaw semen, the relationship between the routine tests sperm-gram that are used for evaluating semen samples *in vitro* and some complementary tests that evaluate the functional capacity of the spermatozoa were studied. As routine sperm-gram tests, progressive post-thaw motility (%MOV), live spermatozoa (%EVIT) and the incidence of normal sperm (%ENOR and %GNOR) were considered. As complementary tests, the hypo-osmotic swelling test (%ENDO), acrosom integrity (%GNAR), motility (%MOVS) and sperm concentration (CONS) after swim-up, rate of penetrated oocytes (%P), divided embryos (%D) and the development of blastocysts (%B) after 7-9d of cultured *in vitro* were examined. Frozen-thawed semen from 7 Rubia Gallega bulls (8 tubes of the same ejaculate) were evaluated. The frozen-thawed spermatozoa of 3 tubes were subjected to a swim-up procedure and those separated in this way were tested for *in vitro* fertilization (FIV) on 2,567 oocytes. There were significant differences ($P < 0,05$) between bulls for all sperm traits. No significant relation between the routine sperm-gram tests and the FIV were found. Positive significant correlations between %ENOR and %GNOR, between %EVIT and %ENDO, %ENOR, %MOV and CONS, between %GNAR and %MOV, %P, %D, %MOVS and CONS, between %P and %D, and between %ENDO and %ENOR, %P, %D, %MOVS and CONS were found. The complementary tests along with the routine sperm-gram allowed the classifica-

tion of the bulls into high, medium and low fertility levels. The results suggest the inclusion of complementary tests that measure the functionality of the spermatozoa in the routine evaluation sperm-gram, in order to more accurately assess the fertilizing capacity of a semen sample.

Key words: Spermatozoa, seminal characteristics, *in vitro* fertilization, frozen-thawed semen, Rubia Gallega bulls.

INTRODUCCIÓN

La fertilidad de los toros utilizados en los programas de inseminación artificial (IA) es una característica básica para garantizar su éxito y difusión. Con frecuencia, la fertilidad de los toros jóvenes que entran en programas de IA es evaluada a partir de la inseminación de un gran número de hembras con dosis de semen descongelado, que fueron calificadas como aceptables mediante su evaluación con test de rutina realizados *in vitro* en el laboratorio. Sin embargo, esta técnica a pesar de ser fiable, es costosa, requiere mucho tiempo y solo permite evaluar un número limitado de machos [23, 46]. En las últimas décadas, se han desarrollado métodos complementarios de evaluación de la calidad de las muestras de semen que se pueden realizar *in vitro*, con la ventaja de ser más rápidos, y que evalúan la capacidad funcional de la célula espermática, considerando los aspectos que tienen que ver con la fertilización [35]. A pesar de ello, hasta el momento, no se ha podido señalar una prueba *in vitro* que permita predecir con certeza la fertilidad potencial del toro [35]. Los resultados han sido inconsistentes debido a los diversos factores que intervienen en el proceso de la fecundación y desarrollo embrionario [15], razón por la cual, el desarrollo de técnicas de laboratorio que puedan predecir de forma segura la fertilidad de una muestra de semen reviste enorme importancia científica y económica [3].

Los espermatozoides son principalmente células catabólicas y su viabilidad decrece sustancialmente al poco tiempo de haber sido eyaculados [15]. La criopreservación intenta frenar los efectos catabólicos, sin embargo, durante el proceso de congelación-descongelación, se producen cambios irreversibles en las membranas del espermatozoide, que destruyen muchas células y dejan al resto altamente sensibles a la acción de cualquier agente estresante del ambiente en el que son depositados, tanto *in vivo* como *in vitro* [15]. Esto confirma que los espermatozoides descongelados de una muestra específica, presentan características diferentes a las que tenía la misma muestra en fresco [48], lo que disminuye su capacidad para fertilizar e iniciar el desarrollo del embrión.

Son escasos los parámetros de valoración de la calidad seminal que al utilizarlos de forma aislada hayan demostrado una correlación alta y significativa con la fertilidad *in vivo* de un toro utilizado en IA, en especial, cuando las muestras de semen se encuentran dentro de los rangos de normalidad aceptable

[3]. Como consecuencia, se ha propuesto la inclusión de pruebas que evalúan la capacidad funcional de los espermatozoides como son los test que valoran de integridad de la membrana plasmática y acrosomal y la técnica de la fecundación *in vitro* (FIV), como pruebas complementarias a las de rutina, para evaluar la capacidad fecundante de una determinada muestra de semen. Esto, favorecería una mejor determinación de la capacidad funcional del espermatozoide, al relacionar las diferentes pruebas *in vitro* del semen, con análisis más discriminativos de la fertilización como son la penetración espermática, la división de los ovocitos y el desarrollo embrionario *in vitro*.

