

Evaluación de la calidad seminal en el verraco

Heriberto Rodríguez-Martínez

Catedrático de Biotecnología de la Reproducción
División de Reproducción Comparada, Obstetricia y Salud de la Ubre,
Depto. de Ciencias Clínicas, Facultad de Medicina Veterinaria y Ciencia Animal,
Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas (SLU), Uppsala, Suecia

Introducción

Antes de usar un verraco sobre un grupo de hembras es muy importante no sólo saber si éste es fértil sino también saber qué nivel de fertilidad tiene, especialmente cuando el verraco va a ser usado en programas de inseminación artificial (IA), donde un alto número de hembras va a ser inseminado con su semen preservado. Por ende, la evaluación de su aptitud reproductiva y de la calidad de su semen, antes y después de su manejo para IA (colección, extensión y enfriado [e incluso congelado y descongelado]) son de primordial importancia para prevenir caídas en la eficiencia reproductiva del hato porcino. La evaluación del verraco requiere de exámenes clínicos y de laboratorio. El análisis seminal *in vitro* (espermiograma), complementario del examen clínico, es de alto valor diagnóstico para evaluar (en forma indirecta) la función testicular, epididimaria y del tracto genital del verraco, permitiendo eliminar casos claros de infertilidad o, incluso, de sub-fertilidad potencial. Asimismo, nos permite determinar el grado de normalidad del semen antes de ser procesado para IA. El espermiograma incluye, en forma rutinaria, la determinación inmediata de su volumen, aspecto (color, contaminación, pH, etc), la concentración y el grado de movilidad progresiva de los espermatozoides así como la evaluación -mediata- de la morfología espermática y la presencia de células extrañas. La movilidad es el parámetro más comúnmente usado para determinar la viabilidad espermática en los eyaculados a ser preservados para IA así como en las muestras seminales post-procesado. Esta presentación

describe los procedimientos básicos de evaluación seminal así como su valor estimativo de la fertilidad potencial del eyaculado y/o del verraco.

Evaluación de la aptitud reproductiva del verraco

El examen andrológico debe tomar siempre en cuenta la influencia de varios factores, como la edad, la estación, el nivel nutricional, la presencia de enfermedades intercurrentes, el manejo, las interacciones sociales y otros factores ambientales que puedan afectar su fertilidad. Su aptitud reproductiva depende primariamente de su salud general y su bienestar, y -específicamente- de la función de su sistema endocrino y de sus testículos, su tracto genital y sus glándulas sexuales accesorias, todo lo cual incide en la eficiencia de su capacidad de servicio. Cada una de estas funciones pueden cambiar en forma continua, dependiente o independientemente entre sí, pasando de ser muy buena a muy mala en el tiempo, afectando la fertilidad en grado variable. La evaluación de la aptitud reproductiva persigue un sólo propósito; llegar a un diagnóstico que nos permita pronosticar el uso del reproductor o de su semen. La evaluación se compone del examen clínico del reproductor, incluyendo su capacidad para servir hembras, así como de la calidad de su semen y, en última instancia, del análisis de su fertilidad, probada mediante registros apropiados.

El examen clínico

El examen clínico debe ser siempre iniciado por una identificación sólida del reproductor (raza, edad, tatuaje, número identificadorio, registro, etc) así como la recolección de una historia clínica lo más completa posible, que incluya datos de manejo, historia nutricional, enfermedades o afecciones previas, uso previo como reproductor (incluyendo anotaciones de comportamiento y resultados de fertilidad). El verraco debe inspeccionarse en el reposo y en movimiento, prestando atención especial al sistema locomotor músculo-esquelético, con énfasis en la conformación de los miembros posteriores (aplomos). El examen clínico general se remite a la inspección, palpación y auscultación somera de los distintos sistemas, con especial atención a los órganos de los sentidos (particularmente vista y olfato). Cuando exista sospecha de afección, el examen se hace más intensivo y específico. El examen físico andrológico debe incluir la inspección del prepucio y pene (durante la colección de semen), la inspección y la palpación del escroto y su contenido (incluyendo la mensura del ancho del escroto, la

mensura testicular y los hallazgos palpatorios en epidídimo y testículo; en éste último describiendo la elasticidad y la resistencia del órgano a la palpación superficial y profunda, respectivamente). Los exámenes paraclínicos de hormonas (LH, FSH, testosterona) no han resultado de valor para la evaluación rutinaria de los verracos, pero pueden usarse en casos especiales. Muestras de sangre para serología se toman en caso de sospecha durante el examen clínico.

