

La evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos mediante la fecundación *in vitro* (Revisión)

J. Gadea

Dpto. de Biología Animal (Fisiología Animal). Facultad de Veterinaria.
Universidad de Murcia. 30100 Murcia
jgadea@um.es

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es revisar los diversos métodos disponibles para evaluar la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos haciendo una especial mención al uso de los sistemas de fecundación *in vitro* para tal fin. Los parámetros del espermiograma clásico por sí solos parecen ser insuficientes para predecir adecuadamente la fertilidad, aunque la información combinada de todos ellos ofrece una buena estimación de la calidad seminal. Para dar una solución a este problema se han desarrollado nuevas técnicas que pretenden alcanzar un mejor conocimiento de la célula espermática, mediante la evaluación de la estructura y funcionalidad del espermatozoide. Entre ellos los que estudian la interacción espermatozoide-ovocito pueden proporcionar una información inequívoca de la capacidad fecundante de los espermatozoides.

PALABRAS CLAVE: Espermatozoide
Fertilidad
Verraco
Fecundación *in vitro*
Análisis seminal

INTRODUCCIÓN

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

Recibido: 13-10-00
Aceptado para su publicación: 16-3-01

En la aplicación de las técnicas de inseminación artificial porcina se han realizado numerosos e importantes avances, lo que ha permitido alcanzar una amplia difusión en las explotaciones con unos resultados equiparables o superiores a los obtenidos con la monta natural (Colenbrander y cols., 1993). Sin embargo, quedan aún importantes temas en los que es posible trabajar para mejorar los resultados productivos. Entre ellos se incluyen la crioconservación del semen, cuya eficacia debe ser optimizada (revisado por Johnson, 1985; Bwanga, 1991), y la mejora de los métodos de evaluación del semen (Hammersedt, 1996).

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

En el trabajo diario en los centros de inseminación artificial se detectan animales que tienen una fertilidad reducida y que al realizar un análisis de rutina presentan un espermiograma anormal. Sin embargo, en otras ocasiones se presentan espermiogramas normales correspondientes a verracos subfértiles. Por ello, ninguno de los parámetros del espermiograma clásico por sí solo parece ser suficiente para predecir adecuadamente la fertilidad, aunque la información combinada de todos ellos ofrece una buena estimación de la calidad seminal (Woelders, 1991).

Para dar una solución a este problema se han desarrollado nuevas técnicas que pretenden alcanzar un mejor conocimiento de la célula espermática. Con este objetivo se puede evaluar la estructura y funcionalidad del espermatozoide. El estudio de la membrana parece ser un buen procedimiento para evaluar la funcionalidad del gameto masculino, ya que ésta interviene activamente en la mayoría de las fases del proceso reproductivo. La membrana puede ser estudiada desde el punto de vista estructural mediante la utilización de tinciones, o bien valorar su funcionalidad, para lo que se ha aplicado el test hipoosmótico (Jeyendran y cols., 1984; Vázquez y cols., 1997) y distintas técnicas con fluorocromos permiten evaluar la funcionalidad espermática (Harrison y Vickers, 1990; Garner y Johnson, 1995).

Los estudios bioquímicos se desarrollaron con la intención de tener una medición objetiva y fácilmente reproducible de la calidad seminal y que fueran reflejo de su actividad funcional. Se han realizado estudios metabólicos y enzimáticos, cuantificándose los diferentes componentes químicos presentes en el eyaculado y que pueden condicionar la actividad del espermatozoide como el contenido en iones, la liberación de enzimas, el contenido de ATP, etc. (Strzezek y Skaweta, 1984; Ciereszko y cols., 1994; Saiz y cols., 1994; Gadea y cols., 1998).

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

Los procesos de capacitación y reacción acrosómica son pasos fundamentales en la fecundación. Por ello, se ha realizado un importante esfuerzo en estudiar los mecanismos

íntimos que regulan estos procesos y que aún son en parte poco conocidos (Barboni, 1994; Harrison, 1996).

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

En los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios utilizando ovocitos homólogos para evaluar la capacidad fecundante del eyaculado porcino. La posibilidad de utilizar ovocitos inmaduros en los sistemas de fecundación con unas tasas de penetración equivalentes a las de ovocitos maduros (Martínez y cols., 1993) supone facilitar en gran medida este estudio, ya que se puede disponer de un gran número de ovocitos a partir de hembras prepúberes sacrificadas en los mataderos comerciales. Por otra parte también se han utilizado sistemas de fecundación de ovocitos madurados *in vitro* que permiten evaluar otros pasos del proceso como la formación del pronúcleo o las tasas de división embrionaria y formación de blastocistos (revisado por Larsson y Rodríguez Martínez, 2000).

El objetivo del presente trabajo es revisar los diversos métodos disponibles para evaluar la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos haciendo una especial mención al uso de los sistemas de fecundación *in vitro* para tal fin.

Conceptos de capacidad fecundante y calidad seminal

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

Por calidad seminal se entiende el conjunto de parámetros que caracterizan la viabilidad de la célula espermática. En un principio se hacía referencia a los caracteres que definen la morfología y el movimiento de los espermatozoides (Larsson, 1986), pero posteriormente se le han añadido otra serie de parámetros que tienen por objetivo cuantificar de algún modo la funcionalidad del espermatozoide (Berger y cols., 1996) o la contaminación microbiana del mismo (Johnson y cols., 2000).

La mayoría de los análisis *in vitro* utilizados hasta el momento ofrece información sobre la calidad seminal, que es fundamental para los estudios en general de la fisiología del espermatozoide y en particular para la conservación del semen. Sin embargo, lo realmente importante para el sector productivo porcino es el estudio de los caracteres relacionados

con el proceso de fecundación, es decir la determinación *in vitro* de la capacidad fecundante de los eyaculados *in vivo* (Woelders, 1991).

