

REAL ACADEMIA DE DOCTORES DE ESPAÑA

**NUEVOS Y ANTIGUOS RETOS DE LA
ESPERMATOLOGÍA VETERINARIA**

**DISCURSO PRONUNCIADO POR EL
EXCMO. SR. DR. D. JOSÉ JULIÁN GARDE LÓPEZ-BREA**

**EN EL ACTO DE SU TOMA DE POSESIÓN
COMO ACADÉMICO DE NÚMERO
EL DÍA 26 DE ABRIL DE 2017**

**Y CONTESTACIÓN DEL ACADÉMICO DE NÚMERO
EXCMO. SR. DR. D. ARTURO RAMÓN ANADÓN NAVARRO**



MADRID

MMXVII



Ediciones de la Universidad
de Castilla-La Mancha

Cuenca, 2017

NUEVOS Y ANTIGUOS RETOS DE LA ESPERMATOLOGÍA VETERINARIA

EXCMO. SR. DR. D. JOSÉ JULIÁN GARDE LÓPEZ-BREA

REAL ACADEMIA DE DOCTORES DE ESPAÑA

**NUEVOS Y ANTIGUOS RETOS DE LA
ESPERMATOLOGÍA VETERINARIA**

**DISCURSO PRONUNCIADO POR EL
EXCMO. SR. DR. D. JOSÉ JULIÁN GARDE LÓPEZ-BREA**

**EN EL ACTO DE SU TOMA DE POSESIÓN
COMO ACADÉMICO DE NÚMERO
EL DÍA 26 DE ABRIL DE 2017**

**Y CONTESTACIÓN DEL ACADÉMICO DE NÚMERO
EXCMO. SR. DR. D. ARTURO RAMÓN ANADÓN NAVARRO**



MADRID

MMXVII



Ediciones de la Universidad
de Castilla-La Mancha

Cuenca, 2017

Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación solo puede ser realizada con la autorización de EDICIONES DE LA UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA salvo excepción prevista por la ley.

Diríjase a CEDRO (Centro Español de Derechos Reprográficos – www.cedro.org),
si necesita fotocopiar o escanear algún fragmento de esta obra.

- © de los textos: José Julián Garde López-Brea.
- © de la edición: Universidad de Castilla-La Mancha.

Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Castilla-La Mancha.

Colección EDICIONES INSTITUCIONALES nº 123



Esta editorial es miembro de la UNE, lo que garantiza la difusión y comercialización de sus publicaciones a nivel nacional e internacional.

I.S.B.N.: 978-84-9044-283-8 (Edición impresa)

D.O.I.: <http://doi.org/10.18239/ins.123.2017> (Edición digital)

D.L.: CU 108-2017

Hecho en España (U.E.) – *Made in Spain (U.E.)*

A la memoria de mi hermano Juan Carlos

A Yolanda

A nuestro hijo, Juan Carlos

“Si he logrado ver más lejos, ha sido porque he subido a hombros de gigantes”

Bernardo de Chartres (Siglo XII)

INDICE

Discurso de Ingreso del Académico de Número Excmo. Sr. Dr. D. José Julián Garde López-Brea	13
Palabras de salutación	15
Mi predecesor	17
El discurso: Nuevos y antiguos retos de la Espermatología Veterinaria	19
Justificación del tema elegido	19
Introducción	23
El espermatozoide objeto de estudio de la espermatología	26
Espermatozoides y técnicas de reproducción asistida	30
Limitaciones de la espermatología veterinaria	52
Oportunidades para el estudio de aspectos reproductivos básicos	57
Nuevo enfoque para resolver el problema de la criopreservación espermática	62
A modo de conclusión	67
Agradecimientos	67
Selección bibliográfica	75
Discurso de contestación del Académico de Número Excmo. Sr. Dr. D. Arturo Ramón Anadón Navarro	105

**DISCURSO DE INGRESO DEL ACADÉMICO ELECTO
EXCMO. SR. DR. D. JOSÉ JULIÁN GARDE LÓPEZ-
BREA**

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia de Doctores de España,
Excelentísimas Señoras Académicas,
Excelentísimos Señores Académicos,
Excelentísimas e Ilustrísimas autoridades,
Señoras y Señores,
Querida Familia y Amigos,

Me siento extraordinariamente honrado porque la Real Academia de Doctores de España haya aprobado con generosidad, reconocerme y aceptarme entre sus Académicos de Número, nombramiento al que espero corresponder como de mí se espera. No obstante, no debo ocultarles que la satisfacción y hasta el legítimo orgullo que tal honor me depara se equilibra, en parte, con la preocupación que me produce el considerar la responsabilidad que asumo en estos momentos al compartir un sitio en esta ilustre Corporación, por la relevancia y prestigio de las personalidades que la integran y han integrado.

“De gente bien nacida es agradecer los beneficios que recibe”, narra D. Miguel de Cervantes Saavedra, en el capítulo XXII de la primera parte del Ingenioso Hidalgo Don Quijote de la Mancha. Viniendo yo de la Mancha, y siendo seguro bien nacido, porque ello se lo debo enteramente a mis generosos padres, en primer lugar, quisiera, en el día de hoy manifestar mi gratitud a todos ustedes, señoras y señores académicos, por haberme permitido pasar a formar parte de esta Institución, que representa uno de los máximos exponentes de las Ciencias, las Letras y las Artes de nuestro país. Quiero, asimismo, agradecer, por su confianza y apoyo, a los Académicos que avalaron generosamente mi candidatura para la vacante en la Sección de Veterinaria, el Excmo. Sr. Dr. D. Guillermo Suárez Fernández, la Excma. Sra. Dra. D^a María Cascales Angosto, y, muy

especialmente, al Excmo. Sr. Dr. D. Antonio Bascones Martínez quién, además, tuvo la deferencia y el compromiso de presentarme ante todos ustedes en la sesión plenaria de esta Corporación en la que se decidió el destino, para los próximos años, de la medalla número 60 que a partir de hoy ostentaré en mi calidad de académico de número de la Real Academia Nacional. Agradecido estoy y estaré permanentemente al Excmo. Sr. Dr. D. José Antonio Rodríguez Montes, quién sin apenas conocerme, me apoyo, asesoró y orientó de una manera generosa y sin fisuras durante todo el proceso de ingreso en esta ilustre Institución. También es de justicia reconocer, y así debo y quiero hacerlo, el apoyo expreso y manifiesto a mi candidatura del Excmo. Señor D. Luis Mardones Sevilla y del Excmo. Sr. D. Amalio de Juana Sardón, presidente en aquel momento de la Sección de Veterinaria. Deseo igualmente mostrar mi más sincera gratitud al Excmo. Sr. Dr. D. Arturo Ramón Anadón Navarro por acceder a la solicitud de esta Institución para hacerme la *laudatio* de contestación al preceptivo discurso de ingreso, agradeciéndole igualmente su constante interés y apoyo en la propuesta para mi ingreso en esta Real Academia; le estoy además muy reconocido por su amistad, afecto personal y respeto que me ha mostrado desde que nos conocemos. Hago extensivo mi agradecimiento a cuantos Académicos me otorgaron su voto, debo a todos ellos la distinción y relevancia que supone ocupar un sitio en esta Corporación.

Igualmente, quiero manifestar ante ustedes que supone para mí una enorme ilusión el poder compartir con quienes fueron mis profesores en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, las tareas académicas de reflexión, debate y profundización dentro del ámbito de actuación de esta Academia. Además, me resulta muy revelador que precisamente algunos de mis profesores, me hayan otorgado su confianza para ocupar un lugar entre ustedes.

Dentro de este brillante elenco de docentes a los que me he referido anteriormente, quisiera hacer una mención especial a cuatro de ellos, ya

que sus lecciones, consejos y cualidades vinieron a marcar desde el inicio de mis estudios de la Licenciatura en Veterinaria mi vida profesional, y despertaron mi interés por el fascinante mundo de la Investigación aplicada a las Ciencias Veterinarias. Me estoy refiriendo a los Excelentísimos Señores D. Félix Pérez y Pérez, D. Albino García Sacristán, D. Elías Rodríguez Ferri, y D. Guillermo Suárez Fernández. Unas líneas aparte merece el Profesor Guillermo Suárez Fernández, al que quiero y debo mostrar mi agradecimiento más especial, cariñoso y sincero, porque siempre me ha avalado, acompañado, asesorado y porque además ha sido para mí, desde el principio de los tiempos, un ejemplo de muchos y grandes valores profesionales y humanos, entre todos estos, me permito destacar dos fundamentales: la honestidad y la generosidad. Conocí a D. Guillermo siendo yo estudiante de segundo curso de la licenciatura de Veterinaria de la UCM, y siendo él por aquellos años Decano de la Facultad. Constaté, entonces, su gran personalidad, y su eficacia al dirigir una institución cuyo reto era modernizarse e igualarse con sus homólogas europeas, lo cual logró. El gran bagaje científico del Don Guillermo Suárez y su visión de que solo la Ciencia de calidad es universal, atrajo en torno a su figura a un excepcional plantel de jóvenes investigadores veterinarios formados en los centros de investigación más prestigiosos del mundo. Gracias, Don Guillermo, por haber sabido crear el ambiente de calidad necesario para poner las bases del siglo XXI en nuestra Facultad.

MI PREDECESOR

Quisiera tener un respetuoso recuerdo para quien sucedo, el Dr. D. Benito Mateos Nevado que ostentó la medalla número 60 de la sección de Veterinaria de esta Real Academia Nacional durante casi 15 años. Es tradición y costumbre al uso, realizar una mención expresa al Académico que a uno le ha precedido en la medalla que ustedes me confieren. No

tuve la oportunidad de conocer al Dr. Mateos Nevado personalmente, pero si he podido comprobar a través de su obra y referencias, que fue un académico ejemplar y, humildemente, espero ser digno de lo que representa ostentar esta medalla. Mi agradecimiento a quienes, junto al Prof. Mateos Nevado, lograron contribuir a la consolidación de una Academia como la que hoy conocemos. Hace casi 20 años, el Prof. Mateos Nevado dictaba en esta Academia su discurso de ingreso titulado: **“El hombre y su alimentación desde su origen al calculítico”**.

El Dr. Mateos Nevado Artero nace en El Real de la Jara, Sevilla, el 18 de julio de 1933; y fallece en Sevilla, el 27 de octubre de 2013. Fue: Veterinario del Cuerpo Nacional Veterinario. Premio Extraordinario de Licenciatura. Premio Nacional Fin de Carrera. Premio Nacional de Doctorado. Premio Miguel de Cervantes. Investigador del CSIC. Profesor Numerario de Universidad de Sevilla. Doctor en Veterinaria por la Facultad de Córdoba. Licenciado en Farmacia por la universidad Complutense de Madrid. Óptico y optómetra por la Universidad Central de Barcelona. Diplomado en Patología Ocular por la Universidad de Granada. Expresidente del Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Sevilla. Fundador y Presidente de la Real Academia Sevillana de Ciencias Veterinarias de Andalucía Occidental, a la que sirvió durante 37 años como presidente. Y medalla de Oro de la Real Academia Sevillana de Ciencias Veterinarias de Andalucía Occidental.

Además, de académico de número de esta Corporación, fue también: Académico de Honor de la Real Academia Nacional de Veterinaria; de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental; de la Real Academia de Córdoba de Ciencias, Bellas Letras y Nobles Artes; de la Real Academias de Bellas Artes Santa Isabel de Hungría de Sevilla; de la Academia de Ciencias Veterinarias de Valencia; y de la Academia de Ciencias Veterinarias de Barcelona.

Además, desempeñó numerosos cargos de responsabilidad en la administración local, autonómica y estatal.

Autor de dos Libros, coordinador de 21 libros y autor de diferentes capítulos en 20 libros. Autor de numerosos trabajos de investigación en revistas nacionales e internacionales y de numerosas comunicaciones y ponencias en Congresos Nacionales e Internacionales.

¿Cuál sería el colofón final a esta breve exposición de los méritos de mi predecesor? Yo diría que es la historia muy resumida y mal hilvanada por mí, de un hombre de firmes convicciones, de voluntad decidida, que con tesonera laboriosidad consiguió abrir el camino que desde siempre tenía trazado, a pesar de las grandes dificultades que a ello se oponían. La fe y esperanza que mantuvo le condujeron finalmente al lugar que siempre deseaba. Buen ejemplo para tantos que se amilanan y desaniman con los primeros tropiezos y no saben, o no quieren, mantener a ultranza una ilusión y transformarla al fin en una realidad vivificante. No aspiro yo a ocupar esa vacante a alcanzar el prestigio de que goza el Dr. Mateos Nevado.

Concluyo mi presentación, pero no el capítulo de agradecimientos, al que retornaré más adelante, ya que queda pendiente la mención de personas y compañeros que han sido fundamentales en el desarrollo de mi trayectoria profesional y personal.

Con su permiso y sin más dilación, voy a abordar el tema de mi discurso de ingreso.

EL DISCURSO: NUEVOS Y ANTIGUOS RETOS DE LA ESPERMATOLOGÍA VETERINARIA

JUSTIFICACIÓN DEL TEMA ELEGIDO

La elección del tema de un discurso no es fácil, tampoco lo ha sido en esta ocasión. He pues que me encontré hace unos meses ante la difícil tarea

de elegir un tema para mi ingreso en esta Real Academia. Pensé inicialmente en algo afín a lo que ha venido siendo mi actividad profesional principal en los últimos cinco años como Vicerrector de Investigación y Política Científica de la Universidad de Castilla-La Mancha: ***la financiación de la I+D+i en el marco de las políticas europeas, nacionales y regionales de investigación y desarrollo***, pero pronto me di cuenta de que tratando este tema podría caer en el riesgo de elaborar un discurso demasiado teórico y tal vez, un tanto impersonal, además de con un cierto trasfondo pesimista. He de reconocer en este momento, porque así corresponde hacerlo, que las conversaciones mantenidas con los académicos de Número, el Excmo. Sr. Dr. D. Pedro Rocamora García-Valls y el Excmo. Sr. Dr. D. Emilio Espinosa Velázquez, presidente de la Sección de Veterinaria, fueron de una influencia vital sobre la decisión final adoptada. Los discursos de ingreso han representado y representan el compromiso formal que, a lo largo de los tiempos, han hecho tribuna de cultura a la vez que reflejo de la personalidad investigadora y humana de los Académicos de Número de la Real Academia Nacional de Doctores de España, ya que reflejan su particular concepto de la temática propia y específica de su área de competencia, a la vez que incorporan la individual y responsable aportación al desarrollo y mejor conocimiento del magisterio universitario de su autor. Así, tras sopesar diversas opciones, decidí abordar un tema relacionado con mi línea principal de investigación desde hace ya más de 25 años: la ***Espermatología y sus aplicaciones a las Ciencias Veterinarias***. Además, y si bien en otras ocasiones habría elegido para un discurso de esta naturaleza, sin necesidad de más justificaciones, aspectos de mi investigación sobre el gameto masculino, que tantas satisfacciones me ha producido en largas horas de laboratorio y en donde he podido aprender de mis maestros, pero también de quienes nos suceden; decidí abordarlo para un acto como el de hoy por, al menos, otros tres motivos reseñables:

1. Para contribuir a rendir un pequeño homenaje académico y científico a la figura del Dr. Pérez-García, Académico de esta corporación hasta que falleció ahora hace cuatro años, uno de los pioneros de la inseminación artificial ganadera en España. Además, D. Tomás fue director del Patronato de Biología Animal, en cuyos laboratorios e instalaciones se impulsó de manera decisiva en base a un desarrollo científico profundo la inseminación artificial ganadera en nuestro país. Lugar, el Patronato como tal, o más tarde como Departamento de Reproducción Animal del INIA, al que ha estado vinculada, de alguna manera, la formación de los grandes espermatólogos veterinarios de nuestro país, entre los cuales humildemente quisiera incluirme, no tanto por mis méritos, sino por mi maestra, la que fue mi directora de tesis la Dra. Isabel Vázquez.
2. Para poner en valor la actividad investigadora de grupos de investigación que llevan trabajando en nuestro país en esta temática desde hace más de 35 años, y que aportan constantemente grandes avances de trascendencia científica internacional desde la Espermatología española. Grupos de excelencia científica, con gran proyección internacional, y con una alta capacidad para la formación de jóvenes investigadores y para la publicación de artículos científicos en revistas internacionales de alto impacto. Grupos que, además, han realizado una investigación básica de calidad que ha acabado aplicándose al sector ganadero, transfiriendo una parte muy importante del conocimiento generado a empresas e industrias nacionales e internacionales.
3. Para poder ilustrar, el mismo, con los resultados más relevantes encontrados por nuestro grupo de investigación en esta materia científica. Los mayores esfuerzos investigadores en los últimos quince años de mi carrera se han centrado en el estudio y en la

aplicación de la Biotecnología Espermática a la gestión y conservación de especies silvestres de mamífero. En concreto gran parte de estos esfuerzos y proyectos se han desarrollado en el ciervo y entre la amplia variedad de aspectos posibles de ser tratados con la rigurosidad científica necesaria, hemos obtenido resultados, empleando estas especies silvestres como modelo, que considero han contribuido al conocimiento y avance de la Espermatología veterinaria en nuestro país. Además, los hallazgos encontrados durante el estudio de los parámetros espermáticos de las poblaciones naturales de ciervo, han tenido una enorme importancia para la identificación de mecanismos reproductivos básicos que no habían sido identificados en especies ganaderas o en la especie humana. Estos resultados serán brevemente comentados al final de este discurso.

Todos los argumentos expuestos, fueron los que me llevaron a inclinarme por la Espermatología como tema para mi discurso de ingreso en el día de hoy, dejando para otro momento de esta Academia el abordaje de las políticas públicas de I+D+I y su relación con las actuales tendencias de financiación de la Investigación y el Desarrollo en el actual contexto de la Unión Europea, fruto de la experiencia de mis últimos 5 años en el mundo de la política científica y la gestión universitaria.

La labor de investigación que pasaré a presentarles a continuación es obviamente una obra conjunta, tal como queda refrendado en los listados de autores de las referencias que la avalan. Además, algunos de los resultados que narraré son fruto de la colaboración entre nuestro grupo de investigación de la Universidad de Castilla-La Mancha, y otros cuatro grupos de investigación nacionales. Me estoy refiriendo a los grupos de Ecología y Biología Reproductivas del Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), liderado por el Dr. Roldan; al Grupo de Investigación en Técnicas de Reproducción Asistida de la Universidad de León, liderado

por el Dr. Anel; al Grupo de Investigación de Reproducción Animal de la Universidad de Murcia, liderado por el Dr. Martínez; y al Grupo de Espermatología y criopreservación del INIA, liderado por el Dr. Santiago-Moreno. A todos ellos, y a los integrantes de sus respectivos equipos les agradezco su entrega y compromiso. Además, a ellos cuatro, les agradezco su especial amistad.

Así me encuentro ante este Excelentísimo auditorio con este tema que he titulado: ***Nuevos y antiguos retos de la Espermatología Veterinaria.***

INTRODUCCIÓN

La Espermatología engloba el estudio científico de los espermatozoides y de las secreciones seminales, analizando entre otros, aspectos relativos a su Histología, Fisiología y Embriología. Igualmente contempla la aplicación de los diferentes procesos tecnológicos que permiten el empleo y la manipulación de los gametos masculinos por medio de las diferentes técnicas de reproducción asistida. La Espermatología Veterinaria hace referencia a la aplicada al estudio, conservación y manipulación de los gametos masculinos de las especies de interés ganadero o zootécnico.

Actualmente, es sobradamente reconocido por la comunidad científica internacional que el espermatozoide es una célula altamente especializada y diferenciada que para cumplir su función debe, después de ser eyaculado, experimentar una serie de cambios en el aparato genital femenino que le aporten su capacidad fecundante. Estos cambios se conocen con el nombre de capacitación espermática y van a desencadenar a su vez, otras dos modificaciones sobre el gameto masculino, la hiperactivación y la reacción acrosómica.