Colección del semen

La colección del semen debe hacerse en una sala de colección o en el corral del verraco en cuestión. La colección puede hacerse con vagina artificial (VA) o manualmente, ya sea con mano enguantada (el llamado método japonés) o introduciendo el pene en un cilindro de goma descartable (IMV, Francia). Normalmente se usa un potro de metal para la colección, al cual los verracos entrenados montan sin mayores problemas. En el caso de colección de semen para diagnóstico en campo, lo más indicado (y probablemente la única forma de colección) es usar una cerda en celo, de edad y tamaño corporal adecuados para el verraco. El semen se colecta en una bolsa de plástico montada en un termo o en un recipiente aislante de boca ancha. La apertura del recipiente se cubre y fija con gasa a los efectos de evitar el contacto de la secreción gelificante de las glándulas bulbouretrales con el resto del eyaculado. Se deja que el verraco entre al área de colección y se familiarice con el ambiente y el potro de colección, una vez que el verraco haya montado en forma correcta el potro, en caso de usar VA se deja que el macho haga movimientos de búsqueda con su pene y que le permite penetrar la VA con una buena cantidad de aire en su cámara (mitad de agua templada y aire), a partir de cuyo momento se comienza a pulsar un manguito de goma acoplado a la válvula de la VA de modo que la presión dentro de la VA aumente y pulse rítmicamente. En caso de usar el método japonés, se permite también que el verraco haga movimientos de búsqueda de la vulva o por debajo del potro y cuando los movimientos de búsqueda disminuyen, se atrapa el glande del pene (porción espiralada) con la mano y se ejerce fuerte presión manual –continuada- sobre el espiral. En el caso de usar un cilindro descartable de goma se coloca el glande del pene dentro del cilindro y se aplica una presión moderada con la mano sobre el cilindro. La presión aplicada sobre el glande del pene (ya sea con VA, cilindro o mano) provoca la

eyaculación que demora mas o menos entre 5 y 15 minutos dependiendo del verraco. Como ya se ha descrito, el eyaculado del cerdo es fraccionado y consiste de una primera fracción que en principio solo contiene secreción de la próstata y algo de gel de las glándulas bulbouretrales (acuosa, translúcida a opaca en color). La segunda porción del eyaculado, fácilmente identificable por su color blanco a lechoso, se llama fracción rica en espermatozoides a la que le sigue otra fracción (post-espermática) donde el número de espermatozoides disminuye rápidamente y donde la secreción creciente de las vesículas seminales y de las glándulas bulbouretrales dominan (la fracción post-espermática vuelve a ser translúcida u opaca, dependiendo del volumen de la secreción bulbouretral que contenga. En muchos verracos se nota un intervalo entre la primera y segunda fracción, lo cual a veces lleva a detener la colección pensando que ya ha eyaculado. Esto no debe permitirse ya que lleva a la colección incompleta del eyaculado, con muy bajo volumen y prácticamente libre de espermatozoides. El volumen del eyaculado varia normalmente dentro de un rango importante (100 a 300 ml) pero si el volumen colectado es menos de 50 ml y la concentración espermática muy baja, hay razón para pensar que la eyaculación (colección) no ha sido completa y debe repetirse. La presión manual (o la presión de la VA) sobre el espiral peneano debe mantenerse durante toda la eyaculación. Sólo se disminuye la presión cuando el verraco intenta hacer nuevos movimientos de búsqueda, lo que marca que la eyaculación ha terminado. Si esto no se hace, el verraco comenzará una nueva onda de eyaculación, algo que algunos consideran -incorrectamente- como verracos que eyaculan dos fracciones ricas en espermatozoides en su eyaculado. El esperma colectado debe evaluarse lo mas rápidamente posible luego de la colección, aunque puede -sin riesgo alguno- mantenerse en el termo de colección hasta una hora luego del muestreo.