La evaluación de la calidad seminal es una parte importante y un punto crítico en el proceso de la inseminación artificial, ya que en muchos casos, verracos asociados con una fertilidad reducida presentan alteraciones detectables mediante un examen rutinario del semen. No obstante, aunque es necesaria una buena calidad seminal para alcanzar unos niveles de fertilidad aceptables, no todos los eyaculados con buena calidad seminal mantienen niveles de fertilidad dentro de la normalidad (Berger y Parker, 1989; Martínez y cols., 1993).

La posibilidad de predecir la capacidad fecundante de un eyaculado mediante los análisis *in vitro* es un problema que hasta la fecha no ha sido resuelto adecuadamente (Hammerstedt, 1996). Algunos autores proponen como causa de la inconsistencia de los resultados conseguidos, la evaluación de un número relativamente reducido de células, la gran influencia de la subjetividad del observador y la alta variabilidad que presentan muchos análisis seminales (Graham y cols., 1980; Evenson y cols., 1994; Saacke y cols., 1994). Además, el número de espermatozoides aplicados en cada inseminación es un factor muy importante a la hora de evaluar la fertilidad y su relación con los parámetros de calidad seminal (Saacke, 1984; Saacke y cols., 1988; Fearon y Wegener, 2000).

En las especies domésticas, las tasas de fertilidad y prolificidad se incrementan cuando se aumenta el número de espermatozoides en la dosis de inseminación, hasta llegar a un nivel en el que un incremento en el número de células no aumenta la proporción de ovocitos que se van a fecundar (Salisbury y Vandemark, 1961). Diversos autores han propuesto funciones matemáticas para describir la relación entre el número de espermatozoides y la tasa de fertilidad (Van Duin, 1964; Schwartz y cols., 1981). Sin embargo, hay que tener en cuenta que hay algunas características del espermatozoide como son las aberraciones cromosómicas, los daños en el ADN o las alteraciones de la estructura de la cromatina (Evenson y cols., 1980; Ballachey y cols., 1988; Evenson y cols., 1994) que determinan la inviabilidad en el desarrollo embrionario aún cuando la fecundación del ovocito se haya producido. Las alteraciones de este tipo no pueden ser compensadas con un incremento del número de espermatozoides en la dosis de inseminación (Des Daas, 1992). Por este motivo, Saacke y cols. (1994) clasifican los parámetros seminales en dos categorías: compensables e incompensables.

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

Estimación de la fertilidad *in vivo* mediante pruebas de campo

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

Para reducir el tiempo de estudio necesario para medir la fertilidad se ha usado la evaluación de embriones recogidos después de unos días postinseminación (Obonyo y cols., 1992; Warberski y cols., 1994a; Garner y cols., 1996), el estudio ecográfico de las hembras que confirme la gestación o la tasa de no retorno al estro (Strzezek y Skaweta, 1984), en vez de las tasas de partos y el tamaño de la camada (Galli y Bosisio, 1988).

Los test de fertilidad heterospermicos se desarrollan como una alternativa a los clásicos test homospermicos a partir de los estudios realizados por Beatty en la década de los 50, primeramente en el conejo (Beatty, 1957 y 1960) y posteriormente en el ganado bovino (Beatty y cols., 1969), porcino (Pursel y cols., 1984; Berger y Parker, 1989; Hammitt y cols., 1989; Berger y cols., 1996; Stahlberg y cols., 2000), ovino (Choudhry y cols., 1995) y caprino (Berger y cols., 1994). Este tipo de prueba se basa en la inseminación de una hembra con una dosis seminal heterospermica, resultado de la suma de un mismo número de espermatozoides de dos o más reproductores. De esta manera, situamos a los espermatozoides en un sistema de competición donde sólo un espermatozoide, presumiblemente el procedente del eyaculado más fértil, fecundará el ovocito (Berger, 1995). Aun cuando el test heterospermico requiere la inseminación de un número menor de reproductoras y en consecuencia menores costes de mantenimiento para obtener niveles de precisión similares, éste necesita de un tiempo de estudio equiparable al de los tests homospermicos y en consecuencia sólo puede ser aplicado a un número reducido de verracos (Saacke, 1984).

Estimación de la fertilidad *in vivo* mediante pruebas *in vitro*

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

El hecho de que se hayan desarrollado innumerables técnicas de análisis del semen indica que hasta el momento no se ha llegado a alcanzar una técnica con una precisión sa-

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

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

Durante mucho tiempo se ha realizado un análisis rutinario del semen como la única herramienta para valorar los eyaculados (Chan y cols., 1985). En este examen rutinario se incluye la valoración del número de células presentes en el eyaculado, el estudio de la motilidad y su morfología. Se caracteriza por la utilización de una serie de técnicas de simple ejecución y con un coste relativamente bajo, que ha permitido su amplia difusión en los centros de inseminación artificial. Por contra, presenta unas tasas de correlación con la fertilidad generalmente bajas (McClure y Tom, 1991).

En cuanto a los parámetros de volumen y concentración espermática hemos de considerar que la presencia de eyaculados de verracos con un bajo volumen y una escasa concentración está asociada a una baja fertilidad, hecho que puede derivarse de un defecto en la espermatogénesis o de una sobreutilización del macho (Larsson, 1986; Martínez y cols., 1992). Hemos de tener en cuenta que la frecuencia de eyacuación tiene un efecto significativo tanto en la concentración como en el volumen del eyaculado, así como en otros parámetros de calidad seminal (Colenbrander y Kemp, 1990).