Este trabajo se realizó con el propósito de investigar la relación que existe entre las pruebas convencionales o de rutina de evaluación de las características seminales *in vitro* y la FIV, utilizando semen descongelado de siete toros de la raza Rubia Gallega. A las pruebas de rutina de evaluación del semen descongelado se adicionaron pruebas complementarias de funcionalidad de la membrana del espermatozoide, como el test de endósmosis y la integridad del acrosoma, así como, la movilidad y la concentración espermática después del swim-up. Se estudió el poder discriminativo de los test de rutina y de las pruebas complementarias, para clasificar la fertilidad potencial de los toros en función de sus características seminales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación de las características seminales

Para la realización de este estudio se han evaluado 7 toros de la Raza Rubia Gallega, con edades comprendidas entre 3 y 6 años. De cada toro se utilizaron 8 pajuelas (de 0,25mL) de un mismo eyaculado (promedio $32,5 \pm 2.0 \times 10^6$ spz/pajuela), las cuales fueron descongeladas en baño maría a 37°C durante un minuto. Cinco pajuelas fueron utilizadas para la evaluación de la movilidad progresiva individual (% MOV), porcentaje de espermatozoides vivos (% EVIT) y con presencia de formas normales (% ENOR) en frotis teñidos con eosina-nigrosina, porcentaje de espermatozoides normales (% GNOR) y con acrosoma intacto (% GNAR) en muestras fijadas en glutaraldehído; además se practicó el test de endósmosis (%ENDO) para determinar la integridad de la membrana plasmática. Para cada una de las pruebas se realizaron 4 frotis, evaluándose un total de 400 espermatozoides por pajuela. Tanto para las pruebas FIV como para la determinación de la concentración (CONS) y motilidad (%MOVS) después del swim-up, se utilizaron las 3 pajuelas restantes de cada toro. Los toros fueron identificados con las letras entre A y G.

Pruebas de rutina de valoración de la calidad seminal

Movilidad individual: Se evaluó de forma subjetiva, colocando una gota del semen descongelado de cada pajuela sobre un portaobjeto atemperado a 37°C y cubriéndola con cubreobjeto. Se observó en un microscopio de contraste de fase (400X). Se determinó el porcentaje de espermato-

zoides con movimiento progresivo clasificándolo en una escala de 0 a 100%.

Vitalidad: Se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos (%EVIT) en frotis teñidos con eosina/nigrosina [44].

Morfología de los espermatozoides: El porcentaje de espermatozoides con formas normales se determinó en frotis teñidos (%ENOR) con eosina/nigrosina [44] y en muestras fijadas (%GNOR) en una solución de glutaraldehído al 0,2% [33] tamponada con cacodilato [43]. Las muestras se observaron en un microscopio de contraste de fase (400X). Los espermatozoides fueron clasificados según su apariencia en: normales, dobladas simples, en ovillo o enrollada en la cabeza, anomalías de la pieza intermedia, presencia de gota citoplasmática en posición proximal y distal, cabezas piriformes, pequeñas y desprendidas.

Pruebas complementarias de valoración cualitativa seminal

Integridad del acrosoma: En muestras fijadas en una solución de glutaraldehído al 0,2% [33] tamponado con cacodilato [43] se determinó el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos (%GNAR), perdidos y dañados mediante la observación de las muestras en microscopio de contraste de fase (1000X).

Integridad de la membrana plasmática: Se practicó el test de endosmosis (%ENDO), utilizando una dilución 1:10 de cada muestra de semen en una solución de citrato de sodio a 100mOsm/Kg [9]. La muestra se incubó a 37°C durante 30 minutos y se fijó con una solución de glutaraldehído al 0,2%. Los espermatozoides se observaron al microscopio de contraste de fase a 400X, considerando como positivo al test aquellos que mostraban torsión helicoidal de la cola.

Separación de los espermatozoides por swim-up: El semen descongelado fue lavado en 3 mL de una solución Tyrode tamponada con hepes, centrifugando a 1000g durante 10 min. El pellet fue resuspendido en 1 mL de medio FIV para realizar el swim-up [32]. Tras 1h de incubación a 38,5°C en 5% CO₂ y en atmósfera saturada de humedad, el sobrenadante (650µL) fue recogido y colocado en un tubo eppendorf determinándose la movilidad (%MOVS) subjetivamente en microscopio de contraste de fases (100X). La concentración (%CONS) se determinó mediante un hemocitómetro.

Maduración de ovocitos: Los ovarios de ternera procedentes de matadero, mantenidos en solución salina (0.9% NaCl) a 35°C, fueron transportados al laboratorio en las 3h siguientes a su recolección. Los ovocitos se aspiraron de los folículos entre 2 y 8mm mediante jeringa y aguja de 18G. Los complejos cumulus-ovocitos (COCs) seleccionados según criterios descritos [25], después de 3 lavados en PBS, 2 veces en el medio de maduración con HEPES y una vez en el mismo medio de maduración, fueron transferidos a placas de 4 pocillos

llos y madurados *in vitro* (50 COCs/pocillo) en pocillos con 500 L de medio TCM 199, suplementado con FCS (10%), EGF (10 ng/mL), L-Glutamina (0,1 gr/mL) y gentamicina (50 g/mL) y cubiertos de aceite mineral [26]. Los COCs se incubaron durante 24h a 38,5°C en una atmósfera con 5% CO₂ en aire y saturada de humedad. Todos los productos químicos utilizados fueron adquiridos de Sigma Chemical CO (St. Louis, MO), a no ser que se indique otra procedencia.