Evaluación de la habilidad y capacidad de servicio

Durante la colección de semen se evalúa, al menos en forma parcial, el interés y la habilidad del verraco para servir, pudiéndose determinar su grado de líbido, su actividad para cortejar el maniquí donde se colecta el semen por ejemplo, la erección, los movimientos de localización y el reflejo eyaculatorio.

Evaluación seminal

Directamente luego de la colección del eyaculado se examina su color, su densidad, su aspecto, así como la concentración y motilidad espermáticas. Luego de esta evaluación inmediata se preparan muestras para la evaluación morfológica del semen. Por último, se determina el volumen del eyaculado (por medición volumétrica o peso específico, 1 g/ml) y en caso de su uso previsible, se extiende el eyaculado con diluyentes apropiados. El semen debe mantenerse en todo momento en condiciones óptimas de temperatura (20° C) ya sea sin extensión o extendido con un diluyente apropiado, en casos en que la evaluación no pueda hacerse de inmediato.

El color es normalmente gris a blanco grisáceo. En caso de haberse colectado solamente la segunda fracción (espermio-rica) el color se hace o más blanco o tira a amarillento, dependiendo del verraco y de la concentración espermática. La contaminación con sangre, suciedad o flóculos se marca siempre (se considera inaceptable). La determinación del pH y la presencia de hemoglobina pueden realizarse con ventaja en forma inmediata a la colección del semen.

Concentración espermática: El semen se extiende 1:1 con solución salina fisiológica y la concentración espermática se determina rápidamente por fotometría. Desgraciadamente la fotometría tiene un alto margen de error, y por ello se debe realizar -en forma periódica- un recuento manual de la concentración espermática, mediante el uso de muestras extendidas y un conteo en cámaras cuentaglobulos (Bürker, por ejemplo) (Bane 1952). La cantidad total de espermatozoides por eyaculado es un parámetro importante ya que refleja indirectamente -en condiciones de colección seminal periódica- la capacidad de producción gonadal y de almacenamiento en las reservas no-gonadales del reproductor (Amann 1981). En condiciones de IA parece existir -para cada verraco- un número límite inferior en cada dosis que garantiza la expresión de un cierto nivel de fertilidad, el cual generalmente define cada individuo (Xu et al. 1998). Desgraciadamente, en condiciones comerciales, aún no se han establecido números mínimos requeridos para obtener tasas de fertilidad aceptable, tendiéndose aún al uso excesivo de espermatozoides por dosis.

La movilidad espermática debe determinarse colocando una gota pequeña (1-2 μ l) en un portaobjeto pre-calentado (38° C), tapando la gota con un cubreobjeto de tamaño adecuado (10x10 mm) y mirando la gota con a 200-400 aumentos en un microscopio equipado con óptica de contraste de fase. Como sabemos que una disminución de la temperatura conduce a una disminución de la movilidad y otros efectos indeseables en los espermatozoides,

tenemos que recordar siempre el uso de material pre-calentado así como tener un microscopio equipado con platina térmica (38° C) para evitar errores de diagnóstico. La movilidad se estima generalmente en forma subjetiva, o sea que un operador estima el porcentaje de espermatozoides que muestran motilidad progresiva y lineal. Como también sabemos que la movilidad del semen de verraco disminuye rápidamente in vitro, tenemos que recordar el preparar al menos 2 gotas para la evaluación. Siendo las gotas tan pequeñas se puede -con ventaja- colocarlas en un mismo portaobjeto. Si hay movimiento espermático anormal (movimientos en círculo, adhesión al vidrio, aglutinación) esto debe siempre anotarse, y repetir la observación con otras gotas. En un eyaculado considerado “normal” la movilidad espermática es usualmente de al menos un 70%. En los últimos años se han desarrollado (y estandarizado) una serie de sistemas computarizados a fin de permitir una evaluación mas” objetiva” de la movilidad individual. Los analizadores de movilidad espermática computarizados (los llamados instrumentos CASA) digitalizan una serie de imágenes (centroides o fotos simples) de lo ofrecido en el campo de un microscopio y luego estas imágenes digitalizadas se procesan en un ordenador (Verstegen et al. 2001). Si bien esta instrumentación puede determinar tanto el porcentaje de espermatozoides móviles cómo una serie de detalles referentes a las características de la movilidad individual y colectiva (velocidad, desviación de la linealidad, etc; Abaigar et al. 1999), e incluso tiene una cierta relación con la fertilidad de las muestras/verracos (Holt et al. 1997, Tardiff et al. 1999), su precio es todavía muy elevado. No sólo esto es un problema, los instrumentos CASA no están tampoco libres de errores de programación. Ciertos patrones de movilidad, como la linealidad, se correlacionan significativamente con la fertilidad a campo (Holt et al. 1997, Abaigar et al. 1999). La velocidad de los espermatozoides de verraco también ha sido relacionada con la fertilidad, cuando los espermatozoides fueron previamente separados por medio de gradientes (Percoll) (Grant et al. 1994).