La motilidad es un buen indicador del metabolismo celular y de la funcionalidad de la membrana espermática, sin embargo la relación con la fertilidad no es estrecha (Woerliders, 1991). Se han desarrollado los sistemas de análisis computerizado de la motilidad (CASA) que han permitido estudiar los parámetros del movimiento espermático (velocidad, movimiento lateral, etc.) (Holt y cols., 1997). La relación entre la motilidad y la fertilidad está sumida en una continua controversia (Pursel y cols., 1984; Strezek y Skaweta, 1984; Aalbers y cols., 1985; Martínez y cols., 1986; Berger y Horton, 1988; Galli y Bosisio, 1988; Berger y Parker, 1989; Gerfen y cols., 1994; Waberski y cols., 1994). Una posible causa de la discrepancia en los resultados se basa en que los estudios se realizan en condiciones experimentales con diferentes métodos de valoración de la motilidad, diferentes tratamientos de conservación del semen (fresco, diluido y congelado) y con diferencias en el número de espermatozoides en las dosis con las que se inseminan las reproductoras. Estas mismas diferencias en los resultados han sido obtenidas en el ganado vacuno donde la relación entre la motilidad y la fertilidad varía en los diferentes estudios entre un valor de r próximo a 0 hasta valores de 0,6 (Graham y cols., 1980).

En la especie porcina, la relación entre en el número de morfoanomalías y los resultados reproductivos ha sido estudiada en varios ensayos, encontrando una relación inversa

entre el aumento del número de formas anormales y la fertilidad (Larsson, 1985; Martínez y cols., 1986; Galli y Bosisio, 1988; Waberski y cols., 1990; Zeuner, 1992; Waberski y cols., 1994; Gadea y cols., 1998).

El análisis clásico de la motilidad, de las morfoanomalías, del estado del acrosoma y las pruebas que valoran la funcionalidad espermática permite predecir los eyaculados que dan lugar a una fertilidad muy reducida, sin embargo no son capaces de discriminar entre eyaculados de fertilidad moderada de aquellos que dan lugar a una fertilidad elevada (Gadea y cols., 1998).

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

Análisis de la interacción ovocito-espermatozoide. Sistemas de fecundación *in vitro*

Sólo los métodos que incluyen el estudio de la interacción con ovocitos vivos pueden proporcionar una información inequívoca de la capacidad fecundante de los espermatozoides (Bavister, 1990). Entre ellos podemos diferenciar los ensayos que miden la unión de los espermatozoides a la zona pelúcida, los tests heterospérmicos y los ensayos basados en la fecundación *in vitro*.

Tests de unión a zona pelúcida

El reconocimiento bioquímico y la unión entre las membranas espermáticas y los receptores de la zona pelúcida son pasos necesarios previos a la penetración del ovocito (Yanagimachi, 1981), de manera que el estudio de los procesos de unión puede explicar una fase muy importante del proceso de fecundación. Para ello se exponen las zonas pelúcidas a espermatozoides capacitados y se evalúa el número de espermatozoides totales fijados a la zona (valor absoluto).

En porcino, Berger y cols. (1989) optimizan las condiciones del ensayo y detectan variaciones en el número de espermatozoides unidos a la zona entre distintos verracos y entre eyaculados de un mismo verraco. Del mismo modo, Ivanova y Mollova (1993) encuentran diferencias significativas en el número de espermatozoides unidos a la zona entre grupos de verracos fértiles y subfértiles. Lynham y Harrison (1998) desarrollan un sistema con ovocitos conservados que facilita en gran medida el test de unión a la zona.

El test de hemizona es una variante del test de unión a la zona y del mismo modo que éste fue desarrollado como una herramienta diagnóstica de la capacidad fecundante de los espermatozoides en la especie humana (Burkman y cols., 1988). En esta técnica se obtienen dos hemizonas por microsección del ovocito lo que permite disponer de dos superficies con una funcionalidad equivalente a la zona pelúcida intacta, una será utilizada por el control y otra por la muestra problema, de manera que el resultado es un índice (valor relativo). Esta metodología ha sido utilizada con espermatozoides de la especie humana (Coddington y cols., 1990), de caballo (Fazeli y cols., 1993), vacuno (Fazeli y cols., 1997;

Zhang y cols., 1998), perro (Ström Holst y cols., 2000), ovino (Pérez Pe y cols., 2000) y de verraco (Fazeli y cols., 1995). Tanto Coddington y cols. (1991) en la especie humana, como Fazeli y cols. (1993) en el caballo y Fazeli y cols. (1997) en el vacuno, describen cómo el número de espermatozoides unidos a la zona es superior en los individuos fértiles que en los subfértiles.

Test de fecundación *in vitro* heteroespecíficos. Test de penetración de ovocitos de hámster libres de zona pelúcida (SPA)

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

En la especie porcina, Imai y cols. (1977) describen por primera vez la penetración de ovocitos de hámster con espermatozoides de verraco; posteriormente Clarke y Johnson (1987) analizan la relación con la calidad seminal, pero son los trabajos de Berger los que establecen las condiciones óptimas para la realización del test (Berger y Horton, 1988) y demuestran una buena correlación con la fertilidad *in vivo* medida con un test heterospermico, que alcanzan valores de $r = 0,89$ ($p < 0,003$) para el número de ovocitos penetrados y $r = 0,78$ ($p < 0,03$) para el número de espermatozoides por ovocito penetrado (Berger y Parker, 1989). Por otra parte, Hammitt y cols. (1989), utilizando semen congelado en un ensayo heterospermico, encuentran una correlación significativa entre el índice de fertilidad, el número de espermatozoides unidos a la zona ($r = 0,64$) y el porcentaje de ovocitos penetrados ($r = 0,75$), aunque no encuentran relación con el número de espermatozoides por ovocito.