Fecundación *in vitro*: Después de 24h de incubación, los COCs madurados se lavaron 3 veces en PBS, 2 veces en medio de fertilización TALP-HEPES y una vez en el medio de fertilización TALP. Aquellos COCs que presentaban las células del cumulus bien expandidas fueron transferidos a placas de 4 pocillos con medio de fertilización TALP suplementado con aminoácidos, hipotaurina (1g/mL) y heparina a una concentración de 10 g/mL 29 y cubiertos con aceite mineral. Para fertilizar se utilizó una concentración fija de un millón de espermatozoides por mililitro separados por swim-up. Una vez fecundados los ovocitos, se mantuvieron durante 18h a 38,5°C en una atmósfera con 5% CO₂ en aire y saturada de humedad.

Cultivo de Embriones: Transcurridas 18h, las células del cúmulus fueron removidas de los ovocitos fertilizados mediante agitación (2 min), dividiéndose en 2 grupos de aproximadamente 60 ovocitos cada uno. Un grupo de ovocitos fue fijado en acético-etanol (1:3) para realizar la determinación de penetración espermática; el otro grupo de ovocitos fue transferido a gotas de 25L de medio SOF y mantenido en cultivo a 38,5°C, en una atmósfera con 5% CO₂ en aire y saturada de humedad. Se determinó el número de embriones divididos a las 48h postinseminación, luego se agregó al medio de cultivo 10% de FCS y el número de blastocistos desarrollados fue observado a los 7-9 días postinseminación

Evaluación de la penetración: Los ovocitos fertilizados fijados en ácido acético- etanol (1:3) y guardados en refrigeración durante 24h fueron teñidos con Lacmoid (1%) [7], observando la penetración en microscopio de contraste de fase a 100X y 400X. Los ovocitos se consideraron fertilizados cuando se observaron en su citoplasma: 2 pronúcleos, 2 pronúcleos más una cola ó 1 pronúcleo más una cola [32]. Los ovocitos con más de 2 pronúcleos o con 2 pronúcleos y 2 colas, fueron considerados polispérmicos y no fueron incluidos en los datos de fertilización, aunque se tuvo en cuenta su incidencia.

Con el propósito de seleccionar aquellos toros cuyo semen tuviera mayor poder fecundante, se planteó una clasificación en la que primero se tomaron en cuenta los resultados de las pruebas de rutina de evaluación seminal, luego se consideraron los resultados de las pruebas complementarias y finalmente, se evaluaron todas las pruebas en conjunto. En cada animal, se ponderó el resultado obtenido en cada una de las pruebas, otorgándole el valor mas alto al toro que obtuviera el máximo índice. Luego se sumaron los valores y se obtuvo una puntuación final para cada animal. En todos los casos, la máxima calificación se correspondió con el valor absoluto de 100.

Los resultados permitieron clasificar a los toros en 3 niveles de fertilidad: alto, medio y bajo.

Análisis estadístico: Las diferencias observadas entre toros para todas las variables estudiadas, fueron determinadas por ANOVA mediante el paquete estadístico SAS [37]. Los análisis de las diferencias entre y dentro de cada animal se realizaron a través del procedimiento GLM, incluyendo los efectos del toro y sus réplicas. Las variables dependientes fueron %ENOR, %GNOR, %GNAR, %EVIT, %MOV, %MOVS, CONCS, %P, %D y %B. Se realizaron correlaciones lineales de Pearson entre las diferentes pruebas de evaluación seminal, considerándose significativas cuando $P < 0,05$. Al detectar un efecto significativo de la variable estudiada, se realizó un análisis de media (LSmeans) para determinar la diferencia correspondiente. Los resultados de cada una de las pruebas fueron agrupados, con la finalidad de jerarquizar los toros, de acuerdo a su fertilidad potencial. Aplicando criterios de ponderación, se consideraron tres niveles de fertilidad: alto, medio y bajo. Para cada uno de los niveles, la máxima calificación se correspondió al valor absoluto de 100.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la TABLA I se presentan las medias y las desviaciones estándar (\pm DE) de las pruebas de rutina de evaluación seminal. Se observaron diferencias ($P < 0,05$) entre toros para todas las variables estudiadas, coincidiendo con lo señalado por otros autores [10, 46]. Los valores de %EVIT variaron entre $74,1 \pm 1,7$ y $88,3 \pm 1,9$, los de %ENOR entre $85,3 \pm 1,8$ y $90,7 \pm 1,9$, los de %GNOR entre $84,6 \pm 2,3$ y $88,1 \pm 2,4$ y los de %MOV entre $50,0$ y $58,0 \pm 3,6$. Todos los toros presentaron índices de movilidad, concentración espermática, porcentaje de espermatozoides vivos y normales, lo suficientemente altos, como para considerar las muestras de semen congelado aceptables para inseminar, según criterios establecidos por la Sociedad Americana de Theriogenología [8]. Los toros A, B C y E mostraron los índices mas altos ($P < 0,05$) en %EVIT y los toros D, F y G los mas bajos, sin embargo, esos mismos toros mostraron valores similares en el %GNOR, %ENOR y %MOV. La variabilidad de los resultados de estas pruebas dificultan la clasificación potencial de los toros; esto, es indicativo de lo limitado de la valoración de una muestra seminal cuando solamente se determina la movilidad, morfología y la vitalidad, expresada como el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos, como es habitual en los centros de producción de semen [35]. Se ha señalado, que el poder de estas pruebas para predecir fertilidad, en muestras de semen de animales en los que el porcentaje de espermatozoides normales y la movilidad son muy altos, es limitada [2, 3, 41].

