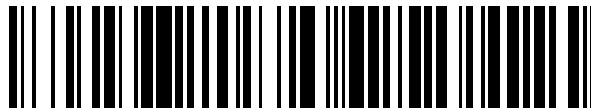


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 624**

51 Int. Cl.:

**G01N 15/10** (2006.01)

**G01N 15/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2000 E 00909058 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.01.2016 EP 1161671**

54 Título: **Determinación de la concentración y de la viabilidad del esperma para inseminación artificial**

30 Prioridad:

**05.03.1999 DK 31799**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**03.05.2016**

73 Titular/es:

**VIKING GENETICS F.M.B.A. (100.0%)  
Ebeltoftvej 16  
8960 Randers SØ, DK**

72 Inventor/es:

**CHRISTENSEN, PREBEN y  
STENVANG, JENS PETER**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 568 624 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Determinación de la concentración y de la viabilidad del esperma para inseminación artificial

5 **Campo técnico**

La divulgación se refiere a la determinación simultánea de la concentración de esperma y espermatozoides vivos en una muestra de semen.

10 **Antecedentes de la divulgación**

La determinación exacta y precisa de la concentración de esperma viable es un tema importante para la industria de la Inseminación Artificial (IA), ya que proporciona a los individuos de género masculino y a los clientes la seguridad de que las dosis de inseminación contienen los recuentos de esperma indicados. Esto es especialmente importante con respecto a la exportación de semen de especies de animales domesticados (Foote, 1972; Fenton *et al.*, 1990; Woelders 1990; Evenson *et al.*, 1993; Donoghue *et al.*, 1996).

En la técnica se sabe como usar cámaras de recuento, tales como Makler™ (Sefi Medical, Haifa, Israel) o hemocitómetros para recuentos de esperma de rutina. Sin embargo, para conseguir una precisión y exactitud aceptables se requieren múltiples medidas. Este procedimiento requiere mucho tiempo y hace que el uso de las cámaras de recuento sea lento. Los recuentos individuales con hemocitómetro no son muy precisos debido a errores inherentes en la técnica, tales como la obtención de una submuestra representativa de la muestra de semen, etc., y además, el proceso es altamente dependiente de las habilidades del operador.

Una técnica ampliamente usada por la industria de la inseminación artificial para determinar la concentración de espermatozoides se basa en la medida espectrofotométrica de la turbidez (Woelders 1990; Evenson *et al.*, 1993). Sin embargo, este método requiere una calibración del espectrofotómetro que se repite a intervalos regulares ya que el rendimiento del instrumento variará con el tiempo, por lo que este método solamente es tan preciso como el método de calibración. La calibración se basa con mayor frecuencia en una de las cámaras de recuento mencionadas anteriormente, por lo que el método de espectrofotómetro es solamente tan preciso como los métodos de cámara de recuento mencionados anteriormente.

Una desventaja adicional del método de espectrofotómetro es que los residuos, tales como partículas de gel en semen de porcino, aumentan la turbidez del semen mediante lo que se introducen errores en el método ya que la distinción de los residuos del semen es muy difícil (Woelders 1990) y el método solamente se usa ampliamente debido a la rapidez del método y al hecho de que ningún otro método funciona de una manera satisfactoria para estas especies.

El semen de especies sin partículas dejen grandes en el semen se puede analizar en contadores electrónicos en los que se hace recuento de las partículas tienen un tamaño de partícula específico (Parks *et al.*, 1985). Sin embargo, los contadores electrónicos no son capaces de distinguir células de semen a partir de los restos que tiene un tamaño de partícula que corresponde al tamaño de partícula de las células de semen. Dado que el semen de la mayoría de las especies contiene un gran número de partículas que tienen un tamaño que corresponde al tamaño de los espermatozoides (es decir, gotitas citoplasmáticas) los recuentos resultantes para eyaculados individuales pueden ser muy inexactos (Parks *et al.*, 1985).

La evaluación de la calidad del semen en centros de inseminación artificial, así como en laboratorios para semen humano y la evaluación de la calidad del semen para semen de animales de laboratorio normalmente se basa en una evaluación de la movilidad del esperma usando un microscopio de contraste de fases con una fase caliente (Woelders, 1990). Aunque este procedimiento es valioso para asegurar que el semen de muy baja calidad se excluye de la inseminación artificial, el método no tiene una precisión o exactitud elevadas. Además, el método depende en gran medida de la destreza del operador y se observan grandes variaciones en los resultados obtenidos por diferentes operadores.

En la técnica también se conoce como usar citómetros de flujo para una caracterización del esperma (Szollosi *et al.*, 1986; Takacs *et al.*, 1987; Evenson *et al.*, 1993). En los métodos desvelados, el esperma se ha matado y teñido con yoduro de propidio, PI, para medir la concentración de esperma. De ese modo, solamente se encuentra concentración de esperma. Una desventaja del método es que no se proporciona una indicación de la cantidad de espermatozoides vivos.

En otro método, solamente se tiñen con yoduro de propidio los espermatozoides muertos, tras lo cual se detecta la luz dispersada desde las partículas sin teñir (incluyendo esperma vivo). Este método se ha usado por Takizawa *et al.* (1994, 1995 y 1998) así como por Yamamoto *et al.* (1996). En este método, no hay discriminaciones entre espermatozoides vivos y residuos en el semen. De ese modo, partículas de gel, gotitas citoplasmáticas, residuos y bacterias se van a incluir probablemente en el recuento o espermático de acuerdo con este método, aumentando de ese modo el valor tanto de la concentración medida como de la viabilidad detectada.

En la técnica también se sabe cómo teñir espermatozoides usando un colorante fluorescente denominado SYBR-14 e

yoduro de propidio, PI, (Kit de Viabilidad del Esperma LIVE/DEAD®, Molecular Probes, Oregon, USA) y por medio de análisis de citometría de flujo para evaluar la viabilidad del esperma (Garner *et al.*, 1994; Garner *et al.*, 1995; Donoghue *et al.*, 1995; Garner *et al.*, 1996a; Garner *et al.*, 1996b; Garner *et al.*, 1997a; Garner *et al.*, 1997b; Garner *et al.*, 1997c; Maxwell *et al.*, 1997; Maxwell and Johnson, 1997; Penfold *et al.*, 1997; Songsasen *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1997; Vetter *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1998; Chalah y Brillard, 1998).

Sin embargo, una desventaja de este método es que el SYBR-14 es altamente tóxico para los espermatozoides y por lo tanto la cantidad de espermatozoides vivos en una muestra disminuirá raso durante un breve periodo de tiempo. Dado que un tiempo de tinción de 10 a 15 minutos sea usado de forma rutinaria en combinación con 100 nM de SYBR-14, los resultados van a ser probablemente imprecisos debido a la disminución de espermatozoides vivos con el tiempo (Christensen y Stenvang, datos sin publicar). Una desventaja adicional del método es que la incubación de las muestras para tinción se realiza al 36-37 °C, lo que es altamente inconveniente en el trabajo de rutina en laboratorios opuestos de inseminación artificial que evalúan la calidad del semen.

En la Patente de Estados Unidos n.º 4.559.309 se desvela un proceso para la caracterización de la movilidad y viabilidad del esperma. Una muestra de esperma se tiñe con Rodamina 123 y bromuro de etidio y las emisiones de fluorescencia del esperma se miden por medio de un citómetro de flujo. Midiendo las emisiones de fluorescencia a longitudes de onda de color verde y de color rojo, se obtiene una medida se correlaciona con la movilidad del esperma (recuentos de color verde) y de los espermatozoides muertos o supuestamente muertos (recuentos de color rojo), respectivamente. La tinción de una segunda muestra con naranja de acridina proporciona una medida del porcentaje de ADN monocatenario y bicatenario en los espermatozoides indicando de ese modo el esperma y las células somáticas maduras e inmaduras. Este proceso no proporciona una medida absoluta de la concentración de semen. Además, son necesarios los procedimientos de tinción diferentes para obtener una medida de la movilidad del esperma y de las células muertas o moribundas y una medida de los tipos de espermatozoides en la muestra.

Además, la tinción de mitocondrias con Rodamina 123 y ADN con PI implica que se tiene como objetivo dos compartimentos celulares diferentes. En el semen de toros normales normalmente se observan 'cabezas separadas' (que afecta a un  $5,3 \pm 0,4$  % del esperma; Barth y Oko, 1989) y la incidencia de este defecto puede ser mucho más elevado para toros individuales. Con esta condición, la parte media y la cola, conectadas, serán móviles y se teñirán con R123. La cabeza separada se teñirá con PI y posteriormente el porcentaje de espermatozoides viables o moribundos en la población de esperma se calculará de forma imprecisa.

Además, en la técnica se sabe cómo controlar la inyección de muestra a los contadores electrónicos o citómetro de flujo para obtener una medida de la concentración. Sin embargo, en estos métodos, el control de las inyecciones de nuestra se ve influido por diferencias entre instrumentos, y se necesita calibración a intervalos regulares. Un ejemplo de un instrumento de este tipo es el Sperm Cell Counter™ de Partec (Partec GmbH, Munster, Alemania) cuando el rendimiento es inaceptable para la evaluación de la concentración de esperma en semen de bovino (Dumont *et al.*, 1996).

Además, se sabe cómo usar una solución de perlas estandarizada para el recuento absoluto de la concentración de esperma; sin embargo, se encontró que el rendimiento de este método era inaceptable para la evaluación de la concentración de esperma (Dumont *et al.*, 1996).

Para todos los métodos mencionados anteriormente es común determinar solamente la proporción de espermatozoides vivos a la concentración de los espermatozoides muertos o eliminados. La lista inicial para obtener una determinación de la proporción de espermatozoides vivos y una determinación de la concentración del semen, se necesita una evaluación de la muestra de semen usando al menos dos métodos diferentes.

Además, un objetivo que existe desde hace mucho tiempo en la industria de inseminación artificial (IA) de ganado es la obtención de un método simple, preciso y exacto para el examen de semen de toro que se correlacione altamente con la fertilidad después de la IA. La evaluación de rutina de volumen del semen, concentración de esperma, la movilidad y movimiento ondulado en un individuo de género masculino de IA son valiosos para descartar el semen de baja calidad, pero parece de poco valor para predecir la fertilidad de los machos individuales (Christensen *et al.*, 1999). En los últimos años, el análisis de esperma asistido por ordenador (CASA; Budworth *et al.*, 1988) ha proporcionado una evaluación objetiva de la movilidad del esperma. Las desventajas de esta técnica tales como una precisión escasa, el sesgo debido a las configuraciones del programa y la migración esperma durante el análisis (Christensen y Stryhn, 1997) limitan el uso potencial.

## Resumen de la divulgación

La invención es como se define en las reivindicaciones.

Un objeto de la presente divulgación es proporcionar un método que permita una determinación simultánea de la concentración de espermatozoides y la proporción de espermatozoides vivos en una muestra de semen.

Un objeto adicional de la presente divulgación es proporcionar un método para una determinación simultánea de la

concentración de espermatozoides y la proporción de espermatozoides vivos, moribundos y muertos.

Además, otro objeto adicional de la presente divulgación es proporcionar un método de acuerdo con el método mencionado anteriormente en el que el proceso de tinción se puede realizar rápido y a temperatura ambiente.

5 La divulgación se refiere a un método un método para la determinación de la concentración total de espermatozoides en un muestra de semen y la proporción de espermatozoides vivos en la misma, método que comprende someter la muestra de semen o una submuestra diluida de la muestra de semen a tinción selectiva de espermatozoides vivos y muertos y determinar la concentración total de los espermatozoides y la proporción de espermatozoides vivos  
10 mediante un medio de detección sensible a la tinción selectiva.

15 Como se explicará con mayor detalle en lo sucesivo, un modo para determinar la concentración total de los espermatozoides y la proporción de espermatozoides vivos es mediante el uso de citometría de flujo en el que el medio de detección es un fotodetector y en el que la información con respecto a concentración se obtiene mediante la incorporación de un patrón interno en forma de partículas fluorescentes, pero en los últimos años se han desarrollado otros métodos de determinación basados en tinción selectiva y también se podrán adaptar al método de la divulgación. Un método de este tipo es un método de microscopía asistida por ordenador en el que se detecta una imagen de partículas teñidas en una cubeta de un volumen definido exactamente por medio de una matriz de fotodetectores tales como una matriz de CCD y se somete a procesamiento de imágenes, consultar el documento WO 98/50777.