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

Test de fecundación *in vitro* homoespecíficos

La utilización de ovocitos y espermatozoides homoespecíficos en un sistema artificial permite analizar con gran detalle todas las fases del proceso de fecundación, que obviamente no pueden ser explorados por las técnicas antes descritas. Por ello, se ha sugerido que sería un método más adecuado para poder predecir la capacidad fecundante de los espermatozoides (Howard y cols., 1991).

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

Para llevar a cabo el proceso de fecundación *in vitro* se han utilizado ovocitos de diferentes procedencias: ovocitos madurados *in vivo* y obtenidos por laparotomía (Coy y cols., 1993a y 1993b); ovocitos madurados *in vitro* (Coy y cols., 1999) y ovocitos inmaduros (Martínez y cols., 1993; Matas y cols., 1996).

Los sistemas de fecundación *in vitro* han ido mejorando en los últimos años mediante el estudio de los factores que pueden influir en los resultados finales, como son la fracción del eyaculado utilizada (Xu y cols., 1996), el número de espermatozoides utilizados (Foxcroft y cols., 1995), las características del semen utilizado (Gadea y Matás, 2000), la presencia de células del *cumulus* (Matás y cols., 1996, Campos y cols., en prensa), el tiempo de cocultivo (Coy y cols., 1993b; Martínez y cols., 1996) o el tamaño de los ovocitos utilizados (Matás y cols., 1996).

La posibilidad de utilizar ovocitos inmaduros permite reducir los costes y el tiempo necesario para llevar a cabo los estudios de fecundación *in vitro*. Mattioli y cols. (1990) demuestran por primera vez que los ovocitos inmaduros pueden ser penetrados aunque el espermatozoide que ha penetrado en el ovocito inmaduro es incapaz de descondensar su material nuclear, como consecuencia de la inmadurez del citoplasma del ovocito. Esta posibilidad permite plantear el test de penetración de ovocitos inmaduros como una vía para testar la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos (Martínez y cols., 1993; Matas y cols., 1996; Gadea y cols., 1998).

En el ganado vacuno se han descrito diferencias en las tasas de penetración asociadas a diferencias individuales (Iritani y cols., 1978), lo que ha permitido analizar la correlación entre las tasas de fecundación *in vitro* e *in vivo* con unos resultados muy interesantes (Marquant-Le Guienne y cols., 1990; Shamsuddin y Larson, 1993; Zhang y cols., 1997).

En el ganado porcino se ha estudiado la influencia individual sobre los resultados de fecundación en distintos trabajos; así Berger y Parker (1989), utilizando el test de penetración de ovocitos de hámster libres de zona pelúcida (SPA) y el test heterospérmico, detectan diferencias individuales, así como Nagai y cols. (1988) utilizando semen congelado. Por otra parte Martínez y cols., (1993) verifican el efecto del verraco en un sistema basado en la utilización de ovocitos inmaduros. En sistemas de fecundación de ovocitos madurados *in vitro* se describen diferencias entre verracos tanto en las tasas de penetración (Wang y cols., 1995; Xu y cols., 1996; Long y cols., 1999) como en las tasas de polispermia (Foxcroft y cols., 1995). Del mismo modo se han descrito diferencias entre las fracciones del eyaculado de un mismo verraco (Xu y cols., 1996).

La correlación entre la fertilidad y los resultados de estos tests ha sido estudiada en un número reducido de trabajos. Así, Flowers (1997) y Xu y cols. (1998) proponen sistemas de ovocitos madurados *in vitro* como medio para predecir la capacidad fecundante. Xu y cols. (1998) obtienen una buena correlación entre la prolificidad y la tasa de formación potencial de embriones (ovocitos penetrados por un solo espermatozoide y con for-

mación del pronúcleo masculino). Sin embargo, no encuentran una relación significativa con la fertilidad. Por otra parte, utilizando sistemas con ovocitos inmaduros se ha obtenido una alta correlación entre la tasa de penetración y el número de espermatozoides con la fertilidad (tasa de partos) y con el tamaño de la camada (Gadea y cols., 1998; Martínez y cols., 1998). También se ha detectado una correlación elevada (Gadea y cols., en prensa) entre la tasa de penetración de ovocitos en un sistema con ovocitos madurados *in vitro* y la fertilidad obtenida tras la inseminación artificial con semen congelado-descongelado. Estos resultados preliminares sugieren que las técnicas FIV pueden ser muy eficaces para la evaluación, con una alta precisión, de nuevos procesos de congelación, de un lote de semen congelado antes de ser exportado, etc...

En cuanto a los verdaderos tests de fecundación, éstos miden la capacidad de producir embriones viables en un sistema de fecundación *in vitro* (Larsson y Rodríguez Martínez, 2000). Estos sistemas necesitan de una fase de maduración de ovocitos *in vitro*, una fase de fecundación *in vitro* y una fase de cultivo de los embriones. En el bovino se ha encontrado una correlación positiva entre la tasa de división de los embriones y el porcentaje de formación de blastocistos con la fertilidad *in vivo* medida como la tasa de no retorno al estro tras la inseminación artificial (Zhang y cols., 1997). En el porcino, hasta el momento no tenemos referencias de que haya trabajos que verifiquen estas relaciones por la dificultad que se ha encontrado para producir embriones porcinos *in vitro* (Day, 2000).

Uno de los puntos clave de una técnica de predicción es su repetibilidad. Ésta puede ser un punto limitante de los sistemas de fecundación *in vitro* debido al gran número de factores que intervienen. Sin embargo, los datos hasta ahora conocidos muestran unos valores aceptables para estas pruebas biológicas (Martínez y cols., 1999). Otro punto en contra es la complejidad y coste del mismo, lo que hace que esta técnica sólo pueda ser utilizada en centros especializados que sirven de laboratorio de referencia.