La evaluación morfológica del semen es de enorme valor diagnóstico y requiere de un manejo adecuado de las muestras a analizar, las cuales se preparan en principio luego de haber evaluado la movilidad. También aquí es necesario recordar que tanto la solución taponada de formalina (fijador) como los portaobjetos a ser usados (frotis) estén temperados al momento del uso. Esto evita la presencia de artefactos (acrosomas rotos,

colas dobladas simples, etc). Se deben hacer dos frotis delgados (para colorear cabezas, para ello se puede usar el semen ya diluido 1:1 que usamos para mirar movilidad) y dos frotis gruesos, escalonados (para colorear otras células que no sean espermatozoides, como los leucocitos, células epiteliales, células espermátogénicas, etc). Todos los frotis se secan al aire. Una vez realizados los frotis, se fijan 4-5 gotas de semen sin diluir en un tubo eppendorf con 1 ml de solución taponada de formalina (Hancock 1961).

Luego de la preparación de los frotis y la fijación seminal con formalina, se toman unos mililitros del eyaculado y se colocan en un tubo de ensayo (es de ésta muestra seminal que se mide -en forma manual- la concentración espermática. Este tubo se envía al laboratorio con el resto de las muestras (frotis y tubo con semen fijado) así como una copia de los datos del verraco, su historia, y la evaluación inmediata del semen.

La evaluación morfológica en el laboratorio esta basada en la microscopia de contraste de fases de preparados húmedos (espermatozoides fijados) y en la microscopia de luz de frotis coloreados. La evaluación de morfología rutinaria incluye la localización de anomalías presentes en los distintos sectores de cada espermatozoide (cabeza [incluyendo el acrosoma], nuca, pieza media, incluyendo la presencia de gotas citoplásmicas y cola). Se debe realizar un recuento sobre un número importante de espermatozoides, utilizando contrastación en el frotis delgado, el cual se tiñe con carbol fucsina, y donde sólo se evalúa la morfología de cabezas de 500 espermatozoides (1000 aumentos en microscopía de luz; Lagerlöf 1934). En el preparado húmedo se examinan 200 espermatozoides a 1000 aumentos (contraste de fase) donde se evalúan acrosomas, bolsas nucleares, piezas medias y colas así como la presencia y ubicación de las gotas citoplásmicas (Bane 1961). Ejemplos de anomalías espermáticas se ven en las Figuras 1 y 2. La cuantificación debe expresarse sobre todas las anomalías presentes ya que de esa manera se puede determinar su origen y la magnitud de la patología que las origina (incluyendo anomalías de la espermatogénesis, de la maduración espermática, etc (Bane 1961), así como la presencia de defectos específicos; Barth & Oko 1989). Se ha intentado reemplazar la evaluación individual, mediante operador experto, por instrumentos de tratamiento de imágenes (los llamados equipos ASMA) aunque no han aún dado los mismos resultados (Thurston et al. 1999, entre otros).