No obstante, conviene recordar que el término esperma deriva del griego “sperma” que significa semilla. En 1637, fue el comerciante holandés Antonie van Leeuwenhoek el primero en reconocer espermatozoides vivos

en los eyaculados y en documentar que los mismos tenían cabeza y cola móvil, y lo hizo con el uso de lentes y microscopios artesanales. Aunque tal hallazgo, resulto inicialmente muy controvertido, el mismo permitió el desarrollo de la teoría celular. Teoría que promulgó que los organismos vivos estaban constituidos por células, que las nuevas células eran generadas como consecuencia de la división de las antiguas, y que las células constituían los elementos esenciales y básicos de la estructura de los tejidos, órganos y organismos. Posteriormente, en 1694, otro microscopista holandés, Nicolaas Hartsoeker, empleando las lentes diseñadas por su compatriota, y debido a la poca resolución de las mismas, intuyó reconocer que las cabezas de los espermatozoides eran hombres completos en miniatura, a los que denominó “homúnculos” o “animáculos”. Este hecho potenció y reavivó la teoría Espermista dentro del Preformacionismo para explicar la generación de los nuevos individuos. Esta teoría biológica defendía que el desarrollo del embrión procedía del crecimiento de un individuo que ya estaba preformado, en este caso en el espermatozoide. Casi 200 años más tarde en 1876, Oscar Hertwig, un zoólogo alemán fue el primero en describir el proceso de la fecundación, empleando para ello el modelo del erizo de mar. La fecundación es el proceso por el cual dos gametos haploides, el espermatozoide y el ovocito, se unen para producir un nuevo individuo genéticamente distinto a sus progenitores. Este hallazgo, entre otros, fue el responsable de que la anterior teoría dejara de tener vigencia. Setenta y cinco años más tarde, se describió que los espermatozoides de la mayoría de las especies de mamíferos, madurados en el epidídimo y eyaculados no estaban aún capacitados para fecundar. Dicha capacidad la adquieren, después de permanecer durante algún tiempo en el tracto genital femenino y experimentar una serie de cambios que afectan a la composición y estructura de su membrana plasmática. Este fenómeno fue referido inicialmente por Chang y Austin, en 1951, de forma independiente; siendo denominado por este último como capacitación espermática. Hasta finales

de la década de los sesenta la capacitación se definía como el tiempo que los espermatozoides debían residir en el aparato genital de la hembra para poder atravesar las distintas envolturas que recubren al ovocito y fusionarse con él. Actualmente se sabe que la capacitación es un proceso de desestabilización de las membranas espermáticas con eliminación o alteración de sustancias adsorbidas o integradas en la membrana plasmática, que ocasiona un influjo de bicarbonato y calcio al interior de la célula espermática. Estas modificaciones originadas durante la capacitación van a desencadenar dos hechos imprescindibles para la fecundación. En primer lugar, se produce un cambio en el patrón de movimiento, incrementándose la actividad del flagelo espermático, acontecimiento que fue descrito por primera vez en el hámster dorado por Yanagimachi en 1970, el cual lo denominó hiperactivación. En cuanto al segundo aspecto consecuente a la capacitación, la liberación del contenido del acrosoma mediante un proceso de exocitosis denominado reacción acrosómica fue descrito por primera vez en 1967 por Barros y colaboradores, e implica la formación de múltiples puntos de fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, originándose: la formación de pequeñas vesículas, la eliminación de la matriz acrosomal y la exposición de la membrana acrosomal interna.

Por otra parte, el desarrollo del microscopio convencional permitió el estudio de las muchas diferencias en tamaño y forma de los espermatozoides de diferentes organismos, pero no fue hasta el desarrollo de la microscopía electrónica cuando se relató con gran precisión la naturaleza y organización de los componentes del espermatozoide. A su vez, se han ido desarrollando estudios bioquímicos que han permitido identificar las enzimas responsables de la producción de energía necesaria para el movimiento del flagelo, así como la mayoría de proteínas del acrosoma, núcleo y flagelo.

EL ESPERMATOZOIDE OBJETO DE ESTUDIO DE LA ESPERMATOLOGIA

El espermatozoide es, por tanto, el producto final del proceso de espermatogénesis, producido a través de sucesivas fases mitóticas, meióticas y post-meióticas en los túbulos seminíferos de los testículos. Aún, existiendo excepciones, por lo general el espermatozoide se divide en dos partes bien diferenciadas e independientes: la cabeza y el flagelo. Este último a su vez se divide en cuello, pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal. Por tanto, si por algo se caracterizan las células espermáticas es por la gran compartimentación de su estructura. El espermatozoide tiene una morfología polarizada y su superficie está muy diferenciada y subdividida en regiones que se diferencian en composición y función. La polarización entre la cabeza y el flagelo es su división más evidente.

En esta sección del discurso detallaremos la estructura del espermatozoide, su composición y los mecanismos que regulan su función. Concretamente nos centraremos en la organización y composición de la cabeza y la cola espermáticas.

Cabeza Espermática

La cabeza del espermatozoide de mamífero contiene el núcleo y el acrosoma rodeado de componentes del citoesqueleto y el citoplasma. El acrosoma rodea la parte apical del núcleo y entre este último y el acrosoma y entre el acrosoma y la membrana hay, citoplasma y citoesqueleto.

Aunque en la mayoría de las especies los espermatozoides son uniformes en forma y tamaño, en los humanos más de un tercio de los espermatozoides son anormales.

En cuanto al núcleo espermático, en el espermatozoide la cromatina está altamente condensada, hasta trece veces más que en el ovocito y el volumen nuclear es considerablemente menor que en las células somáticas, aproximadamente en un 15%.

En relación a las proteínas nucleares, los espermatozoides de mamífero tienen dos tipos importantes: protaminas e histonas. Las protaminas son las predominantes y están compuestas entre 27 y 65 aminoácidos, siendo ricas en aminoácidos básicos como la arginina y la cisteína. En humanos y en ratón hay dos tipos de protaminas que son esenciales para la fecundación.

En el espermatozoide maduro, la replicación y transcripción terminan cuando se sustituyen las histonas por dos tipos de protaminas: P1 y P2, respectivamente. Además de inactivar las funciones del ADN, la incorporación de las protaminas permite un empaquetamiento mayor, haciendo que el núcleo espermático tenga un volumen estimado de aproximadamente la sexta parte del núcleo de una célula somática. Una vez que el núcleo del espermatozoide ha entrado en el ovocito, el ADN tan altamente empaquetado debe descondensarse.

En los últimos años, se ha demostrado que en el espermatozoide también hay ARN. Así, se ha evidenciado en espermatozoides eyaculados de ratón, hombre y toro la presencia de ARNm, ARN antisentido y microARNs.

El flagelo espermático

Los componentes principales del flagelo son el axonema, las mitocondrias, las fibras densas externas y la vaina fibrosa. El movimiento del flagelo está producido por la flexión de su eje, llamado axonema. El axonema está formado totalmente por microtúbulos y por sus proteínas asociadas, estando constituido por dos microtúbulos sencillos rodeados por nueve microtúbulos dobles. Cada miembro del par de microtúbulos sencillos (el

par central) es un microtúbulo completo pero cada uno de los dobletes exteriores está compuesto por un microtúbulo completo y un microtúbulo parcial fusionados (microtúbulos A y B), de tal forma que ambos comparten una pared común. Los microtúbulos están compuestos por dímeros de β -tubulina (56 KDa) y α -tubulina (54 KDa). Los microtúbulos del axonema están asociados a proteínas, entre la que destaca la dineína, cuyas cabezas interaccionan con los microtúbulos adyacentes y generan una fuerza de deslizamiento entre microtúbulos. La dineína tiene un dominio motor que hidroliza ATP para desplazarse a lo largo del microtúbulo y una cola que transporta carga. Otras proteínas asociadas son las Tektinas, proteínas del citoesqueleto asociadas a microtúbulos y que se expresan en las espermátidas. Al menos se han identificado 5 tektinas en los espermatozoides de mamífero. Por ejemplo, la TEKT2 se localiza en el axonema de tal modo que alteraciones en el gen que codifica para esta proteína dan lugar a ratones estériles por poseer espermatozoides con flexión flagelar y motilidad reducida.

Las mitocondrias espermáticas son alargadas, aplanadas y dispuestas en circunferencia de extremo a extremo formando una vaina helicoidal que se enrolla alrededor de las fibras densas. El número de hélices, de vueltas en espiral y de longitud de la pieza intermedia varía entre especies. La organización de la vaina mitocondrial es uniforme en la mayoría de las especies, pero el número preciso de mitocondrias difiere entre especies. En la vaina mitocondrial existen otras proteínas que favorecen el mantenimiento normal de su estructura como la glutatión peroxidasa. La SPATA19 (spergin1) se localiza en la pieza intermedia y está asociada a la vaina mitocondrial como una molécula adhesiva.

Las fibras densas externas son estructuras del citoesqueleto que solamente se encuentran en las colas espermáticas de los vertebrados. Son importantes para la estabilidad de la cola, así como apoyan el batido flagelar, pero no parecen estar involucradas en la motilidad de forma activa. Se trata de nueve fibras localizadas entre la vaina mitocondrial y el

axonema en la pieza intermedia rodeadas por la vaina fibrosa en la pieza principal. Las fibras recorren longitudinalmente la longitud de la pieza intermedia y la mayor parte de la pieza principal del flagelo, y se unen al doblete de microtúbulos del axonema. Las fibras densas externas (ODF) están constituidas por dos proteínas principales (ODF1 y ODF2), que a su vez están asociadas a otras muchas. Además, rodeando a las fibras densas externas, se encuentran las fibras satélites que parecen separar la estructura de las ODF. La función de las fibras densas externas es mejorar la flexión de la cola y/o la protección de la cola del espermatozoide contra las fuerzas de cizalladura encontradas durante su paso por el epidídimo, transporte y eyaculación. Son importantes también para la estabilidad y el retroceso elástico de la cola de los espermatozoides, así como para el apoyo del batido flagelar, pero no están involucradas en la motilidad activa.

El anillo de Jensen está localizado en la unión entre la pieza intermedia y la pieza principal del espermatozoide maduro. Es esencial para la estructura y la integridad mecánica del flagelo.

La vaina fibrosa define la extensión de la pieza principal, con diferencia el segmento más largo del flagelo. Es una estructura del citoesqueleto que es, probablemente única en el flagelo de espermatozoides de mamíferos y en los de algunas aves. Situada justo bajo la membrana plasmática y unida al anillo, es un cilindro que se va estrechando formado por dos columnas longitudinales conectadas por nervios en circunferencia. Las columnas están formadas por estructuras filamentosas orientadas longitudinalmente que discurren unidas a las fibras 3 y 8. En cuanto a su composición, la vaina fibrosa es muy resistente y contiene puentes disulfuro que contribuyen a su estabilización. Parece ser que hay más de 20 proteínas que están localizadas en la vaina o cerca de ella en los espermatozoides de mamíferos. En cuanto a su función, la vaina fibrosa sirve como una estructura mecano-elástica implicada en dar forma a la onda flagelar. Además, sirve de estructura para las enzimas glucolíticas y los componentes de la cascada de señalización mediada por la

fosforilación de tirosinas, desempeña un papel en la regulación de la motilidad espermática, y participa en la maduración, capacitación e hiperactivación.

ESPERMATOZOIDES Y TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Desde hace muchas décadas, viene resultando de interés utilizar por medio de diferentes técnicas de reproducción asistida, espermatozoides de mamífero sometidos a diferentes procedimientos tecnológicos. Los motivos (zootécnicos, sanitarios, de manejo, conservacionistas y de bienestar animal) por los que los espermatozoides han sido procesados, manipulados y empleados en diferentes procesos biotecnológicos en el pasado, siguen teniendo vigencia en el Siglo XXI. Entre los procedimientos tecnológicos a los que se puede someter a los espermatozoides podemos citar los siguientes: refrigeración, congelación, sexado, enriquecimiento, y a veces a varios de ellos de forma casi simultánea. Todos ellos con aplicaciones de gran alcance para la conservación de la biodiversidad animal y para la producción y mejora genética en especies de interés económico. Sin embargo, los espermatozoides son células muy especializadas y a la vez muy sensibles. Por ello, todos los procedimientos tecnológicos anteriormente citados producen daños, a veces microlesiones, en los espermatozoides, que sin duda afectan a sus propiedades, pudiendo comprometer al final su capacidad fecundante y, por tanto, el proceso reproductivo.

Existe una gran variedad de biotecnologías reproductivas desarrolladas hasta el presente o en proceso de desarrollo que contemplan el empleo de espermatozoides. Las tecnologías más desarrolladas en animales incluyen la obtención y congelación del semen, la inseminación artificial, y la fecundación *in vitro*. A continuación, se describe brevemente el estado actual de todas ellas.

1) Obtención y congelación de semen

La obtención de semen en animales silvestres representa en sí misma una considerable dificultad. En animales domésticos se ha recurrido al entrenamiento de los machos para poder obtener semen de forma rutinaria mediante el empleo de una vagina artificial, o mediante el empleo de la recogida manual. En animales no acostumbrados al manejo humano es necesario recurrir a la obtención de semen mediante técnicas de electroeyaculación bajo anestesia quirúrgica. Esta técnica es segura, con riesgos mínimos, y se ha empleado ya en muchas especies animales. En nuestra experiencia con ungulados no se ha encontrado inconveniente alguno y se ha utilizado en forma reiterada sobre los mismos individuos sin consecuencias negativas, lo cual es importante ya que, en numerosas ocasiones, interesa realizar recogidas repetidas de semen en cada macho con el fin de conservar un elevado número de muestras para su utilización futura.

Es también posible obtener espermatozoides a partir de animales muertos. Así, pueden recuperarse espermatozoides viables del epidídimo hasta varias horas (o unos pocos días) después de la muerte. Esta posibilidad tiene grandes ventajas a la hora de conservar material genético de especies muy amenazadas (como, por ejemplo, el lince ibérico) en las que lamentablemente no es inusual encontrar animales atropellados en las carreteras. También puede ser de gran utilidad para disponer de una buena representación de germoplasma de especies de las que se obtienen muestras como resultado de la actividad cinegética (por ejemplo, el ciervo ibérico). Los espermatozoides obtenidos del epidídimo pueden suspenderse en una solución salina o en medio de cultivo y se procesan y emplean de manera similar a los obtenidos mediante electroeyaculación. Dentro de esta línea, nuestro grupo de investigación ha obtenido descendencia viva en ungulados silvestres mediante la aplicación por inseminación artificial de muestras espermáticas recuperadas del epidídimo de machos que llevaban muertos más de cuatro días.

La congelación del material espermático presenta un gran número de ventajas. Entre ellas destacamos las siguientes: preservación y uso de germoplasma sin limitaciones en el tiempo y en el espacio, prevención de riesgos sanitarios al poder transportar germoplasma congelado en lugar de trasladar animales vivos, y mejor manejo del espacio ya que permite la conservación indefinida del material genético sin necesidad de ocupar grandes espacios en los programas de cría. Además, permite el intercambio de material genético entre individuos que estén muy alejados geográficamente, siendo este hecho de especial interés de cara a disminuir la consanguinidad en poblaciones fragmentadas de especies en peligro de extinción.

El proceso de criopreservación o congelación espermática no es un procedimiento igualmente exitoso en todas las especies animales, existiendo además grandes diferencias individuales en la resistencia de los espermatozoides a la congelación dentro de una misma especie o raza. Por otro lado, en individuos de especies o razas amenazadas, la eficacia de la congelación espermática puede verse aún más afectada por las elevadas tasas de consanguinidad que presentan algunos de estos animales. En los machos de estas especies, la importancia de conservar germoplasma del mayor número posible de animales, obliga en ocasiones a congelar semen de una muy mala calidad inicial, hecho que condiciona al desarrollo de protocolos de congelación espermática individualizados para cada individuo.

La congelación del semen de rumiantes, resulta más compleja que la de otras especies animales, debido fundamentalmente a las características bioquímicas y morfológicas de los espermatozoides de estos animales. Además, el empleo de la criopreservación del material seminal y su uso mediante inseminación artificial ha sido desarrollado en la mayoría de las especies domésticas, no presentando, sin embargo, el mismo progreso en las especies de animales silvestres.

El daño que experimentan los espermatozoides durante la criopreservación ha sido atribuido a diversos factores, entre los que destacamos los siguientes: cambios en la temperatura, formación de cristales de hielo, estrés oxidativo, alteraciones en las membranas espermáticas, daño en el ADN, toxicidad a los crioprotectores y estrés osmótico. Estos daños pueden verse disminuidos mediante la elección de un diluyente de congelación adecuado. Para especies silvestres se han usado diluyentes adaptados a partir de otros de especies domésticas, con pocas o ninguna modificación. Teniendo en cuenta las diferencias y problemas anteriormente expuestos, a lo largo de los últimos años se han ido optimizando los protocolos para tener diluyentes específicos disponibles no solo para cada especie, sino también para cada tipo de muestra, dependiendo de su origen (eyaculada o epididimaria).

Durante la congelación, el enfriamiento se produce a velocidades finitas (lentas o rápidas). La velocidad de congelación óptima es aquella en la cual la célula puede perder agua y al mismo tiempo se observa la máxima supervivencia celular. Dicha velocidad es diferente en función de la especie animal donante de los espermatozoides.

La viabilidad espermática tras la congelación puede verse comprometida dependiendo de la composición de los diluyentes de congelación, indicando este hecho la importancia de la misma en el proceso de criopreservación.

Diversos componentes del diluyente, como el crioprotector, la yema de huevo, los azúcares, las sustancias tampón y otros aditivos, pueden interactuar, frecuentemente de un modo específico, haciendo que la formulación idónea de dichos diluyentes sea muy diferente para congelación espermática de unas especies a otras.

En los protocolos de criopreservación espermática se suele incluir una fase inicial de refrigeración, en la que la temperatura de la muestra se disminuye desde temperatura ambiente (o desde la temperatura corporal del animal)

hasta 5°C. Esta fase es especialmente crítica ya que los espermatozoides son muy sensibles a una reducción rápida de la temperatura durante este proceso, pudiendo generar una situación conocida como “choque frío”. Los signos más obvios del choque frío incluyen pérdida de movilidad, de la integridad de las membranas espermáticas y del funcionamiento celular. El llamado choque frío puede reducirse variando las tasas de enfriamiento antes de la congelación y/o mediante la incorporación sustancias como la yema de huevo en los diluyentes. Sin embargo, a pesar de que la yema de huevo ha sido descartada como un factor inductor de la capacitación, un aumento de la concentración de la misma en el diluyente de criopreservación podría provocar la desestabilización de la membrana, aumentando el daño acrosomal tal y como ha sido demostrado en los últimos años en semen de porcino y ovino. Igualmente, se ha comprobado que este problema puede solventarse disminuyendo la concentración de yema o de los constituyentes de la misma, sin que la supervivencia espermática y la fertilidad disminuyan.

La sensibilidad de los espermatozoides al choque frío puede verse afectada también por la porción del tracto genital de la que procedan las muestras espermáticas. En este sentido, ha quedado demostrado en diferentes especies que los espermatozoides eyaculados son más susceptibles al choque frío que los epididimarios. Incluso, se ha observado que los espermatozoides procedentes del epidídimo proximal son más resistentes al choque frío que los de la cola y los eyaculados, sugiriendo que durante la maduración espermática, ocurren cambios en dichas células que las hacen más susceptibles al choque frío, incluyendo la pérdida de fosfolípidos de membrana.

Los crioprotectores protegen a las células durante la congelación de consecuencias como la formación de cristales. Por tanto, y aunque son esenciales para la protección contra el daño que se produce en las células durante la criopreservación, los mismos pueden ser nocivos para las células espermáticas, incluso a bajas concentraciones. Las causas del

daño producido por los crioprotectores sobre los sistemas biológicos pueden ser; osmóticas, bioquímicas, o fisicoquímicas.

La elección del crioprotector parece haberse basado en pruebas ensayo/error, debido a que no hay una explicación completa y satisfactoria de la acción de los mismos sobre las células espermáticas. Se ha probado la eficacia de muchos compuestos como crioprotectores. El glicerol, junto con otras sustancias como el metanol, etilenglicol, propilenglicol y el dimetil sulfóxido (DMSO), pertenecen a un grupo de crioprotectores que son permeables a la membrana celular. El glicerol es el más utilizado desde que se demostró su eficacia a finales de los años cuarenta por Polge y colaboradores, aunque en casos concretos, otros crioprotectores dan lugar a mejores resultados; como, por ejemplo, el DMSO para la congelación de espermatozoides de conejo.

Por otro lado, la temperatura de adición del crioprotector parece influir sobre los resultados de viabilidad celular tras la descongelación. De este modo, se ha sugerido que la toxicidad celular es menor añadiendo el crioprotector a 5°C para el caso concreto del morueco, mientras que esta temperatura tiene consecuencias nocivas para los espermatozoides humanos, siendo más adecuado añadirlo a 22°C. Para otras especies de ungulados se ha propuesto la adición a 22°C como la más adecuada y menos lesiva. Por lo tanto, los efectos del glicerol en el medio citoplasmático parecen ser específicos de especie e incluso, podrían afectar de forma diferente a las distintas regiones subcelulares. Además, existe una concentración óptima de crioprotector en el medio de congelación según la especie. Así, el rango óptimo para congelar espermatozoides de morueco oscila entre 4-6%, apareciendo el daño celular al sobrepasar el 8%. Por otro lado, la motilidad de los espermatozoides de verraco se mantiene mejor tras la criopreservación en diluyentes que contienen un 3-4% de glicerol, aunque sus acrosomas se dañan a concentraciones tan bajas como 1-2%. Para la congelación de

muestras espermáticas epididimarias de ciervo, se ha propuesto por nuestro grupo de investigación, un 6% de glicerol como la mejor alternativa. Además del daño producido por los crioprotectores permeables, se debe tener en cuenta el efecto perjudicial de los solutos presentes en el diluyente durante la congelación en sí, puesto que los mismos, someten a las células espermáticas a una situación de estrés osmótico. Dicho estrés supone uno de los efectos más nocivos durante la criopreservación. Los cambios osmóticos pueden producirse gradual o rápidamente, dependiendo de la velocidad de enfriamiento, de si se producen o no cristales de hielo y del método de adición del crioprotector. Estos cambios pueden provocar que los espermatozoides se vuelvan inmóviles, pero aún, así retienen el potencial para la motilidad y la fertilidad. Además, estos cambios dan lugar a dos factores estresantes que pueden confundirse: la osmolalidad final alcanzada por las células y la diferencia osmótica entre el interior y el exterior celular.