20 La información representada por la concentración absoluta (en peso o en volumen, siendo la base normalmente preferente en volumen) de espermatozoides y la proporción de espermatozoides vivos constituye un conjunto de datos relevante, pero se entenderá que este conjunto, por supuesto, se puede expresar como la concentración de espermatozoides vivos, o la concentración de espermatozoides muertos, u otros parámetros que se pueden calcular  
25 sobre la base de la combinación de la concentración de espermatozoides y la proporción de espermatozoides vivos.

Independientemente de la forma en la que se exprese el conjunto de datos, se puede usar para la evaluación de semen de rutina, por ejemplo, para inseminación artificial y para determinación del grado de dilución necesario para asegurar un número adecuado de espermatozoides vivos en cada dosis de inseminación.

30 La determinación de la concentración total de espermatozoides y la proporción de espermatozoides vivos se realiza preferentemente usando la misma muestra o submuestra y en la misma rutina de determinación, es decir, la secuencia de etapas de determinación realizada en una y en la misma muestra. La determinación de la concentración total de espermatozoides y la proporción de espermatozoides vivos se realiza preferentemente de forma básicamente  
35 simultánea y preferentemente en la misma operación de determinación, es decir, en la misma etapa.

Como las muestras de semen son relativamente viscosas, normalmente se prefiere que la muestra de semen esté diluida para formar una submuestra diluida. La dilución de la muestra se realiza preferentemente usando un diluyente que mantenga la viabilidad de los espermatozoides durante la determinación, tal como solución salina tamponada con fosfato.

40 La tinción selectiva adecuada comprende una tinción que tiñe todos los espermatozoides combinada con una tinción que tiñe de forma selectiva las células muertas. La dirección selectiva se puede realizar de forma adecuada usando uno o más fluorocromos que dan como resultado cualidades fluorescentes que se confieren a los espermatozoides vivos y los espermatozoides muertos, pudiéndose distinguir la cualidad o cualidades fluorescentes de las células vivas, con los medios de detección, de la cualidad por cualidades fluorescentes de los espermatozoides muertos, determinación que se realiza mediante recuento selectivo de células de cada cualidad fluorescente. En este contexto, la expresión "recuento selectivo" pretende incluir cualquier método de recuento o cálculo o procesamiento de imágenes que se base en la detección realizada y que dé como resultado datos que indiquen por un lado la  
45 concentración total de espermatozoides y por otro lado la proporción de células muertas; pudiéndose volver a calcular a continuación la última proporción fácilmente en la proporción de células vivas, consultar anteriormente.

50 Los fluorocromos que tiñen los espermatozoides pueden ser cualquier fluorocromo que se una a ADN. Los fluorocromos normalmente comprenden un fluorocromo capaz de teñir de forma selectiva espermatozoides muertos o moribundos, siendo capaz este fluorocromo de entrar en un espermatozoide través de una membrana plasmática con escapes o defectuosa, pero que es básicamente incapaz de entrar en un espermatozoide que tiene una membrana plasmática intacta, y otro fluorocromo capaz de teñir todos los espermatozoides, siendo este fluorocromo capaz de entrar en una célula a través de la membrana celular intacta.

60 Mediante adaptación adecuada de la tinción, también se ha encontrado que es posible determinar de forma selectiva la proporción de espermatozoides moribundos. Esto se obtiene por lo general mediante el uso de una concentración menor de la usada convencionalmente para la tinción con fluorocromo de todos los espermatozoides, tal como se explicará con mayor detalle en lo sucesivo. De este modo es posible diferenciar entre espermatozoides vivos y espermatozoides moribundos. Aunque las determinaciones de movilidad convencionales realizadas mediante  
65 microscopía no permiten una distinción de este tipo, en el método de la divulgación, es posible usar una tinción que permita una determinación de una fase de transición durante la que la membrana plasmática de los espermatozoides

se hace cada vez más permeable como una indicación de los espermatozoides que están sometidos a deterioro. Tales espermatozoides aparecerán con movimiento en las observaciones de movilidad con microscopía, pero tendrán un periodo de movilidad activa mucho más corto que los espermatozoides que tienen una membrana plasmática intacta (Christensen *et al.*, datos sin publicar).

5 Los espermatozoides moribundos tienen una membrana plasmática con escapes o no intacta por lo que estos espermatozoides se tiñen por los fluorocromos que tiñen todos los espermatozoides y también por los fluorocromos que tiñen los espermatozoides muertos. La tinción de los espermatozoides muertos, sin embargo, será mucho más fuerte que la tinción de la célula moribunda, con lo que la intensidad de la tinción proporciona información sobre el estado de la célula. Al mantener una concentración adecuadamente baja de la tinción con fluorocromo de todos los espermatozoides, se hace posible el recuento de forma selectiva de la proporción de espermatozoides que tienen una calidad fluorescente (respectivas intensidades de longitudes de onda características de los dos fluorocromos) que se puede distinguir tanto de las células vivas como de las células muertas.

15 Los espermatozoides que tienen una membrana plasmática con escapes por lo general morirán poco después de que este proceso haya comenzado. El número de espermatozoides moribundos por lo general es el más elevado cuando una las de semen se ha congelado o se ha almacenado durante un periodo de tiempo anterior a la evaluación. Por lo tanto, este método también se puede usar para desarrollo y evaluación de los nuevos medios para congelación o almacenamiento de líquido de esperma y/o para la mejora de los procedimientos de almacenamiento y/o congelación/descongelación o incluso para el desarrollo de nuevos procedimientos de este tipo.

20 La excitación de los fluorocromos se puede realizar por medio de luz en el intervalo de longitud de onda de 488 nm ("láser de color azul"), en cuyo caso el fluorocromo que tiñe los espermatozoides vivos pueden ser adecuadamente SYBR-14, y el fluorocromo que tiñe los espermatozoides muertos o moribundos puede ser, adecuadamente, yoduro de propidio, PI.

25 De forma alternativa, la excitación de los fluorocromos se puede realizar por medio de luz en el intervalo de longitud de onda de aproximadamente 543 nm ("láser de color verde"), en cuyo caso el fluorocromo que tiñe los espermatozoides vivos puede ser adecuadamente MPR71292, y el fluorocromo que tiñe los espermatozoides muertos o moribundos puede ser el homodímero 2 de etidio, EHD2.

30 El SYBR-14 usado en concentraciones estándar es ligeramente tóxico para los espermatozoides con lo que la cantidad de espermatozoides vivos en una muestra disminuirá incluso en un breve periodo de tiempo. Dado que se ha usado un tiempo de tinción de 10 a 15 minutos en el uso convencional de SYBR-14, los resultados tienden a ser ligeramente inexactos debido a la disminución de espermatozoides vivos en el tiempo (Christensen y Stenvang, datos sin publicar). Por lo tanto, de acuerdo con una realización de la divulgación, se usa un breve periodo de tinción (2½-5 min) con lo que se reduce la toxicidad de los colorantes, tales como SYBR-14, facilitando la determinación de la viabilidad del esperma con alta precisión y exactitud. Además, se prefiere realizar la tinción de los espermatozoides a una temperatura inferior a 35 °C, tal como, como máximo 30 °C, por ejemplo, a una temperatura entre 15 °C y 25 °C, preferentemente a temperatura ambiente, tal como aproximadamente 20 °C.

45 El fluorocromo que tiñe todos los espermatozoides se puede usar en concentraciones inferiores a las concentraciones aplicadas convencionalmente para tales fluorocromos para evitar la toxicidad de los colorantes, por ejemplo en concentraciones en el intervalo de 25 a 75 nanomolar, preferentemente tal como en concentraciones de 50 nanomolar.

50 El uso de tales concentraciones por debajo de concentraciones convencionales para la tinción de espermatozoides vivos tiene una serie de ventajas en el método de la divulgación; a continuación se proporcionan algunos ejemplos para la combinación de los fluorocromos SYBR-14 y PI, pero las ventajas también se podrán obtener con otras combinaciones pertinentes.

55 En primer lugar, como se ha mencionado anteriormente, se ha demostrado que el uso de concentraciones convencionales de SYBR-14 para teñir espermatozoides es tóxico para los espermatozoides. Algunos estudios han demostrado que una concentración de SYBR-14 de 100 nM da como resultado una disminución de la cantidad de espermatozoides vivos de un 0,6 % por minuto, mientras que no se encuentra una disminución en la cantidad de espermatozoides vivos cuando la concentración aplicada de SYBR-14 está por debajo de las concentraciones convencionales como se ha mencionado anteriormente.

60 Además, para facilitar la detección de espermatozoides moribundos, la intensidad de la señal fluorescente del SYBR-14 se debería reducir al mínimo. La razón de esto es que los espermatozoides moribundos que tienen una membrana con escapes absorben fácilmente el SYBR-14, pero absorben solo ligeramente el fluorocromo PI, por lo cual la señal de PI fluorescente emitida desde un espermatozoide moribundo es relativamente débil. Por lo tanto, la intensidad de la respuesta fluorescente de SYBR-14 de los espermatozoides que están moviéndose de reducir al mínimo para facilitar la detección simultánea de la respuesta fluorescente débil de PI presente en los espermatozoides moribundos y la fuerte respuesta fluorescente del SYBR-14 también presente en los espermatozoides moribundos.

65 Cuando una muestra de semen se ha congelado, tanto como un 30 % de los espermatozoides pueden ser espermatozoides moribundos. Por lo tanto, es de suma importancia que los espermatozoides moribundos se

discriminen de los espermatozoides vivos para proporcionar un verdadero recuento de espermatozoides vivos. Si se usaron concentraciones convencionales de SYBR-14, solamente se puede desvelar una cantidad tan pequeña como un 10 % de los espermatozoides moribundos, por lo que el número de espermatozoides vivos estaría muy sobrestimado.

5 Como se ha mencionado anteriormente, una realización importante del método de la divulgación se realiza usando un citómetro de flujo, tal como un citómetro de barrido láser. En este caso, la determinación del parámetro de concentración se obtiene mediante la combinación de la muestra o submuestra con un medio estándar de concentración interna que determina la concentración total de los espermatozoides y la proporción de  
10 espermatozoides vivos de forma simultánea por medio de un medio de detección sensible a la tinción selectiva y a los medios internos de referencia de concentración.

El medio estándar de concentración interna puede ser cualquier medio de patrón de concentración que se pueda combinar de forma adecuada con la muestra o submuestra y se detecta con el medio de detección para funcionar  
15 como una referencia indicativa de la concentración de espermatozoides. El medio estándar de concentración interna puede estar formado de forma conveniente por partículas de normalización, siendo las partículas de normalización añadidas en un número predeterminado por unidad de peso o normalmente de volumen de la muestra o submuestra. Las partículas de normalización son partículas fluorescentes, en particular perlas fluorescentes, que tienen una cualidad fluorescente que se puede distinguir de las cualidades fluorescentes de los espermatozoides vivos,  
20 espermatozoides muertos, y espermatozoides moribundos.

El tamaño y la concentración total de espermatozoides de la submuestra se puede adaptar de forma adecuada para que el número de espermatozoides corresponda a entre una décima parte y diez veces el número de las los de normalización, en particular, a entre una cuarta parte y cuatro veces el numero de las partículas de normalización,  
25 como por ejemplo a entre la mitad y dos veces el número de las partículas de normalización.

Las perlas se pueden proporcionar en una suspensión que comprende perlas y diluyente. Una ventaja de una suspensión es que comprende tanto las perlas como el diluyente para que la suspensión la pueda preparar un fabricante en un proceso altamente automatizado para obtener un número muy preciso de perlas en la suspensión.  
30 Además, la suspensión que comprende el diluyente y las perlas se puede preparar en tubos, siendo los tubos adecuados como cámaras de medida en clasificadores de células activadas con fluorescencia, tales como citómetros de flujo. De este modo, las inexactitudes procedentes de la redistribución y la dilución de la suspensión se reducen al mínimo. Además adicionalmente, usando tubos del mismo proceso de preparación con el mismo número de lote, se pueden obtener los resultados correspondientes con independencia de los diferentes aparatos usados por diferentes usuarios. Por ejemplo, se pueden usar tubos CD4/3 y CD8/3 fabricados por Becton Dickinson (documento EP 0 568 183) que contienen un número predeterminado de perlas en un diluyente. Además, se pueden usar tubos que contienen solamente perlas, tales como los tubos "Trucount" fabricados por Becton Dickinson y que contienen un número predeterminado de perlas.