Los resultados de las pruebas complementarias de evaluación seminal se pueden observar en la TABLA II. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los toros para las pruebas %GNAR, %ENDO y CONS. Las medias variaron

TABLA I
VALORACIÓN DE LAS PRUEBAS DE RUTINA DE EVALUACIÓN DEL SEMEN DESCONGELADO DE TOROS DE LA RAZA RUBIA GALLEGA (MEDIA \pm DE)

TORO	EVIT	ENOR	GNOR	MOV
A	84,8 \pm 2,5 ^a	86,6 \pm 2,6 ^a	86,5 \pm 2,9 ^{ab}	58 \pm 3,6 ^a
B	88,3 \pm 1,9 ^b	90,7 \pm 1,9 ^b	87,7 \pm 1,8 ^a	57 \pm 2,4 ^{ac}
C	87,5 \pm 3,1 ^{ab}	86,7 \pm 2,2 ^a	85,9 \pm 2,1 ^{ab}	52 \pm 2,4 ^b
D	80,8 \pm 3,4 ^c	89,2 \pm 1,6 ^{cb}	88,1 \pm 2,4 ^a	52 \pm 2,4 ^b
E	86,3 \pm 2,3 ^{ab}	86,7 \pm 1,9 ^a	86,5 \pm 2,5 ^{ab}	55 \pm 0,0 ^c
F	74,1 \pm 1,7 ^d	85,3 \pm 1,8 ^a	84,6 \pm 2,3 ^b	50 \pm 0,0 ^b
G	74,6 \pm 1,4 ^d	87,2 \pm 2,1 ^{ac}	86,9 \pm 2,2 ^{ab}	50 \pm 0,0 ^b

EVIT= % espermatozoides vivos determinados por eosina/nigrosina. ENOR= % Espermatozoides normales determinados por eosina/nigrosina. GNOR= % Espermatozoides normales determinados por contraste de fases. MOV= % Movilidad progresiva postdescongelación. Columnas con diferentes exponentes difieren al $P < 0,05$.

TABLA II
RESULTADOS DE LAS PRUEBAS COMPLEMENTARIAS DE EVALUACIÓN DEL SEMEN DESCONGELADO DE TOROS DE LA RAZA RUBIA GALLEGA (MEDIA \pm DE)

TORO	ENDO	GNAR	MOVS	CONS
A	74,7 \pm 1,5 ^a	71,1 \pm 1,4 ^b	>70	4,2 \pm 0,2 ^a
B	77,3 \pm 1,2 ^b	74,1 \pm 0,8 ^a	>70	4,6 \pm 0,2 ^a
C	73,6 \pm 1,8 ^a	72,1 \pm 1,6 ^b	>70	3,6 \pm 0,9 ^{ab}
D	74,7 \pm 1,4 ^a	72,5 \pm 1,4 ^b	>70	3,4 \pm 0,3 ^{ab}
E	75,8 \pm 0,9 ^{ab}	72,9 \pm 1,2 ^a	56,6	2,9 \pm 0,1 ^{bc}
F	71,4 \pm 1,8 ^c	71,5 \pm 2,4 ^c	>70	2,0 \pm 0,3 ^c
G	71,0 \pm 1,7 ^c	71,3 \pm 1,5 ^c	>70	2,9 \pm 0,5 ^{bc}

ENDO= % espermatozoides con endósmosis positiva. GNAR= % Espermatozoides con acrosoma intacto. MOVS= % Movilidad post-swim-up. CONS= Concentración swim-up. Columnas con diferentes exponentes difieren al $P < 0,05$.

entre $71,0 \pm 1,7$ y $77,3 \pm 1,2$ para %ENDO; $71,1 \pm 1,4$ y $74,1 \pm 0,1$ para % GNAR; y $2,0 \pm 0,3$ y $4,6 \pm 0,2$ para CONS. Para %MOVS, todos los toros tenían movilidad superior al 70%, con excepción del toro E en el que fue del 56,6%. Al realizar el test de endósmosis (%ENDO) y determinar %GNAR, los toros F y G resultaron tener los índices mas bajos de integridad de la membrana plasmática y del acrosoma ($P < 0,05$), lo que afectaría su calidad, ya que los espermatozoides para poder fertilizar tienen que mantener el acrosoma y la membrana plasmática intactas [4, 5]. Ambas membranas, cumplen funciones específicas tanto en el metabolismo espermático como durante los procesos de capacitación, reacción del acrosoma y fertilización del ovocito [35, 50]. Igualmente, fueron estos toros F y G los que tuvieron el índice de división embrionaria mas bajo ($P < 0,05$), posiblemente, debido a que mostraban menos espermatozoides con membrana plasmática y acrosomal intacta.