Durante el proceso de congelación y posterior descongelación, los espermatozoides experimentan procesos de deshidratación y rehidratación. Estos procesos tienen gran influencia en la resistencia de los espermatozoides a la criopreservación, ya que la deshidratación disminuye el peligro de formación de cristales intracelulares de hielo, aunque una excesiva deshidratación puede tener también efectos deletéreos. De este modo, si durante la congelación aumenta mucho la osmolaridad del medio en los remanentes de agua sin congelar por la acumulación de solutos, las células espermáticas pueden quedar expuestas a estas altas presiones osmóticas produciéndose fenómenos de cambios de pH y desnaturalización de proteínas.

Por todo ello, ajustar la osmolalidad del medio de congelación ha tenido siempre especial relevancia en este proceso biotecnológico y por ello, se ha estudiado en muchas especies.

Los medios para la criopreservación espermática están diseñados para ser aproximadamente isotónicos con el semen, minimizando así los daños producidos por el metabolismo espermático y mejorando la supervivencia.

Los azúcares son un componente esencial en los diluyentes de congelación. En muchos estudios se ha demostrado que la adición de azúcares al medio provoca un aumento en la viabilidad a la post-descongelación de las células espermáticas de mamífero.

Los azúcares tienen varias funciones en el medio: proporcionan sustratos energéticos para las células espermáticas durante la incubación, mantienen la presión osmótica del diluyente y funcionan como crioprotectores. La habilidad crioprotectora de los azúcares depende de su peso molecular y del tipo de tampón utilizado. Además, los azúcares podrían jugar un papel clave en la prevención de alteraciones en la membrana durante situaciones de deshidratación. El efecto positivo de los azúcares sobre la viabilidad espermática a la descongelación ha quedado demostrado en la congelación de espermatozoides de numerosas especies de mamíferos.

Otro aspecto importante a tener en cuenta es que los procesos de enfriamiento, congelación y posterior descongelación producen estrés tanto a nivel físico como químico en las membranas espermáticas, reduciendo la viabilidad espermática y su capacidad fecundante. El estrés químico se debe a la producción de radicales libres del oxígeno (ROS). Este hecho se ha demostrado en espermatozoides humanos, de toro y de ratón.

La criopreservación aumenta la generación de ROS, produciendo daño en el ADN espermático, alteraciones en el citoesqueleto, inhibición de la fusión espermatozoide-ovocito, además de afectar al axonema espermático, lo que produce una pérdida de motilidad. Estos daños y alteraciones pueden derivar finalmente en infertilidad.

Un modo de solventar los efectos deletéreos producidos por los ROS tras la descongelación es añadir compuestos antioxidantes al medio de congelación para bloquear o proteger a los espermatozoides del daño oxidativo. Hasta el momento, se han probado gran variedad de antioxidantes que pueden destruir directamente a los ROS o disminuir la toxicidad de éstos sobre el semen de una gran variedad de especies de mamíferos y de aves. Ejemplos de ellos son: la vitamina E, la vitamina C, la catalasa y la superóxido dismutasa.

En general, la criopreservación espermática se ha llevado a cabo con éxito en diferentes especies, sin embargo, existen grandes diferencias en la calidad espermática a la descongelación entre individuos. Hasta el momento se ha intentado mejorar la supervivencia espermática a la descongelación mediante un enfoque empírico, manipulando aspectos de los protocolos de criopreservación, como hemos visto anteriormente. Se ha sugerido que los “malos congeladores” podrían convertirse en buenos, optimizando los protocolos de congelación. Sin embargo, las mejoras propuestas para mejorar los resultados a la descongelación pueden no beneficiar del mismo modo a todos los individuos de una misma especie, mejorando casi siempre las muestras espermáticas de los considerados como “buenos congeladores” y no la de los “malos”.

Se han encontrado diferencias entre individuos frente a la criopreservación en diversas especies. El efecto individual en la resistencia a la congelación es evidente, entre otros, en caballos, toros, cerdos, y ciervos.

Los mecanismos que explicarían las diferencias en criosensibilidad entre diferentes individuos de una misma especie aún están por determinar, aunque existen evidencias de que se trata de diferencias a nivel fisiológico. Las anomalías en la morfología espermática, tras la criopreservación, son un indicador importante del descenso de fertilidad en hombres; verracos, toros y cabras. Sin embargo, aunque la morfología espermática puede ser un indicador del potencial de la crioresistencia de un

determinado macho, los resultados entre distintos laboratorios han sido muy dispares, hasta la aparición de sistemas automáticos de análisis de la morfometría espermática. Estos sistemas se han puesto a punto para muchas especies.

Nuestro grupo de investigación ha podido demostrar que esas diferencias en la congelabilidad espermática entre machos están relacionadas con el tamaño medio de la cabeza espermática en el semen fresco de los distintos individuos de la especie cervuna. Otros autores también han encontrado relación entre el tamaño de la cabeza y la congelabilidad de los espermatozoides en semen de verraco. Estas observaciones han llevado a pensar que es posible que el área de la cabeza y la forma influyan en el volumen total del espermatozoide, causando diferencias en los movimientos de agua, iones y crioprotectores que afecten a la congelación.

Por otro lado, se ha demostrado la existencia de subpoblaciones espermáticas en base a la morfología de los espermatozoides. En este sentido, Thurston y colaboradores en 2001 propusieron que las variaciones en la morfología espermática tenían que estar originadas durante la espermatogénesis cuando el genotipo puede afectar la estructura espermática, por lo tanto, las diferencias en morfología espermática estarían genéticamente determinadas. Así, propusieron que la morfología de los espermatozoides podría ser un reflejo de la espermatogénesis y, por tanto, una herramienta potencialmente valiosa para la evaluación de variaciones celulares que pudieran afectar al éxito de la congelación.

Posteriormente, Thurston y su grupo en 2002, basándose en las premisas del trabajo anterior, utilizaron técnicas de ADN para identificar posibles marcadores ligados a genes que controlan la capacidad del esperma para resistir con éxito el proceso de congelación, utilizando el ADN espermático de cada uno de los verracos, clasificando a los verracos como "buenos" y "malos" congeladores. Estos autores identificaron 16 marcadores

genéticos comparando los perfiles obtenidos del ADN con la congelabilidad, mediante análisis de regresión logística. Según los autores, estos hallazgos apoyarían la hipótesis de la existencia de una base genética para las diferencias en resistencia a la congelación espermática entre individuos, es decir que la congelabilidad espermática podría estar regulada genéticamente.

2) Inseminación artificial

El método ideal de inseminación artificial consiste en la utilización de técnicas no invasivas para depositar el semen en el tracto genital femenino (vagina o útero). La eficacia de esta técnica es baja, especialmente cuando se emplea semen congelado. Presenta además el inconveniente de ser difícil de emplear en algunas especies debido al estrés que se ocasiona con el manejo de los animales. Por este motivo se prefiere realizar la inseminación mediante laparoscopia bajo anestesia general, depositando el semen directamente en los cuernos uterinos. Para esta técnica se emplea habitualmente semen congelado. Aunque es posible emplear semen refrigerado (a 5°C), éste puede emplearse sólo durante un corto periodo de tiempo después de su obtención.

La limitación principal que presenta la aplicación de la inseminación artificial en algunas especies es la escasa información existente sobre la fisiología reproductiva femenina. Con el fin de lograr una mejor organización de los trabajos de inseminación artificial se recurre a la sincronización de los ciclos hormonales de las hembras. Para ello se emplean dispositivos vaginales de liberación de hormonas esteroides (progesterona), tratamiento luteolítico con prostaglandinas, y gonadotrofinas que inducen la ovulación. Hay una serie de factores que influyen en el éxito de este procedimiento de sincronización de celo e inseminación artificial tales como la duración del tratamiento, las dosis

hormonales y el intervalo entre la finalización del mismo y el momento de la inseminación.

Hasta la fecha se ha obtenido descendencia viva mediante el empleo de inseminación artificial con semen congelado en unas 30 especies diferentes de mamíferos, siendo 16 de estas especies silvestres. Así, se ha conseguido el nacimiento de individuos mediante inseminación artificial en diferentes especies de ciervos como, por ejemplo, el ciervo de Eld, en el que se consiguió el nacimiento de gachos mediante inseminación artificial laparoscópica. De igual forma se ha empleado la inseminación artificial unida a la congelación del semen para la conservación del turón de patas negras. Por medio de la inseminación laparoscópica se obtuvieron nuevos individuos en esta especie. En cuanto a los felinos salvajes, tan solo se ha obtenido descendencia mediante inseminación artificial en tres de ellas: puma, tigre y leopardo. La inseminación vaginal ha sido muy poco satisfactoria en estas especies, habiendo reportado mejores resultados la intrauterina. En estas especies la inmovilización farmacológica se hace totalmente necesaria para poder aplicar estas técnicas de reproducción artificial, pero ejerce efectos negativos sobre la reproducción.

Para finalizar este apartado, mencionar que el empleo de esta metodología de inseminación intrauterina por nuestro grupo en el ciervo ibérico ha reportado resultados de fertilidad al parto bastante satisfactorios, y siempre muy superiores a los obtenidos mediante el empleo de la vía exocervical. Así, hemos obtenidos resultados de fertilidad medios al parto de un 61%, los cuales están muy próximos a los obtenidos en ciervos de granja en Nueva Zelanda. Igualmente, por medio de la aplicación de esta metodología hemos obtenidos fertilidades superiores al 65% cuando la inseminación se realizó en hembras nulíparas. Por tanto, podemos concluir que hemos conseguido adecuar la técnica de inseminación artificial, desarrollada inicialmente para ciervos de granja en Nueva Zelanda, a una subespecie silvestre de ciervo, el ciervo ibérico,

consiguiendo resultados de fertilidad muy similares a los reportados en aquel país.

3) *Fecundación in vitro*

Aunque podría pensarse que la fecundación *in vitro* es una técnica demasiado compleja para aplicar a animales, su desarrollo presenta un gran número de ventajas frente a las biotecnologías reproductivas mencionadas en los párrafos precedentes. Por una parte, reduce la necesidad de controlar la reproducción de la hembra para obtener ovocitos, permite la obtención de un mayor número de embriones que con la superovulación de las hembras donantes al poder repetir durante más veces el tratamiento de recogida de ovocitos, posibilita la obtención de descendencia a partir de animales con ciertos problemas de infertilidad, y reduce el número de espermatozoides viables necesarios para fecundar en comparación con la inseminación artificial o la monta natural. Además, y no menos importante, permite la fecundación de gametos (conservados en forma congelada) cuya combinación se estime más oportuna según los programas de conservación de recursos genéticos y de mejora genética animal.

Por otra parte, esta técnica está bastante desarrollada en bovino, aplicándose incluso de forma comercial. Sin embargo, en el resto de especies domésticas su progreso ha sido mucho más lento, habiendo obtenido resultados muy poco satisfactorios en especies como la equina. Existen múltiples factores implicados en el éxito de esta tecnología. Así, es necesario contar con tratamientos y medios adecuados para madurar los ovocitos, capacitar *in vitro* los espermatozoides y cultivar *in vitro* los embriones durante varios días. Existen especies en las que la puesta a punto de esta técnica ha fracasado debido a que ha sido imposible encontrar un medio idóneo para capacitar los espermatozoides, como por ejemplo ocurre en el caballo. Este hecho vuelve a poner de manifiesto las diferencias que existen entre las distintas especies y la necesidad de profundizar en dichas

metodologías para adaptarlas de forma específica a cada especie. Por otra parte, ha sido demostrado por diversos autores que el factor limitante en la fecundación *in vitro* es contar inicialmente con ovocitos de buena calidad. De este modo, diversos autores sugieren estudiar marcadores de calidad ovocitaria e incluso mejorar la calidad de los ovocitos durante la maduración tras la adición de diferentes sustancias.

Se ha obtenido descendencia viva a partir de embriones generados *in vitro* en felinos, en primates y en ungulados. Así, nuestro grupo de investigación ha obtenido con éxito embriones de ciervo, llegando incluso a obtener un 17% de blastocistos a partir de ovocitos procedentes de ovarios que fueron almacenados hasta 24 horas tras la muerte del animal. Aunque estos resultados son inferiores que los reportados para otros rumiantes como el bovino u ovino, resultan muy prometedores al tratarse de una especie silvestre con las complicaciones propias de la recogida y procesado de muestras en dichas especies.

4) Evaluación de capacidad fecundante de los gametos masculinos

La eficacia de los métodos de evaluación de la calidad de los gametos y sobre todo de su capacidad fecundante, es aún limitada, siendo muy difícil predecir la fertilidad de una muestra de semen por medio de la evaluación de la calidad de la misma.

En los centros de inseminación artificial ganadera se vienen desarrollando de forma rutinaria diferentes pruebas de evaluación seminal con el objetivo de discriminar aquellas muestras que no tengan una calidad seminal mínima. Algunas de ellas tienen una relación con la fertilidad, sin embargo, muchas veces las correlaciones encontradas entre estas pruebas de contrastación seminal y la fertilidad de los machos son mínimas. Esta pérdida de correlación puede deberse a varios motivos como el número de espermatozoides utilizados en la inseminación artificial o la existencia de variaciones en la fertilidad dependiendo de parámetros externos como la

explotación, el manejo e incluso el inseminador, siendo complicado establecer una relación directa entre la calidad seminal y la fertilidad. Finalmente, muchas de las pruebas utilizadas, como por ejemplo la motilidad, son pruebas subjetivas existiendo por tanto diferencias en las evaluaciones. En el caso de especies ganaderas, no determinar de forma precoz la fertilidad supone un coste económico para los centros de sementales, puesto que es posible que se mantengan animales con bajas tasas de fertilidad. Por lo tanto, determinar la fertilidad de un macho de forma temprana a partir de evaluaciones seminales eficientes mejoraría el rendimiento económico, puesto que aquellos machos con problemas de fertilidad podrían retirarse y no ser utilizados para inseminación artificial.

Uno de los objetivos, más importantes, de los análisis seminales en los laboratorios de reproducción animal es la predicción de la fertilidad. En los últimos años, se han intentado buscar parámetros seminales determinados *in vitro* que pudieran predecir la fertilidad *in vivo* sin tener que inseminar cientos o miles de hembras.

La mayor parte de los trabajos llevados a cabo han sido realizados en bovino. Entre los resultados obtenidos hasta el momento, se han encontrado relaciones entre la fertilidad *in vivo*, usando semen congelado, y parámetros como la motilidad espermática mediante sistemas de análisis de imágenes (CASA), donde la correlación encontrada es aceptable. Cuando parámetros como la motilidad se combinaron con parámetros espermáticos funcionales se obtuvieron mejores correlaciones y mejores valores predictivos de la fertilidad de la inseminación artificial en toro. Por otro lado, la velocidad de movimiento espermática es un factor determinante en el éxito fecundante del macho tanto en contextos no competitivos como competitivos.

Otras características espermáticas que se han relacionado con la fertilidad son la morfología, la presencia de acrosomas normales, la integridad de la membrana plasmática, y la integridad de la cromatina. Aunque todas las pruebas mencionadas anteriormente se pueden utilizar para evaluar de una

forma rápida las muestras espermáticas, no incorporan información de daños físicos subcelulares que pueden ocurrir durante la criopreservación. En este contexto, actualmente, se intenta buscar técnicas más sofisticadas para evaluar la estructura espermática a la descongelación.

En los últimos años se han intentado relacionar pruebas de análisis espermáticos, utilizando sondas fluorescentes y citometría de flujo. La utilización de aparatos como el citómetro de flujo permite analizar miles de células en un periodo de tiempo muy corto, aumentando la precisión de las evaluaciones e incluso permitiendo determinar diferentes subpoblaciones dentro de una muestra espermática. Además, el uso de fluorocromos facilita la evaluación de la funcionalidad de diversas estructuras u orgánulos de los espermatozoides, imposibles de evaluar utilizando otras metodologías. En diferentes estudios se ha llegado a la conclusión de la existencia de relaciones entre fertilidad *in vivo* y viabilidad espermática (fluorescencia) antes y después de someter a los espermatozoides a un test de resistencia osmótica. También se ha relacionado la tinción triple (PI/PNA/SYBR-14) para la evaluación de la viabilidad y el porcentaje de acrosomas intactos con la fertilidad. Sin embargo, muchos otros estudios no han encontrado relaciones entre fertilidad y viabilidad, o porcentajes de acrosomas intactos para muestras seminales descongeladas.

La funcionalidad e integridad mitocondriales, cuantificadas con fluorocromos específicos, también se han intentado correlacionar con la fertilidad de la inseminación artificial en morueco y en toro sin encontrarse grandes relaciones.

En un estudio reciente de O'Meara y colaboradores realizado en 2008 con semen de morueco, se demostró que, bajo las condiciones experimentales de ese estudio, no se encontró ningún test *in vitro* para parámetros como motilidad, viabilidad, estado del acrosoma y capacitación, ya sea mediante citometría de flujo, por CASA o por microscopia de fluorescencia que, se relacionase con la fertilidad *in vivo*.

La integridad del ADN es otro parámetro espermático que se ha intentado relacionar con fertilidad. Los espermatozoides de rumiantes se caracterizan por tener una cromatina altamente condensada donde las protaminas empaquetan fuertemente y protegen al ADN haploide. Un empaquetamiento óptimo del ADN parece esencial para un potencial de fertilidad elevado. Sin embargo, procesos como la criopreservación pueden deteriorar la integridad del ADN. En los últimos 25 años, se han diseñados varios modelos para determinar el daño en el ADN incluyendo el COMET, TUNEL, el test de la naranja de acridina (AOT), DBD-FISH, ISNT, y SCSA®. El TUNEL y el SCSA® tienen como ventaja la utilización del citómetro de flujo como herramienta. El SCSA® es el más utilizado comúnmente. Nos da información sobre los espermatozoides con o sin fragmentación en el ADN, el porcentaje de fragmentación y la proporción de espermatozoides con ADN inmaduro. La integridad del ADN evaluada mediante SCSA® muestra relación con la fertilidad. Esta prueba nos da un índice de fragmentación espermática (DFI) que se ha relacionado con tasas de fertilidad, en humano, altas, moderadas y bajas, cuando el DFI era de 0-15%, 16-29% y > 30%, respectivamente. Además, también se han propuesto umbrales de sub-fertilidad en otras especies como en cerdo con un 18% de DFI y en toro con un 20%, aunque no existían datos de fertilidad *in vivo* en estos trabajos, con lo que los valores de subfertilidad tenían poco valor. Sin embargo, en otros estudios con ensayos de inseminación artificial sí que se ha visto que, en toros con fertilidades diferentes, el DFI variaba desde el 1,8% al 8,0%.

Utilizando otras pruebas basadas en la funcionalidad de los espermatozoides y por lo tanto a priori, capaces de determinar la habilidad de los mismos para llevar a cabo pasos específicos en el proceso de fertilización, también se encuentran resultados muy dispares. Así, utilizando el método de swim-up, el número de espermatozoides viables con motilidad linear correlacionó con la fertilidad. Igualmente, los resultados de la relación obtenida tras inducir la reacción acrosómica y la fertilidad fueron muy variables.

Finalmente, relaciones que oscilaron entre $r=0,35-0,59$ fueron encontradas entre la fecundación *in vitro* y la fecundación *in vivo*. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la fecundación *in vitro* heteróloga pueden ser útil para predecir la fertilidad de los espermatozoides de morueco, utilizando ovocitos de ternera. Sin embargo, muchas veces resulta complicado encontrar una relación entre la fertilidad *in vivo* y los parámetros espermáticos por diferentes motivos. En primer lugar, existen muchas diferencias en la fertilidad en función de la hembra, por lo que el número de hembras inseminadas por macho tiene que ser elevado. En segundo lugar, el número de espermatozoides utilizado en la inseminación artificial suele ser alto para asegurarse la fecundación, siendo por lo tanto difícil detectar muestras espermáticas subfértiles puesto que siempre hay espermatozoides fértiles en número suficiente para poder llevar a cabo la fecundación del ovocito. Además, si los eyaculados inicialmente son preseleccionados por su calidad puede ser imposible detectar cualquier relación.

Por último, existen diferencias de fertilidad según la explotación, el sistema de manejo e incluso el técnico y la técnica de inseminación. Por lo tanto, teniendo en cuenta todos estos factores podría ser posible encontrar relaciones entre distintos parámetros seminales y la fertilidad. De este modo, se han llevado a cabo algunos estudios en ungulados silvestres en los que se han encontrado relaciones entre algunos parámetros espermáticos y la fertilidad *in vivo* e *in vitro*. Así, utilizando la misma concentración espermática se encontró una correlación entre las características de velocidad espermática del semen descongelado y la morfología, con la fertilidad. Igualmente, también se encontró una relación entre determinadas características espermáticas y la fecundación *in vitro* heteróloga. No obstante, estos trabajos se han llevado a cabo con ciervos y los eyaculados no han sido seleccionados previamente, puesto que se utilizaron las muestras espermáticas de animales de gran valor genético.

Como conclusión, podemos decir que se han encontrado más relaciones con la fertilidad con las técnicas modernas de análisis espermático que con las convencionales. Sin embargo, esas relaciones son modestas y muy cambiantes entre laboratorios.

5) Nuevas biotecnologías aplicadas a los espermatozoides

Existen biotecnologías reproductivas que se han comenzado a utilizar con animales domésticos de manera experimental y que, aunque no tienen aún una utilización generalizada, se muestran muy interesantes para un uso futuro. A continuación, se describen brevemente algunas de ellas.