En cualquier caso la predicción de la capacidad fecundante de un eyaculado es una tarea compleja (Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000), que hasta el momento no ha sido resuelta con satisfacción por los métodos de análisis clásicos. Pero ante esta situación se abre una nueva expectativa con el uso de los sistemas de fecundación *in vitro* porcina que permitirá evaluar un gran número de fases del proceso de fecundación que no pueden ser evaluados por el espermograma clásico.

SUMMARY

Evaluation of the fertilizing capability of boar spermatozoa through use of *in vitro* fertilization techniques (Review)

The objective of this paper is to review different methodologies for evaluating the boar sperm fertilizing capacity, with a special interest on the use of *in vitro* fertilization systems. The classical laboratory methods are not efficient enough for predicting the fertility, but the use of combined test can provide good information for evaluating sperm quality. Several methods have been designed to test different aspects of semen quality. The tests that evaluate the relation sperm-oocyte are the most informative method for assessing sperm fertilizing ability *in vitro*.

KEY WORDS: Spermatozoa
Fertility
Boar
In vitro fertilization
Semen-analysis

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALBERS J.G., JOHNSON L.A., AALBERTS-SMIT E.A., RADEMAKER J.H.M., 1985. ATP content of fresh and frozen-thawed boar semen and its relationship to sperm concentration and fertility. En: Deep Freezing of Boar Semen. Johnson, L.A., Larsson, K., ed. Swedish Univ. Agric. Sci., Uppsala. pp. 259-264.
- AMANN R.P., 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.* 10, 89-98.
- ANDREWS J.C., HOWARD J.G., BAVISTER B.D., WILDT D.E., 1992. Sperm capacitation in the domestic cat (*Felis catus*) and leopard cat (*Felis bengalensis*) as studied with a salt-stored zona pellucida penetration assay. *Mol. Reprod. Devel.* 31, 200-207.
- BALLACHEY B.E., EVENSON D.P., SAACKE R.G., 1988. The sperm chromatin structure assay: Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *J. Androl.* 9:109-115.
- BARBONI B., 1994. Methods for the assessment of capacitation. *Zygote* 2, 367-369.
- BAVISTER B.D., 1990. Test of sperm fertilizing ability. En: *Gamete Physiology*. Asch, R.H., Balmaceda J.P., Johnston, I., ed. . Norwell, Massachusetts: Sero Symposia, USA. pp 77-105.
- BEATTY R.A., 1957. A pilot experiment with heterospermic insemination in the rabbit. *J. Genet.* 55, 325-347.
- BEATTY R.A., 1960. Fertility of mixed semen from different rabbits. *J. Reprod. Fertil.* 1, 52-60.
- BEATTY R.A., BENNETT G.H., HALL J.G., HANCOCK J.L., STEWART D.L., 1969. An experiment with heterospermic insemination in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 19, 491-502.
- BERGER T., 1995. Proportion of males with lower fertility spermatozoa estimated from heterospermic insemination. *Theriogenology* 43, 769-775.
- BERGER T., 1996. Fertilization in ungulates. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 351-360.
- BERGER T., ANDERSON D.L., PENEDO M.C.T., 1996. Porcine sperm fertilizing potential in relationship to sperm functional capacities. *Anim. Reprod. Sci.* 44, 231-239.
- BERGER T., DAVIS A., WARSHIP N.J., HEDRICK J.L., 1989. Sperm binding to the porcine zona pellucida and inhibition of binding by solubilized components of the zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* 86, 559-565.
- BERGER T., DROBNIS E.Z., FOLEY L., METZLER J.K., HORTON M., 1994. Evaluation of relative fertility of cryopreserved goat sperm. *Theriogenology* 41, 711-717.
- BERGER T., HORTON M.B., 1988. Evaluation of assay conditions for the zona free hamster ova bioassay of boar sperm fertility. *Gamete Res.* 19, 101-111.
- BERGER T., PARKER K., 1989. Modification of the zona free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlation with in vivo fertility. *Gamete Res.* 22, 385-397.
- BRACKETT B.G., COFONE M.A., BOICE M.L., BOUSQUET D., 1982. Use of zona-free hamster ova to assess fertilizing ability of bull and stallion. *Gamete Res.* 5, 217-227.
- BURKMANN L.J., KRUGER T.F., CODDINGTON C.C., ROSENWAKS Z, FRANKEN D.R., HODGEN G.D., 1988. The hemizona assay (HZA). development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertil. Steril.* 49, 688-697.
- BWANGA C.O., 1991. Cryopreservation of boar semen. *Acta vet. scand.* 32, 431-453.
- CAMPOS I., COY P., ROMAR R., RUIZ S., GADEA J. Effect of maturational stage, coincubation and cumulus cells on in vitro penetrability of porcine oocytes. *Theriogenology*. (En prensa.)
- CIERESZKO A., GLOGOWSKI J., DEMIANOWICZ W., STRZEZEK J., 1994. Stimulation of aspartate aminotransferase from farm animal semen by pyridoxal 5' phosphate. *Anim. Reprod. Sci.* 34, 327-341.
- CLARK L.K., SCHINCKEL A.P., SINGLETON W.L., EINSTEIN M.E., TECLAW R.F., 1989. Use of farrowing rate as a measure of fertility of boars. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 194, 239-243.
- CLARKE R.N., JOHNSON L.A., 1987. Effect of liquid storage and cryopreservation of boar spermatozoa on acrosomal integrity and the penetration of zona free hamster ova in vitro. *Gamete Res.* 16, 193-204.
- CODDE J.M., BERGER T., 1995. In vivo fertility of rams in relation to sperm zona pellucida binding and sperm zona pellucida penetration of ovine oocytes. *Theriogenology.* 44, 901-906.
- CODDINGTON C.C., JOHNSON D., FULGHAM D.L., HERR J.C., ALEXANDER N.J., HODGEN, G., 1990. Sperm bound to zona pellucida in hemizona assay demonstrate acrosome reaction when stained with T-6 antibody. *Fertil. Steril.* 54, 504-508.
- COLENBRANDER B., FEITDMAN H., GROOTEN H.J., 1993. Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 48, 207-215.
- COLENBRANDER B., KEMP B., 1990. Factors influencing semen quality in pigs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 40, 105-115.
- COY P., MARTÍNEZ E., RUIZ S., VÁZQUEZ J.M., ROCA J., GADEA J., 1993a. Environment and medium volume influence in vitro fertilisation of pig oocytes. *Zygote.* 1, 209-13.
- COY P., MARTÍNEZ E., RUIZ S., VÁZQUEZ J.M., ROCA J., MATAS, C., 1993b. Sperm concentration influences fertilization and male pronuclear formation in vitro in pigs. *Theriogenology* 40, 539-546.