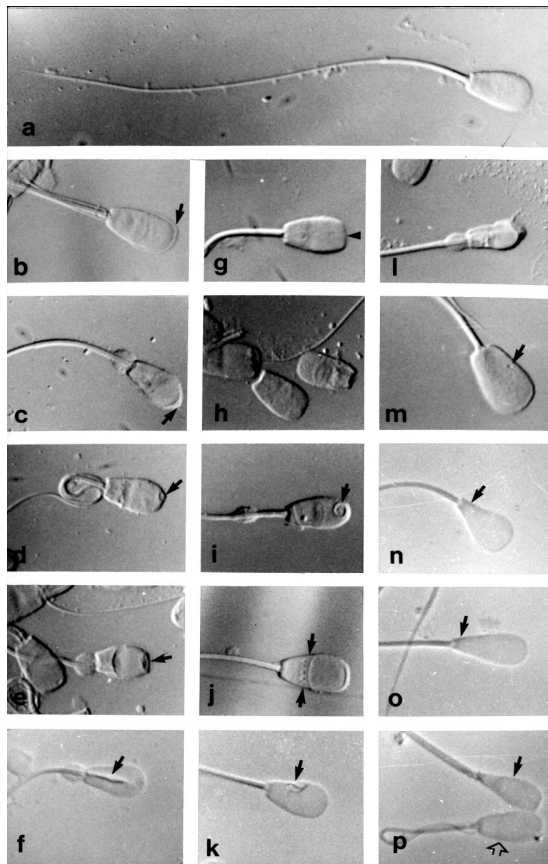


Figura 1: Ejemplos de anomalías espermáticas de cabeza (a: espermatozoide normal, b: acrosoma levantado, c-e y g: diferentes formas de defecto específico de acrosoma (knobbed defect), f: defecto de cresta, h: cabezas sueltas normales, i: cráter nuclear, j: defecto de diadema, k: defecto de cráter lateral, l: pequeña, m: gigante, n: forma de pera, o-p: cabezas estrechas).

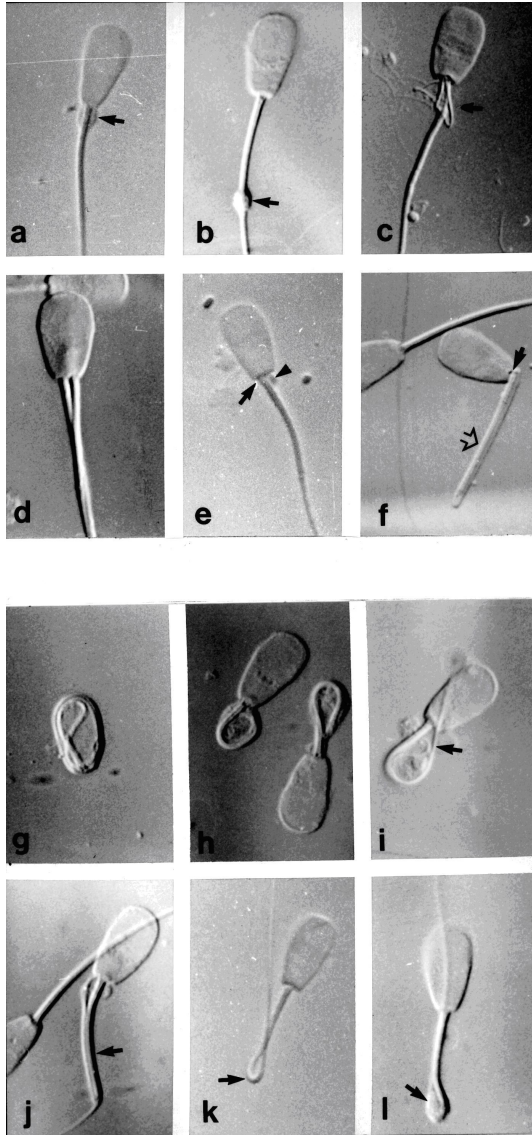


Figura 2: Ejemplos de anomalías espermáticas de pieza media (plancha superior, a-f) y cola (plancha inferior, g-l). En a: gota citoplasmática proximal, b: gota citoplasmática distal, c: pieza media desorganizada, d: pieza media doble, e: implantación abaxial de cola, f: nuca rota, g: cola enrollada alrededor de la cabeza, h-i: cola enrollada debajo de la cabeza, j: cola doblemente enrollada, k: cola doblada simple (en látigo), l: cola en látigo con una cola citoplasmática distal retenida.