40 El diluyente puede ser un diluyente que no sea tóxico para el esperma y que mantenga la viabilidad durante los procedimientos de tinción y análisis. El diluyente puede ser un diluyente que disminuya el tiempo de tinción. El diluyente puede comprender cualquier medio capaz de evitar que los espermatozoides se peguen a las paredes laterales de la cámara de medida o el tubo de medida, tal como un compuesto químico, tal como una proteína, tal como BSA, u otro compuesto adecuado, tal como alcohol de polivinilo (PVA), etc.

45 Para obtener una precisión de las medidas incluso más elevada, la dilución automatizada del semen se puede aplicar. De este modo, la parte que depende del operador del proceso se elimina lo que hace que el proceso sea altamente reproducible.

50 La determinación de la concentración de los espermatozoides y la proporción de espermatozoides vivos se puede determinar como un valor medio de la determinación de la concentración total de los espermatozoides y la proporción de espermatozoides vivos realizada en dos o más submuestras de la muestra de semen. Por la presente, la concentración de los espermatozoides y la proporción de espermatozoides vivos se puede determinar de forma más precisa.

55 Después del análisis de la submuestra, la muestra se puede diluir hasta una concentración de semen determinada previamente o un número de espermatozoides vivos determinado previamente y se puede distribuir con el fin de llenar una dosis de inseminación con un número apropiado de espermatozoides vivos para inseminación artificial. Una indicación de la calidad del semen basándose en la concentración del semen y el número de espermatozoides vivos en el eyaculado correspondiente puede acompañar a la dosis de inseminación. De este modo, los usuarios, tales como  
60 los centros de inseminación artificial, pueden obtener información valiosa con respecto al semen.

Además, el método de la divulgación hace que sea posible obtener una base sólida para aceptar o rechazar el semen de eyaculados en función de si cumplen o no cumplen los valores especificados para la concentración total de espermatozoides y la proporción de espermatozoides vivos, con el fin de garantizar que para inseminación artificial  
65 solamente se usa el semen de una cierta calidad.

El método de la divulgación también se puede usar para determinar el número absoluto de espermatozoides producidos por los animales sometidos a toxicología u otros experimentos farmacológicos. Además, el método de la divulgación se puede usar para demostrar que animales o seres humanos se han visto influidos por ejemplo, por un entorno toxicológico o invasiones químicas en el organismo.

Además, debido a la objetividad y la reproducibilidad del método, el método se puede usar para evaluar la calidad del semen y la cantidad de semen humano, tanto en relación con inseminación artificial como con fecundación *in vitro* y en relación con investigaciones de la disminución propuesta en la calidad del semen humano.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método para predecir la probabilidad de fertilización de un animal hembra mediante inseminación artificial con una dosis de inseminación, que comprende la determinación de la concentración total de espermatozoides en la muestra de semen de la que se toma o se va a tomar la dosis de inseminación, y la proporción de espermatozoides vivos en la misma con un método tal como se describe en el presente documento, y que incluye la concentración total determinada de ese modo de los espermatozoides en la muestra de semen y la proporción de espermatozoides vivos en la misma, o la concentración, que se puede calcular a partir de la misma, de espermatozoides vivos en la muestra, en los parámetros sobre la base de los cuales se prevé la posibilidad de la fertilización del animal. La probabilidad de que la fertilización del animal hembra se puede predecir sobre la base de la concentración total de espermatozoides determinada en la muestra de semen y la proporción de espermatozoides vivos en la misma, o la concentración, que se puede calcular a partir de la misma, de espermatozoides vivos en la muestra.

La predicción de la probabilidad de fertilización del animal hembra se puede realizar sobre la base de correlaciones estadísticamente significativas entre datos de fertilidad obtenidos en experimentos de inseminación con varios animales hembra y los datos que indican la concentración total de espermatozoides en la muestra de semen usada en los experimentos de inseminación y la proporción de espermatozoides vivos en la misma, y/o datos que indican la concentración de espermatozoides vivos en la misma. El protocolo para un ejemplo de experimentos adecuados se proporciona en el Experimento 3 que sigue a continuación.

Cuando el animal hembra es un animal múltiparo, el número de crías resultantes de la fertilización también se puede predecir, a partir de datos establecidos por el método de la divulgación como se describe en el presente documento, en correlación con los resultados de experimentos diseñados de forma adecuada.

La predicción se puede realizar sobre la base de los resultados obtenidos de un eyaculado recién obtenido o sobre la base de los resultados obtenidos de una muestra de semen que es una dosis de inseminación congelada, siendo la muestra descongelada antes de someterla al método de determinación, o sobre la base de una combinación de una determinación en la muestra congelada-descongelada y una determinación en el eyaculado recién obtenido del que se derivó la muestra congelada-descongelada. Otro tipo de muestra es una muestra diluida y almacenada.

#### 40 Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra una representación de los resultados del FACSCount con láser de 488 nm que muestra la intensidad de fluorescencia de color verde con respecto a fluorescencia de color rojo usando el método de la divulgación. El espermatozoides vivos (a), espermatozoides muertos (b) así como espermatozoides moribundos (c) se puede identificar y se separan claramente de residuos (d) y perlas (e). En esta muestra en particular, el espermatozoides moribundo representa un 9,4 % del recuento de espermatozoides total.

Las Figs. 2A y 2B muestran resultados de la evaluación de la concentración del espermatozoides en el contador de partículas Sysmex. Una diferencia entre la primera discriminación (flechas) y la segunda discriminación (línea vertical punteada) conduce a diferencias en la concentración de espermatozoides de  $750 \times 10^6$  espermatozoides/ml y  $700 \times 10^6$  espermatozoides/ml, respectivamente. Observar que el Sysmex está diseñado para recuento de hematología y que el recuento del espermatozoides se hace en el canal de los glóbulos rojos (RBC). El eje x indica el tamaño de la partícula de acuerdo con el principio de Coulter y la curva ilustra la distribución de partículas en relación con el tamaño.

La Fig. 3 muestra la línea de regresión para FACSCount con láser de color azul (488 nm) con respecto a la Cámara Makler. Los datos son datos corregidos a partir del modelo de error de medida.

La Fig. 4 muestra la línea de regresión para FACSCount con láser de color verde (543 nm) con respecto a la Cámara Makler. Los datos son datos corregidos a partir del modelo de error de medida.

La Fig. 5 muestra la línea de regresión para Espectrofotómetro (L'Aiglon) con respecto a la cámara Makler. Los datos son datos corregidos a partir del modelo de error de medida.

La Fig. 6 muestra la línea de regresión para contador de partículas (Sysmex) con respecto a la cámara Makler. Los datos son datos corregidos a partir del modelo de error de medida.

La Fig. 7 muestra la línea de regresión para FACSCount con láser de color verde (543 nm) con respecto a FACSCount con láser de color azul (488 nm). Los datos no corregidos muestran una correlación muy elevada entre estas técnicas. La pendiente  $\beta$  es 0,99 y el coeficiente de correlación es 0,99.

5

## Descripción de realizaciones preferentes

### EXPERIMENTO 1

#### 10 Resumen

En un primer experimento, la concentración y la viabilidad de espermatozoides vivos y muertos en una muestra de semen y posteriormente, mediante análisis de las muestras de semen con citometría de flujo de acuerdo con una realización preferente de la divulgación. Para fines de comparación, la concentración del espermatozoides también se determinó usando métodos de la técnica anterior, es decir, mediante la determinación de la concentración del espermatozoides con un espectrofotómetro (L'Aiglon, IMV, Cedex, Francia) y un contador de partículas (Sysmex F-820, SYSMEX, Almind, Dinamarca), y haciendo uso adicionalmente un contador manual que usa una cámara Makler (Sefi Medical, Haifa, Israel) y un microscopio de contraste de fases.

20

Los análisis que usan citometría de flujo para determinación simultánea de la concentración y la viabilidad del espermatozoides en eyaculados de toro en el puesto de IA se realizaron usando dos citómetros de flujo FACSCount diferentes (BDIS Europe, Erembodegem-Aalst, Bélgica) equipados con un láser de color azul (488 nm), y un láser de color verde (543 nm), respectivamente. El espermatozoides se tiñó con una combinación de SYBR-14 y PI para análisis con la longitud de onda de excitación de color azul (488 nm) o se tiñó con una combinación de MPR71292 y EHD2 para análisis con la longitud de onda de excitación de color verde (543 nm). Los datos obtenidos de los citómetros de flujo se analizaron posteriormente con el software Attractor™ (BDIS Europe, Erembodegem-Aalst, Bélgica). Además de la determinación de la concentración del espermatozoides, los análisis citometría de flujo también proporcionaron un cálculo de la viabilidad del espermatozoides.

25

En general, se encontró un buen acuerdo entre los métodos mencionados anteriormente. El breve periodo de tinción (2½-5 min) en combinación con una concentración mínima de SYBR-14, reducía la toxicidad de este colorante, facilitando, de este modo, la determinación de la viabilidad del espermatozoides con precisión y exactitud elevadas. Además, el protocolo usado permitía la detección de espermatozoides vivo, muerto así como moribundo.

30

### 35 MATERIALES Y MÉTODOS

#### Muestras de semen

Las muestras de semen a usar en los experimentos se recogieron de 25 toros proporcionando un total de 52 eyaculados. Las muestras de semen se recogieron durante 4 días de toros con diferencias tanto en la concentración como en la calidad del semen. Una alícuota de 2-3 ml del semen sin procesarse como con un tubo (n.º de Cat 347880 de NUNC Intermed, Lifetechnologies, Roskilde, Dinamarca) y se colocó en una mezcladora Swelab-820 (Bie & Berntsen, Rødovre, Dinamarca) y se mezcló continuamente. Todos los procesamientos y análisis se realizaron en 30 minutos después de la recogida de semen.

45

#### Determinación de la concentración de espermatozoides usando la cámara Makler

Dos muestras de semen sin procesar se diluyeron a 1:40 con un aparato de autodilución Hamilton Microlab A503 (Struers KEBO lab., Albertslund, Dinamarca) y usando una solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4, 300 mOsm con BSA al 0,1 %). Las muestras diluidas se colocaron en una mezcladora (Adams Nutator, NC. Nielsen, Brøndy, Dinamarca). Antes de la evaluación, los espermatozoides se inmovilizaron mediante la adición de 7,5 µl de formaldehído al 4 % (p/v) y la cámara Makler se cargó con una submuestra de 7,5 µl. La tapa de la cámara Makler se colocó en posición y se tocó suavemente con la punta de una uña para asegurarse de que permanecía firmemente en los pilares (anillos de Newton). Se hizo el recuento de un total de 25 cuadrados con microscopía de contraste de fases un aumento de 200x. Después del recuento, la cámara se lavó con agua destilada, se secó y se volvió a cargar con una submuestra de la misma muestra. Posteriormente, este procedimiento se aplicó para la segunda submuestra y se obtuvo un total de 4 medidas (2 muestras x 2 replicados) por eyaculado.

50

#### 60 Determinación de la concentración de espermatozoides usando espectrofotómetro

Una muestra de 20 µl del semen sin procesar se diluyó hasta un volumen total de 4 ml (1:200) en una cubeta para el espectrofotómetro de L'Aiglon. La dilución se realizó con un aparato de autodilución CAVRO (Z 069, IMV). Después de la dilución, una pequeña pieza de papel de aluminio se colocó sobre la cubeta y la muestra diluida se mezcló suavemente con la mano. Después de reposar aproximadamente 10 segundos, la cubeta se colocó en el espectrofotómetro y la concentración de espermatozoides se midió. La cubeta se cubrió de nuevo con papel de aluminio se

65



mezcló cuidadosamente con la mano, y después de un periodo de reposo, la cubeta se midió una vez más en el espectrofotómetro. Después de esta medida, una segunda muestra se diluyó y se midió. Por lo tanto, se obtuvo un total de 4 medidas por eyaculado.