- COY P., RUIZ S., ROMAR R., CAMPOS I., GADEA J., 1999. Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems. *Theriogenology* 51, 799-812.
- 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.
- CHOUDHRY T.M., BERGER T., DALLY M., 1995. In vitro fertility evaluation of cryopreserved ram semen and its correlation with relative in vivo fertility. *Theriogenology* 43, 1195-1200.
- DAY B.N., 2000. Reproductive biotechnologies: current status in porcine reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 161-72.
- DES DAAS, N., 1992. Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim. Reprod. Sci.* 28, 87-94.
- EVENSON D.P., DARZINKIEWICZ Z., MELAMED M.R., 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 240, 1131-1134.
- EVENSON D.P., THOMPSON L., JOST L., 1994. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* 41, 637-651.
- FAZELI A. R., ZHANG B. R., STEENWEG W., LARSSON B., BEYERS M. M., VAN DEN BROEK J., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H., COLENBRANDER B., 1997. Relationship between sperm-zona pellucida binding assays and the 56-day nonreturn rate of cattle inseminated with frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 48, 853-863.
- FAZELI A.R., HOLT C., STEENWEG W., BEVERS M.M., HOLT W.V., COLENBRANDER B., 1995. Development of a sperm hemizona binding assay for boar semen. *Theriogenology* 43, 17-27.
- FAZELI A.R., STEENWEG W., BEVERS M.M., BRACHER V., PARLECLIET J., COLENBRANDER B., 1993. Use of sperm binding to homologous hemizona pellucida to predict stallion fertility. *Equine Vet. J. Suppl.* 15, 57-59.
- FEARON J.M., WEGENER P.T., 2000. Relationship between fertility in cattle and the number of inseminated spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 119, 293-308.
- FLOWERS W.L., 1997. Management of boars for efficient semen production. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 52, 67-78.
- FOOTE R.H., 1988. Preservation and fertility prediction of spermatozoa. 11th Int. Congr. Anim. Reprod. 5, 127-134.
- FOXCROFT G.R., XU X., SETH P.C., HARBISON D.S., CHEUNG A.P., 1995. Semen dilution for assessment of boar ejaculate quality in pig IVM and IVF systems. *Theriogenology* 53, 212 abstr.
- GADEA J., MATÁS C., 2000. Sperm factors related to in vitro penetration of porcine oocytes. *Theriogenology* 54, 1343-1357.
- GADEA J., MATÁS C., LUCAS, X., 1998. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. *Anim. Reprod. Sci.* 54, 95-108.
- GADEA J., RUIZ S., SELLÉS E., ROMAR R., MATÁS C., COY P., POTO A., PEINADO B. El uso de la fecundación in vitro para la evaluación de los sistemas de congelación de semen porcino. ITEA (en prensa)
- GALLI A., Basetti M., BALDUZZI D., MARTIGNONI M., BORNAGHI, MAFFII M., 1991. Frozen bovine semen quality and bovine cervical mucus penetration test. *Theriogenology* 35, 837-844.
- GALLI A., BOSISIO M., 1988. Quality of semen stored at +15/16 °C is related to fertility of artificially inseminated swine. *Theriogenology* 30, 1185-1190.
- GARNER D.L., DOBRINSKY J.R., WELCH G.R., JOHNSON L.A., 1996. Porcine sperm viability, oocyte fertilization and embryo development after staining spermatozoa with SYBR-14. *Theriogenology* 45, 1103-1113.
- GARNER D.L., JOHNSON L.A., 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol. Reprod.* 53, 276-284.
- GERFEN R.W., WHITE B.R., COTTA M.A., WHEELER M.B., 1994. Comparison of the semen characteristics of Fengjing, Meishan and Yorkshire boars. *Theriogenology* 41, 461-469.
- GRABNER R., ELZE K., MOLZAHN E., 1986. Studies into effects of season and average outdoor temperature on productivity and sperm quality of insemination boars. *Mh. Vet. Med.* 41, 737-741.
- GRAHAM E.F., PACE M.M., 1967. Some biochemical changes in spermatozoa due to freezing. *Cryobiology* 4, 75-84.
- GRAHAM E.F., SCHMEHL M.K.L., NELSON D.S., 1980. Problems with laboratory assays. 8th NAAB Tech. Conf. A.I. Reprod. 1-8.
- 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.
- HAMMERSTEDT R.H., 1996. Evaluation of sperm quality: Identification of the subfertile male and courses of action. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 77-87.