A) Preselección de sexo, mediante separación de espermatozoides X e Y

Existe desde hace décadas un interés marcado por lograr la elección del sexo de la descendencia. En especies domésticas, este logro contribuye sustancialmente a facilitar el manejo y hacer más eficiente el uso de los recursos ganaderos ya que se permite producir animales del sexo de interés (por ejemplo, hembras en ganado lechero). En un programa de cría en cautividad de especies silvestres, la posibilidad de selección el sexo de las crías podría contribuir sustancialmente a un mejor aprovechamiento del espacio disponible para alojamiento de animales y a una mejor programación genética de conservación.

Si bien es posible seleccionar el sexo de los embriones antes de la transferencia (mediante biopsia de blastómeros y diagnóstico empleando técnicas de biología molecular), este método presenta muchos inconvenientes para su uso por la necesidad de una infraestructura compleja y la baja eficiencia del método. Además, sería necesario descartar un número muy elevado de embriones del sexo no deseado con todos los inconvenientes que ello conlleva. Por otra parte, la preselección de sexo mediante separación de espermatozoides portadores de

cromosomas X o Y, y su uso posterior en inseminación artificial o fecundación *in vitro*, representa una opción más interesante y accesible.

La determinación del sexo está relacionada con la presencia de los cromosomas sexuales. En mamíferos los ovocitos portan un cromosoma X, mientras que la mitad de los espermatozoides portan un cromosoma X, y la otra mitad un cromosoma Y. La formación de un embrión con un complemento XX resulta en una hembra, mientras que un embrión XY da origen a un macho. Existen diferencias en el tamaño y, por tanto, en la cantidad de ADN que tienen los cromosomas X e Y. El cromosoma X es mayor que el Y, y esta diferencia puede llegar a ser de más de un 10% en algunas especies. Sobre esta base, los espermatozoides pueden separarse midiendo la cantidad de ADN (mediante tinción con un colorante fluorescente) y clasificación y separación por un equipo de citometría de flujo. Esta es la única técnica que, en la actualidad, permite una separación fiable de espermatozoides con un tipo u otro de cromosoma sexual y que ha demostrado la posibilidad de obtener descendencia del sexo deseado en animales y seres humanos. Existen aún algunos problemas técnicos relacionados principalmente con la velocidad a la que se realiza la separación de los espermatozoides, lo que limita el uso que puede hacerse de ellos y se debe recurrir a la inseminación artificial por laparoscopia para su aplicación. Se encuentran en desarrollo métodos para realizar inseminación artificial convencional con un número reducido de espermatozoides preseleccionados. Además, existe la posibilidad de emplear estos espermatozoides preseleccionados a través de fecundación *in vitro*, o microinyección de espermatozoides. Nuestro grupo de investigación ha obtenido recientemente, en colaboración con el grupo del Dr. Emilio Martínez, resultados muy esperanzadores mediante la aplicación de espermatozoides sexados y criopreservados de ciervo, por medio de inseminación artificial. En estos trabajos hemos obtenido el 93% de individuos de sexo deseado al nacimiento, siendo el porcentaje de

individuos del mismo sexo nacidos con el semen no sexado (control) del 53%.

B) *Microinyección de espermatozoides*

Existen situaciones en las que sólo se dispone de pocos espermatozoides o de espermatozoides de mala calidad (con anomalías morfológicas o motilidad limitada) con escasas posibilidades de fecundar si se emplean en inseminación artificial o en fecundación *in vitro*. Estas situaciones pueden darse con machos muy consanguíneos que tienen mala calidad seminal, o cuando el semen de un macho tiene una supervivencia reducida a un proceso de criopreservación. También existen procedimientos, como la preselección de sexo, que resultan en un número limitado de espermatozoides.

La microinyección intracitoplásmica de espermatozoides permite la inyección de un solo espermatozoide en el interior del ovocito. Además de permitir un aprovechamiento considerable de los escasos espermatozoides que pueden estar disponibles, tiene la ventaja adicional de que para su empleo no es necesario incubar los espermatozoides para que experimenten los procesos de preparación para la fecundación que tienen lugar en el tracto genital femenino (“capacitación”), y que son necesarios para la fecundación *in vitro*. Esto puede suponer una ventaja en aquellas especies en las que hasta el momento es imposible capacitar los espermatozoides como en el caballo.

La técnica de microinyección de espermatozoides se ha aplicado con éxito en animales de laboratorio, animales domésticos y en seres humanos. Sin embargo, aún no se ha empleado esta tecnología en animales no domésticos, con excepción de algunos primates.

6) Tecnologías espermáticas en fase experimental

Existen también nuevas técnicas, aún en fase experimental, que son potencialmente de interés o utilidad y que se están ensayando con

animales de laboratorio, o en animales domésticos. A continuación, se describe la más incipiente de todas ellas.

Obtención, conservación y trasplante de espermatogonias.
Espermatogénesis in vitro

La reserva de espermatozoides congelados puede agotarse si se usan todas las dosis de semen existentes. En determinados programas de conservación puede interesar conservar por muchos años el material genético de los fundadores o de algunos individuos en particular, y la limitación de las dosis de semen puede ser un problema. Además, cuando se accede a material proveniente de animales muertos, solo existe una cantidad limitada de espermatozoides que pueda conservarse. Por otra parte, el material proveniente de animales muertos puede haberse obtenido en época no reproductiva (si la especie tiene reproducción estacional) y no será posible en estos casos obtener espermatozoides.

En los casos anteriores sería deseable poder conservar células primitivas, espermatogonias o espermatoцитos, de la línea germinal masculina que se encuentran en el testículo (células madre de la línea celular que dará origen a los espermatozoides). Para ello, sería necesario aislarlas del testículo y congelarlas en condiciones adecuadas. Para su empleo existirían varias posibilidades. Por una parte, las espermatogonias se podrían trasplantar al interior de los túbulos seminíferos de los testículos de animales “huéspedes” de su misma especie (aunque esto presenta dificultades si la especie está amenazada, y el riesgo de un rechazo inmunológico) o se podrían trasplantar a los túbulos seminíferos de los testículos de otra especie diferente. En este último caso sería necesario evaluar cuál es la especie más adecuada. Hay experiencias en roedores de laboratorio en los que ha sido posible trasplantar espermatogonias de rata o hámster a ratón y lograr producción de espermatozoides de éstos en el huésped. En animales menos relacionados genéticamente, las

posibilidades de éxito han sido inferiores, aunque se han reportado resultados satisfactorios. Otra posibilidad, según investigaciones recientes, es la de trasplantar trozos de tejido testicular (sin necesidad de separar y aislar las espermatogonias) al testículo de individuos de la misma o de otra especie. Estos estudios han demostrado que es posible obtener espermatozoides a partir de un testículo trasplantado y que dichos espermatozoides son capaces de fecundar y generar crías vivas.

Otra aplicación tecnológica posible es el cultivo de las espermatogonias o espermatoцитos en el laboratorio, bajo condiciones que permitieran la diferenciación *in vitro*, es decir, la especialización y formación de las células espermáticas, incluyendo el proceso de meiosis *in vitro*. Así, se ha logrado mantener en cultivo espermatogonias de ratón durante varios meses y también es posible conservarlas mediante criopreservación. En cuanto a la posibilidad de lograr una meiosis y diferenciación *in vitro*, se presentan más complicaciones y el éxito es aún limitado. Investigaciones muy recientes han logrado, mediante la utilización de nuevos procedimientos, mantener en cultivo durante varias semanas a células germinales (pre-espermatogonias) procedentes de terneros recién nacidos; estas células lograron experimentar la meiosis *in vitro* y dar origen a espermátidas. Cuando estas espermátidas se microinyectaron a ovocitos, se obtuvieron blastocistos diploides.

LIMITACIONES DE LA ESPERMATOLOGÍA VETERINARIA

Las técnicas reproductivas anteriormente descritas se han usado desde hace muchos años en animales domésticos, en seres humanos y algo menos en especies silvestres. Técnicas como la inseminación artificial, y la conservación de semen mediante refrigeración o congelación, se emplean de rutina en la industria ganadera desde hace más de 65 años. El interés en un uso ganadero llevó a un incremento en las investigaciones sobre esta tecnología en la década de los años 50 con un desarrollo

considerable en los años 60 y 70. Es hoy una técnica de rutina en la industria ganadera. La fecundación *in vitro* se desarrolló en los años 60 en animales de laboratorio y se empleó con éxito por primera vez en 1978 en seres humanos y en 1982 en bovinos. La microinyección de espermatozoides comenzó a experimentarse en la década de los 70 en animales de laboratorio y se empleó con éxito por primera vez en humanos en el año 1992.

No obstante, y a pesar de haber transcurrido mucho tiempo desde que se congelaran las primeras dosis espermáticas, el proceso de criopreservación espermática no es un procedimiento igualmente exitoso en todas las especies animales, existiendo además grandes diferencias individuales en la resistencia de los espermatozoides a la congelación dentro de una misma especie o raza. Por otro lado, en individuos de especies o razas amenazadas, la eficacia de la congelación espermática puede verse aún más afectada por las elevadas tasas de consanguinidad que presentan algunos de estos animales. En los machos de estas especies, la importancia de conservar germoplasma del mayor número posible de animales, obliga en ocasiones a congelar semen de una muy mala calidad inicial, hecho que condiciona al desarrollo de protocolos de congelación espermática individualizados para cada macho. Igualmente, la conservación del semen en estado líquido durante largos periodos de tiempo tampoco está completamente resuelta, funcionando de una forma rutinaria, casi exclusivamente en la especie porcina. Finalmente, en los diluyentes de congelación se siguen utilizando sustancias de origen animal y no definidas como la yema de huevo, habiendo sido muy limitados los avances en relación a los diluyentes empleados.

Otras tecnologías espermáticas más recientemente desarrolladas, como la separación de los espermatozoides portadores de un cromosoma X o Y mediante técnicas de citometría de flujo, como único procedimiento que ha demostrado su eficacia en la preselección del sexo de la progenie, origina un estado de inestabilidad en las células separadas que les provoca una

disminución de su capacidad fecundante. Para que esta tecnología pueda ser aplicada en las distintas especies de mamífero, tienen que desarrollarse procedimientos que superen algunos de los impedimentos que existen en la actualidad. Estas limitaciones de la técnica se detallarán más adelante.

A pesar de los muchos esfuerzos desarrollados por aumentar la eficacia de los diferentes procesos tecnológicos aplicados a los espermatozoides, muchos sectores todavía encuentran en el Siglo XXI que éstos tienen muchas limitaciones para su aplicación. A continuación, se enumeran algunas de ellas.

- La baja eficacia del proceso de congelación espermática en la mayoría de las especies. Así, durante la criopreservación aproximadamente el 50% de las células espermáticas no sobreviven al proceso, presentando una fisiología alterada los espermatozoides que si lo hacen. Ello obliga actualmente al empleo de semen congelado por vía quirúrgica o semi-quirúrgica en numerosas especies, y además muy cerca del momento de la ovulación. Todo ello hace que la congelación espermática, siendo el método teóricamente ideal de conservación seminal, sea utilizado de forma muy limitada, y casi nunca de forma comercial en la mayoría de las especies de mamífero. Resolver este problema de forma genérica para la mayoría de las especies, es posiblemente uno de los retos más importantes de la espermatología moderna.
- La refrigeración como procedimiento de conservación seminal, es la alternativa a la criopreservación en aquellas especies en las que sus espermatozoides tienen dificultad para soportar los actuales protocolos de congelación-descongelación. La temperatura a la que se suele conservar en refrigeración el semen diluido se sitúa por debajo de los 20°C, siendo los rangos de entre 17 y 15°C o entre 4 y 6°C, los más utilizados. Con los protocolos actuales de refrigeración, los

espermatozoides pueden mantener una óptima calidad y aceptable capacidad fecundante durante las primeras 48-72 h de conservación. Mayores tiempos de conservación no son recomendados en prácticamente ninguna especie, ya que los espermatozoides pierden drásticamente y progresivamente tanto su calidad como su capacidad fecundante a medida que aumenta el tiempo de conservación. Prolongar dicho tiempo de conservación es, por lo tanto, un reto a conseguir. Conseguirlo o no pasa por diseñar nuevos protocolos de conservación, los cuales deben, entre otras cosas, incluir mejores y más efectivos diluyentes seminales.

- Los diluyentes empleados en la conservación seminal (especialmente en la congelación), utilizan en su formulación sustancias de origen animal o vegetal, siendo por tanto medios químicamente no definidos. Resulta sorprendente que esto siga siendo así en los inicios del Siglo XXI. Ello ocasiona serios problemas de tipo sanitario, y metodológico, ya que en numerosas ocasiones este aspecto de la conservación espermática se sostiene sobre unas bases demasiado empíricas. Poder criopreservar espermatozoides de manera eficiente y segura, desde una perspectiva sanitaria, es un reto, no solo para la producción ganadera, sino también para el normal desarrollo de otras biotecnologías, incluso algunas de interés para la salud humana. En este sentido no debemos olvidar que preservar de manera eficiente espermatozoides de algunas especies (porcino) portadores de determinados genes ayudaría enormemente al proceso evolutivo de la tecnología de los xenotrasplantes o a la producción de modelos biológicos para estudiar determinadas enfermedades humanas.
- Las posibilidades reales de predecir la fertilidad de un macho, eyaculado o dosis seminal por medio del empleo de las diferentes técnicas de laboratorio, siguen siendo, hoy en día, muy escasas. Ello ocasiona grandes pérdidas económicas, ya que en numerosas

ocasiones se emplean por medio de inseminación artificial un elevado número de dosis seminales de las que se obtiene posteriormente una tasa de nacimientos muy baja. Además, en el caso de especies o variedades en peligro de extinción, el uso de estas dosis seminales con baja capacidad fecundante por medio de inseminación artificial, origina la pérdida de germoplasma y de variabilidad genética sin que los resultados obtenidos justifiquen su empleo, mientras que su utilización por medio de otras TRA, como la fecundación *in vitro* o la inyección intracitoplasmática, podría reportar mejores resultados reproductivos de cara a la conservación de la especie. Resolver este problema ha sido un objetivo histórico para los investigadores que han trabajado en inseminación artificial.

- La separación de los espermatozoides en función del cromosoma sexual que transportan (X o Y), es hoy en día posible gracias a la citometría de flujo. Sin embargo, para que su utilización práctica pueda ser una realidad, debemos todavía superar importantes limitaciones. La primera, el bajo rendimiento de los equipos de separación y, la segunda, los efectos negativos que el proceso de separación ejerce sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides separados. Es por ello que diseñar medios apropiados para recoger y conservar los espermatozoides separados, desarrollar protocolos de manipulación post-separación que prolonguen la vida útil de los espermatozoides separados, y establecer estrategias de inseminación que permitan obtener elevadas tasas de fertilidad, son las principales tareas científicas por desarrollar.

Éstas y otras limitaciones de los procesos tecnológicos aplicados a los espermatozoides no podrán ser superadas a menos que se desarrolle una propuesta innovadora de las tendencias actuales de investigación en esta especialidad de las Ciencias Veterinarias. Estos inconvenientes

tecnológicos de la espermatología actual, que hacen que la aplicación de las biotecnologías derivadas, tengan hoy en día, aún, un alcance muy limitado, nos lleva a proponer una aproximación totalmente nueva a la investigación en algunas de estas áreas, proponiendo soluciones innovadoras, que más adelante detallaremos en este discurso.

OPORTUNIDADES PARA EL ESTUDIO DE ASPECTOS REPRODUCTIVOS BÁSICOS

La posibilidad de trabajar durante estos últimos años en el estudio de poblaciones naturales de ciervo nos ha permitido dar respuesta a algunas incógnitas, que han contribuido a un mejor conocimiento de algunos mecanismos de espermatología básica, hasta el momento desconocidos. Un gran enigma dentro del fascinante mundo de la reproducción animal ha sido siempre la determinación de las características espermáticas determinantes de la fertilidad masculina. El descubrimiento de estos mecanismos ha resultado en el desarrollo de numerosos proyectos de investigación, tanto en las distintas especies ganaderas como en la especie humana. Estudios anteriores a los nuestros no habían podido identificar claramente qué factores espermáticos determinan la fertilidad de los machos. Ello es muy probable que se haya debido a que se realizaron con animales domésticos o en clínicas de reproducción asistida de la especie humana. En el primer caso se trata de animales que han sido seleccionados a lo largo de muchas generaciones para incrementar su fertilidad, mientras que en el segundo se trata de una parte de la población con problemas de fertilidad. Por tanto, ni los animales domésticos ni los pacientes de clínicas de reproducción asistida presentan el grado de variabilidad encontrado en las poblaciones naturales. Por los motivos anteriormente aludidos es muy probablemente que no se haya encontrado esa relación clara entre fertilidad y características espermáticas de los machos.

Así, nosotros nos propusimos estudiar si existía relación entre algunas de las características espermáticas de los machos procedentes de poblaciones naturales de ciervo ibérico y la fertilidad de los mismos. Para ello, en primer lugar, obtuvimos las muestras espermáticas de los ciervos abatidos durante el desarrollo de las actividades cinegéticas. Una porción de las muestras se llevó al laboratorio para analizar la cantidad y calidad seminal, por medio de distintos parámetros, y otra se utilizó para después realizar un experimento de inseminación artificial y determinar así las tasas de fertilidad de los distintos machos evaluados. Cada hembra fue inseminada con el semen de un único macho, pero el semen de cada macho se empleó para inseminar varias hembras, con el fin de poder calcular su tasa de fertilidad. Después relacionamos las tasas de fertilidad de cada macho con las características del semen analizadas en el laboratorio. Un primer hecho importante observado fueron las grandes diferencias de fertilidad entre los distintos venados muestreados. Así, mientras algunos machos dejaron preñadas al 75% de las hembras inseminadas con su semen, otros solo obtuvieron una tasa de éxito reproductivo del 20%. Estas diferencias de fertilidad han sido observadas en otras especies domésticas, pero sin haberse podido relacionar con las características espermáticas de los correspondientes machos. El análisis conjunto de las tasas de fertilidad y de los datos de calidad espermática de todos los venados estudiados, reveló que los machos más fértiles eran aquellos que presentaban espermatozoides más rápidos y con menores porcentajes de anomalías morfológicas. Por tanto, este estudio con poblaciones naturales de ciervo, nos permitió evidenciar que la fertilidad de los machos depende fundamentalmente de dos características de sus espermatozoides, la velocidad a la que nadan y la tasa de integridad morfológica.

Otro tema de especial interés dentro del área de Biología Espermática ha sido el estudio de las eventuales relaciones entre la forma y función espermática, no habiéndose encontrado con anterioridad una clara

relación entre ambos aspectos espermáticos. Como anteriormente hemos demostrado, la fertilidad de los machos varía considerablemente entre los mismos, y dichas diferencias están basadas fundamentalmente en las diferentes velocidades espermáticas de cada individuo, una característica que se ha demostrado que es responsable también de diferencias de fertilidad en otros taxones. Por ello, decidimos examinar las relaciones entre algunos componentes de las dimensiones espermáticas y la velocidad de movimiento de esos mismos espermatozoides. Encontramos que la longitud de la pieza intermedia está inversamente relacionada con la velocidad espermática, descubrimiento que no responde a la hipótesis de que la longitud de la pieza intermedia determine el aporte energético que es necesario para el movimiento espermático. Por otro lado, el tamaño relativo del resto de flagelo (longitud de las piezas principal y terminal en relación a la longitud total del flagelo) y la existencia de cabezas espermáticas muy alargadas están positivamente relacionados con los parámetros de velocidad espermática. En conclusión, nuestros resultados demuestran que la hidrodinámica de la cabeza espermática y la fuerza ejercida por el flagelo son los determinantes morfológicos de la velocidad espermática.

La teoría evolutiva propone que los caracteres sexuales secundarios han evolucionado por selección sexual. En otros taxones la preferencia de la hembra por los machos más ornamentados está bien demostrada. Sin embargo, entre los mamíferos, los caracteres sexuales secundarios se consideran armas cuya función principal es la de aumentar el éxito en los combates entre machos. Estudios recientes habían demostrado que el tamaño de la cuerna estaba relacionado con el número de descendientes que producía un macho. La interpretación que se había dado de este resultado era que los machos con cuernas de mayor tamaño vencen más a menudo en las peleas con otros machos, lo que les permite defender un harén de mayor tamaño y aparearse con más hembras. La función de las cuernas en los combates entre machos es obvia, pero nosotros nos

planteamos el estudio de una nueva hipótesis. Una hipótesis especialmente controvertida, por la que se proponía que la función principal de los caracteres sexuales secundarios era la de señalar la fertilidad del macho. Así, evaluamos esta hipótesis en el ciervo (*Cervus elaphus hispanicus*), una especie donde los caracteres sexuales secundarios, las cuernas, alcanzan un tremendo grado de elaboración. Analizamos la posibilidad de que la cuerna transmitiese un mensaje a las hembras sobre la calidad del macho, en concreto, sobre su fertilidad. Con tal objetivo, comparamos para unos 200 machos varias características de sus espermatozoides con el tamaño y complejidad de su cuerna. Para ello, tomamos medidas y muestras de animales abatidos en monterías, y analizamos en el laboratorio las características de los testículos y la calidad de sus espermatozoides. Los resultados indicaron que los machos con cuernas de mayor tamaño y complejidad tenían testículos de mayor tamaño en relación al tamaño corporal, y espermatozoides que nadaban a mayor velocidad.