La técnica del swim-up, se utiliza ampliamente en FIV para seleccionar espermatozoides móviles, obteniéndose a través de ella una preparación relativamente libre de células espermáticas muertas, anormales, inmaduras y de otras células que no sean espermatozoides [36]. El hecho que la movilidad y la concentración después del swim-up hayan sido correlacionadas con la fertilidad *in vivo* e *in vitro* de los toros [24, 46], sugiere la idea de su uso como una prueba de la posible capacidad fecundante de los espermatozoides. Como se puede apreciar en la TABLA II, el toro E, tuvo el valor mas bajo de %MOVS, de igual forma ocurrió para los toros E, F y G en lo relativo a CONS (P<0,05), sin embargo, en estos mismos toros coinciden los valores inferiores (P<0,05) observados para la división de ovocitos (TABLA III). Estos resultados, confirman que la concentración espermática es esencial para la penetración espermática y fertilización de los ovocitos y, que la hiperactividad de los espermatozoides juega un papel muy importante en la penetración de la zona pelúcida al momento de la fertilización [17, 42, 49].

Las medias y desviaciones estándar (\pm DE) de los resultados de la fecundación *in vitro* en toros de la raza Rubia Gallega, se pueden observar en la TABLA III. Se analizaron un total de 1.268 ovocitos para las pruebas de penetración (%P) y un total de 1.305 para las de división de embriones (%D) y desarrollo de blastocistos (%B). Hubo variabilidad entre toros (P<0,05) para todas las pruebas realizadas. Los %P oscilaron entre $65,90 \pm 1,8$ y $92,2 \pm 4,10$, correspondiendo el valor mas bajo al toro E (P<0,05) y el mas alto al toro D. Para %D y %B los valores variaron entre $72,7 \pm 7,50$ y $94,0 \pm 2,3$ y entre $10,4 \pm 1,9$ y $26,5 \pm 6,5$, respectivamente; correspondiendo para %D el valor mas alto al toro D y el mas bajo al toro E, y para % B el mas alto fue para el toro D y el mas bajo para el B. Varios autores han señalado una alta variabilidad en los resultados de la fecundación *in vitro* entre toros, así como, entre los eyaculados de un mismo toro [5, 6,19, 21, 22,30, 31, 32, 40, 46].

En la TABLA IV se pueden observar las correlaciones de Pearson entre todas las variables en estudio, incluyendo las de fecundación *in vitro*. Se obtuvieron correlaciones altas y

significativas entre %ENDO y %EVIT, %GNOR, %MOV, %MOVS y CONS y entre %ENOR y %GNOR, %MOV y %MOVS, coincidiendo con lo señalado por otros autores [1, 10, 36, 47]. Ninguna de las pruebas que se utilizan de forma rutinaria para la evaluación seminal, se correlacionó con las de fecundación *in vitro*, concordando con trabajos previos [13, 18]. Se apreció una correlación alta y significativa entre %P y %D, entre %P y %GNAR, %ENDO, %MOVS y CONS y entre %D y %GNAR, %ENDO, %MOVS y CONS, coincidiendo con lo señalado en otras investigaciones [16, 22, 40, 46]. Esta correlación indicaría que estas medidas de funcionalidad espermática, podrían ser utilizadas para explicar diferencias en la fertilidad de los toros, cuando se realizan evaluaciones de muestras seminales. El uso de pruebas que valoren la capacidad funcional del espermatozoide, podría ser mas efectivo para la evaluación del potencial de fertilidad de los espermatozoides, que las pruebas de rutina [2, 3]. No se observaron correlaciones entre %D y %B ni entre %P y %B, aunque se han señalado correlaciones altas y significativas entre la división de embriones y la penetración de ovocitos *in vitro* y la fertilidad *in vivo* de los toros [22], sin embargo, los resultados son contradictorios en cuanto a la correlación del desarrollo de blastocistos *in vitro* con la fertilidad *in vivo* [38, 45]. En apariencia, el desarrollo de los embriones *in vitro* es más dependiente de las condiciones del medio en el que se cultivan [4, 20, 26, 28], aunque también se ha señalado, que aspectos relacionados con la estructura y función del genoma paterno, son críticos en todos los procesos que ocurren durante y después de la fecundación [11, 12].