5 Determinación de la concentración de espermatozoides usando contador de partículas

Para el recuento de la concentración de espermatozoides en el contador de partículas Sysmex F-820 es necesaria una dilución de dos etapas. La primera etapa fue la dilución de 20 µl de semen sin procesar hasta un volumen de 10 ml (1:500) y en la segunda etapa, se diluyeron 100 µl de semen diluido hasta un volumen total de 10 ml y se colocó en una taza de muestra (1:100, dando como resultado una dilución combinada de 1:50.000). Ambas etapas de dilución se realizaron con un aparato de autodilución AD-270 (SYSMEX, Almind, Dinamarca). La taza de muestra se cubrió con un trozo pequeño de papel de aluminio y se mezcló cuidadosamente con la mano y se dejó reposar durante aproximadamente 10 segundos antes de hacer el recuento en el Sysmex. Después del recuento, la taza de muestra se cubrió de nuevo con papel de aluminio, se mezcló y se hizo el recuento una vez más. A continuación, la muestra se descartó y una segunda muestra se diluyó, se trató y se hizo recuento de acuerdo con este procedimiento. Se obtuvo un total de 4 recuentos por eyaculado.

Determinación de la concentración y viabilidad del espermatozoides usando citómetro de flujo

20 Para los análisis de citometría de flujo es necesaria una dilución en dos etapas. En primer lugar, la muestra se diluye 250x en un medio de PBS que contiene BSA al 0,1 %, (n.º de Cat 3478880 NUNC Intermed, Lifetechnologies, Roskilde, Dinamarca), y en segundo lugar una muestra de 20 µl se transfiere a un tubo de Recuento de Espermatozoides que contiene aproximadamente 100.000 perlas usando pipeteo manual inverso. Los colorantes se añadieron a los tubos de Recuento de Espermatozoides menos de 12 horas antes de usar los tubos en el procedimiento de análisis. Como se ha mencionado anteriormente, se usaron dos citómetros de flujo diferentes, siendo uno un FACSCount equipado con un láser de color verde (543 nm) y siendo el segundo un FACSCount equipado con un láser de color azul (488 nm).

30 A cada tubo de Recuento de Espermatozoides a analizar en el primer FACSCount (543 nm), se añadieron 2 µl de MPR71292 y 2 µl de EHD-2 para proporcionar concentraciones finales de 100 nM y 5 µM, respectivamente.

A cada tubo de Recuento de Espermatozoides a analizar en el segundo FACSCount (488 nm), se añadieron 5 µl de SYBR-14 y 5 µl de PI para proporcionar concentraciones finales de 50 nM y 12 µM, respectivamente.

35 Antes de la apertura de los tubos de Recuento de Espermatozoides, los tubos se mezclaron en centrifugadora durante 3 segundos en una posición boca abajo y durante número de segundos en una posición normal. La mezcla en centrifugadora se repitió durante dos segundos después de la adición del espermatozoides y antes de cada análisis. Después de la adición del espermatozoides, los tubos de Recuento de Espermatozoides se colocaron en una mezcladora (Adams Nutator, N.C. Nielsen, Brøndby, Dinamarca) durante 4 min a temperatura ambiente sin luz que alcanzara el tubo. Después de 4 min, los primeros replicados se analizaron de forma simultánea en los dos citómetros de flujo y los segundos replicados se analizaron después de un periodo de tinción de 6 min. Los tubos se analizaron dos veces para proporcionar un segundo replicado en lugar de pipetear dos submuestras de los tubos. En cada citómetro de flujo se realizó un total de 4 análisis por eyaculado.

Análisis de datos de FACSCount

45 Durante los análisis de citometría de flujo, los datos se almacenaron en un disco flexible en el FACSCount, y después de las medidas, los datos del disco flexible se analizaron usando el software Attractor™ (BD) en la Royal Veterinary and Agricultural University, Sección de Reproducción.

50 Análisis estadístico

Los datos obtenidos a partir de los cinco métodos (cámara Makler, espectrofotómetro (L'Aiglon), contador de partículas (Sysmex), y citómetros de flujo (FACSCount con láser de color verde o de color azul) se sometieron a análisis de varianza para resaltar efectos significativos de fecha, toro, muestra, replicado, combinaciones de estos efectos así como variación residual. Los datos de viabilidad de los análisis de FACSCount también se sometieron a análisis de varianza. Se usó el siguiente modelo estadístico (1):

60 (1) 
$$Y_i = \alpha_{i, fecha} + B_i, toro + C_i, toro'fecha + D_i, fecha'toro'muestra + \epsilon_i$$

en el que:  $Y_i$  = resultado para el método

$\alpha_{i, fecha}$  = efecto de la fecha (sistemático)

$B_{i,toro}$  = efecto del toro

$C_{i,toro*fecha}$  = efecto del eyaculado

$D_{i,fecha*toro*muestra}$  = efecto de la muestra

$\epsilon_i$  = error residual

$i$  = el número de observación (medida), 1, ..., 208.

Las letras en el modelo mencionado anteriormente indican efectos aleatorios. Sin embargo, los cálculos para la muestra global y las diferencias de replicados se realizaron en un modelo estadístico con efecto sistemático demuestra, replicado y fecha e.

Los datos de los cuatro métodos (espectrofotómetro, contador de partículas, citómetro de flujo con láser de color verde o de color azul) se sometieron a análisis de regresión para comparar los resultados de estos métodos con los resultados obtenidos con la cámara Makler. Los análisis de regresión se basaron en los valores medios para las cuatro medidas por eyaculado para cada uno de los métodos. Al principio, los análisis de regresión se realizaron sin correcciones, pero debido a una gran variación de los datos de la cámara Makler, los análisis de regresión también se realizaron usando un modelo de error de medida que tiene en cuenta la imprecisión de la cámara Makler. Todos los análisis estadísticos se realizaron con la versión 6.12 de SAS (SAS, 1990).

Como se puede observar a partir de las Figs. 3-6 que muestran las líneas de regresión de los resultados de cada uno de los cuatro métodos con respecto al recuento manual de la cámara Makler, la concentración de los espermatozoides varía de  $200 \times 10^6$  a  $3000 \times 10^6$ . Esta variación es una variación entre toros así como una variación entre eyaculados de cada toro como también se indica en el método estadístico mencionado anteriormente.

#### Cámara Makler

Los datos obtenidos con la cámara Makler parecían más imprecisos de lo que se preveía a partir de estudios iniciales y el coeficiente de variación fue de un 21,3 %.

#### Precisión del método de espectrofotómetro

Los resultados de los análisis de varianza para datos obtenidos con el espectrofotómetro se muestran en la tabla 1. El coeficiente instrumental de variación (% de CV) es de un 2,10 % y la gran variación entre muestras dentro de eyaculados (variación de la muestra) hace que el método sea significativamente más impreciso, y el intervalo de confianza de un 95 % para la determinación de la concentración del esperma con el espectrofotómetro de L'Aiglon es  $\pm 169 \times 10^6$  espermatozoides/ml cuando se realiza una sola medida (una muestra, una medida). Una variación general pequeña se detectó en la concentración entre las dos muestras con la muestra 1 siendo  $48,5 \pm 15 \times 10^6$  espermatozoides/ml inferior a la de la muestra 2. La razón para esta diferencia no es evidente.

#### Precisión del método de contador de partículas

La Tabla 1 también muestra los resultados para el contador de partículas Sysmex. El coeficiente de variación con este método es elevado, 6,1 %. En las medidas se usaron dos conjuntos de recuentos en los que la discriminación en el tamaño de partícula difería en los dos replicados, respectivamente, incluyendo y excluyendo una población de partículas más pequeñas en el "recuento de esperma" (véanse las Figs. 2A y 2B). Si estas observaciones se excluyen, el coeficiente de variación para el Sysmex es de un 4,0 %. La variación de la muestra con el contador de partículas Sysmex es pequeño y el intervalo de confianza de un 95 % del método para una sola medida por eyaculado es de  $\pm 118 \times 10^6$  espermatozoides/ml (dos conjuntos de recuentos mencionados anteriormente se excluyen en este cálculo, si se incluyen, el intervalo de confianza de un 95 % es  $\pm 182 \times 10^6$  espermatozoides/ml).

Tabla 1. Fuentes de variación para los cuatro métodos: espectrofotómetro (L'Aiglon), contador de partículas (Sysmex) y FACSCCount (láser de color verde) y FACSCCount (láser de color azul). Los números entre corchetes indican el porcentaje de la variación total para los métodos.

Fuente de variación	L'Aiglon		Sysmex		FACSCCount (láser de color verde)		FACSCCount (láser de color azul)	
Toro <sup>1</sup>	179,312	(52)	197,497	(51)	220,714	(58)	226,901	(59)

Fuente de variación	L'Aiglon		Sysmex		FACSCCount (láser de color verde)		FACSCCount (láser de color azul)	
Toro <sup>2</sup> fecha*	155,884	(45)	186,918	(48)	153,674	(40)	151.766	(39)
Toro <sup>3</sup> *fecha*muestra	6,462	(1,9)	64	(~0)	4,896	(1,3)	1,554	(0,4)
Residual <sup>4</sup>	968	(0,3)	3,599	(0,9)	3,755	(1,0)	7,285	(1,4)
% de CV <sup>5</sup>	2,10		4,0*		4,3		6,0	
95 % de int. de confianza <sup>6</sup>	± 169 x 10 <sup>6</sup>		± 118 x 10 <sup>6**</sup>		± 182 x 10 <sup>6</sup>		± 84 x 10 <sup>6</sup>	
<sup>1</sup> Variación general entre toros <sup>2</sup> Variación entre eyaculados dentro de toros. (variación de eyaculado) <sup>3</sup> Variación entre muestras (variación de muestra) <sup>4</sup> Variación residual (variación instrumental) coeficiente de variación instrumental <sup>6</sup> 95 % de intervalo de confianza para una sola medida por eyaculado (una muestra, un replicado) *6,1 % si se incluyen todas las medidas **± 182 x 10 <sup>6</sup> espermatozoides/ml si se incluyen todas las medidas								

Precisión del método de contador de partículas

- 5 La Tabla 1 también muestra los resultados para el contador de partículas Sysmex. El coeficiente de variación con este método es elevado, 6,1 %. En las medidas se usaron dos conjuntos de recuentos en los que la discriminación en el tamaño de partícula difería en los dos replicados, respectivamente, incluyendo y excluyendo una población de partículas más pequeñas en el "recuento de esperma" (véanse las Figs. 1 y 2). Si estas observaciones se excluyen, el coeficiente de variación para el Sysmex es de un 4,0 %. La variación de la muestra con el contador de partículas Sysmex es pequeño y el intervalo de confianza de un 95 % del método para una sola medida por eyaculado es de ± 118 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml (dos conjuntos de recuentos mencionados anteriormente se excluyen en este cálculo, si se incluyen, el intervalo de confianza de un 95 % es ± 182 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml).

Precisión del FACSCCount con láser de color verde (543 nm)

- 15 Los resultados del FACSCCount con láser de color verde se muestran en la tabla 1. El coeficiente de variación es de un 4,3 % y el intervalo de confianza de un 95 % para una sola medida por eyaculado es ± 182 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml. Se debería indicar que no se observan diferencias significativas entre replicados o muestras.

Precisión del FACSCCount con láser de color azul (488 nm)

- 20 Los resultados del FACSCCount con láser de color azul (tabla 1) tienen un coeficiente de variación más elevado (6,0 %) pero debido a una variación menor entre muestras, el intervalo de confianza de un 95 % para una sola medida por eyaculado es ± 184 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml. Se observó una concentración de esperma más elevada para el replicado 2 (54,7 ± 11 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml más elevada que la del replicado 1). La razón para esa diferencia no era evidente.

Precisión del FACSCCount (láser de color verde) para determinación de la viabilidad del esperma

- 30 Los resultados para la determinación de la viabilidad del esperma con FACSCCount (láser de color verde) se muestran en la tabla 2. El coeficiente de variación para el método es de un 1,2 %. El intervalo de confianza de un 95 % para la determinación de la viabilidad del esperma basándose en una medida por eyaculado es ± 4,0 %. Se observó una pequeña disminución en la viabilidad del esperma con el tiempo (- 0,27 ± 0,07 %/min). Esta disminución es mucho menor que las disminuciones observadas en los ensayos que usan un tiempo de tinción superior a 10 minutos. Con un tiempo de tinción de 3-5 minutos, la precisión del método solo se ve influida ligeramente.