Los frotis escalonados se colorean con HE o con la técnica de Papanicolau a los efectos de determinar la presencia y magnitud relativa de células extrañas. Entre las mismas encontramos las células epiteliales (de la uretra, pene, glándulas sexuales accesorias), las células espermátogénicas (espermátidas redondeadas, células gigantes), las células epiteliales de la rete testis o ductos eferentes (células medusa) las células epiteliales principales del epidídimo (células en bote), o inflamatorias (leucocitos, linfocitos, monocitos/macrófagos). Normalmente, la presencia de células epiteliales descamadas es un hallazgo común y sin relación con patologías, así como la presencia fortuita de algunas otras células arriba indicadas. Un aumento en el número de las mismas (especialmente de células espermátogénicas e inflamatorias) es una clara señal de procesos patológicos que exige su seguimiento. En casos donde los parámetros seminales se salen de los límites considerados normales, una nueva muestra seminal debe ser analizada, en algunos casos inmediatamente (hipoplasia testicular, procesos inflamatorios o sospecha de defectos específicos) y en otros en períodos relacionados a la sospecha en sí, como exigir reposo de una semana para sospechas de inmadurez espermática (gotas citoplasmáticas proximales) o esperar una nueva onda de la espermátogénesis (dos meses por ejemplo en el cerdo) cuando se sospecha degeneración testicular o la inmadurez del epitelio seminífero (pubertad retardada).

Cuando se hace la evaluación final de la morfología espermática, se debe siempre hacer una evaluación global, teniendo en cuenta la problemática clínica. Hay que tener consideración de los datos cuantitativos (volumen, concentración, cantidad total de espermatozoides), así como los datos de calidad espermática (morfología espermática, presencia de células inflamatorias u otras células). En el cerdo, una especie seleccionada por su calidad seminal (la cual incide en forma importante en su fertilidad post-IA), se consideran parámetros normales de morfología cuando las anomalías de cabeza espermática no sobrepasan el 10% y cuando ninguno de los otros parámetros (acrosomas, pieza media, cola, gotas citoplasmáticas proximales) sobrepasan el 5% cada uno o el 10-15% del total. La presencia de defectos específicos de la espermátogénesis (generalmente hereditarios) que resulten en anomalías morfológicas típicas (como la presencia de vacuolas nucleares [“diadem defect”], el acrosoma plegado [“knobbed defect”], los

espermatozoides decapitados, las colas cortas o mutiladas [“tail stump”], la cola no desplegada [“Dag defect”] o la pieza media en tirabuzón [“corkscrew defect”], ver Barth & Oko 1989) que se pueden ver ocasionalmente en verracos son defectos muy graves ya que interfieren con la fecundación y pueden ser esterilizantes, tales como el defecto de “colas cortas” descrito en los cerdos de la raza Yorkshire en Finlandia (Andersson et al. 2000, Sukura et al. 2002). En la [Tabla 1](#) se presentan rangos y nivel de aceptabilidad para ciertos parámetros seminales en verraco.

Tabla 1: Rangos y nivel de aceptabilidad para ciertos parámetros del semen de verraco*.

	Rango
Aceptable (para IA)_Volumen del eyaculado (ml)	100-300
50_Numero total de espermatozoides ($\times 10^9$)	10-100
10_Motilidad progresiva (%)	70-90
70_Anormalidades de cabezas espermáticas (%)	2-5
5_Gotas citoplasmáticas proximales (%)	1-5
5_Defectos de acrosoma (%)	1-2
5_Anormalidades de pieza media (%)	2-5
5_Colas dobladas simples (%)	1-5
25_*	No puede haber ni contaminación con sangre ni presencia de células inflamatorias.

La evaluación de la morfología espermática es, como se indicó anteriormente, un componente importante del espermiograma y por ende, de la evaluación clínica

andrológica. La morfología espermática indica desviaciones de la espermatogénesis y la maduración epididimaria y sus resultados, convenientemente evaluados, son usados para eliminar reproductores con semen de baja calidad para IA, en casos en los que éstos indiquen patologías genitales mayores. Desafortunadamente, cuando los parámetros morfológicos están dentro de límites aceptables, la morfología de la muestra seminal por se no nos provee de información suficiente para juzgar el nivel esperado de fertilidad del semen luego de la IA, independientemente si ésta es juzgada subjetivamente o usando un equipo computarizado (ASMA) ya que en muchos casos un número total de espermatozoides alto en la dosis, es capaz de compensar, al menos parcialmente, por un alto porcentaje de anormalidades morfológicas (Rodríguez-Martínez & Larsson 1998).