Por lo tanto, el tamaño y complejidad de la cuerna refleja precisamente aquellas características que determinan la fertilidad de los machos, es decir, la capacidad de producir espermatozoides y la velocidad a la que nadan. Estos resultados demuestran que la información que la cuerna transmite podría ser de utilidad para que las hembras pudiesen “elegir” aparearse con los machos más fértiles. Puesto que ha quedado demostrado que los machos de ciervo presentan una gran variación en las tasas de fertilidad, aparearse con un macho poco fértil podría ser un riesgo considerable para las hembras. Queda por resolver cómo las hembras llevan a cabo esta selección de pareja, y entre las opciones posibles cabe considerar que la calidad de la cuerna influya sobre “decisiones” como a qué harén incorporarse, o cuánto tiempo quedarse en un harén. La información que transmite la cuerna también podría ser de interés para otros machos, pues el portador de una cuerna grande y compleja está advirtiéndolo que su semen es muy competitivo y que si otro macho copula

con las hembras que defiende tiene pocas posibilidades de fecundar. Finalmente, esta evidencia pone de manifiesto que la relación encontrada anteriormente entre tamaño de cuerna y número de crías, podría no deberse exclusivamente a la capacidad de los machos con cuernas más grandes para ganar las peleas, sino también a que son machos más fértiles y, es posible, que sean venados más pretendidos por las hembras.

Para finalizar, hacer referencia a los resultados obtenidos en relación con otro tema de gran actualidad dentro del mundo de la Biología Reproductiva, los mecanismos por medio de los cuales los mamíferos seleccionan el sexo de sus crías. Estudios anteriores, desarrollados exclusivamente en hembras, habían demostrado que las ciervas dominantes producían más machos, mientras que las subordinadas producían más hembras.

Aunque en teoría los machos también se beneficiarían de “manipular” el sexo de sus crías, esta posibilidad no había sido considerada hasta la fecha, de ahí el carácter pionero de los resultados del estudio que a continuación detallaré. Desarrollamos un experimento de inseminación artificial, en el que se inseminó a todas las hembras con la misma cantidad de espermatozoides. Se empleó esta metodología para evitar que las hembras, al observar a los machos durante la cubrición, pudiesen de alguna manera sesgar el sexo de sus crías. Nuestros resultados han demostrado que los machos de ciervo más fértiles generan una proporción significativamente mayor de machos en su descendencia, mientras que los menos fértiles producen una mayor proporción de hembras.

Los mecanismos que permiten a los machos sesgar la proporción de crías hacia un sexo determinado se desconocen. El hecho de que en mamíferos el sexo de las crías venga determinado por el tipo de espermatozoide (portador de cromosoma X o Y) que fecunda el ovocito, sugiere que los machos podrían tener mayor control sobre los mecanismos de determinación de sexo que en otras especies. El estudio plantea dos

posibilidades; en primer lugar, los machos podrían diferir en la proporción de espermatozoides portadores de X e Y en el eyaculado; y, en segundo lugar, los espermatozoides portadores del cromosoma Y (que es el que genera crías masculinas) podrían ser más competitivos en los machos más fértiles, mientras que los espermatozoides portadores de X (que es el que genera crías hembra) podrían ser más competitivos en los machos menos fértiles. Estas diferencias en competitividad de los dos tipos de espermatozoides podrían estar relacionadas con diferencias en morfología, tamaño o función, debidas a la expresión diferencial de genes en los cromosomas sexuales.

En nuestro trabajo se inseminó a todas las hembras con la misma cantidad de esperma. Sin embargo, en poblaciones naturales, los machos más fértiles tienen testículos de mayor tamaño y producen más espermatozoides. Esto hace pensar que es posible que los efectos encontrados en este estudio sean aún más marcados en la naturaleza, donde las diferencias entre machos, en cuanto al número de espermatozoides, podrían contribuir a generar diferencias en fertilidad aún mayores.

NUEVO ENFOQUE PARA RESOLVER EL PROBLEMA DE LA CRIOPRESERVACIÓN ESPERMÁTICA

Para intentar resolver los problemas anteriormente referidos, y conseguir así que la Espermatología pueda afrontar con éxito los retos que se le presentan en el Siglo XXI, hemos de aplicar nuevos conocimientos y herramientas con el objetivo general de mejorar la eficacia de los procesos tecnológicos que se aplican al semen en las diferentes especies y razas de mamíferos domésticos y silvestres, intentando mantener su capacidad fecundante en unos niveles similares a los del semen fresco no manipulado.

En este contexto, proponemos una nueva línea de investigación que nos permita desarrollar una nueva metodología para identificar donde residen las diferencias en congelabilidad y/o fertilidad entre individuos de una misma especie. Nos centraremos inicialmente en los estudios relacionados con congelabilidad espermática y las variaciones individuales al proceso.

Con anterioridad ha quedado demostrado que entre “buenos congeladores” y “malos congeladores” hay diferencias en las secuencias de ADN, sin embargo, no existen suficientes evidencias de que esos genes o loci identificados estén relacionados directamente con criosupervivencia. Las diferencias identificadas a nivel de secuencias de ADN no garantizan que esas diferencias genéticas sean las responsables de las diferencias en congelabilidad. Así, las secuencias de ADN en las que se encontraron diferencias entre buenos y malos congeladores podrían codificar para proteínas relacionadas con funciones que nada tuviesen que ver con el espermatozoide o regular funciones en las que otro tipo de células estén involucradas, por ejemplo, células neuronales, o incluso tratarse de secuencias sin sentido.

Por lo tanto, aunque esta idea fue en su momento innovadora, las variaciones genéticas (secuencia ADN) no explican las diferencias fenotípicas para “congelabilidad”, sobre todo, si tenemos en cuenta, como apuntaban los autores responsables de los hallazgos que la congelación espermática no es un fenómeno biológico natural, con lo que no es muy probable que haya un gen o grupo de genes para controlar o regular la criopreservación.

Podemos hacernos la pregunta: ¿realmente las diferencias a nivel de secuencia de ADN nos dan información sobre diferente respuesta a la criopreservación? La respuesta parece ser negativa, ya que, la maquinaria de replicación de ADN en las células espermáticas está “apagada” con lo que no hay expresión génica una vez los espermatozoides están maduros.

Resultaría más útil una aproximación funcional al problema, en la que podamos identificar moléculas potencialmente activas en los espermatozoides. Si consideramos que el espermatozoide es transcripcionalmente activo, al menos, durante parte de la espermatogénesis y que las moléculas responsables de un fenotipo determinado (congelabilidad) están en el espermatozoide, entonces funcionalmente será mucho más importante buscar las eventuales diferencias que puedan existir entre buenos y malos congeladores a nivel de ARNm y de proteínas espermáticas. De este modo tendríamos una aproximación de genómica funcional al problema.

Hasta hace relativamente poco tiempo se creía que el espermatozoide era una célula altamente diferenciada y especializada que servía solamente como transporte del genoma paterno hasta el ovocito. Sin embargo, en los últimos años han ido apareciendo un número creciente de estudios describiendo y catalogando la presencia de varios ARNs en los gametos masculinos de muchas especies.

Hay diferentes hipótesis sobre la función de estos ARNs en el espermatozoide que apuntan a que podrían estar involucrados en:

- Traducción de novo para reponer proteínas degradadas. Hoy en día, parece estar claro que la traducción espermática en espermatozoides maduros es un fenómeno general en los mamíferos que implicaría la maquinaria de traducción mitocondrial.
- Función estructural (re-empaquetamiento de la cromatina)
- Papel post-fecundación (liberando ARNm esenciales para el ovocito)
- Función epigenética (ayudando a establecer o mantener la impronta paterna).

La demostración de que las células espermáticas podrían utilizar, transcritos de ARNm estables, presentes en los espermatozoides desde la

espermatogénesis, para sintetizar proteínas nuevas abre una nueva puerta al conocimiento de toda esta línea de investigación.

Por tanto, nos planteamos en este momento, una investigación en nuevas direcciones, proponiendo soluciones que complementan los enfoques existentes. Desarrollaremos nuevas vías de investigación, ya que creemos que con las líneas tradicionales de investigación relacionadas con esta disciplina de la Ciencia es muy difícil responder a algunos interrogantes históricos en espermatoología. Nuestra hipótesis se basa en la premisa de que las diferencias entre individuos “buenos” y “malos congeladores” de semen, podría radicar en los ARNm que contienen sus espermatozoides.

Por ello, pensamos que realizando estudios de genómica de ARNm espermático y proteómica, se podrían identificar donde residen las diferencias de congelabilidad espermática entre individuos de una misma especie y en la medida de lo posible, entre especies diferentes. Así, empleando microarrays, utilizando ARNm espermático, combinado con estudios de proteómica, dentro del marco de este nuevo enfoque perseguimos profundizar en el conocimiento de la influencia del factor individual sobre la resistencia de los espermatozoides a la congelación. Con estos estudios de genómica de ARNm espermático pretendemos identificar donde residen las diferencias metabólicas y funcionales entre espermatozoides de machos con distinto fenotipo (congelabilidad espermática).

La identificación de los mecanismos responsables de las diferencias en congelabilidad, nos permitirá la mejora de los protocolos de congelación espermática con una base fisiológica y no basados solamente en el método de ensayo/error que es el que ha utilizado hasta el momento. Por todo lo anteriormente expuesto, parece necesario desarrollar técnicas experimentales que tengan en cuenta no sólo atributos de los gametos, sino también su capacidad funcional y metabólica, y las características de su ARNm y las implicaciones funcionales que deriven de las mismas

La capacidad de supervivencia a la criopreservación puede radicar en el plasma seminal, en la célula espermática o en ambos. Sin embargo, nuestros resultados, han demostrado la existencia de variabilidad entre machos para fertilidad y congelabilidad con muestras espermáticas epididimarias, que no contienen plasma seminal, por lo que iniciaremos nuestro estudio, solamente a nivel de célula espermática.

Como punto de partida, los estudios propuestos se realizarán con semen de ovino. Hemos elegido esta especie como modelo debido a las grandes diferencias individuales en congelabilidad que presenta y porque con la inmensa mayoría de las razas con las que podemos trabajar han sido seleccionadas en base a la producción de leche y no a parámetros de fertilidad, con lo que presentan un amplio rango en tasas de fertilidad y de características espermáticas.

Nuestro objetivo es aún más ambicioso y creemos que, aunque comencemos con la especie ovina, los trabajos a desarrollar en el futuro para dar respuesta a estos objetivos deben realizarse con muestras espermáticas procedentes de numerosas especies y razas de mamíferos domésticos y silvestres. Esta aproximación multiespecífica presenta numerosas ventajas para resolver problemas de esta naturaleza y envergadura. En primer lugar, nos puede permitir identificar problemas y buscar soluciones de una validez general (universal) para todas las especies o grupos de especies cercanas (por ejemplo, protocolos o diluyentes de congelación). En segundo lugar, al trabajar con un grupo de especies tan heterogéneo, sometidas a distintas presiones de selección natural y artificial, los experimentos desarrollados en algunas de ellas pueden ser muy útiles para dar respuesta a preguntas universales de la espermatología (por ejemplo, relaciones entre calidad seminal y capacidad fecundante *in vivo*).

A MODO DE CONCLUSIÓN

Finalizo mi exposición planteando una pregunta que sé que es de difícil respuesta: ¿podrá la espermatología resolver los retos que se le presentan en el Siglo XXI? Desde hace décadas los espermatozoides de mamíferos han sido sometidos a diversos procedimientos para su conservación y uso mediante el empleo de técnicas de reproducción asistida. Las razones que han justificado tal empleo han sido descritas a lo largo del presente discurso y siguen teniendo vigencia en el Siglo XXI. Los espermatozoides pueden ser objeto de producción *in vitro*, conservación por refrigeración o congelación, o manipulación por sexado y enriquecimiento. En ocasiones, varias de estas técnicas se emplean de forma conjunta. Como células altamente especializadas y sensibles, cuando son así procesados resultan frecuentemente dañadas, a veces con microlesiones, y con sus propiedades alteradas, lo cual reduce su capacidad fecundante. El presente discurso se ha planteado con el objetivo general de dar a conocer el estado del arte de las diferentes técnicas de reproducción asistida que emplean espermatozoides como gametos vehiculados. Además, se han descrito propuestas de mejora para los referidos procesos biotecnológicos, desarrolladas en base a la experiencia en técnicas y métodos de espermatología veterinaria adquiridas durante el desarrollo de mi experiencia científica de más de 25 años en diferentes laboratorios de espermatología en España y en el extranjero. Todo ello, se ha abordado con un enfoque multidisciplinar y transversal. La respuesta a mi pregunta inicial, necesariamente no puede ser precisa, ya que el futuro, nuestro gran desconocido, es imprevisible.

AGRADECIMIENTOS

Como anticipaba al principio de este discurso hay algunos agradecimientos pendientes. *“Si he logrado ver más lejos, ha sido porque he subido a hombros de gigantes”*, escribía Isaac Newton en una carta a

Robert Hooke en 1676. Aparentemente, la cita inicial no es de Newton. Dicha referencia es atribuida a Bernardo de Chartres en el Siglo XII. Decía Bernardo de Chartres *que somos como enanos a los hombros de gigantes. Podemos ver más, y más lejos que ellos, no por la agudeza de nuestra vista ni por la altura de nuestro cuerpo, sino porque somos levantados por su gran altura.* No sería ni justo ni adecuado olvidarme de todas aquellos “gigantes” que a lo largo del tiempo han dejado su impronta en mi persona y que han contribuido de manera sustancial a que yo sea hoy el “enano” qué gracias a todos ellos, y solo a todos ellos, ha alcanzado este reconocimiento. Además, de la familia y los amigos, han sido numerosos los maestros, compañeros y colaboradores, quiénes sin queja, y a veces superando dificultades, no han hecho más que hacerme patente su estímulo con el fin de que pudiera conseguir mis más altas aspiraciones y ambiciones.

Permítanme en primer lugar, expresar mi más profundo y cariñoso agradecimiento a toda mi familia que me ha dado el equilibrio que según dijera Santiago Ramón y Cajal, necesita todo investigador, lo que me ha permitido dedicarme a aquello que más me gusta: la docencia, la gestión y especialmente la investigación. Por muchos años que tenga de vida, me faltará tiempo para agradecer la confianza, el cariño y el afecto que todos me habéis procesado durante todo este tiempo. A mis padres les debo todo lo que soy. Muchas gracias a los dos por vuestro apoyo constante y educación tan maravillosa. Espero que mi desarrollo como persona os haya resultado siquiera medianamente satisfactorio. A mi padre, veterinario en el sentido más amplio y perfecto de la palabra, le debo también mi vocación por nuestra disciplina, y siempre ha sido, y es, un ejemplo en lo profesional y en lo personal en el que fijarnos. A Yolanda, mi mujer, por estar permanentemente a mi lado y apoyarme incondicionalmente en todos mis proyectos. Sé que te debo demasiadas cosas; especialmente tiempo y también sé que cada vez tengo menos tiempo para devolvértelo. Lo intentaré. Es muy posible que si yo hubiese

dedicado a la Ciencia el tiempo que te he dedicado a ti (o mejor dicho el que no te he dedicado), la Ciencia ya me habría dejado a mí. Juntos hemos pasado momentos buenos, pero también de “los otros”, pero aquí seguimos y seguiremos por mucho tiempo. Gracias, por todo ello, y especialmente por estar siempre. Gracias también por soportarme con paciencia y estoicismo en estos últimos días. Especial reconocimiento merecen para mí, mis hermanos: Juan Carlos, Sonia y Nuria. Gracias, en primer lugar, por los buenos e inolvidables momentos vividos. En vosotros he tenido grandes compañeros y aliados en la lucha por mis ilusiones y sueños. Gracias también por vuestra generosidad y cercanía. No puedo acabar este apartado de agradecimientos familiares, sin recordar a las personas que ya no están con nosotros, y que tan importantes han sido en nuestras vidas. Quiero mencionar de forma particular a una de ellas porque su recuerdo ha sido para nosotros un estímulo constante para evitar desfallecer en los momentos académicos y personales difíciles, que como ustedes podrán imaginar los ha habido. Me estoy refiriendo a mi hermano Juan Carlos, buena gente, muy buena gente como dicen en La Mancha, y además un gran amigo de sus amigos. Casi han pasado ya 25 años desde que no te tenemos entre nosotros, pero como puedes comprobar no nos dejaste, ya que, raro, muy raro, es el día que no nos acordamos de ti. Espero que desde ahí arriba aceptes con tu sonrisa tan especial e inolvidable para todos los que te conocimos, el discurso que acabo de leer y que te dedico de corazón. Además, ahora, desde hace ocho años, está con nosotros el “otro” Juan Carlos, nuestro hijo: Un chico rápido, sensible, inquieto, divertido, alegre y con espíritu crítico, entre otras muchas cualidades. Sin tu saberlo, o tal vez sí, contigo reaprendo todos los días. A ti Juan Carlos, te amamos desde antes de haber nacido, y además eres la alegría de este académico. Además, tu das sentido y justa medida a las cosas cada día. A ti también te debo tiempo. No sé si por razones de edad tendré el tiempo suficiente para resarcirte de lo que involuntariamente te

haya podido ocasionar. Pero sí que intentaré con la máxima intensidad que la vida me permita recuperar el tiempo perdido.

Tengo una especial deuda con mis amigos, con todos, pero principalmente con los del mundo del deporte, especialmente por su amistad, ayuda, confianza e interés por mis proyectos durante todos estos años. Gracias porque la inmensa mayoría de vosotros sois mis amigos de “toda la vida”. Gracias también porque vosotros me brindasteis por primera vez la oportunidad de aprender a trabajar en equipo, aprendizaje que ha resultado posteriormente de vital importancia en el transcurso de mi vida profesional y académica. Y estoy seguro que seguiremos, juntos, superando los retos que nos propongamos. No puedo olvidarme en este capítulo de agradecimientos referido a mis amigos, de todos los que he conocido durante el desarrollo de mi actividad profesional en estos años. Probablemente no haya mejor título, y me sentiré por ello orgulloso y agradecido de por vida por la oportunidad que me habéis dado de ser vuestro amigo.

En la intersección entre lo familiar y lo profesional, aunque con el paso del tiempo mucho más cercanos a la familia, se encuentran para mi dos personas a las que también debo mucho y a las que se lo quiero reconocer ya que han contribuido enormemente a mi formación desde mi más temprana juventud. Me estoy refiriendo a Gregorio Ginés y Claudio Camarena. Hoy soy capaz de valorar mejor que hace diez años, la impronta me habéis dejado en mí persona. Hoy soy consciente, mucho más que hace diez años de lo que habéis moldeado mi carácter y mi personalidad. Hoy sé, porque y por quien creo que **soy incansable e innacesible al desaliento**. De vosotros he aprendido que no sólo hay que atravesarse a saber, sino saber atreverse. Gracias por ello, y especialmente por todo lo demás, que se reconocer que es demasiado.

Siguiendo en este capítulo de agradecimientos no quisiera olvidarme de mis compañeros de trabajo en Universidad de Castilla-La Mancha. Ocupan

un lugar muy especial para mí, mis colaboradores y doctorandos. A todos ellos mi más sincero agradecimiento por su vocación, entrega y compromiso. Todos habéis sido importantes para mí por diferentes motivos, pero permítanme que tan solo me refiera a dos de ellas en este momento, a las Doctoras Soler y Fernández-Santos por ser las dos personas que forman la fracción más cercana de mi grupo de investigación y también por su buen hacer y saber, y por su entrega y dedicación sin condiciones a nuestra causa. No sé si de alguna manera "somos un equipo". Me gustaría que concluyerais, como yo lo hago, que lo somos y que el trabajo de los tres ha sido más que la suma de los esfuerzos individuales. Estoy firmemente convencido de que la colaboración y complementariedad de las personas en investigación es la clave para abordar con éxito retos más ambiciosos, donde las fronteras de cualquier tipo han de pasar a ser una simple anécdota.

Y termino este apartado recordando a quien me han enseñado y me ha dado la oportunidad de trabajar en política universitaria, en la política de la ciencia y de la innovación. Porque gestionar es hacer política; porque en cada decisión que se toma y tiene un efecto, se hace política. Agradezco con mucho cariño, emoción y afecto a mi Rector, el Profesor Miguel Ángel Collado Yurrita la oportunidad que me dio hace, ya 5 años, de compartir con él, un gran proyecto universitario, el de la Universidad de Castilla-La Mancha, cuando me incorporó a su equipo como Vicerrector de Investigación y Política Científica de nuestra universidad. Gracias a él, he podido trabajar con personas extraordinarias, mis compañeras y compañeros, amigas y amigos, del equipo rectoral de la UCLM, que me han enseñado el servicio público con mayúsculas, la importancia que es tomar decisiones basadas en evidencias y me han permitido entender y aprender el necesario vínculo que debe existir entre la Educación Superior, la Investigación, la Innovación, el desarrollo y las necesidades que demandan nuestros conciudadanos, a los que nos debemos. Gracias por todo ello Rector, gracias querido Miguel Ángel.