Precisión del FACSCCount (láser de color azul) para determinación de la viabilidad del esperma

- 40 Los resultados del FACSCCount (láser de color azul) para determinación de la viabilidad del esperma se muestran en la tabla 2. El coeficiente de variación es igual (CV = 1,1 %) al del FACSCCount con láser de color verde pero debido a una variación de la muestra ligeramente mayor, el intervalo de confianza de un 95 % para una sola medida por eyaculado desde un 6,2 %. La viabilidad del esperma no disminuyó con el tiempo (-0,15 ± 0,07 %/min) de un efecto

probablemente por la reducción de la concentración de la tinción con SYBR-14 (50 nM)).

Tabla 2. Fuentes de variación para la determinación con citometría de flujo de la viabilidad del espermatozoide. Los números entre corchetes indican el porcentaje de la variación total del método.

	FACSCCount (láser de color verde)		FACSCCount (láser de color azul)	
Toro <sup>1</sup>	29,73	(65,8)	24,16	(45,8)
Toro <sup>2</sup> fecha*	11,24	(24,9)	18,75	(35,5)
Toro <sup>3</sup> fecha*muestra	3,26	(7,2)	9,01	(17,0)
Residual <sup>4</sup>	0,94	(2,1)	0,83	(1,6)
% de CV <sup>5</sup>	1,2		1,1	
95 % de int. de confianza <sup>6</sup>	± 4,0 %		± 6,2 %	
<sup>1</sup> Variación general entre toros <sup>2</sup> Variación entre eyaculados dentro de toros. (variación de eyaculado) <sup>3</sup> Variación entre muestras dentro de eyaculados (variación de muestra) <sup>4</sup> Variación residual (variación instrumental) <sup>5</sup> Coefficiente instrumental de variación <sup>6</sup> 95 % de intervalo de confianza para una sola medida por eyaculado (una muestra, un replicado)				

#### ANÁLISIS DE REGRESIÓN

Las líneas de regresión para los cuatro métodos después de corrección para imprecisión de la "regla de oro" se muestran en las Figs. 3 a 6 y los resultados de los análisis de regresión se muestran en la tabla 3. Las concentraciones de espermatozoides en las muestras de semen varían de  $200 \times 10^6$  a  $3000 \times 10^6$  espermatozoides por ml. Las pendientes de todas las líneas de regresión no son significativamente diferentes de 1 y las intersecciones para las diferentes líneas de regresión no son significativamente diferentes de 0. A partir de la tabla 3, a decir que el error de los análisis de FACSCCount es más elevado que para el espectrofotómetro y el contador de partículas. Los coeficientes de correlación a partir de los análisis de regresión incorrección mostraron una correlación ligeramente menor para los análisis con FACSCCount en los que la correlación para el láser de color verde y de color azul era respectivamente de 0,91 y 0,9 frente a 0,945 para contador de partículas y 0,96 para espectrofotómetro. Esto está en contraste con los resultados obtenidos anteriormente en los que los coeficientes de correlación para contador de partículas, espectrofotómetro y FACSCCount fueron respectivamente 0,93, 0,93 y 0,97. En teoría, la correlación para el FACSCCount (cualquier láser) debería ser más elevada que la de los otros métodos por qué el método de citometría de flujo identifica espermatozoides a partir de una tinción del ADN. Sin embargo, dado que el semen de toro contiene una cantidad de residuos muy pequeña, la diferencia entre los resultados obtenidos usando citometría de flujo y los resultados obtenidos usando otras técnicas es pequeña.

#### DISCUSIÓN GENERAL

**Viabilidad del espermatozoide:** Los dos métodos para la determinación de la viabilidad del espermatozoide son muy precisos y solamente para la combinación de 292 y EHD2 se observó una ligera disminución en la viabilidad ( $-0,27 \pm 0,07$  %/min). Dado que los análisis se pueden realizar después de un tiempo de tinción de 2½ min, la viabilidad se puede determinar de forma precisa así como de forma exacta. Puede ser deseable teñir dos muestras por eyaculado dado que la diferencia de las muestras es una fuente significativa de variación. Con dos muestras por eyaculado, el intervalo de confianza de un 95 % para la determinación de la viabilidad del espermatozoide será de un 2,8 % (láser de color verde) a un 4,4 % (láser de color azul). Usando las técnicas descritas, la viabilidad del espermatozoide se puede determinar con un grado de precisión y exactitud mucho más elevado que lo que es posible con la evaluación microscópica de la movilidad del espermatozoide. Esto implica que la fertilidad de una muestra de semen se puede predecir de forma más exacta a partir de los datos de viabilidad del espermatozoide. La correlación entre la viabilidad y la fertilidad del espermatozoide se demuestra en el experimento 3

Tabla 3. Resultados de los análisis de regresión (corregidos para imprecisión de la cámara Makler). Valores ± desviación estándar (sd).

Método	intersección (α)	pendiente (β)	error
FACSCCount (láser de color verde)	- 150 ± 115	1,03 ± 0,07	70
FACSCCount (láser de color azul)	- 200 ± 130	1,05 ± 0,08	70
Espectrofotómetro (L'Aiglon)	20 ± 75	0,94 ± 0,05	40
Contador de Partículas (Sysmex)	-50 ± 85	1,01 ± 0,05	40

*Concentración del esperma:* En la presente investigación, la determinación de la concentración del esperma con FACSCount (cualquier láser) es muy próxima a los resultados conseguidos usando el contador de partículas (Sysmex) o el espectrofotómetro (L'Aiglon) y la correlación entre métodos de FACSCount es muy elevada (Fig. 7). En ambos métodos de citometría de flujo, se tomaron muestras de 5000 sucesos por análisis, y se cree que se pueden obtener resultados todavía mejores tomando muestras de 10000 sucesos.

Una fuente de variación significativa para la determinación con citometría de flujo de la concentración de esperma es la diferencia entre muestras. Esta diferencia se refiere tanto a la diferencia real entre muestras como la diferencia entre tubos de Recuento de Esperma. La variación entre muestras se puede reducir mediante la aplicación de un procedimiento de dilución totalmente automatizado reduciendo de este modo al mínimo el factor dependiente del operador. Además, los resultados del método se pueden mejorar mediante una determinación de la concentración de esperma para un eyaculado basándose en un valor medio obtenido a partir de análisis de dos tubos de Recuento de Esperma. De ese modo, tanto la influencia de la variación en el número de cuentas entre tubos individuales de Recuento de Esperma se podría reducir, y además la viabilidad del esperma se podría determinar de forma más precisa si se basara en dos muestras.

## EXPERIMENTO 2

### Resumen

En un segundo experimento, la concentración y la viabilidad del esperma eyaculados de porcino se han determinado de acuerdo con una realización preferente de la presente divulgación. Los espermatozoides vivos y muertos en muestras de semen de porcino se tiñeron de forma selectiva, y posteriormente las muestras de semen se analizaron con citómetros del flujo FACSCount equipados con cualquiera de un láser de 488 nm o de 543 nm. Se analizó un total de 58 eyaculados en cada uno de los dos citómetros de flujo y en un espectrofotómetro (Corning 254). Además, el recuento del esperma se hizo en un hemocitómetro Thoma usando microscopía de contraste de fases con un aumento de 200x.

Los resultados de este experimento muestran que la determinación de la concentración del esperma con las dos técnicas de citometría de flujo da como resultado una precisión y exactitud más elevadas que las obtenidas con el espectrofotómetro Corning 254. Las partículas de gel, presentes en un gran número en el semen de porcino, aumentan la turbidez del semen de porcino y hacen que las medidas de espectro fotometría sean poco confiables. Esto es una ventaja significativa de la técnica de citometría de flujo ya que proporciona un recuento de esperma más preciso y exacto y proporciona de forma simultánea una determinación precisa de la viabilidad del esperma.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras de semen

Se analizó un total de 58 eyaculados de porcino. Dos submuestras de cada eyaculado se diluyeron 250x en un medio de PBS que contenía BSA al 0,1 % y una alícuota de 60 µl se transfirió a un tubo de Recuento de Esperma. Los tiempos de tinción para SYBR-14/PI así como para MPR71292/EHD2 fueron de 4 mins y los tubos se analizaron posteriormente en dos citómetros de flujo FACSCount equipados con un láser de 488 nm y un láser de 543 nm, respectivamente.

Los 58 eyaculados se recogieron de 40 cerdos. A partir de cada eyaculado, se tomó una alícuota de 3 ml y se colocó en un tubo (n.º de Cat 347880 de NUNC Intermed, Lifetechnologies, Roskilde, Dinamarca) y se colocó en una mezcladora Swelab-820 (Bie & Berntsen, Rødovre, Dinamarca) y se mezcló continuamente. Todos los análisis posteriores se realizaron dentro del 30 mins después de la recogida de semen.

### Determinación de la concentración de esperma usando hemocitómetro Thoma

El semen sin procesar se diluyó en una solución de cloruro sódico al 5 % en p/v. La proporción de dilución varió de acuerdo con la concentración del esperma determinada usando el método de espectrofotometría i para conseguir un número de espermatozoides apropiado en el hemocitómetro Thoma.

Por lo tanto, las muestras más concentradas se diluyeron 72 x, mientras que las muestras 'finas' solamente se diluyeron 16 x. Las muestras se colocaron en una mezcladora (Adams Nutator, N.C. Nielsen, Brøndy, Dinamarca) durante el recuento. La tapa del hemocitómetro Thoma se colocó en posición en los dos pilares (anillos de Newton) y las dos zonas de de recuento se llenaron tubo capilar. En cada mitad de la cámara de recuento, se hizo el recuento de 5 campos grandes de cada 6 cuadrados pequeños. La cámara de recuento se llenó dos veces por cada una de las dos personas implicadas en el recuento.

### Determinación de la concentración de esperma usando espectrofotómetro (Corning 254)

Para la determinación espectrofotométrica de la concentración del esperma, se diluyeron 0,25 ml de semen sin

procesar con 9,75 ml de solución de EDTA en una cubeta. La concentración del esperma se midió posteriormente y la cubeta se mezcló cuidadosamente a mano y se volvió medio. Una muestra posterior se trató del mismo modo, por lo tanto, se realizaron 4 medidas por eyaculado.

#### Determinación de la concentración y viabilidad del esperma usando citómetro de flujo

La dilución de las muestras para los análisis de citometría de flujo se realizó como se ha descrito para semen de toro (experimento 1), aparte de un volumen de 60  $\mu$ l de la muestra diluida 250 x que se transfieren a cada tubo de Recuento de Esperma usando pipeteo manual inverso. Las concentraciones del colorante y el protocolo del análisis son idénticos a los mencionados anteriormente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El coeficiente de variación para la determinación con citometría del flujo de la concentración del esperma fue de un 3,2 % y de un 3,1 % para citómetros de flujo FACSCount equipados con un láser de 488 nm y un láser de 543 nm, respectivamente. Para comparación, el coeficiente de variación para las medidas de espectrofotometría fue de un 5,9 % lo que indica una imprecisión más elevada de esta técnica. Además, los datos para las medidas de espectrofotometría se distribuían de forma más aleatoria alrededor de la línea de regresión que los datos obtenidos usando las medidas de citometría de flujo. En el modelo de error de medida, la desviación estándar era 40 para el método de espectrofotometría que se debería comparar con una desviación estándar de 20 para los resultados obtenidos usando los dos citómetros de flujo. El coeficiente de variación para la determinación de la viabilidad del esperma era de un 1,4 % para ambas técnicas de citometría de flujo.