Registros de fertilidad

Los datos de fertilidad de un reproductor a evaluar andrológicamente son de suma importancia. Éstos determinan, en última instancia, su normalidad basado en el nivel de fertilidad registrado, llegando a clasificarle como subfétil o, en casos graves, como de infertilidad permanente y completa (esterilidad). Sin embargo, la fertilidad de un verraco es difícil de medir en forma adecuada. En cerdos, como en la mayoría de las especies, en condiciones de monta natural, el número de montas por celo es alto, aumentando por ende la fertilidad por número de hembras. En especies polítoas como el cerdo, se prefiere utilizar el concepto de prolificidad utilizando datos de tasas de camada o parición por celo o servicio/IA. Cuando se utiliza monta controlada o IA para efectivizar el uso de los machos, la medición de la fertilidad depende primariamente del número de hembras.

Determinación tradicional de la calidad espermática post-preservación

Luego de la preservación, alícuotas del semen son examinadas, comúnmente, en forma subjetiva, por medio de la observación de frotis húmedos en un microscopio de luz equipado con óptica de contraste de fases. Por ende, los resultados obtenidos dependen enteramente de la habilidad y experiencia del evaluador. El método es simple, sencillo y rápido y todavía constituye el parámetro de elección para determinar el grado de daño celular que los procedimientos de preservación, especialmente el almacenaje prolongado

en forma líquida o la congelación bajo condiciones industriales, inflige a los espermatozoides. A los efectos de aumentar la objetividad del análisis de motilidad y el análisis de los diferentes patrones de motilidad espermática, el uso de analizadores de movilidad espermática computarizados (los llamados instrumentos CASA, Holt et al 1997), ha aumentado en forma importante. La morfología también puede usarse como indicador de la habilidad de los espermatozoides para sobrellevar los procesos de almacenaje, enfriado, congelado y descongelado, evaluando por ej. el aspecto del acrosoma o la presencia de colas dobladas simples para indicar daños a nivel de membrana o del flagelo, respectivamente, y de esa manera permite evitar el uso de cierto semen procesado para la IA. La evaluación de la integridad de la membrana plasmática se incluye hoy como un parámetro valioso por su cierta relación con fertilidad. El método más simple es exponer a los espermatozoides a una solución hipoosmótica (HOS-tests), aunque los resultados obtenidos no siempre están relacionados con la fertilidad de las muestras o individuos examinados (Perez-Llano et al 2001, Saravia et al 2004). En la última década, el uso de marcadores fluorescentes para el ADN, enzimas citoplasmáticas, lectinas, iones o el potencial de membrana han mostrado ser de alto valor para determinar la integridad de los distintos compartimientos subcelulares y tienen relación con fertilidad (Holt et al 1997). Los fluoróforos han sido usados en conexión con microscopía de fluorescencia (donde se requiere un operador para el recuento). Aunque esta metodología es más barata, sólo permite la evaluación de unos cientos de espermatozoides por muestra, dejando a la misma con un grado de exactitud muy por debajo de la citometría de flujo (usando los llamados analizadores de FACS; Garner & Johnson 1995), tecnología que permite el examen de miles de espermatozoides en minutos, con una buena correlación con fertilidad (Maxwell et al 1998), pero cuyo alto costo todavía representa un obstáculo para su aplicación de rutina. Recientemente, un ensayo de unión de Anexina-V usando análisis con FACS ha sido usado en nuestro laboratorio para monitorizar la externalización de la fosfatidil serina en espermatozoides cryopreservados en verraco (Peña et al 2003), que permitiría, por su más alta sensibilidad, la detección de cambios tempranos en la membrana plasmática.

Considerando que la fecundación depende de la presencia de varias características espermáticas interrelacionadas, uno se pregunta si los análisis del semen que se utilizan

actualmente son lo suficientemente discriminatorios para poder medir la capacidad fecundante de una muestra seminal, por ej. para IA, particularmente cuando la misma ha sido extendida y enfriada (o congelada y descongelada; Almlid et al. 1989, Amann & Hammerstedt 1993). A pesar de que algunos de los atributos necesarios para que un espermatozoide sea fértil han sido identificados, otros aún se desconocen, así como no se sabe mucho de cuál es la combinación efectiva que se requiere en las diferentes circunstancias de IA (lugar de inseminación, momento de la misma, concentración de la dosis, etc) ya sea in vivo o in vitro. Este nivel de complejidad y el número de factores desconocidos hacen extremadamente difícil la evaluación de la fertilidad potencial de los espermatozoides, tanto a nivel del eyaculado como luego de la preservación.