En este apartado, merece unas palabras de reconocimiento especial el Profesor Juan María Vázquez Rojas, catedrático de la Universidad de Murcia y actualmente Secretario General de Ciencia e Innovación del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Aún perdura en mi recuerdo, el día de 1990 que, desempeñándome como becario predoctoral del INIA, me desplazé a Murcia, a la facultad de Veterinaria para interactuar con el Grupo del Dr. Emilio Martínez. Grupo al que ya pertenecía el Dr. Vázquez. Después de aquel encuentro inicial, hemos colaborado en numerosos proyectos y actividades científicas, contribuyendo todas ellas de forma muy eficaz a mi formación científica y humana. Pero ha sido en los últimos cinco años, cuando más he disfrutado de sus enseñanzas y de su manera tan especial, eficaz y rápida de entender la gestión de la I+D+i. Gracias por todo ello querido Juan María.

No obstante, estos cinco años como gestor universitario, no han sido de los más fáciles. Al revés, han sido difíciles. Pero para contrarrestar estas condiciones no favorables del entorno, he tenido a unos extraordinarios compañeros en el Vicerrectorado de Investigación y Política Científica, sin cuya asistencia, ayuda, compromiso y entrega, estos cinco años hubiesen sido muy diferentes. Gracias a todos, especialmente a la Dra. Fernández-Vaquero, y a los Dres. Sáez y Alfaro. Unas palabras aparte merece Antonio Alfaro, el que ha sido mi mano derecha, izquierda y mucho más durante estos últimos años y siempre con buen humor, positivismo y alegría, a pesar de lo que, a veces, nos ha tocado vivir. Gracias querido amigo.

Asimismo, debo manifestar mi gratitud a mi querida amiga y eficiente compañera Mercedes Acebal, quien siempre dispone de tiempo, paciencia, amabilidad y dulzura para resolver cualquier problema que surja en el Gabinete de nuestro Vicerrectorado. Gracias por tu apoyo Mercedes.

Finalmente deseo expresar mi reconocimiento a todos los compañeros, y amigos que atendiendo mi invitación han querido acompañarme en este

acto tan importante para mí, por el apoyo y el afecto que con su presencia me honran. Gracias de corazón.

Excelentísimos Señores y Señoras Académicos: A lo largo de este discurso he procurado exponer un tema de investigación científica de actualidad por los motivos anteriormente aludidos, y a mi entender de interés para esta Corporación. Espero haber acertado, tanto en el tema como en el planteamiento general del mismo. No quisiera finalizar este discurso sin reiterar el agradecimiento a esta Institución y a sus miembros por la confianza y responsabilidad depositada en mi persona que no se verán defraudadas. Desde este momento les garantizo mi total disponibilidad y dedicación para todas aquellas misiones que la Real Academia Nacional de Doctores de España tenga a bien encomendarme. Yo no puedo garantizarles el éxito, pero sí el trabajo, el entusiasmo y el espíritu de aventura que cualquier acción humana que merezca la pena tiene que tener.

Y este es el punto donde deben terminar mis palabras.

Excelentísimas Sras. Académicas, Excelentísimos Sres. Académicos, Autoridades, Señoras, Señores, amigas y amigos todos:

Gracias por su atención

HE DICHO.

Madrid, 26 de abril de 2017

SELECCIÓN BIBLIOGRAFICA

- Abdelhakeam AA, Graham EF, Vázquez IA, Chaloner KM. 1991. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Development of an extender for freezing: Effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars, and the method of dilution. *Cryobiology* 28:43-49.
- Aboagla EME, Terada T. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62:1160-72.
- Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 41:183-197.
- Almlid T, Jhonson LA. 1988. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J Anim Sci* 66:2899-2905.
- Alvarez JG, Storey BT. 1992. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 13:232-241.
- Amanai M, Brahmajosyula M, Perry AC. 2006. A restricted role for sperm-borne microRNAs in mammalian fertilization. *Biol reprod* 75:877-884.
- Amann RP, Pickett BW. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of spermatozoa. *Equine Vet Sci.* 7:145–173.
- Anel-López L, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Tarantini T, Del Olmo D, Ortiz JA, Martínez EA, Roca J, Vázquez J M, Garde JJ, Parrilla I. 2017. Optimization of protocols for Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) sperm handling before sex sorting by flow cytometry. *Theriogenology* 92:129-136.

- Anel-López L, García-Álvarez O, Parrilla I, Del Olmo D, Fernández-Santos MR, Soler AJ, Maroto-Morales A, Ortíz JA, Alkmin DV, Tarantini T, Roca J, Martínez EA, Vázquez JM, Garde JJ. 2016. The Effect of Oxidative Stress on Thawed Bulk-Sorted Red Deer Sperm. *Reproduction in domestic animals* 51:407-414.
- Anel-López L, García-Álvarez O, Parrilla I, Del Olmo D, Maroto-Morales A, Fernández-Santos MR, Ortíz JA, Soler AJ, Martínez EM, Vázquez JM, Garde JJ. 2017. Effect of sex-sorting and cryopreservation on the post-thaw sperm quality of Iberian red deer spermatozoa. *Theriogenology* 89:206-213.
- Arruda RP, Ball BA, Gravance CG, Garcia AR, Liu IKM. 2002. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphology. *Theriogenology* 58:253–256.
- Askari HA, Check JH, Peymer N, Bollendorf A. 1994. Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. *Arch Androl* 33:11-15.
- Aslam M, Ahmad KM, Ahmad M, Gill SA. Additive effects of carbohydrates in tris as bull semen extenders equilibrated for three or five hours. *Pakistan Vet J* 1992; 12:174-177.
- Austin CR, Bishop MW. 1958. Capacitation of mammalian spermatozoa. *Nature* 181, 851.
- Avarbock MR, Brinster CJ, Brinster RL. 1996. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nature Medicine* 2, 693-696.
- Barth AD. 1992. The relationship between sperm abnormalities and fertility. In: *Proceedings of the 14th technical conference on AI and reproduction*. P. 47-63.

- Baumber J, Ball BA, Linfor JJ. 2005. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *Am J Vet Res* 66: 772-779.
- Berlinguer F, Ledda S, Rosati I, Bogliolo L, Leoni G, and Naitana S. 2003. Superoxide dismutase affects the viability of thawed European mouflon (*Ovis g. musimon*) semen and the heterologous fertilization using both IVF and intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Fertil Dev* 15:19–25.
- Berlinguer F, Leoni GG, Bogliolo L, Bebbere D, Succu S, Rosati I, Ledda S, Naitana S. 2005. In vivo an in vitro fertilizing capacity of cryopreserved European mouflon (*Ovis gmelini musimon*) spermatozoa used to restore genetically rare and isolated populations. *Theriogenology* 63:902-911.
- Birkhead, T. R. 1998. Sperm competition and sexual selection. Academic Press, San Diego.
- Birkhead TR, Martinez JG, Burke T, Froman DP. 1999. Sperm mobility determines the outcome of sperm competition in the domestic fowl. *Proc. R. Soc. B* 266:1759–1764.
- Blackshaw A. 1960. The effect of milk diluents on the viability of ram spermatozoa and their revival after freezing. *Aust Vet J* 36:432-435.
- Bredderman PJ, Foote RH. 1969. Volume of stressed bull spermatozoa and protoplasmic droplets and the relationship of cell size to motility and fertility. *J Anim Sci* 28:496-501.
- Brigelius-Flohe R, Traber MG. 1999. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J* 13:1145-1155.
- Buffone MG. 2016. Sperm Acrosome Biogenesis and Function during fertilization. *Advances in anatomy, embryology and cell biology*. Springer international publishing Switzerland.

- Clouthier DE, Avarbock MR, Maika SD, Hammer SR, Brinster NL. 1996. Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature* 381, 418-421.
- Clutton-Brock TH, Albon SD, Guinness FE. 1984. Maternal dominance, breeding success, and birth sex ratios in red deer. *Nature* 308:358-360.
- Colas G. 1975. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J Reprod Fertil* 42:277-285
- Correa JR, Pace MM, Zavos PM. 1997. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional testes and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology* 48:721-731.
- Cragle RG, Salisbury GW. 1959. Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. IV. pH, osmotic pressure and the cations, sodium, potassium and calcium. *J Dairy Sci* 42:1304-1313.
- Curry MR, Watson PF. 1994. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology* 31:39-46.
- Curry MR. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *J Reprod Fertil*. 5:46–52.
- Chandler JE, Painter CL, Adkinson RW, Memon MA, Hoyt PG. 1988. Semen quality characteristics of dairy goats. *J Dairy Sci*. 71:1638–1646.
- Chatterjee S, Gagnon C. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev* 59:451-458.
- Christensen P, Stenvang JP, Korsgaard IR, Pedersen KM, Jensen L, Lehn-Jensen, H. 2000. Objective parameters for estimation of the fertility of bull sperm. En: Proc. of the 14th international congress on animal reproduction.

- Darszon A, Trevino CL, Wood C, Galindo B, Rodríguez-Miranda E, Acevedo JJ, Hernández-González EO, Beltran C, Martínez-López P, Nishigaki T. 2007. Ion channels in sperm motility and capacitation. *Society of Reproduction and Fertility supplement* 65:229-244.
- Dass JHG. 1997. Prediction of bovine male fertility. The Netherlands: Wageningen.
- Davis RO, Gravance CG. 1994. Consistency of sperm morphology classification methods. *J Androl* 15:83–91.
- De Lamirande LE, Gagnon C. 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl* 13:368-378.
- Del Olmo E, Bisbal A, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Ramón M, Jiménez-Rabadan P, Anel-López L, Soler AJ, Garde JJ, Fernández-Santos MR. 2015. Free-radical production after post-thaw incubation of ram spermatozoa is related to decreased in vivo fertility. *Reproduction, fertility, and development* 27:1187-1196.
- Del Olmo E, Bisbal A, Maroto-Morales A, García-Álvarez O, Ramón M, Jiménez-Rabadan P, Martínez-Pastor F, Soler AJ, Garde JJ, Fernández-Santos MR. 2013. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. *Anim Reprod Science* 138:102-109.
- Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. 2000. Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes. *Molecular Reproduction and Development* 57:270-279.
- Dobrinski, I., Avarbock MR, Brinster RL. 1999. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biol Reprod* 61:1331-1229.
- Doiguchi M, Mori T, Toshimori K, Shibata Y, Iida H. 2002. Spergen-1 might be an adhesive molecule associated with mitochondria in the middle piece of spermatozoa. *Dev Biol* 252:127-137.

- Domínguez-Rebolledo AE, Fernández-Santos MR, Bisbal A, Ros-Santaella JL, Ramón M, Carmona M, Martínez-Pastor F, Garde JJ. 2010. Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. *Reprod Fertil Dev.* 22:856-870.
- Donoghue A, Johnston L, Seal S, Armstrong D, Tilson D, Wolf P, Wildt D. 1990. In vitro fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the tiger (*Panthera tigris*). *Biol Reprod* 43, 733-747.
- Donoghue AM, Donoghue DJ. 1997. Effects of water- and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. *Poult Sci* 76:1440-1445.
- Eddy EM, Toshimori K, O'Brien D A. 2003. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microscopy research and technique* 61:103-115.
- Eddy EM. 2007. The scaffold role of the fibrous sheath. *Society of Reproduction and Fertility supplement* 65:45-62.
- Eddy EM. 2015. The spermatozoon. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press.
- Esteso MC, Fernández-Santos MR, Soler AJ, Garde JJ. 2003. Head dimensions of cryopreserved red deer spermatozoa are affected by thawing procedure. *Cryo letters* 24:261-268.
- Esteso MC, Fernández-Santos MR, Soler AJ, Montoro V, Quintero-Moreno A, Garde JJ. 2006. The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm heads. *Reproduction in domestic animals* 41:241-246.
- Esteso MC, Soler AJ, Fernández-Santos MR, Quintero-Moreno A, Garde JJ. 2006. Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in iberian red deer (*Cervus*

elaphus hispanicus) epididymal sperm samples. *J Androl* 27(5):662-670.

Evans G, Hollinshead FK, Maxwell WM. 2004. Preservation and artificial insemination of sexed semen in sheep. *Reprod Fertil Dev* 16:455-464.

Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Jost LK. 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210:1131-1133.

Evenson DP, Jost LK. 2000. Sperm chromatin structure assay for fertility assessment. In: Robinson P ed. *Current protocols in cytometry*, vol 1, Wiley New York.

Evenson DP, Wixon R. 2006. Clinical aspects of sperm ADN fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology* 65:979-991.

Fahy GM. Cryoprotectant toxicity neutralizers reduce freezing damage. *CryoLetters* 1983; 4:309-314.

Fahy GM. Cryoprotectant toxicity reduction: Specific or non-specific? *CryoLetters* 1984; 5:287-294.

Fahy GM. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology* 1986; 32:1-13.

Farrel PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 49:871-879.

Fernández-Santos M R, Domínguez-Rebolledo AE, Estes MC, Garde J JJ, Martínez-Pastor F. 2009. Catalase supplementation on thawed bull spermatozoa abolishes the detrimental effect of oxidative stress on motility and DNA integrity. *International journal of andrology* 32: 353-359.

Fernández-Santos MR, Domínguez-Rebolledo AE, Estes MC, Garde JJ, Martínez-Pastor F. 2009. Refrigerated storage of red deer

- epididymal spermatozoa in the epididymis, diluted and with vitamin C supplementation. *Reproduction in domestic animals* 44:212-220.
- Fernández-Santos MR, Estes MC, Montoro V, Soler AJ, Garde JJ. 2006b. Cryopreservation of Iberian red deer epididymal spermatozoa: Effects of Egg Yolk, Glycerol and the Cooling Rate. *Theriogenology* 66:1931-1942
- Fernández-Santos MR, Estes MC, Montoro V, Soler AJ, Garde JJ. 2006c. Influence of various permeating cryoprotectants on cryopreservation of iberian red deer epididymal spermatozoa: effects of concentration and temperature of addition. *J Androl* 27:734-745.
- Fernández-Santos MR, Estes MC, Soler AJ, Montoro V, Garde JJ. 2006a. Effects of egg yolk and cooling rate on the survival of refrigerated red deer epididymal spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 41:114-118.
- Fernández-Santos MR, Martínez-Pastor F, García-Macías V, Estes MC, Soler AJ, de Paz P, Anel L, Garde JJ. 2007a. Extender Osmolality and Sugar Supplementation Exert a Complex Effect on the Cryopreservation of Iberian Red Deer Epididymal Spermatozoa. *Theriogenology* 67:738-753.
- Fernández-Santos MR, Martínez-Pastor F, García-Macías V, Estes MC, Soler AJ, de Paz P, Anel L, Garde JJ. 2007b. Sperm characteristics and ADN integrity of Iberian Red Deer Epididymal Spermatozoa frozen in the presence of enzymatic and non-enzymatic antioxidants. *J Androl* 28:294-305.
- Fernández-Santos MR, Martínez-Pastor F, Matias D, Domínguez-Rebolledo AE, Estes MC, Montoro V, Garde JJ. 2009. Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. *Animal reproduction science* 111:93-104.

- Fernández-Santos MR, Soler AJ, Ramón M, Ros-Santaella JL, Maroto-Morales A, García-Álvarez O, Bisbal A, Garde JJ, Santiago-Moreno J. 2011. Effect of post-mortem time on post-thaw characteristics of Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) spermatozoa. *Anim. Rep. Sci.* 129:56-66.
- Fiser PS, Ainsworth L, Langford GA. 1981. Effect of osmolality of skim-milk diluents and thawing rate on cryosurvival of ram spermatozoa. *Cryobiology* 18:399-403.
- Fiser PS, Fairfull RW. 1986. Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity, and osmolality of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoa. *Theriogenology* 25:473-484.
- Fiser PS, Fairfull RW. 1990. Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml straws. *Mol Reprod Dev* 25:123-129.
- Foote RH. 1989. Value of testicular and sperm profiles in optimizing reproductive success: lessons learned from selective breeding programs of domestic and laboratory animals. *Proc Clin Biol Res* 302:107–126.
- Foote RH. 2003. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Anim Reprod Sci* 2003; 75:119–139.
- Fraser L. 2004. Structural damage to nuclear ADN in mammalian spermatozoa: its evaluation techniques and relationship with male fertility. *Polish Journal of Veterinary Sciences.* 7:311-321.
- Froman DP, Feltmann AJ, Rhoads ML, Kirby JD. 1999. Sperm mobility: a primary determinant of fertility in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biol Reprod* 61:400–405.
- Fugger EF. 1999. Clinical experience with flow cytometric separation of human X- and Y-chromosome bearing sperm. *Theriogenology* 52:1435-1440.

- Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA. 2008. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *The International journal of developmental biology* 52:473-480.
- Gage MJG, Macfarlane CP, Yeates S, Ward RG, Searle JB, Parker GA. 2004. Spermatozoa traits and sperm competition in Atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. *Curr Biol* 14:44–47.
- García MA, Graham EF. 1989. Development of a buffer system for dialysis of bovine spermatozoa before freezing. II. Effects of sugars and sugars alcohols on post thaw motility. *Theriogenology* 31:1029-1037.
- García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Martínez-Pastor F, Fernández-Santos MR, Estes MC, Perez-Guzman MD, Soler AJ. 2009. Heterologous in vitro fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology* 71:643-650.
- García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Martínez-Pastor F, Garde JJ, Ramon M, Fernández-Santos MR, Estes MC, Pérez-Guzman MD, Soler A J. 2009. Sperm characteristics and in vitro fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Manchega ram: electroejaculation and postmortem collection. *Theriogenology* 72:160-168.
- García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Ramón M, del Olmo E, Jiménez-Rabadan P, Fernández-Santos MR, Anel-López L, Garde JJ, Soler A J. 2014. Dynamics of sperm subpopulations based on motility and plasma membrane status in thawed ram spermatozoa incubated under conditions that support in vitro capacitation and fertilisation. *Reproduction, fertility, and development* 26:725-732.
- Garde JJ, Soler AJ, Cassinello J, Crespo C, Malo AF, Espeso G, Gomendio M, Roldan ERS. 2003. Sperm cryopreservation in three species of endangered gacelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorr*, and *G. dorca neglecta*). *Biol Reprod* 69:602-611.

- Gil J, Lundeheim N, Soderquist L, Rodriiguez-Martinez H. 2003a. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology* 59:1241-1255.
- Gil J, Rodríguez-Irazoqui M, Lundeheim N, Soderquist L, Rodríguez-Martinez H. 2003b. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology* 59:1157-1170.
- Gilmore JA, McGann LE, Ashworth E, Acker JP, Raath JP, Bush M, Critser JK. 1998. Fundamental cryobiology of selected African mammalian spermatozoa and its role in biodiversity preservation through the development of genome resource banking. *Anim Reprod Sci* 53:277-297.
- Gomendio M, Cassinello J, Roldan ERS. 2000. A comparative study of ejaculate traits in three endangered ungulates with different levels of inbreeding: fluctuating asymmetry as an indicator of reproductive and genetic stress. *Proc Roy Soc Lond B* 267:875–882.
- Gomendio M, Harcourt AH, Roldan ERS. 1998. Sperm competition in mammals. In: Birkhead TR, Moller AP (eds.), *Sperm Competition and Sexual Selection*. London: Academic Press 667–751.
- Gomendio M, Malo AF, Soler AJ, Fernández-Santos MR, Estes MC, García AJ, Roldan ERS, Garde JJ. 2006. Male fertility and sex ratio at birth in red deer. *Science* 314:1445-1447.
- Graham E, Schmehl M, Evensen B, Nelson D. 1978. Semen preservation in non domestic-mammals. *Sym Zool Soc (London)* 43:153-173.
- Gravance CG, Vishwanath R, Pitt C, Garner DL, Casey PJ. 1998. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *J Androl* 19:704–709.
- Gur Y, Breitbart H. 2006. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev* 20:411–416.

- Gur Y, Breitbart H. 2008. Protein synthesis in sperm: Dialog between mitochondria and cytoplasm. *Mol Cell Endocrinol* 282:45-55.
- Hallap T, Nagy S, Haard M, Jaakma Ü, Johannisson A, Rodríguez-Martínez H. 2005. Sperm chromatin stability in frozen-thawed semen in maintained over age in AI bulls. *Theriogenology* 63;1152-1763.
- Hamatani T. 2011. Spermatozoal RNA profiling towards a clinical evaluation of sperm quality. *Reprod Biomed Online*. 22:103-5.
- Hamatani T. 2012. Human spermatozoal RNAs. *Fertility and sterility* 97: 275-281.
- Hammerstedt RH, Graham JK. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 29:26-38.
- Herrick JR, Bartels P, Krisher RL. 2004. Postthaw evaluation of in vitro function of epididymal spermatozoa from four species of free-ranging African bovids. *Biol Reprod* 71:948-958.
- Hill GE. 1990. Female house finches prefer colourful males: Sexual selection for a condition-dependent trait. *Animal Behaviour* **40**: 563-572.
- Hinshaw DB, Sklar LA, Bohl B, Schraufstatter IU, Hyslop PA, Rossi MW, Spragg RG, Cochrane CG. 1986. Cytoskeletal and morphologic impact of cellular oxidant injury. *Am J Pathol* 123:454-464.
- Holt WV, Bennett P, Volobouev V, Watson P. 1996. Genetic resource banks in wildlife conservation. *J Zool* 238:531-544.
- Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62:3-22.
- Honaramooz A, Snedaker A, Boiani A, Schöler H, Dobrinski I, Schlatt S. 2002. Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature* 418:778–781.