- HAMMITT D.G., MARTIN P.A., CALLANAN T., 1989. Correlations between heterospermic fertility and assays of porcine seminal quality before and after cryopreservation. *Theriogenology* 32, 385-399.
- HANADA A., CHANG M.C., 1976. Penetration of hamster and rabbit zona-free eggs by rat and mouse spermatozoa with special reference to sperm capacitation. *J. Reprod. Fertil.* 46, 239-241.
- HANADA A., CHANG M.C., 1978. Penetration of zona-free or intact eggs by foreign spermatozoa and the fertilization of deer mouse eggs in vitro. *J. Exp. Zool.* 203, 277-285.
- HARRISON R.A.P., 1996. Capacitation mechanisms and role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 8, 581-594.
- HARRISON R.A.P., VICKERS S.E., 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 88, 343-352.
- HOLT C., HOLT W.V., MOORE H.D.M., REED H.C.B., CURNOCK R.M., 1997. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on farm inseminations: Results of two fertility trials. *J. Andrology* 18, 312-323.
- HOWARD J., BUSH M., WILDT D.E., 1991. Teratospermia in domestic cats compromises penetration of zona free hamster ova and cat zonae pellucidae. *J. Androl.* 12, 36-45.
- HURTGEN J.P., 1986. Mating systems and boar management. En: *Current therapy in theriogenology*. ed. Morrow, D.A. pp. 978-980.
- IMAI H., NIWA K., IRITANI A., 1977. Penetration in vitro of zona free hamster eggs by ejaculated boar spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 51, 495-497.
- IMAI H., NIWA K., IRITANI A., 1980. Ultrastructural observations of boar spermatozoa penetrating zona-free hamster eggs. *Biol. Reprod.* 23, 481-486.
- IRITANI A., NIWA K., IMAI H., 1978. Sperm penetration in vivo of follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.* 54, 379-383.
- IVANOVA M., MOLLOVA M., 1993. Zona-penetration in vitro test for evaluating boar sperm fertility. *Theriogenology* 40, 397-410.
- JEYENDRAN R.S., VAN DER VEN H.H., PÉREZ-PELAEZ M., CRABO B.G., ZANEVELD L.J.D., 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.* 70, 219-228.
- JEYENDRAN R.S., VAN DER VEN H.H., ROSECRNAS R., PÉREZ-PELAEZ M., AL-HASANI S., ZANEVELD L.J.D. 1989. Chemical constituents of human seminal plasma: Relationship to fertility. *Andrologia* 21, 423-428.
- JOHNSON LA, 1985. Fertility results using frozen boar spermatozoa: 1970 to 1985. En: *Deep Freezing of Boar Semen*. Eds.: Johnson, L.A. y Larsson, K. Swedish Univ. Agric. Sci., Uppsala. pp. 199-224.
- JOHNSON LA, WEITZE KF, FISER P, MAXWELL WMC., 2000. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 143-172.
- LARSSON B., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H., 2000. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 327-336.
- LARSSON K., 1985. Boar sperm viability after freezing and thawing. En: *Deep Freezing of Boar Semen*. Eds.: Johnson, L.A. y Larsson, K. Swedish Univ. Agric. Sci., Uppsala. pp. 177-188.
- LARSSON K., 1986. Evaluation of boar semen. En: *Current therapy in theriogenology*. Eds.: Morrow, D.A. pp. 972-975.
- LONG C.R., DOBRINSKY J.R., JOHNSON L.A., 1999. In vitro production of pig embryos: comparisons of culture media and boar. *Theriogenology* 51, 1375-1390.
- LYNHAM J.A., HARRISON R.A.P., 1998. Use of stored pig eggs to assess boar fertilizing functions in vitro. *Biol. Reprod.* 58, 539-550.
- MARQUANT-LE GUIENNE B., HUMBLLOT P., THIBIER M., THIBAUT C., 1990. Evaluation of bull semen fertility by homologous in vitro fertilization test. *Reprod. Nutr. Dev.* 30, 259-266.
- MARTÍNEZ E.A., ROCA J., VÁZQUEZ J.M., LUCAS X., GIL M.A., PARRILLA, I., 1999. Reproducibility of homologous in vitro penetration assay for assessment of fertilizing ability of boar semen. IV Int. Conf. Boar Semen Preservation, Beltsville, Maryland. USA. P-8.
- MARTÍNEZ E.A., RUIZ S., ROCA J., VÁZQUEZ J.M., COY P. 1992. Nuevas técnicas en contrastación seminal porcina. *Med. Vet.* 9, 71-83.
- MARTÍNEZ E.A., RUIZ S., SEBASTIÁN J., SÁNCHEZ R., GARCÍA C., MARTIN S., 1986. Factores que afectan a la inseminación artificial porcina. *An. Vet. (Murcia)* 2, 115-120.
- MARTÍNEZ E.A., VÁZQUEZ J.M., MATAS C., GADEA J., ALONSO I., ROCA J., 1996. Oocyte penetration by fresh or stored diluted boar spermatozoa before and after in vitro capacitation treatments. *Biol. Reprod.* 55, 134-140.