La determinación de la concentración del esperma en semen de porcino es difícil debido a una gran cantidad de partículas de gel que hacen que las lecturas espectrofotométricas sean imprecisas. Del mismo modo, los resultados obtenidos usando contadores de partículas, tal como el Sysmex usado para semen de toro, proporcionarán lecturas imprecisas debido a la gran cantidad de partículas de gel con un tamaño correspondiente al tamaño de los espermatozoides, y además, el sistema de flujo de un contador de partículas a menudo se obstruye con partículas de genes grandes también presentes en el semen de porcino. La determinación de la concentración del esperma using métodos de citometría de flujo es significativamente más exacta y precisa que las medidas de espectrofotometría y, además, la obstrucción del sistema de flujo debido a partículas grandes es un suceso raro. La precisión elevada de los métodos de citometría de flujo cuando se usa en el semen de porcino se explica por la gran cantidad de partículas de ser presentes en el semen de porcino, haciendo que los métodos de la técnica anterior sean altamente imprecisos. Además adicionalmente, el método de citometría de flujo proporciona una determinación objetiva y precisa de la viabilidad del esperma, siendo el método significativamente más preciso que la evaluación microscópica subjetiva, convencional de la movilidad del esperma.

## EXPERIMENTO 3

### Resumen

Una aplicación importante de los métodos de citometría de flujo descritos anteriormente es la posibilidad de predecir la fertilidad de acuerdo con la concentración del esperma determinada previamente y viabilidad del esperma. Para evaluar el valor de esta técnica para la selección de muestras de semen para inseminación artificial (IA), se realizó un ensayo de fertilidad a gran escala con semen de toro. En el presente experimento se ha usado SYBR-14 en una concentración de 50 nM y PI en una concentración de 12  $\mu$ M. Se analizaron cuatro eyaculados de cada uno de 157 toros (razas Holstein o Jersey) recién obtenidos se congelaron-descongelaron usando métodos de citometría de flujo y análisis de esperma asistido por ordenador (CASA). Además, el semen recién obtenido se sometió a evaluación morfológica del semen, y la evaluación de rutina estándar de las muestras de semen se realizó en las estaciones de toro implicadas. Se realizaron un total de 121.232 inseminaciones con dosis de inseminación proporcionadas a partir de los 4 x 157 eyaculados en los rebaños de vacuno daneses. Los datos preliminares de este ensayo extenso muestran que la determinación de la determinación con citometría de flujo de la viabilidad del esperma explica de un 30 % a un 50 % de la variación en la fertilidad después de la inseminación. Por el contrario, la evaluación de rutina solamente explicaba aproximadamente un 10 % de esta variación y la determinación computerizada de la movilidad del esperma era solo ligeramente mejor que la evaluación microscópica usada de forma rutinaria. En conclusión, la determinación con citometría del flujo de la viabilidad del esperma permite una selección más precisa de muestras de semen para IA y esta técnica es de gran valor para los criadores de ganado en todo el mundo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El semen de un total de 157 toros se recogió 4 veces cada una con un intervalo de una semana. El volumen del semen se evaluó y la concentración de esperma se determinó usando un contador de partículas. La movilidad del esperma y el movimiento ondulado se determinó usando un microscopio de contraste de fase con un aumento de 200 x y 100 x, respectivamente. La evaluación morfológica se realizó en dos frotis teñidos con Eosina-Nigrosina por eyaculado. El análisis por ordenador de la movilidad del esperma se realizó con un sistema HTM IVOS (Christensen y Stryhn 1997). Para evitar el sesgo dependiente del tiempo, se tomaron 20 campos de forma aleatoria en dos cámaras Makler. Los

análisis de citometría de flujos se realizaron usando FACSCount citómetros de flujo modificados.

En total, se realizaron 121.232 inseminaciones de forma aleatoria en rebaños de vacuno daneses. Los datos de fertilidad y los datos de los análisis del semen se analizaron usando modelos lineales mixtos

5

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los estudios anteriores han mostrado un valor limitado de la evaluación subjetiva de la movilidad del esperma con respecto a la predicción de fertilidad de una muestra de semen. La tinción del esperma de toro con SYBR-14 y PI y el posterior análisis en un citómetro de flujo FACSCount tal como se realiza de acuerdo con una realización preferente de la presente divulgación, proporciona una determinación objetiva y precisa de la viabilidad, y además una determinación precisa de la concentración del esperma. Como se ha descrito anteriormente, este método permite la detección simultánea de espermatozoides vivos, muertos y moribundos, y los datos preliminares de los primeros análisis estadísticos muestran una alta correlación para la fertilidad *in vivo*. Aproximadamente de un 30 % a un 50 % de la variación en la fertilidad después de la inseminación se puede explicar a partir del parámetro de viabilidad. Por el contrario, la evaluación microscópica rutinaria de la movilidad del esperma solamente explica aproximadamente un 10 % de la variación. La viabilidad del esperma determina usando métodos de citometría de flujo representa la primera técnica que hace posible mejorar la fertilidad de forma significativa mediante la selección de muestras pobres de esperma en el laboratorio de un centro de toros. Debido a la alta precisión de esta técnica, es posible resaltar los eyaculados en los que se puede anticipar un resultado inaceptable después de la inseminación. Por lo tanto, tales eyaculados se pueden descartar y la fertilidad en general se puede mejorar. La misma correlación parece probable para una serie de diferentes especies, pero el valor preciso de la técnica solamente se puede aclarar en ensayos de fertilidad para cada especie/raza. En la actualidad, un ensayo de este tipo está en curso con semen de porcino.

## 25 Referencias

- Donoghue AM, Garner DL, Donoghue DJ, Johnson LA, 1995: Viability Assessment of Turkey Sperm Using Fluorescent Staining and Flow Cytometry. Poultry Sci, 74: 1191-1200.
- Donoghue AM, Thistlethwaite D, Donoghue DJ, Kirby JD, 1996: A New Method for Rapid Determination of Sperm Concentration in Turkey Semen. Poultry Sci., 75: 785-789.
- Dumont P, Coupet H, Gary F, 1996: Some aspects of evaluation of semen quality and processing in France. Proc. 8th European AI-Vets meeting.
- Evenson DP, Parks JE, Kaproth MT, Jost LK, 1993: Rapid Determination on Sperm Cell Concentration in Bovine Semen by Flow Cytometry. J Dairy Sci 76: 86-94.
- Fenton SE, Ax RL, Cowan CM, Coyle T, Gilbert GR, Lenz RW: Validation and Application of an Assay of Deoxyribonucleic Acid to Estimate Concentrations of Bull Sperm. J. Dairy Sci., 73: 3118-3125.
- Foot RH, 1972: How to Measure Sperm Cell Concentration by Turbidity (Optical Density). Proceedings 4th Techn. Conf. on Anim. Reprod. and AI, NAAB, pp. 2-6.
- Garner DL, Johnson LA, Yue ST, Roth BL, Haugland RP, 1994: Dual DNA Staining Assessment of Bovine Sperm Viability Using SYBR-14 and Propidium Iodide. J Androl, 15: 620-629.
- Garner DL y Johnson LA, 1995: Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR-14 and Propidium Iodide. Biol Reprod, 53: 276-284.
- Garner DL, Dobrinsky JR, Welch GR, Johnson LA, 1996a: Porcine Sperm Viability, Oocyte Fertilization and Embryo Development after Staining Spermatozoa with SYBR-14. Theriogenology, 45: 1103-1113.
- Garner DL, Johnson LA, Allen CH, Palencia DD, Chambers CS, 1996b: Comparison of Seminal Quality in Holstein Bulls as Yearlings and as Mature Sires. Theriogenology, 45: 923-934.
- Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, DeJarnette JM, Marshall CE, 1997a: Fluorometric Assessments of Mitochondrial Function and Viability in Cryopreserved Bovine Spermatozoa. Biol Reprod, 57: 1401-1406.
- Garner DL, Thomas CA, Allen CH, 1997b: Effect of Semen Dilution on Bovine Sperm Viability as Determined by Dual-DNA Staining and Flow Cytometry. J Androl, 18: 324-331.
- Garner DL, Thomas CA, Allen CH, Sasser RG, 1997c: Effect of Cryopreservation on Bovine Sperm Viability as Determined by Dual DNA Staining. Reprod Domest Anim, 32: 279-283.
- Maxwell WM y Johnson LA, 1997: Chlorotetracycline Analysis of Boar Spermatozoa After Incubation, Flow Cytometric Sorting, Cooling, or Cryopreservation. Mol Reprod Dev, 46: 408-418.
- Maxwell WM, Welch GR, Johnson LA, 1997: Viability and Membrane Integrity of Spermatozoa after Dilution and Flow Cytometric Sorting in the Presence or Absence of Seminal Plasma. Reprod Fertil Dev, 8: 1165-78.
- Parks JE, Ehrenwald E, Foot RH, 1985: Counting mammalian spermatozoa in biological fluids containing particulate matter. J. Dairy Sci., 68: 2329.
- Penfold LM, Garner DL, Donoghue AM, Johnson LA, 1997: Comparative Viability of Bovine Sperm Frozen on a Cryomicroscope or in Straws. Theriogenology, 47: 521-530.
- Songsasen N, Betteridge KJ, Leibo SP, 1997: Birth of Live Mice Resulting from Oocytes Fertilized In Vitro with Cryopreserved Spermatozoa. Biol Reprod, 56: 143-152.
- Szollósi J, Takacs T, Balazs M, Gaspar R, Matyus L, Szabo G, Tron L, Resli I, Dajanovich S, 1986: Flow-cytometric evaluation of bull semen. 1. Objective determination of sperm cell counts in diluted semen samples. Magyar Alla-torvosok Lapja, 41: 459-463.
- Takacs T, Szollósi J, Balazs M, Gaspar R, Matyus L, Szabo G, Tron L, Resli I, Dajanovich S: Flow cytometric

- determination of the sperm cell number in diluted bull semen samples by DNA staining method. *Acta. Bichim. Biophys. Hung.*, 22: 45-57.
- Takizawa S, Katoh C, Fukatsu N, Horii I, 1994: Evaluation of rat sperm viability and number by flow cytometry. *Teratology*, 50: 40B.
- 5 Takizawa S, Katoh C, Fukatsu N, Horii I, 1995: Flow Cytometric Analysis for the Evaluation of the Rat Sperm Viability and Number in the Male Reproductive Toxicity Studies. *Cong. Anom*, 35: 177-187.
- Takizawa S, Katoh C, Inomata A, Horii I, 1998: Flow cytometric analysis for sperm viability and counts in rats treated with trimethylphosphate or pyridoxine. *J. Toxicol. Sci.* 23: 15-23.
- 10 Thomas CA, Garner DL, DeJarnette JM, Marshall CE, 1997: Fluorometric Assessments of Acrosomal Integrity and Viability in Cryopreserved Bovine Spermatozoa. *Reprod Biol*, 56: 991-998.
- Thomas CA, Garner DL, DeJarnette JM, Marshall CE, 1998: Effect of Cryopreservation on Bovine Sperm Organelle Function and Viability As Determined by Flow Cytometry. *Biol Reprod*, 58: 786-793.
- Vetter CM, Miller JE, Crawford LM, Armstrong MJ, Clair JH, Conner MW, Wise DL, Skopek TR, 1998: Comparison of motility and membrane integrity to assess rat sperm viability. *Reprod Toxicol*, 12: 105-114.
- 15 Woelders H, 1990: Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. *Boar Semen Preservation II*, *Reprod. Domest. Anim*, Suppl 1: 145-164.
- Yamamoto T, Mori S, Yoneyama M, Imanishi M, Takeuchi M, 1996: Estimation of rat sperm with flow cytometer (FCM): simultaneous analysis of sperm number and sperm viability. *Teratology*, 54: 38A.
- 20 Chalah T, Brillard JP, 1998: Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI). *Theriogenology*, 50: 487-493.
- Amann RP, 1989: Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J Androl* 10, 89-98.
- Budworth PR, Amann RP, Chapman PL, 1988: Relationships between computerized measurement of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *J Androl* 9, 41-54.
- 25 Christensen P, Stryhn H, 1997: Time-dependent bias in the assessment of bull semen by computer-aided sperm analysis. *Biol Reprod* 56, Suppl 1, 173.
- Christensen P, Brockhoff PB, Lehn-Jensen H, 1999: The Relationship between Semen Quality and the Nonreturn Rate of bulls. *Reprod Dom Anim* 34, 503-507.
- Barth AD, Oko RJ, 1989: *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. 1st edition, Iowa State University Press, pp 160-163.
- 30