- Iguer-Ouada M, Verstegen JP. 2001. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* 55:671-684.
- Ijaz A, Hunter AG, Graham EF. 1989. Identification of the capacitating agent for bovine sperm in egg yolk-TEST semen extender. *J Dairy Sci* 72:2700-2706.
- Imai H. 2010. New Strategy of Functional Analysis of PHGPx Knockout Mice Model Using Transgenic Rescue Method and Cre-LoxP System. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 46:1-13.
- Inaba K. 2011. Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Molecular human reproduction* 17:524-538.
- Iritani A, Hosoi Y, Torii R. 1998. Application of ICSI in domestic and/or zoo animals. En: *Gametes: Development and Function*. A. Lauria, F. Gandolfi, G. Enne y L. Gianaroli (eds), Roma, Serono Symposia, pp. 393-404.
- Januskauskas A, Gil J, Söderquist L, Haard MGM, Haard MCh, Johannisson A, et al. 1999. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology* 52:641-658.
- Januskauskas A, Johanninson A, Rodríguez-Martínez H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology* 60:743-758.
- Januskauskas A, Johanninson A, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. 2000. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology* 53:859-875.

- Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. 2001. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology* 55:947-961.
- Januskauskas A, Söderquist L, Haard MGM, Lundeheim N, Rodríguez-Martinez H. 1996. Influence of sperm number per straw on the post-thaw sperm viability and fertility of Swedish Red and White AI bulls. *Acta Vet Scand* 37:461-470.
- Jasko DJ, Lein DH, Foote RH. 1990. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987–1988). *J Am Vet Med Assoc.* 197:389–394.
- Jasko DJ, Little TV, Lein DH, Foote RH. 2002. Comparison of spermatozoa movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases. *JAVMA* 200:979-985.
- Jégou B, Pineau C, Toppari J. 2003. Spermatogenesis in vitro in mammals. En: *Assisted Reproductive Technology. Accomplishments and New Horizons.* C.J. De Jonge y C.L.R. Barratt, eds, Cambridge, Cambridge University Press, pp. 3-25.
- Jhonson LA, Pursel VG, Gerrits RJ. Total phospholipid and phospholipid fatty acids of ejaculated and epididymal semen and seminal vesicle fluids of boars. *J Anim Sci* 1972; 35:398-403.
- Johnson LA, Welch GR. 1999. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* 52:1323-1341.
- Jones R, James PS, Howes L, Bruckbauer A, Klenerman D. 2007. Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation. *Asian Journal of Andrology* 9:438-444.
- Jones RC. 1973. Collection, motility and storage of spermatozoa from the African elephant, *Loxodonta Africana*. *Nature (New Biol)* 243:38-39.

- Kruger TF, DuToit TC, Franken DR, Acosta AA, Oehninger SC, Menkveld R, Lombard CJ. 1993. A new computerized method of reading sperm morphology (strict criteria) is as efficient as technician reading. *Fertil Steril*. 59:202–209.
- Kruuk EB, Slate J, Pemberton J, Brotherstone S, Guinness F, Clutton-Brock T. 2002. Antler size in red deer: heritability and selection but no evolution. *Evolution* 56:1683–1695.
- Larsson M, Norrander J, Graslund S, Brundell E, Linck R, Stahl S, Hoog C. 2000. The spatial and temporal expression of Tekt1, a mouse tektin C homologue, during spermatogenesis suggest that it is involved in the development of the sperm tail basal body and axoneme. *European Journal of Cell Biology* 79:718-725.
- Lee DR, Kaproth MT, Parks JE. 2001. In vitro production of haploid germ cells from cells of neonatal bulls. *Biol Reprod* 65: 873-878.
- Leibo SP, Songsasen H. 2002. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology* 57:303-326.
- Levitan DR. 2000 Sperm velocity and longevity trade off each other and influence fertilization in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Proc. R. Soc. B* 267:531–534.
- Lindemann C B. 1996. Functional significance of the outer dense fibers of mammalian sperm examined by computer simulations with the geometric clutch model. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 34:258-270.
- Liu Z, Foote RH. 1998. Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. *J Dairy Sci* 81:1868-1873.
- Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. 1998. Reactive oxygen species: potential cause for ADN fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 13:896-900.

- Loskutoff N, Betteridge K. 1993. Embryo technology in pets and endangered species. En: Embryonic development and manipulation in animal production: trends in research and applications. A. Lauria y F. Gandolfi, eds., London, Portland Press, pp. 235-248.
- Loskutoff NM. 1998. Biology, technology and strategy of genetic resource banking in conservation programs for wildlife. En: Gametes: Development and Function. A. Lauria, F. Gandolfi, G. Enne y L. Gianaroli L, eds. Roma, Serono Symposia, pp. 275-286.
- Loskutoff NM. 2003. Role of embryo technologies in genetic management and conservation of wildlife. En: Reproductive Science and Integrated Conservation. W.V. Holt, A.R. Pickard, J.C. Rodger y D.E. Wildt, eds., Cambridge, Cambridge University Press, pp. 183-194.
- Ma F, Wu D, Deng L, Secret P, Zhao J, Varki N, Lindheim S, Gagneux P. 2012. Sialidases on mammalian sperm mediate deciduous sialylation during capacitation. *The Journal of biological chemistry* 287, 38073-38079.
- Malo A.F, Gomendio M, Garde JJ, Lang-Letton B, Soler AJ, Roldan ER. 2006. Sperm design and sperm function. *Biology Letters* 2:246–249.
- Malo AF, Garde JJ, Soler AJ, García AJ, Roldan ERS, Gomendio M. 2005. Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biol Reprod* 72:822-829.
- Maroto-Morales A, García-Álvarez O, Ramón M, Martínez-Pastor F, Fernández-Santos MR, Soler AJ, Garde JJ. 2016. Current status and potential of morphometric sperm analysis. *Asian Journal of Andrology* 18:863-870.
- Maroto-Morales A, Ramón M, García-Álvarez O, Montoro V, Soler AJ, Fernández-Santos MR, Roldan ER, Pérez-Guzmán MD, Garde JJ.

2015. Sperm head phenotype and male fertility in ram semen. *Theriogenology* 84, 1536-1541.
- Martínez AF, Martínez-Pastor F, Álvarez M, Fernández-Santos MR, Esteso MC, de Paz P, Garde JJ, Anel L. 2008. Sperm parameters on Iberian red deer: Electroejaculation and post-mortem collection, *Theriogenology* 70:216-226.
- Martínez-Pastor F, Aisen E, Fernández-Santos MR, Esteso MC, Maroto-Morales A, García-Álvarez O, Garde JJ. 2009. Reactive oxygen species generators affect quality parameters and apoptosis markers differently in red deer spermatozoa. *Reproduction* 137:225-235.
- Martínez-Pastor F, Álvarez M, Martínez F, García AJ, Anel E, Soler AJ, Boixo JC, García-Macías V, Garde JJ, and Anel L. 2004. Seminal parameters of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) and the effect of hybridation (*hispanicus* x *scoticus*) on its quality. En: *Proceedings of the 15th ICAR219 Porto Seguro Brasil*.
- Martínez-Pastor F, Anel L, Guerra C, Álvarez M, Soler AJ, Garde JJ, Chamorro C, de Paz P. 2006. Seminal plasma improves cryopreservation of Iberian red deer epididymal sperm. *Theriogenology* 66:1847-1856.
- Martínez-Pastor F, Fernández-Santos MR, Del Olmo E, Domínguez-Rebolledo A, E, Esteso MC, Montoro V, Garde JJ. 2008. Mitochondrial activity and forward scatter (FSC) vary in necrotic apoptotic and membrane-intact sperm subpopulations. *Reprod Fertil Dev* 20:547-556.
- Martínez-Pastor F, Fernández-Santos MR, Domínguez-Rebolledo A, Esteso M, Garde JJ. 2009. DNA status on thawed semen from fighting bull: a comparison between the SCD and the SCSA tests, *Reprod Domest Anim* 44:424-431.

- Martínez-Pastor F, Johanninsson A, Gil A, Kaabi M, Anel, Paz P, Rodríguez-Martínez H. 2004. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. *Anim Reprod Sci* 84:121-133.
- Martínez-Pastor F, Martínez F, García-Macias V, Estes MC, Anel E, Fernández-Santos MR, Soler AJ, de Paz P, Garde JJ, Anel L. 2006. A pilot study on post-thawing quality of Iberian red deer spermatozoa (epididymal and electroejaculated) depending on glycerol concentration and extender osmolality. *Theriogenology* 66:1165-72.
- Martínez-Pastor F, Tizado EJ, Garde JJ, Anel L, de Paz P. 2011. Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology* 75(5):783-95.
- Martins RP, Krawetz SA. 2007. Nuclear organization of the protamine locus. *Society of Reproduction and Fertility supplement* 64:1-12.
- Matsuoka Y, Iguchi N, Kitamura K, Nishimura H, Manabe H, Miyagawa Y, Koga M, Matsumiya K, Okuyama A, Tanaka H, Nishimune Y. 2004. Cloning and characterization of a mouse spergen-1 localized in sperm mitochondria. *International Journal of Andrology* 27:152-160.
- Mazur P, Katkov II, Katkova N, Critser JK. 2000. The enhancement of the ability of mouse sperm to survive freezing and thawing by the use of high concentrations of glycerol and the presence of an *Escherichia coli* membrane preparation (Oxyrase) to lower the oxygen concentration. *Cryobiology* 40:187-209.
- Mazur P. 1970. *Cryobiology: the freezing of biological systems*. Science 168:939-949.
- Medrano Hernández JA. 1998. *The Importance of Individual Variation in Boar Semen Cryopreservation [PhD thesis]*. London: Royal Veterinary College

- Molinia FC, Evans G, Maxwell WM. 1994. In vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reprod Nutr Dev* 34:491-500.
- Monfort SL, GW Asher DE Wildt TC Wood MC Schiewe LR, Williamson M. Bush y W.F. Rall. 1993. Successful intrauterine insemination of Eld's deer (*Cervus eldi thamin*) with frozen-thawed spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 99:459-465.
- Nagano M, McCarrey JR, Brinster RL. 2001. Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes. *Biol Reprod* 64:1409-1416.
- Nixon B, Aitken RJ. 2009. The biological significance of detergent-resistant membranes in spermatozoa. *Journal of Reproductive Immunology* 83:8-13.
- O'Meara CM, Hanrahan JP, Prathalingan NS, Owen JS, Donovan A, Fair S, Ward F, Wade M, Evans ACO, Lonergan P. 2008. Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 69(4):513-22.
- O'Flaherty C, Beconi M, Beorlegui N. 1997. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrología* 29:269-275.
- Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. 1999. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. *Biol Reprod* 60:515-521.
- Papadopoulos S, Hanrahan JP, Donovan A, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. 2005. In vitro fertilization as a predictor of fertility from cervical insemination of sheep. *Theriogenology* 63:150-159.
- Parkinson TJ, Whitfield CH. 1987. Optimisation of freezing conditions for bovine spermatozoa. *Theriogenology*.27:781-797.

- Parks JE, Lee DR, Huang S, Kaproth MT. 2003. Prospects for spermatogenesis in vitro. *Theriogenology* 59:73-86.
- Peña FJ, Saravia F, García-Herreros M, Núñez-Martín I, Tapia JA, Johannisson A, Wallgren M, Rodríguez-Martinez H. 2005. Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality. *J Androl* 26:716–723.
- Peris SI, Morrier A, Dufour M, Bailey JL. 2004. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm ADN damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *J Androl* 25:224-233.
- Polge C, Smith AU, Parkers AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949:164:666.
- Pope CE. 2000. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology* 53:163-174.
- Popwell JM, Flowers WL. 2004. Variability in relationships between semen quality and estimates of in vivo and in vitro fertility in boars. *Ani Reprod Sci* 81:97-113.
- Ramón M, Jiménez-Rabadan P, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Soler AJ, Fernández-Santos MR, Pérez-Guzman MD, Garde JJ. 2014. Understanding sperm heterogeneity: biological and practical implications. *Reproduction in domestic animals* 49:30-36.
- Ramón M, Martínez-Pastor F, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Soler AJ, Jiménez-Rabadan P, Fernández-Santos MR, Bernabeu R, Garde J J. 2012. Taking advantage of the use of supervised learning methods for characterization of sperm population structure related with freezability in the Iberian red deer. *Theriogenology* 77:1661-1672.

- Ramón M, Pérez-Guzman MD, Jiménez-Rabadan P, Estes MC, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Anel-López L, Soler AJ, Fernández-Santos MR, Garde JJ. 2013. Sperm cell population dynamics in ram semen during the cryopreservation process. *PLoS one* 8, e59189.
- Rath D, Niemann H. 1997. In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology* 47:785:793.
- Reis MM, Tsai MC, Schlegel PN, Feliciano M, Raffaelli R, Rosenwaks Z, Palermo GD. 2000. Xenogeneic transplantation of human spermatozoa. *Zygote* 8:97-105.
- Revell SG, Mrode RA. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci* 36:77-86
- Rijsselaere T, Van Soom A, Hoflack G, Maes D, de Kruif A. 2004. Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser. *Theriogenology*. 62:1292–1306.
- Roca J, Rodríguez MJ, Gil MA, Carvajal G, Garcia EM, Cuello C, Vázquez JM, Martínez EA. 2005. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J Androl* 26:15-24.
- Rodríguez-Martínez H, Barth AD. 2007. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 64:39-54.
- Rodríguez-Martínez H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Domest Anim* 38:312–318.
- Roldan ERS, Cassinello J, Abaigar T, Gomendio M. 1998. Inbreeding, fluctuating asymmetry and ejaculate quality in an endangered ungulate. *Proceedings of the Royal Society of London, series B* 265: 243-248

- Roldan ERS, Garde JJ. 2004. Biotecnología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción. En: Los Retos Medioambientales del siglo XXI. La Conservación de la Biodiversidad en España. M Gomendio (ed). Fundación BBVA, Bilbao pp. 283-307.
- Rybar R, Faldikova L, Machatkova M, Rubes, J. 2004. Bull and boar sperm ADN integrity evaluated by sperm chromatin structure assay in the Czech Republic. *Veterinary Medicine (Czech)* 1:1-8.
- Saacke RG, White JM. 1972. Semen quality test and their relationship to fertility. In: Proceedings of the 4th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction. NAAB, Columbia, MO, pp. 22-27
- Salamon S, Maxwell WMC. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62:77-111.
- Sánchez-Partida LG, Windsor DP, Eppleston J, Setchell BP, Maxwell WM. 1999. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. *J Androl* 20:280-288.
- Schlatt S, Honaramoo A, Boiani M, Scholer HR, Dobrinski I. 2002. Progeny from sperm obtained after ectopic grafting of neonatal mouse testes. *Biol Reprod* 68:2331-2335.
- Schlatt S, Kim SS, Gosden R. 2002. Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotopic grafting to castrated hosts. *Reproduction* 124:339–346.
- Seidel GE, Johnson IA. 1999. Sexing mammalian sperm – Overview. *Theriogenology* 52:1267-1272.
- Seidel GE. 2003. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. *Theriogenology* 59:585-598.

- Sekoni VO, Gustafsson BK. 1987. Seasonal variations in the incidence of sperm morphological abnormalities in dairy bulls regularly used for artificial insemination. *Br Vet J* 143:312–317.
- Simon L, Lutton D, McManus J, Lewis SE. 2011. Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertil Steril*.95:652-657.
- Smikle CB, Turek PT. 1997. Hypo-osmotic swelling can accurately assess the viability of nonmotile sperm. *Mol Reprod Dev* 47:200-203.
- Sofikitis N, Kaponis A, Mio Y, Makredimas D, Giannakis D, Yamamoto Y, Kanakas N, Kawamura H, Georgiou J, Schrader L, Lolis E, Giannakopoulos X, Loutradis D, Tarlatzis V, Miyagawa I. 2003. Germ cell transplantation: a review and progress report on ICSI from spermatozoa generated in xenogeneic testes. *Human Reproduction Update* 9:291-307.
- Soler AJ, Estes MC, Fernández-Santos MR, Garde JJ. 2005. Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5°C in the epididymis for several days. *Theriogenology* 64:1503-1517.
- Soler AJ, García AJ, Fernández-Santos MR, Estes MC, Garde JJ. 2003. Effects of thawing procedure on post-thawed in vitro viability and in vivo fertility of red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. *J Androl.* 24:46-56.
- Soler AJ, Garde JJ. 2003. Relation between the characteristics of epididymal red deer spermatozoa and penetrability into zona-free hamster ova. *J Androl* 24(3):393-400.
- Songsasen N, Leibo SP. 1997. Cryopreservation of mouse spermatozoa ii Relationship between survival after cryopreservation and osmotic tolerance of spermatozoa from three strains of mice. *Cryobiology* 35:255–269.

- Spano M, Bonde J, Hjollund HI, Kolstadt HA, Cordelli E, Leter G. 2000. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertility and Sterility* 73:43-50.
- Storey BT. 2008. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *The International Journal of Developmental Biology* 52:427-437.
- Suarez SS. 2002. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod Domest Anim* 37:140–143.
- Tebet JM, Martins MI, Chirinea VH, Souza FF, Campagnol D, Lopes MD. 2006. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology* 66(6-7):1629-32.
- Thomas CA, Garner DL, Dejarnette JM, Marshall CE. 1997. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod.* 56:991–998
- Thompson LA, Brook PF, Warren MA, Barratt CLR, Cooke ID. 1994. A morphometric comparison of the nuclear morphology of fresh and frozen-thawed human zona-bound and unbound sperm. *J Androl* 15:337–342.
- Thurston LM, Siggins K, Mileham AJ, Watson PF, Holt W. 2002. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biol Reprod* 66:545- 554.
- Thurston LM, Watson PF, Holt WV. 1999. Sources of variation in the morphological characteristics of sperm sub-populations objectively assessed by a novel automated sperm morphology analysis system. *J Reprod Fertil* 117:271–280.
- Thurston LM, Watson PF, Mileham AJ, Holt WV. 2001. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier Shape Descriptors

- in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J Androl.* 22:382–394
- Topfer-Petersen E, Friess AE, Stoffel M, Schill WB. 1990. Boar sperm membranes antigens. II. Reorganization of an integral membrane antigen during capacitation and acrosome reaction. *Histochemistry* 93:491-495.
- Van Steirteghem, AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, Wisanto A, Devroey P. 1993. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 8:1061-1066.
- Vázquez JM, Parrilla I, Rija J, Gil MA, Cuello C, Vázquez JL, Martínez EA. 2009. Sex-sorting sperm by flow cytometry in pigs: issues and perspectives. *Theriogenology* 71(1):80-8.
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development (Cambridge, England)* 121:1129-1137.
- Volpe S, Leoci R, Aiudi G, Lacalandra GM. 2009. Relationship between motility and mitochondrial functional status in canine spermatozoa. *Reprod Domest Anim.* 44:275-278.
- Wai-sum O, Chen H, Chow PH. 2006. Male genital tract antioxidant enzymes-Their ability to preserve sperm ADN integrity. *Mol Cell Endocrinol* 250:80-83.
- Wall RJ, Foote RH. 1999. Fertility of bull semen frozen and store in clarified egg yolk-Tris-glycerol extender. *J Dairy Sci* 82:817-821.
- Wang WH, Abeydeera LR, Fraser LR, Niwa K. 1995. Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and IVF of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J Reprod Fertil.* 104:305–313.

- Watson PF, Holt WV. 2001. Cryobanking the Genetic Resource: Wildlife conservation for the Future? Taylor and Francis, London.
- Watson PF, Morris GJ. 1987. Cold shock injury in animal cells. In: Bowler K, Fuller BJ, (ed), Temperature and animal cells. Cambridge: Company of Biologists Limited; pp 311-340.
- Watson PF. 1979. The preservation of semen in mammals. In: Reviews of Reproduction Biology. Finn CA (ed) Oxford: University Press pp. 283-351.
- Watson PF. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 7:871-891.
- Whilhelm KM, Grahamn JK, Squires EL. 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.
- White IG. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A review. *Reprod Fertil Dev* 5:639-658.
- Wildt DE, J Howard y J Brown. 2001. Reproductive sciences in carnivore conservation. En: *Carnivore Conservation*. J.L. Gittleman, S.M. Funk, D. Macdonald y R.K. Wayne, eds. Cambridge, Cambridge University Press, pp. 359-371.
- Wildt DE. 1990. Potential applications of IVF technology for species conservation. En: *Fertilization in Mammals*. B.D. Bavister, J.M. Cummins y E.R.S. Roldan eds. Norwell, MA, Serono Symposia, pp. 349-364.
- Wildt DE. 2000. Genome resource banking for wildlife research, management and conservation. *ILAR J* 41:4:228-234.

- Withfield CH, Parkinson TJ. 1995. Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by in vitro induction of acrosome reactions with calcium ionophore (A23187). *Theriogenology* 44(3):413-22.
- Xie F, Garcia MA, Carlson AE, Schuh SM, Babcock DF, Jaiswal BS, Gossen JA, Esposito G, van Duin M, Conti M. 2006. Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Developmental biology* 296:353-362.
- Yassen AM, Foote RH. 1967. Freezability of bull semen in centrifuged or dialyzed and reconstituted buffered egg yolk extenders. *J Dairy Sci* 50:1481-1485.
- Yoshida M, Forsberg M, Greve T, Gustafsson H, Katila T, Kindahl H, Ropstad E. 2000. Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim Reprod Sci* 60-61:349-355.
- Zeng Y, Clark EN, Florman HM. 1995. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol* 171:554-563.
- Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H. 1997. Relations between embryo development in vitro and 56-day non-return rates of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. *Theriogenology* 48:221-231.
- Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H. 1998. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. *Int J Androl* 21:207-216.