La TABLA V muestra la distribución de los toros al clasificarlos por la posible capacidad fecundante del semen descongelado, de acuerdo a las pruebas realizadas. En las pruebas de rutina de los 7 toros evaluados, solamente el toro B quedó clasificado en el nivel alto, quedando los toros A, C, D y E en el nivel medio, y G y F en el nivel bajo. Al realizar la clasificación considerando las pruebas complementarias de capacidad fecundante, los toros A y D quedaron clasificados en el nivel alto, mientras que B y C quedaron en el nivel medio; nuevamente, los toros F y G se agruparon en el nivel bajo. Por

TABLA III
RESULTADOS DE FECUNDACIÓN *IN VITRO* DEL SEMEN DESCONGELADO DE 7 TOROS DE LA RAZA RUBIA GALLEGA.
(MEDIAS \pm DE, %)

Toro	% Penetración		% División		% Blastocistos		% Polispermia	
	Nº	Media \pm DE	Nº	Media \pm DE	Nº	Media \pm DE	Nº	%
A	147/187	81,1 \pm 6,50 ^a	168/199	84,4 0,59 ^a	34/199	17,0 \pm 3,09 ^a	0,0	0,0
B	140/176	79,9 \pm 7,00 ^a	134/174	77,3 7,37 ^b	18/174	10,4 \pm 1,88 ^b	0,0	0,0
C	153/174	88,0 \pm 2,50 ^a	157/180	87,3 0,87 ^a	19/180	11,1 \pm 0,38 ^b	3,0	1,7
D	166/180	92,2 \pm 4,10 ^a	171/182	94,0 2,34 ^a	45/182	26,5 \pm 6,53 ^a	3,0	1,6
E	101/187	65,90 \pm 1,8 ^b	143/197	73,0 5,50 ^b	26/197	13,3 \pm 4,74 ^b	2,0	1,0
F	150/180	83,33 \pm 7,3 ^a	147/187	72,8 6,96 ^b	30/187	11,1 \pm 3,84 ^b	0,0	0,0
G	146/184	80,41 \pm 2,9 ^a	157/186	72,4 2,46 ^b	23/186	11,8 \pm 0,93 ^b	3,0	1,6

Nº= Sumatorio de tres replicas. Polis= % Polispermia Medias en la misma columna con diferentes exponentes difieren significativamente P<0,05

TABLA IV
NIVELES DE SIGNIFICANCIA DE LA CORRELACIÓN DE PEARSON ENTRE LAS VARIABLES DE EVALUACIÓN SEMINAL IN VITRO Y LA FIV

Variable	ENDO	ENOR	GNOR	GNAR	MOV	P	D	B	MOVS	CONS
EVIT	***	**	**	ns	***	ns	ns	ns	*	**
ENDO		***	**	ns	***	*	*	ns	**	**
ENOR			***	ns	**	ns	ns	ns	*	ns
GNOR				ns	***	ns	ns	ns	*	ns
GNAR					**	*	*	ns	**	*
MOV						ns	ns	ns	*	**
P							***	ns	***	ns
D								ns	**	ns
B									ns	ns

ENDO=% Espermatozoides con endósmosis positiva. ENOR= % Espermatozoides normales determinados por eosina/nigrosina. EVIT=% Espermatozoides vivos determinados por eosina/nigrosina. GNOR= % Espermatozoides normales determinados por contraste de fases. GNAR= % Espermatozoides con acrosoma intacto MOV= % Movilidad progresiva post descongelación. P= % penetración. D=% Embriones divididos. B= % Blastocistos. MOVS= % movilidad post swim-up. CONS= Concentración post swim-up. Significancia: * P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001.

esa razón, al efectuar la evaluación final, en la que se consideraron los puntos de las pruebas de rutina y las complementarias incluyendo la FIV, en el nivel alto quedaron seleccionados los toros A, B, y D, en el medio el toro C y E y en el bajo F y G.

Como puede observarse, las pruebas de rutina para clasificar los toros tuvieron muy poco poder predictivo de la capacidad fecundante de las muestras de semen congelado. La evaluación de la movilidad y del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos no es indicativo de la funcionalidad del espermatozoide y de su poder fecundante [35], aunque debido a la información que nos ofrecen acerca de la vitalidad del espermatozoide, estas pruebas siempre deberán ser incluidas en la evaluación seminal. La determinación de la morfología puede ser utilizada para eliminar toros con pobre calidad seminal y siempre debería ser incluida en la evaluación, no obstante, en toros en los cuales los porcentajes de espermatozoide normales es aceptable, la morfología no ofrece información acerca del nivel de fertilidad de la muestra. Al adicionar a las pruebas de rutina los resultados de la evaluación de las pruebas complementarias, en las que se evaluó la funcionalidad del espermatozoide, es posible lograr una mejor discriminación de los toros de acuerdo con la capacidad fecundante de su semen congelado. Queda bien documentado que el espermatozoide tiene una serie de atributos que afectan la fecundación, división y el desarrollo de los embriones y que estos atributos no pueden ser detectados cuando se hacen pruebas convencionales o de rutina de evaluación seminal [11, 14].