**REIVINDICACIONES**

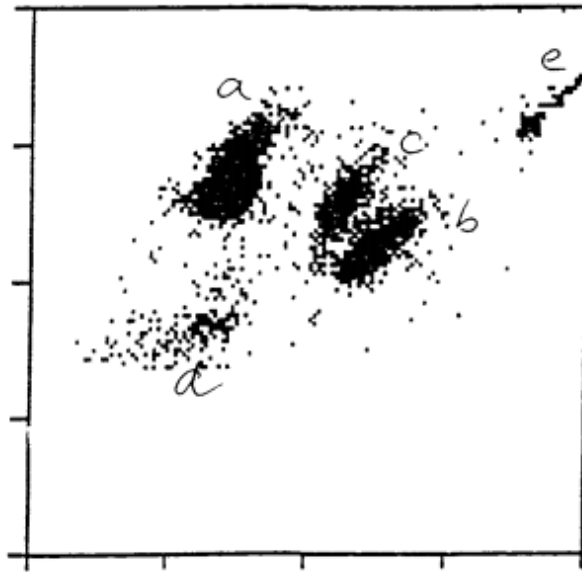
1. Un método para la determinación objetiva de la concentración total de espermatozoides en una muestra de semen y la proporción de espermatozoides vivos en la misma, que comprende someter la muestra de semen, o una submuestra diluida de la muestra de semen, a tinción selectiva, en el que la tinción selectiva comprende un fluorocromo que se une a ADN y que tiñe todos los espermatozoides combinado con un fluorocromo que se une a ADN y que tiñe de forma selectiva los espermatozoides muertos, en el que la muestra o submuestra se combina con un medio estándar de concentración interna, y la determinación de la concentración total de los espermatozoides y la proporción de espermatozoides vivos se realizan de forma simultánea con un medio de detección sensible a la tinción selectiva y al medio de referencia de concentración interna, en el que la determinación de la concentración total de espermatozoides y la proporción de espermatozoides vivos se realizan usando la misma muestra o submuestra y se realizan de forma simultánea en la misma operación de determinación.
2. Un método de acuerdo con la precedente, en el que cualquier dilución de la muestra se ha realizado usando un diluyente que mantiene la viabilidad de los espermatozoides durante la determinación.
3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la tinción selectiva se realiza usando uno o más fluorocromos dando como resultado cualidades fluorescentes que se confieren a espermatozoides vivos y espermatozoides muertos, pudiéndose distinguir la cualidad o cualidades fluorescentes de las células vivas, con los medios de detección, a partir de la cualidad o cualidades fluorescentes de los espermatozoides muertos, y la determinación se realiza mediante recuento selectivo de células de cada cualidad fluorescente.
4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que también se determina la proporción de espermatozoides moribundos, siendo adaptada la tinción selectiva para permitir la distinción, con los medios de detección, entre espermatozoides moribundos, espermatozoides muertos y espermatozoides vivos.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la tinción selectiva se realiza usando uno o más fluorocromos dando como resultado cualidades fluorescentes que se confieren a espermatozoides vivos, espermatozoides muertos y espermatozoides moribundos, pudiéndose distinguir entre sí la cualidad o cualidades fluorescentes de espermatozoides vivos, espermatozoides muertos y espermatozoides moribundos con los medios de detección, y la determinación se realiza mediante recuento selectivo de células de cada cualidad fluorescente.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los fluorocromos comprenden un fluorocromo capaz de teñir de forma selectiva espermatozoides muertos o moribundos, siendo este fluorocromo capaz de entrar en un espermatozoide a través de una membrana plasmática con escapes o defectuosa, pero siendo básicamente incapaz de entrar en un espermatozoide que tiene una membrana plasmática intacta, y otro fluorocromo capaz de teñir todos los espermatozoides, siendo este fluorocromo capaz de entrar en una célula a través de una membrana celular intacta.
7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la excitación de los fluorocromos se realiza por medio de luz en el intervalo de longitud de onda de aproximadamente 488 nm, siendo SYBR-14 el fluorocromo que tiñe todos los espermatozoides, y siendo yoduro de propidio el fluorocromo que tiñe los espermatozoides muertos o moribundos.
8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la excitación de los fluorocromos se realiza por medio de luz en el intervalo de longitud de onda de aproximadamente 543 nm, siendo MPR71292 el fluorocromo que tiñe todos los espermatozoides, y siendo el homodímero 2 de etidio, EHD2, el fluorocromo que tiñe las células muertas o moribundas.
9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el fluorocromo que tiñe todos los espermatozoides se usa en concentraciones totales inferiores a las concentraciones totales estándar aplicadas de forma convencional para tales fluorocromos.
10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el fluorocromo que tiñe todos los espermatozoides se usa en concentraciones totales en el intervalo de 25 a 75 nanomolar.
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el fluorocromo que tiñe todos los espermatozoides se usa en concentraciones totales de aproximadamente 50 nanomolar.
12. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que la tinción de los espermatozoides se realiza a una temperatura inferior a 35 °C.
13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la tinción de los espermatozoides se realiza a una temperatura como máximo de 30 °C.
14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la tinción de los espermatozoides se realiza a una temperatura entre 15 °C y 25 °C.

15. Un método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la tinción de las células se realiza a temperatura ambiente.
- 5 16. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio estándar de concentración interna está formado por partículas de normalización, siendo añadidas las partículas de normalización en un número predeterminado por cantidad en peso o volumen de la muestra o submuestra.
- 10 17. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las partículas de normalización son partículas fluorescentes que tienen una cualidad fluorescente que se puede distinguir de las cualidades fluorescentes de los espermatozoides vivos, espermatozoides muertos, y espermatozoides moribundos.
- 15 18. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio de detección comprende un citómetro de flujo.
- 20 19. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio de detección comprende un citómetro de barrido por láser.
- 25 20. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tamaño y la concentración total de espermatozoides de una submuestra se adaptan de modo que el número de espermatozoides corresponde a entre una décima parte y diez veces el número de partículas de normalización.
- 30 21. Un método de acuerdo con la reivindicación 20, en el que el tamaño y la concentración total de espermatozoides de la submuestra se adaptan de modo que el número de espermatozoides corresponde a entre una cuarta parte y cuatro veces el número de partículas de normalización.
- 35 22. Un método de acuerdo con la reivindicación 21, en el que el tamaño y la concentración total de espermatozoides de la submuestra se adaptan de modo que el número de espermatozoides corresponde a entre la mitad y dos veces el número de partículas de normalización.
- 40 23. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el diluyente es un diluyente que contiene proteína.
- 45 24. Un método de acuerdo con la reivindicación 23, en el que la proteína es BSA.
- 50 25. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el diluyente es un diluyente que contiene alcohol de polivinilo.
- 55 26. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la determinación de la concentración de los espermatozoides y la proporción de espermatozoides vivos se determinan como un valor medio de la determinación de la concentración total de los espermatozoides y la proporción de espermatozoides vivos realizada en dos o más submuestras de una muestra de semen.
- 60 27. Un método para predecir la probabilidad de fertilizar un animal hembra mediante inseminación artificial con una dosis de inseminación, que comprende la determinación de la concentración total de espermatozoides en la muestra de semen a partir de la cual se toma o se va a tomar la dosis de inseminación, y la proporción de espermatozoides vivos en la misma con un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-26, y que incluye la concentración total de los espermatozoides determinada de este modo en la muestra de semen y la proporción de espermatozoides vivos en la misma, o la concentración, que se puede calcular a partir de la misma, de espermatozoides vivos en la muestra, en los parámetros sobre cuya base se predice la probabilidad de fertilizar al animal.
- 65 28. Un método de acuerdo con la reivindicación 27, en el que la probabilidad de fertilizar al animal hembra se predice sobre la base de la concentración total determinada de los espermatozoides en la muestra de semen y la proporción de espermatozoides vivos en la misma, o la concentración, que se puede calcular a partir de la misma, de espermatozoides vivos en la muestra.
29. Un método de acuerdo con la reivindicación 27 o 28, en el que la predicción de la probabilidad de fertilizar al animal hembra se realiza sobre la base de correlaciones estadísticamente significativas entre datos de fertilidad obtenidos en experimentos de inseminación con varios animales hembra y datos que indican la concentración total de los espermatozoides en la muestra de semen usada en los experimentos de inseminación y la proporción de espermatozoides vivos en la misma, y/o datos que indican la concentración de espermatozoides vivos en la misma.
30. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27-29, en el que el animal hembra es un animal múltiparo, y también se predice el número de crías que resultan de la fertilización.
31. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27-30, en el que la muestra de semen es un

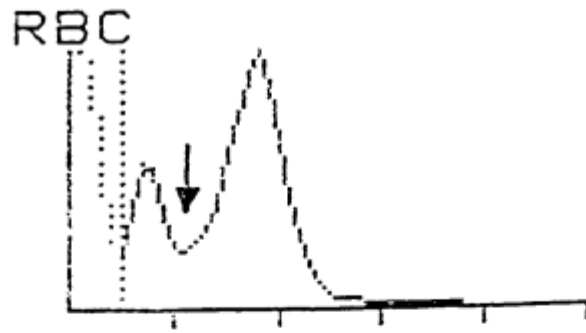
eyaculado recién obtenido.

32. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27-31, en el que la muestra de semen es una dosis de inseminación congelada, siendo la muestra descongelada antes de someterla al método de determinación.

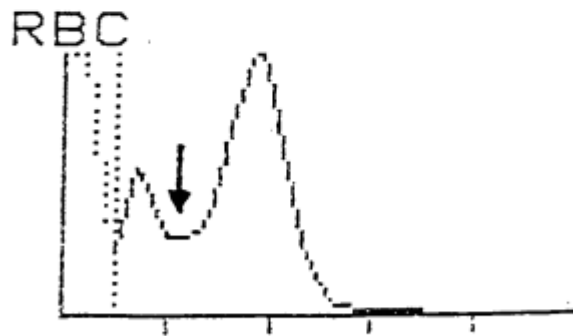
5 33. Un método de acuerdo con la reivindicación 32, en el que los datos obtenidos con el método de determinación realizado en el eyaculado recién obtenido a partir del que se tomó la dosis de inseminación se incluyen en conjunto con datos obtenidos con el método de determinación realizado en la dosis de inseminación.