Agradecimientos

Los trabajos del autor han sido financiados por la Fundación Sueca de Investigación Agropecuaria (SLF, Köttböndernas) y FORMAS, Estocolmo, Suecia.

Referencias

- Abaigar T, Holt WV, Harrison RAP, del Barrio G (1999) Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol Reprod* 60: 32-41.
- Almlid T, Clarke RN, Pursel VG, Johnson LA (1989) Effectiveness of in vitro methods for predicting in vitro fertilizing capacity of boar spermatozoa cryopreserved with 2% or 4% glycerol. *Zuchthygiene* 24: 8-15.
- Amann RP (1981) A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J Androl* 2: 37-58.
- Amann RP, Hammerstedt RH (1993) In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl* 14: 397-405.
- Andersson M, Peltoniemi OAT, Mäkinen A, Sukura A, Rodriguez-Martinez H (2000) The hereditary "short tail" sperm defect - A new reproductive problem in yorkshire boars. *Reprod Dom Anim* 35: 59-63.

- Bane A (1952) A study on the technique of hemocytometric determination of sperm motility and sperm concentration in bull semen. *Cornell Vet* XLII: 518-531.
- Bane A (1961) Acrosomal abnormality associated with sterility in boar. *Proc. 4th ICARAI Congr, The Hague, IV*: 810-817.
- Barth A, Oko R (1989) Defects of the sperm head and tail. In: Iowa State University Press (eds.). *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Iowa: Ames, 130-228.
- Garner DL, Johnson LA (1995) Viability assessment of the mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod* 53: 276-284.
- Grant SA, Long SE, Parkinson TJ (1994) Fertilizability and structural properties of boar spermatozoa prepared by Percoll gradient centrifugation. *J Reprod Fert* 100: 477-483.
- Hancock L (1952) The morphology of bull spermatozoa. *Br J Exp Biol* 29: 445-453.
- Holt C, Holt WV, Moore HDM, Reed HCB & Curnock RM (1997) Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: Results of two fertility trials. *J Androl* 18: 312-323.
- Lagerlöf N (1934) Morphological studies on the changes in the sperm structure and in the testes of bulls with decreased or abolished fertility. *Acta Path Microbiol Scand Suppl* 19: 254-267.
- Maxwell WMC, Long CR, Johnson LA, Dobrinsky JR, Welch GR (1998) The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* 10: 444-440.
- Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H (2003) Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theriogenology* 60: 677-689.
- Perez-Llano B, Lorenzo JL, Yenes P, Trejo A, Garcia-Casado P (2001) A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology* 56: 387-398.
- Rodriguez-Martinez H, Larsson B (1998) Assessment of sperm fertilizing ability in farm animals. *Acta Agric Scand A Suppl* 29: 12-18.
- Saravia F, Wallgren M, Nagy S, Johannisson A, Rodríguez-Martínez H (2004) Deep freezing of concentrated boar semen for intrauterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology* (Accepted for publication).
- Sukura A, Mäkipää R, Vierula M, Rodriguez-Martinez H, Sundbäck P, Andersson M (2002) Hereditary sterilizing short-tail sperm defect in Finnish Yorkshire boars. *J Vet Diag Invest* 14: 382-388.

- Tardiff S, Laforest JP, Cormier N, Bailey JL (1999) The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology* 52: 447-459.
- Thurston LM, Watson PF, Holt WV (1999) Sources of variation in the morphological characteristics of sperm subpopulations assessed objectively by a novel automated sperm morphology analysis system. *J Reprod Fert* 117: 271-280.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K (2001) Computer assisted semen analysers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57: 149-179.
- Xu X, Pommier S, Arbov T, Hutchings B, Sotto W, Foxcroft GR (1998) In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. *J Anim Sci* 76: 3079-3089.