CONCLUSIÓN

En este trabajo se han ensayado pruebas adicionales a las que se utilizan en forma rutinaria para la evaluación de la capacidad fecundante de una muestra de semen. Los resultados han coincidido con otras investigaciones en las que se señalan correlaciones entre las pruebas de evaluación seminal *in vitro* y la fer-

TABLA V
CLASIFICACIÓN DE LOS TOROS DE ACUERDO LA CAPACIDAD FECUNDANTE DE SU SEMEN DESCONGELADO

Prueba	Nivel de fecundidad		
	Alto	Medio	Bajo
De Rutina	B	A-C-D-E	F-G
Complementarias	A-D	B-C	E-F-G
Todas Juntas	A-B-D	C-E	F-G

tilidad *in vitro* e *in vivo* de los toros. Existe un posible error en la predicción de la fertilidad potencial de una muestra de semen, basada en las pruebas convencionales de evaluación seminal, en las cuales la movilidad se evalúa subjetivamente y la morfología puede verse afectada por el proceso de congelación-descongelación y del manejo de los espermatozoides en el laboratorio. Debido a ello, se recomienda la inclusión de la prueba de la endósmosis y de la integridad del acrosoma, así como la de la evaluación de la movilidad, concentración swim-up y de la FIV, por la información adicional que proporciona acerca de la fertilidad potencial de la muestra a analizar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALIERTA, S.; LOSINNO, L.; AGUILAR, J.; MARÍA, G. A.; GIL, L.; MOSCHETTI, E. Correlaciones entre el test hi-po-osmótico y otros parámetros utilizados en la evaluación de semen equino criopreservado. **ITEA**. Vol. Extra 20 (2): 612-614. 1999.
- [2] AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately. **J. Androl.** 10 (2): 89-98. 1989.
- [3]

- AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. *In vitro* evaluation of sperm quality: An Opinion. **J. Androl.** 14 (6): 397-406. 1993.
- [4] BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artefacts. **Human. Reprod. Update.** 1: 91-148. 1995.
- [5] BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS, J.F.; DRESSEL, M.A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biol. Reprod.** 27: 147-158. 1982.
- [6] BRACKETT, B.G.; KESKINTEPE, L. Defined sperm treatments and insemination conditions enable improved bovine embryo production *in vitro*. **Theriogenology.** 45:253 (Abstr). 1996.
- [7] CHANG, M. C. Fertilizability of rabbit ova and the effects of temperature *in vitro* on their subsequent fertilization and activation in vivo. **J. Exp. Zool.** 121: 351-381. 1952.
- [8] CHENOWETH, P.J.; HOPKING, F.M.; SPITER, J.C.; LARSON, R.E.S. Guidelines for using the bull breeding soundness Evaluation form. **Theriogenology Handbook.** B. Hasting NE:SFT. 1-5.1993.
- [9] CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. The hyposmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriogenology.** 42: 351-360. 1994.
- [10] CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationship among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional test and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology.** 48: 721-731. 1997.
- [11] DE JONGE, C.J. Attributes of fertyl spermatozoa- an update. **J. Androl.** 20:463-473. 1999.
- [12] DE JONGE, C.J. Paternal contributions to embryogenesis. **Reprod. Med. Review.** 83:203-214. 2000.
- [13] ERIKSON, B.; SHAMUSUDDIN, M.; HAARD, M.; LARSON, B.; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Motility and membrane integrity of frozen/thawed spermatozoa in relation to IVF and field fertility. **Proceedings of the XVII Nordic Veterinary Congress.** Reykjavik 2: 200-201. 1994.
- [14] GORDON, I. Problems and prospects in the laboratory productions of cattle embryos. **Proceedings. 2nd Meeting AETE.** 21-29. Hannover, Germany. 4-5 Septiembre. 1995.
- [15] HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **J. Androl.** 11: 73-88. 1990.
- [16] HENAUULT, M.A.; KILLIAN, G.J. Effects of sperm preparation and bull fertility on *in vitro* penetration of zona-free bovine oocytes. **Theriogenology.** 43: 739-749. 1995.
- [17] HO, H.; SUAREZ, S.S. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. **Reproduction.** 122: 519-526. 2001.
- [18] JANAUKAUSKAS, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen-thawed semen. **Acta. Vet. Scand.** 36: 571-574. 1995.
- [19] KAATSKA, L.; RYNSKA B. Bull effect on developmental capacity of bovine *in vitro* matured and fertilized oocytes. **I Integrated European Conference on Progress in Embryo Technology and Genetics Engineering in cattle and sheep Breeding.** Krakow, Poland. 49: 1202-1207. 1994.
- [20] KHOSLA, S.; DEAN, W.; BROWN, D.; REIK, W.; FEIL, R. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. **Biol. Reprod.** 64: 918-926. 2001.
- [21] KREYSING, U.; NAGAI, T.; NIEMANN, H. Male dependent variability of fertilization and embryo development in two bovine *in vitro* fertilization systems and the effect of casein phosphopeptides (CPPs). **Reprod. Fertil. Dev.** 9: 465-474. 1997.
- [22] KURTU, J.M.; AMBROSEV, J.D.; RAJAMAHENDRAN, R. Cleavage rate of bovine oocytes *in vitro* is affected by bulls but not sperm concentration. **Theriogenology.** 45: 257. 1996.
- [23] LARSON, B.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we use *in vitro* fertilization test to predict semen fertility. **Anim. Reprod. Sci.** 60-61: 327-336.2000
- [24] LATHROP, W.F.; FOOTE, R.F. The swim-up test to predict fertility of bull spermatozoa. **J. Dairy Sci.** 69 (Suppl.1): 239. 1986.
- [25] LE GIENNE, B. Petit atlas de l'ovocyte bovin 1998. **Elevage et Insemination.** 288: 24-30. 1998.
- [26] LEE, K.F.; CHOW, J.F.C.; XU, J.S.; CHAN, S.T. H.; I.P.; S.M.; YEUNG, W.S.B. A comparative study of gene expression in murine embryos developed *in vivo*, cultured *in vitro*, and cocultured with human oviductal cells using messenger ribonucleic acid differential display. **Biol. Reprod.** 64: 910-917. 2001.
- [27] LONERGAN, P.; CROLAN, C.; VAN LANGENDONCK, T.; DONNAY, I.; KHATIR, H.; MERMILLOD, P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development. **Biol. Reprod.** 54: 1420-1429. 1996.