- MARTÍNEZ E.A., VÁZQUEZ J.M., MATAS C., ROCA J., GADEA J., COY, P., 1993. Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Theriogenology* 40, 547-557.
- MARTÍNEZ E.A., VÁZQUEZ J.M., ROCA J., BLANCO O., LUCAS X., MATAS, C., GIL M.A., 1998. Relationship between homologous in vitro penetration assay and boar semen fertility. *Theriogenology* 49, 371 abst.
- MATAS C., MARTÍNEZ E., VÁZQUEZ J.M., ROCA J., GADEA J., 1996. In vitro penetration assay of boar sperm fertility: effect of various factors on the penetrability of immature pig oocytes. *Theriogenology* 46, 503-513.
- MATTIOLI M., GALEATI G., SEREN E., 1990. Use of stored zonae pellucidae for the assessment of the fertilizing capacity of boar sperm. 11th IPVS Congr., Lausanne 48. Abstract.
- McCLURE R.D., TOM R. 1991. Human sperm hypo-osmotic swelling test: Relationship to sperm fertilizing ability. *Int. J. Fertil.* 36, 360-366.
- OBONYO M., LOSETH K.J., CRABO B.G., 1992. Relation between the fertility of frozen boar semen and semen quality measured as sperm motility and with glass wool/Sephadex filters. 12th Int. Congr. Anim. Reprod. 505-507.
- PÉREZ-PE R., STROM HOLST B., MUIÑO-BLANCO T., SÖDERSQUIST L., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H., 2000. Development of a sperm zona pellucida binding assay for ram semen: Preliminary results. 14th Int. Congr. Anim. Reprod. Estocolmo (Suecia). P 2:14.
- PHILPOTT M., 1993. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Br. vet. J.* 149, 339-369.
- PURSEL V.G., REXROAD C.E., WALL R.J., 1984. Relationship of competitive fertility to quality of boar semen. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. 2, 63-65.
- ROGERS B.J., 1985. The sperm penetration assay: its usefulness re-evaluated. *Fertil. Steril.* 43, 821-840.
- SAACKE R.G., 1984. Semen quality: Importance of and influencing factors. 10th Tech. Conf. A.I. Reprod. pp 30-36.
- SAACKE R.G., NADIR S., NEBEL R.L., 1994. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization and embryo quality in ruminants. *Theriogenology* 41, 45-50.
- SAACKE R.G., NEBEL R.L., KARABINUS D.S., BAME J.H., MULLINS J., 1988. Sperm transport and accessory sperm evaluation. 12th Tech. Conf. A.I. Reprod. pp. 7-14.
- 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». *Porci* n.º 24. 57-76.
- SALISBURY G.W., VANDEMARK N.L., 1961. *Physiology of reproduction and artificial insemination in cattle*. Ed: Freeman, W.H. San Francisco. 361.
- SCHWARTZ D., MCDONALD P.D.M., HEUCHTEL V., 1981. On the relationship between the number of spermatozoa and the probability of conception. *Reprod. Nutr. Devel.* 21, 979-988.
- SHAMUSDIN M., LARSSON B., 1993. In vitro development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors. *Reprod. Dom. Anim.* 28, 77-84.
- STAHLBERG R, HARLIZIUS B, WEITZE KF, WABERSKI D., 2000. Identification of embryo paternity using polymorphic DNA markers to assess fertilizing capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in boars. *Theriogenology.* 53, 1365-1373.
- STAUSS C.R., VOTTA T.J., SUÁREZ S.S., 1995. Sperm motility hiperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol. Reprod.* 53, 1280-1285.
- STROM HOLST B, LARSSON B, LINDE-FORSBERG C, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H., 2000. Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 119, 77-83.
- STRZEZEK J., SKAWETA R., 1984. Application of chosen biochemical indexes for biological quality of boar semen stored at 15-18 C. 10th Int. Congr. Anim. Reprod., Urbana, IL 2, 67-69.
- VAN DUIJN, C., 1964. Relationship between spermatozoan numbers and fertility. *Int. J. Fert.* 9, 609-612.
- VÁZQUEZ J.M., MARTÍNEZ E.A., MARTÍNEZ P., ROCA J., 1997. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa and its relation to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology* 47, 913-922.
- WABERSKI D., DIRKSEN G., WEITZE K.F., LEIDING C., HANG R., 1990. Effect of sperm motility and morphology on the fertility of AI boars in a field trial. *Tierärztl. Prax.* 18, 591-594.
- WABERSKI D., MEDING S., DIRKSEN G., WEITZE K.F., LEIDING C., HAHN R., 1994. Fertility of long-term-stored boar semen: Influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen, *Anim. Reprod. Sci.* 36, 145-151.

- WANG W.H., ABEYDEERA L.R., FRASER L.R., NIWA, K., 1995. Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J. Reprod. Fert.* 104, 305-313.
- WILHELM K.M., GRAHAM J.K., SQUIRES E.L., 1996. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. *Theriogenology* 46, 559-578.
- WOELDERS H., 1991. Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. En: *Boar semen preservation II*. Ed. Johnson L.A., Rath, D. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg. pp. 145-164.
- 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.
- XU X., POMMIER S., ARBOV T., HUTCHINGS B., SOTTO W., FOXCROFT G.R., 1998. In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. *J. Anim. Sci.* 76, 3079-89.
- YANAGIMACHI R., 1981. Mechanisms of fertilization in mammals. En: *Fertilization and embryonic development in vitro*. Ed.: Mastroianni, L., Biggers, J.D. Plenum Press, New York. pp 81-182.
- YANAGIMACHI R., 1984. Zona free hamster eggs: their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gamete Res.* 10, 187-232.
- YANAGIMACHI R., YANAGIMACHI H., ROGERS B.J., 1976. The use of zona free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 15, 471-476.
- YANAGIMACHI R., 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 2, 371-372.
- ZEUNER A., 1992. On the relations between sperm morphology and the fertility of boar semen. 12th Int. Congr. Anim. Reprod., The Hague, The Netherlands. 3, 1617-1619.
- ZHANG B.R., LARSSON B., LUNDEHEIM N., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H., 1997. Relationship between embryo development in vitro and 56-day nonreturn rates of cows inseminated with frozen-thawed semen from dairy bulls. *Theriogenology* 48, 221-231.
- ZHANG B.R., LARSSON B., LUNDEHEIM N., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H., 1998. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. *Int J Androl.* 21, 207-16.