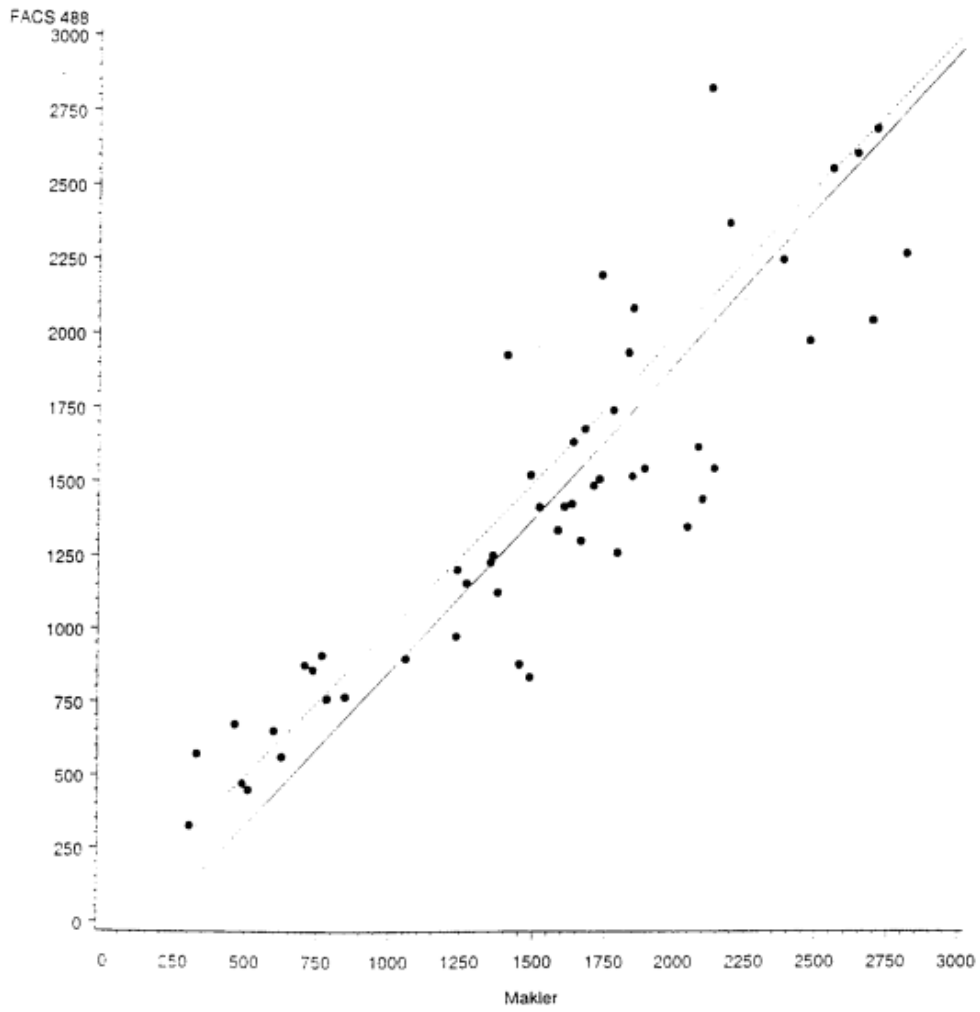
**Fig. 1**



**Fig. 2A**

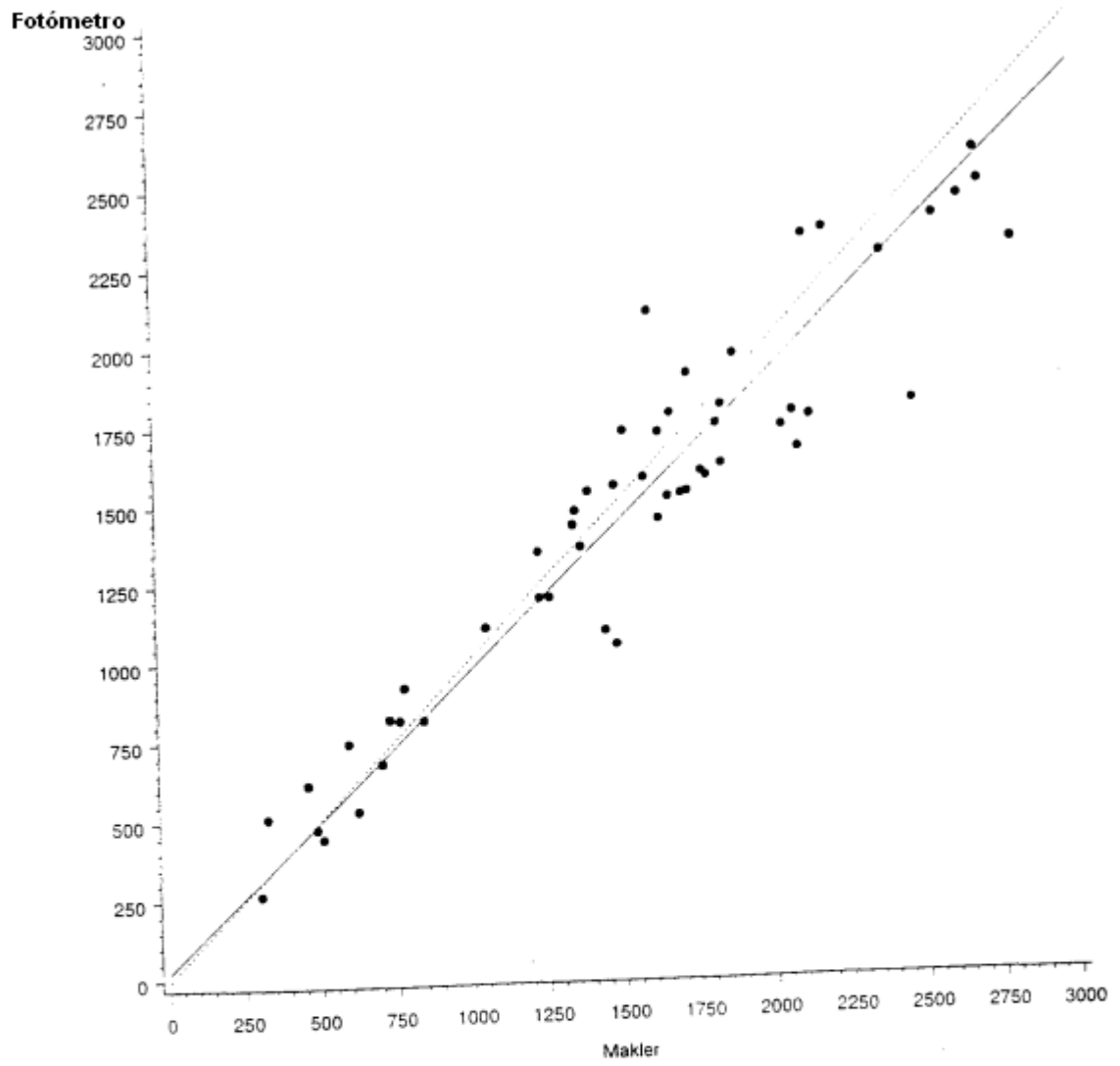


**Fig. 2B**



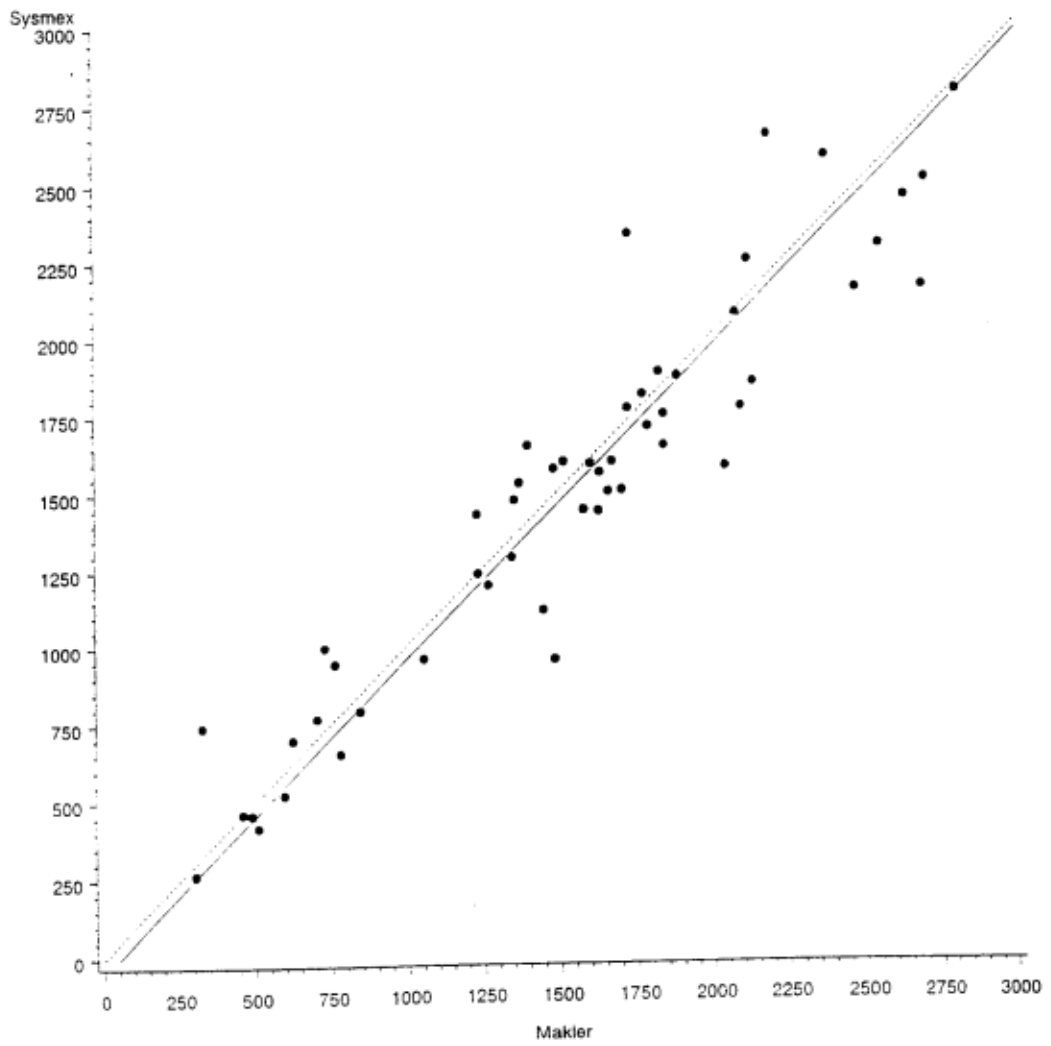
**Fig. 3**



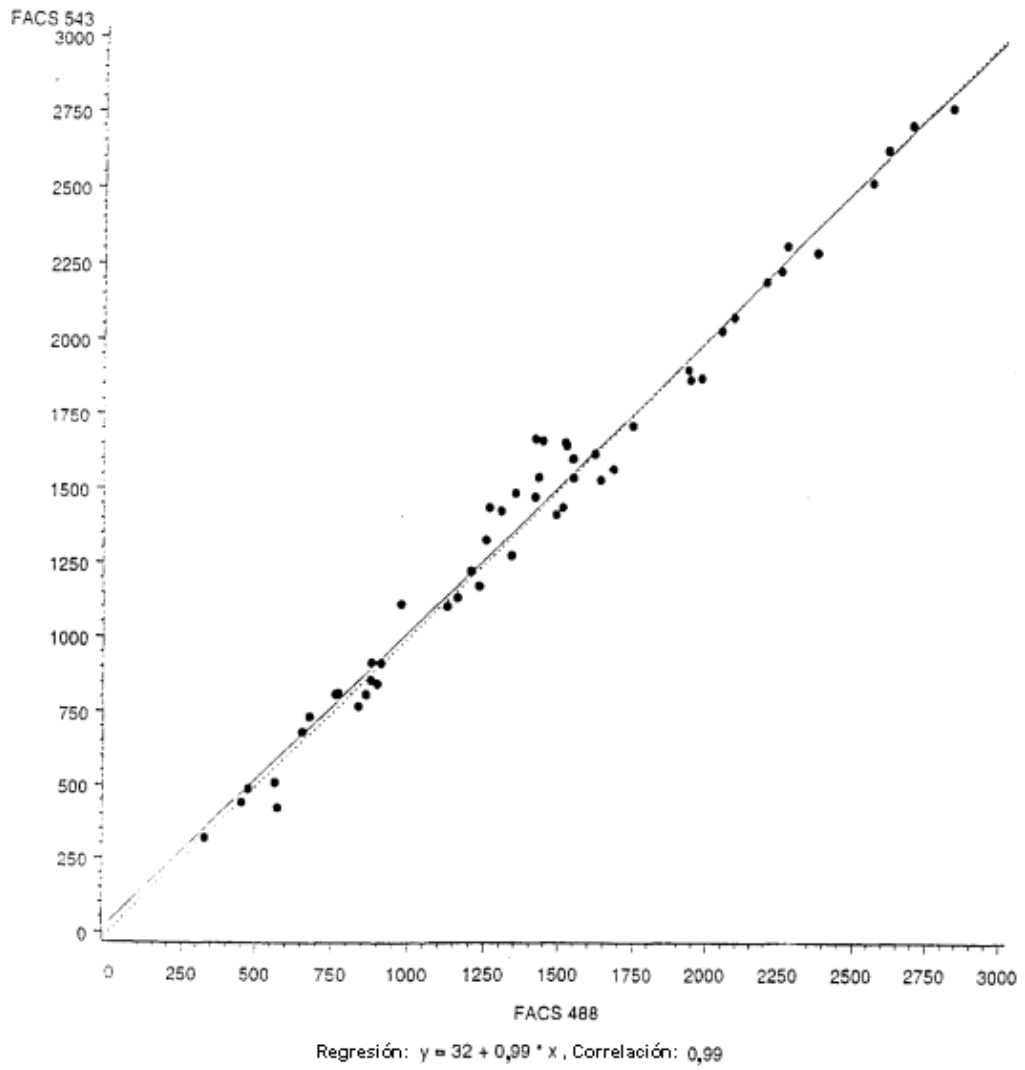


**Fig. 5**





**Fig. 6**



**Fig. 7**