- [28] LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **17th meeting AETE**. 83-93. Lyon, Francia 7-8 Septiembre. 2001.
- [29] MADRID-BURY, N.; OTER, M.; PÉREZ-GARNELO, S.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; DE LA FUENTE, J. Efecto de diferentes concentraciones de heparina sobre la fertilización *in vitro* con semen descongelado de toros de la raza Rubia Gallega. **ITEA**, Vol Extra (22) II: 787-789. 2001.
- [30] NIWA, K.; OHGODA, O. Synergistic effect of caffeine and heparine on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. **Theriogenology**. 30: 733-741. 1988.
- [31] OTOI, T.; TACHIKAWA, S.; KONDO, S.; SUZUKI, T. Effects of different lots of semen from the same bull on *in vitro* development of bovine oocytes fertilized *in vitro*. **Theriogenology**. 39: 713-718. 1993.
- [32] PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; CRISTER, E.S.; EYESTONE, W.H.; FIRST, N.L. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**. 25: 591-600. 1986.
- [33] PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. **Theriogenology**. 1: 63-68. 1974.
- [34] RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocyst as assessed by survival after vitrification. **Theriogenology**. 56: 1-16. 2001
- [35] RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; LARSSON, B.; ZHANG, B.R.; SÖDERQUIST, L. *In vitro* assessment of viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. **J. Reprod. Dev.** 43 1-11. 1997.
- [36] RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and technique for sperm clean-up. **Reprod. Fert. Dev.** 9: 297-308. 1997.
- [37] SAS. INSTITUTE INC. **SAS User's guide. Statistics version 6.12**. Cary. NC. USA 1996.
- [38] SCHNEIDER, C.S.; ELLINGTON, J.E.; WRIGHT, JR. R.W. Effects of bulls with different field fertility on *in vitro* embryo cleavage and development using sperm co-culture systems. **Theriogenology**. 45: 262-269. 1996.
- [39] SCHNEIDER, C.S.; ELLINGTON, J.E.; WRIGHT, R.W. JR. Relationship between bull field fertility and *in vitro* embryo production using sperm preparation methods with and without somatic cell co-culture. **Theriogenology** 51: 1085-1098. 1999.
- [40] SHAMSUDDIN, M.; LARSSON, B. *In vitro* development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors. **Reprod. Dom. Anim.** 28: 77-84. 1993.
- [41] SÖDERQUIST, L.; JANSSON, L.; LARSSON, B.; EINARSSON, S. Sperm morphology and fertility in AI bulls. **J. Vet. Med. A.** 38: 534-543. 1991.
- [42] STAUUS, C.R.; VOLTA, T.J.; SUAREZ, S.S. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. **Biol. Reprod.** 53: 1280-1285. 1995.
- [43] TALBOT, P.; CHACON, R.S. "A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reaction of human sperm". **J. Exp. Zool.** 215 (2): 201-208. 1981.
- [44] TAMULI, M.K.; WATSON P.F. Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the sperm sub-population. **Anim. Reprod. Sci.** 35: 247-254. 1994.
- [45] ZHANG, B.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Relationship between embryo development *in vitro* and 56 days nonreturn rates of cow inseminated with frozen-thawed semen from dairy bulls. **Theriogenology**. 48: 221-231. 1997.
- [46] ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. **Int. J. Androl.** 21: 207-216. 1998.
- [47] ZAVOS, P.M.; CORREA, J.R.; ZARMAKOUPIZ-ZAVOS P.N. Measurement of the sperm motility index via the sperm quality analyzer and its relationship to other qualitative sperm parameters. **Theriogenology**. 46: 421-427. 1996.
- [48] WATSON, P. F. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fert. Dev.** 7: 871-891. 1995.
- [49] YANAGIMACHI, R. *In vitro* capacitation of hamsters spermatozoa by follicular fluid. **J. Cell. Biology.** 142: 473-484. 1969.
- [50] YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In. **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil and Neil et al (eds). Raven Press. Ltd. NY. Chap 5 135-185. 1988.