DISCURSO DE CONTESTACIÓN DEL ACADÉMICO DE
NÚMERO
**EXCMO. SR. DR. D. ARTURO RAMÓN ANADÓN
NAVARRO**

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia de Doctores de España,
Excmas. y Excmos. Señores Académicos,
Señoras y Señores,

Mis primeras palabras han de ser para manifestar mi agradecimiento y confianza que me ha otorgado la Junta de Gobierno de la Real Academia de Doctores de España y a su Presidente, así como a todos los académicos de esta Corporación por el hecho de darme la responsabilidad de presentar a un nuevo Académico de Número el Prof. Dr. José Julián Garde López-Brea. El encargo para mi constituye un honor que me llena de satisfacción, pues es una ocasión de dejar testimonio de la admiración y el respeto que tengo por el Profesor Garde López-Brea con el que me une el tener una sincera amistad, la misma profesión, coincidencias en nuestras vidas paralelas y que nos dediquemos al estudio y cultivo de ámbitos científicos próximos y relacionados.

La incorporación del Dr. José Julián Garde López-Brea para esta Real Academia de Doctores de España, medalla nº 60 de la Sección 10: Veterinaria, es una mejora en la trayectoria y calidad y excelencia de sus miembros y actividades. Conozco su perfil humano, científico y profesional, su capacidad de gestión universitaria y su personalidad; ello nos debe honrar a todos pues enmarca a esta Docta Institución en su prestigio.

Don José Julián Garde López-Brea, nace en Madrid el año 1966. Pertenece a una familia veterinaria pues su padre también lo es. Su padre D. Julián Garde Pinar trabajó durante muchos años en el Ministerio de Agricultura y con él tuve relación profesional, mucho aprecio y respeto. Posiblemente la profesión de su padre le marco en su devenir profesional pues supo inculcarle el amor por los animales y una pasión por la naturaleza. Cursó la licenciatura en veterinaria en la Universidad

Complutense de Madrid que finalizó en 1989 y defendió el Doctorado en Veterinaria en la misma Universidad en 1993. Sus primeros comienzos fueron en el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) en el que entró como becario predoctoral para poner a punto y desarrollar las investigaciones que le llevarían a la realización de su Tesis Doctoral titulada “Congelación de semen en la especie ovina: Características Biológicas de las dosis descongeladas” bajo la dirección de la Dra. Isabel Vázquez González, Investigadora científica de este organismo, iniciándose así en el campo de la reproducción animal. En el año 1992 dejó de ser becario predoctoral en el INIA para trasladarse a la Consejería de Agricultura y Medio Ambiente de la Comunidad Autónoma de Castilla La Mancha en Valdepeñas, donde desempeñó un puesto de relevancia administrativa. Al cabo de un año de estar en esta Consejería se incorporó a tiempo completo como Profesor Ayudante de Escuela Superior en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes de la Universidad de Castilla La Mancha, campus de Albacete, puesto que desempeñó durante un año (1993-1994) para pasar a ser nombrado a continuación Profesor Asociado a tiempo completo de dicha Universidad (1994-1997). Desde entonces inicia una vertiginosa carrera docente e investigadora. En el año 1997, mediante concurso-oposición obtiene la plaza de Profesor Titular de Universidad posición en la que permaneció hasta que también por concurso-oposición alcanzó en el año 2003 una Cátedra de Universidad, de nueva dotación, adscrita al área de conocimiento “Producción Animal” de la Universidad de Castilla La Mancha (UCLM).

En cuanto a su **actividad docente** indicar, como he señalado, que es Catedrático de Universidad de la Universidad de Castilla-La Mancha del área de conocimiento “Producción Animal” con destino en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes, y adscrito al Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética, campus de Albacete. En esta Escuela Técnica superior ha ocupado los cargos

académicos de vicesecretario (1996-1997) y de subdirector (1997-1999), habiendo contribuido a la revisión y modificación de los planes de estudios de los títulos vinculados a las referidas ingenierías, grados y másteres. En la Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes ha sido responsable de las disciplinas de biología y fisiología animal, fisiología y tecnología de la reproducción animal y zoología.

Este bagaje docente le confiere conocimientos de las ingenierías relacionadas con la Agronomía, y el ámbito Forestal, y le da la oportunidad desde el curso académico 2011-2012 de ser profesor de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Castilla-La Mancha, impartiendo docencia en las disciplinas de Fisiología Humana y Fisiopatología Molecular, destacándose que fue uno de los profesores fundadores de esta facultad que entra a iniciar los estudios en el curso académico previo es decir 2010-2011. Durante estos años académicos el Prof. Garde ha contribuido al desarrollo de esta nueva facultad y además ha trabajado en la memoria que ha permitido que recientemente el grado de farmacia de la UCLM haya sido reconocido por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte con el Nivel 3 del Marco Español de Cualificaciones para la Educación Superior (MECES).

Desde el año 2000 y durante varios años, el Prof. Garde ha impartido, como profesor, enseñanza reglada en el máster sobre “Conservación y gestión de los recursos cinegéticos” del que ha sido también subdirector. En el año 2004-2005 fue Profesor del Máster en Ingeniería Agroambiental y actualmente es profesor y director del máster sobre “Biotecnología reproductivas aplicadas a pequeños rumiantes (domésticos y silvestres)”. Es de destacar que ha impartido docencia en Iberoamérica habiendo sido nombrado Profesor invitado en la Universidad Nacional de Comahue (1995), y Profesor Asociado *Ad Honorem* en la Universidad de la Pampa (1998-1999), ambas universidades de Argentina.

Inició su **experiencia investigadora** con los estudios de distintos aspectos de la biología y la criobiología espermática durante la realización de su Tesis Doctoral continuando con investigaciones relacionados con la biotecnología reproductiva, andrología e interacción de gametos, prestando especial interés en espermatozoología y criobiología espermática en el ciervo Ibérico, así como en la de otros pequeños rumiantes tanto domésticos como silvestres. Indudablemente y como lógica consecuencia de la aplicación de las investigaciones generadas durante el transcurso de estos trabajos experimentales, se consiguió la difusión y aplicación de algunas de las tecnologías reproductivas desarrolladas con objetivos meramente de interés zootécnico.

El Dr. Garde, adquirió experiencia en el campo de la biología molecular y la capacitación espermática en diferentes centros e institutos nacionales e internacionales, destacando la estancia como becario posdoctoral realizada en el Babraham Institute (Cambridge, Reino Unido), instituto establecido por el Agricultural Research Council y el Medical Research Council con el objetivo de investigar sobre cuestiones de biología fundamental, y desarrollo y respuesta de organismos al medio ambiente. Desde 1989, y con la experiencia adquirida en estos centros el Prof. Garde ha desarrollado trabajos de investigación aplicando las biotecnologías reproductivas a la conservación animal y participando en un destacado programa de conservación del lince ibérico, entre otras actividades de interés científico.

El profesor Garde fundó en 1999, el laboratorio de biología de la reproducción de la Universidad de Castilla-La Mancha donde ha creado un grupo consolidado de investigación, de trabajo multidisciplinar que ha sido pionero en España en la aplicación de la inseminación artificial en el ciervo Ibérico. En la actualidad es investigador responsable del área de reproducción de este grupo consolidado de investigación de la Universidad de Castilla-La Mancha. Y desde el año 1999 es también investigador del “Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos” (IREC), centro mixto

Universidad Castilla-La Mancha, Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha.

Es miembro de la Society for the Study of Reproduction y de la American Society of Andrology. Premiado en la primera de edición (2001) de los premios de Investigación de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha con el premio Joven Investigador “Luisa Sigea de Velasco” en recuerdo de la gran escritora y poetisa de la corte de Don Manuel de Portugal, también conocida como la Toledana y profunda conocedora del latín así como del griego, el árabe y el siríaco. Fue miembro del Comité organizador del 10th International Symposium on Spermatology, que se celebró en Madrid en septiembre de 2006.

Posee cuatro de los cuatro sexenios de investigación posibles (2014) y cinco de los cinco quinquenios de docencia posibles, evaluados favorablemente. Tiene más de 125 publicaciones científicas publicados en revistas internacionales de su especialización recogidas en el *Science Citation Index* (ISI web of Sciences) y 25 capítulos en libros de difusión nacional sobre reproducción animal en editoriales muy reconocidas que dejan constancia clara de un quehacer laborioso e intenso. Las principales revistas internacionales de su especialidad han publicado sus trabajos en particular: *Biology of Reproduction*, *PLOS one*, *Reproduction in Domestic Animals*, *International Journal of Andrology*, *Biology Letter and Science*. Ha presentado más de 190 contribuciones a congresos, de las que 11 son ponencias en congresos internacionales y ponente en más de 80 conferencias y cursos. Ha tutorizado a 9 estudiantes en programas internacionales con Venezuela (2), Perú (1), Argentina (1), Argelia (1) y Alemania (4). Ha dirigido 14 tesis doctorales y 16 proyectos fin de carrera a estudiantes ingenieros superiores e ingenieros técnicos agrónomos referidos a oveja de raza manchega, muflón y ciervos. Podemos concluir que el Dr. Garde posee 1581 citas y un índice hSCI de 27. El *índice h* actúa como marcador de productividad y como evaluador de impacto, lo que le ha permitido ganar protagonismo como indicador bibliométrico de la

difusión científica. El dígito “*h*” equipara las publicaciones de una revista o de un autor y las citas que estas han obtenido. Un *índice h* 27, por ejemplo, quiere decir que hay 27 publicaciones de un mismo autor que han recibido cada una de ellas al menos 27 citas. En definitiva, el factor de impacto de las revistas y el índice hSCI se toman como índices de producción científica en el marco de la calidad y excelencia.

El Dr. Garde ha disfrutado de 24 proyectos de investigación de financiación pública [1 proyecto europeo, 16 proyectos nacionales (11 como investigador principal), 7 proyectos regionales (6 como investigador principal)]. Durante su trayectoria investigadora hay que destacar la transferencia de algunos de los resultados obtenidos a las empresas del sector. Ha logrado 16 contratos de I+D competitivos cofinanciados con empresas privadas, CDTI y Fondo Tecnológico, de los que 14 son como investigador principal.

Actualmente, está llevando a cabo trabajos relacionados con el sexado de espermatozoides desarrollando nuevos medios para poder aplicar de una forma efectiva esta técnica en ciervos, gracias a que desde el año 2011 se le han concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad, actualmente de Economía, Industria y Competitividad 3 proyectos de investigación en esta línea de trabajo. Hay que señalar que la consecución de todos estos proyectos en los que ha sido investigador principal ha sido posible gracias al esfuerzo de su grupo de investigación con perfil competitivo, dinámico y acreditado en la Universidad de Castilla La Mancha, cuyo valor le ha permitido publicar en excelentes revistas de investigación.

Revisor de proyectos investigación para: Agencia Nacional de Evaluación y Prospección (ANEP), Ministerio de Ciencia y Tecnología, Ministerio de Educación y Ciencia, Instituto de Salud Carlos III, Generalitat Valenciana, Fundación Séneca de la Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de

Murcia, INIA, Ministerio de Agricultura, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, CSIC, CONICET (Argentina), y FONCYT (Argentina).

Por último, en la **actividad de gestión** señalaremos que fue vocal del Área de Ganadería de la ANEP (2006-2009) posición que le permitió adquirir conocimientos muy profundos de los temas de investigación desarrollados en nuestro país en el ámbito de las Ciencias Veterinarias y la Ingeniería Agronómica vinculada a la Producción Animal.

El Dr. Garde fue vicedirector del IREC durante cuatro años (1999-2003) y durante una corta etapa de un año director del mismo (2003-2004). Hasta el año pasado ha sido también director de la Cátedra ENRESA (2013-2016). Ha sido Vocal asesor (2011-2012) y Presidente (2013) del Comité 6.1 (Tecnologías Mecánicas y de la Producción), de la Comisión Nacional de Evaluación de la Actividad Investigadora (CNEAI), que como es conocido se encarga de evaluar la actividad investigadora (sexenios) del profesorado universitario y de los investigadores del CSIC. El comité 6.1 de la CNEAI evalúa las solicitudes de 45 campos científicos relacionados con las Ingenierías y la Arquitectura. Por ello, en estos tres años de dedicación a la CNEAI le han permitido conocer de forma exhaustiva los ámbitos de la investigación vinculados a la ingeniería.

Coordinador y profesor del programa de doctorado “Biología de los recursos cinegéticos” desde el curso 2002-2003 hasta la fecha, es de destacar la mención de calidad, otorgada a este programa por la Agencia Nacional de Evaluación de la Calidad y Acreditación (ANECA),

Desde el año 1996 es director de la sección de recursos cinegéticos del Instituto de Desarrollo Regional de la Universidad de Castilla-La Mancha.

En la actualidad es Vicerrector de Investigación y Política Científica de la Universidad de Castilla-La Mancha, cargo que ocupa desde el año 2011, y académico de número de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España, con la medalla nº 10, desde el año 2006.

En el plano personal al Dr. Garde se le caracteriza por ser una persona organizada y con buen método de trabajo, al que se une su carácter moderado, talante dialogante, ponderado juicio y pensamiento claro que le hace ser muy resolutivo y brillante en sus decisiones.

EL DISCURSO

Por su carácter preceptivo, voy a dedicar un comentario al discurso de ingreso que acabamos de escuchar, pues su omisión pudiera parecer descortesía. Glosa que ha de ser necesariamente muy breve y a la vez superficial pues me resultaría muy difícil aportar alguna novedad a un tema que ha sido magistralmente presentado por el nuevo académico y que además lo conoce por su experiencia investigadora personal y la de su equipo de investigación desde hace más de 25 años.

Desde hace décadas los espermatozoides de los mamíferos han sido sometidos a diversos procedimientos para su conservación y uso mediante el empleo de técnicas de reproducción artificial. Las razones que han justificado su empleo han sido de tipo zootécnico, sanitario, de manejo, conservacionistas y de bienestar animal, y siguen teniendo vigencia en el Siglo XXI. Los espermatozoides pueden ser así objeto de producción *in vitro*, mediante xenotrasplante, conservación por refrigeración o congelación, o manipulación por sexado y enriquecimiento. Aunque no existieran entonces, ya se intuían todas estas técnicas que utilizamos en la actualidad. El Profesor Bonadonna, de la Universidad de Milán (Italia) hablaba de fecundación instrumental, hoy convertida en fecundación asistida en España, como más acorde a la utilización en el género humano. En ocasiones, varias de estas técnicas se emplean de forma conjunta. Como células altamente especializadas y sensibles, cuando son así procesadas y manipuladas resultan frecuentemente dañadas, a veces con microlesiones, y con sus propiedades alteradas, lo cual reduce su capacidad fecundante.

La biología y tecnología espermáticas han experimentado un verdadero progreso en los últimos años, gracias a los avances que ha supuesto la aplicación de técnicas de biología molecular, hecho que ha permitido adoptar nuevos enfoques en temas de investigación básicos, así como el desarrollo de nuevas biotecnologías. Entre las biotecnologías espermáticas de mayor potencial se encuentran la criopreservación y el sexado de espermatozoides, ambas con aplicaciones de gran alcance para la producción animal en especies de interés económico, la conservación de la biodiversidad, y la salud animal y humana. A lo largo de su discurso, el Profesor Garde ha abordado estos temas, combinando resultados y hallazgos científicos derivados de investigación iterativa y creciente con los de la investigación puntera o desgarradora. Igualmente, ha tratado en este discurso con especial dedicación los aspectos relacionados con la evaluación espermática y las posibilidades de predicción *in vitro* de la fertilidad masculina, dedicando especial atención a las técnicas de fecundación *in vitro* heteróloga, como el test del hámster, y la homóloga.

Elabora en su discurso una reseña de las propiedades biológicas y estructurales del objeto de estudio de la espermatología: el espermatozoide. Para posteriormente, dar a conocer el estado del arte de las diferentes técnicas de reproducción asistida que emplean espermatozoides como gametos vehiculados en veterinaria. Con maestría singular nos ha mostrado las inmensas posibilidades que ofrecen tanto desde un punto de vista teórico-práctico estas tecnologías espermáticas. Desde sus aplicaciones en el mantenimiento del equilibrio genético de poblaciones, a las que dedica una atención especial, a su uso para la producción de gametos derivados de células madre embrionarias o de células somáticas. Todos los aspectos tratados se estructuran en un conjunto coherente, en el que se combinan en su discurso de ingreso ordenadamente conceptos teóricos con métodos de trabajo.

A pesar de los muchos esfuerzos por aumentar la eficacia de los diferentes procesos tecnológicos aplicados a los espermatozoides, muchos sectores todavía encuentran en el Siglo XXI que éstos tienen muchas limitaciones para su aplicación práctica e industrial. En este sentido, el Dr. Garde nos detalla las limitaciones de la espermatología veterinaria actual, muchas de las cuales han sido también limitaciones históricas en el pasado de esta disciplina científica. Problemas como la irregular respuesta a la congelación del semen en las diferentes especies; el desarrollo de medios químicamente definidos para la conservación y manipulación de los espermatozoides; la predicción *in vitro* de la capacidad fecundante *in vivo* de una dosis, eyaculado o seminal; el desconocimiento de los factores ligados al individuo que inciden en la resistencia espermática a la congelación o en la capacidad fecundante; o el análisis e identificación funcional de las lesiones y/o micro-lesiones producidas por los diferentes procesos biotecnológicos en las células espermáticas, son tan solo algunas de las limitaciones históricas de la espermatología veterinaria que lamentablemente hoy aún siguen vigentes y que han sido enumeradas por nuestro nuevo Académico en su discurso de ingreso.

Según refiere el Profesor Garde en su discurso, éstas y otras limitaciones de los procesos tecnológicos aplicados a los espermatozoides no pueden ser superadas a menos que haya una propuesta rompedora de las tendencias actuales de la investigación en esta especialidad dentro del campo de las ciencias veterinarias. Esta observación motiva a nuestro nuevo Académico a formular una aproximación totalmente nueva a la investigación, proponiendo soluciones enteramente novedosas, para abordar el problema de la congelación espermática. Esta propuesta es presentada de manera valiente y arriesgada en la parte final de su discurso, y la misma está basada en el empleo de resultados y hallazgos previos de su grupo de investigación, para en combinación con estudios de expresión génica diferencial en los espermatozoides, poder identificar donde residen a nivel de la célula espermática, las diferencias funcionales,

genómicas, proteómicas y metabolómicas entre espermatozoides con diferente resistencia al proceso de congelación espermática. Todo ello, con el objeto final de diseñar procesos y medios diluyentes para la congelación seminal basados en los hallazgos previos.

Como no puede ser de otra forma, nuestro nuevo Académico nos introduce durante el desarrollo de todo el discurso, en los resultados más relevantes de su línea de investigación, en la que lleva trabajando ya muchos años, particularmente referidas a especies silvestres y en especial al ciervo ibérico. Así, a lo largo de todo el discurso ha ido aportando resultados y datos procedentes de su trayectoria investigadora sobre espermatología veterinaria desarrollada durante estos últimos 25 años, especialmente los relacionados con el desarrollado metodologías eficaces de inseminación artificial con semen congelado en ungulados silvestres. Así, ha logrado una metodología de inseminación artificial en ciervas con semen obtenido *post-mortem* que reporta resultados de fertilidad al parto del 60%. Igualmente, en colaboración con el Grupo del Dr. Eduardo Roldán del Museo Nacional de Ciencias Naturales del CSIC, fueron pioneros, a nivel mundial, *en la obtención del primer ejemplar de una especie de gacela en peligro de extinción mediante el empleo de semen descongelado por inseminación artificial*. En los últimos años, el grupo suyo, en colaboración con el del Dr. Emilio Martínez de la Universidad de Murcia ha puesto a punto la técnica de sexado de semen congelado e inseminación artificial en ciervos, con unas tasas de machos nacidos en la descendencia superiores al 93%, estando, el ratio en el nacimiento de manera natural cercano al 53%. Todo ello, ha sido abordado en este discurso con un enfoque multidisciplinar y transversal.

No quisiera olvidarme de las publicaciones en la revista Science en donde el Profesor Garde y su equipo, conjuntamente con el grupo del Dr. Roldán, ha sido el primero en demostrar que los machos de ciervo más fértiles,

generan una mayor proporción de machos en su descendencia, mientras que los menos fértiles producen una mayor proporción de hembras. Estudios previos, desarrollados exclusivamente en hembras, habían demostrado que las ciervas dominantes producían más machos, mientras que las subordinadas producían más hembras, de acuerdo con la hipótesis de Trivers y Willard. Esta publicación y el significado evolutivo de estos resultados son descritos de manera exhaustiva al final de su discurso por nuestro académico, dejando abierta la posibilidad de la aplicación de los resultados obtenidos por su grupo para el sexado de espermatozoides empleando para ello, técnicas alternativas disruptivas.

El trabajo presentado es un catálogo de investigaciones que lleva a cabo desde hace años y que podemos calificar como un índice del que se puede seguir desarrollando nuevas investigaciones, no solo en el ciervo, sino también extrapolando las técnicas a otras especies que pueden adquirir y de hecho lo están haciendo, una importancia capital en la economía de ciertas regiones, en donde la dinámica de los nuevos tiempos económicos puede llevarnos.

Gracias por su atención.

HE DICHO

