



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL
“Dr. ABRAHAM HERNANDEZ PRADO”
POSTGRADO EN REPRODUCCIÓN ANIMAL Y
TECNOLOGÍA DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL



Evaluación de las Características Seminales de Sementales Bovinos mediante el Analizador Seminal Computarizado (CASA)

E.G. Gloria Agüero

Tutora: Thaís del Valle Díaz, M.V., MSc., PhD.

Asesores: Pedro Bastidas, M.V., MS., PhD.

Andrés Kowalski, Ing. Agr., MS., PhD.

Enero 2012

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS	v
DEDICATORIA	vii
AGRADECIMIENTO.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II: OBJETIVOS	4
Objetivo General	4
Objetivos Específicos	4
CAPÍTULO III: REVISIÓN DE LITERATURA	5
Evaluación de Semen	5
Características Macroscópica	5
Volumen	5
Color	6
Olor	6
Aspecto	6
Densidad macroscópica	6
Características Microscópicas	7
Motilidad masal	7
Motilidad individual	8
Vitalidad	10
Morfología	10

	Pág.
Concentración espermática	14
Evaluación de Semen asistida por Computadora (CASA)	15
Determinación de Sub-poblaciones Espermáticas	22
Parámetros que evalúan la motilidad de los espermatozoides.....	27
CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS	33
Unidades Experimentales	33
Procedimientos	34
Preparación de los medios de evaluación	34
Colección de semen	35
Evaluación de Semen	36
Características macroscópicas	37
Volumen	37
Color	37
Olor	37
Densidad macroscópica	37
Características microscópicas	38
Motilidad masal.....	38
Motilidad individual	38
Vitalidad	39
Morfología	39
Concentración espermática	39
Evaluación de Semen mediante el Sistema CASA	40
Determinación de sub-poblaciones espermáticas	42

	Pág.
Análisis Estadístico	44
CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
Estandarización del Método de Evaluación de Semen utilizando el Sistema Computarizado de Análisis Seminal (CASA)	46
Distribución de Sub-poblaciones Espermáticas	48
Relación entre Sub-poblaciones de Espermatozoides en Semen Fresco (SF) y Semen Descongelado (SD)	54
Efecto de la Criopreservación sobre las Sub-poblaciones de Espermato- zoides en Semen Fresco (SF) y Semen Descongelado (SD)	56
Variación de las Sub-poblaciones Espermáticas en el Tiempo	58
Morfología Espermática	61
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Clasificación de la motilidad espermática de acuerdo a la Sociedad de Teriogenología de los Estados Unidos de Norteamérica.....	9
2	Comparación de resultados para motilidad individual (MI) en semen fresco entre pruebas rutinarias de laboratorio y resultados obtenidos por el sistema CASA	46
3	Comparación de resultados para motilidad individual (MI) en semen descongelado entre pruebas rutinarias de laboratorio y resultados obtenidos por el sistema CASA	48
4	Distribución de las sub-poblaciones de espermatozoides en semen bovino fresco con base en la evaluación de la velocidad a través del sistema CASA.....	50
5	Distribución de las sub-poblaciones de espermatozoides en semen bovino descongelado con base en la evaluación de la velocidad a través del sistema CASA.....	52
6	Relación entre sub-poblaciones de espermatozoides en semen bovino fresco (SF) y semen bovino descongelado (SD) con base en la evaluación de la velocidad a través del sistema CASA.....	55
7	Efecto de la criopreservación sobre las sub-poblaciones en semen bovino fresco (SF) y semen bovino descongelado (SD)	57
8	Variación en el tiempo del patrón de las sub-poblaciones presentes en el semen fresco de toros reproductores	59

Cuadro		Pág.
9	Variación en el tiempo del patrón de las sub-poblaciones presentes en el semen bovino descongelado de toros reproductores	61
10	Porcentaje de atipias primarias, atipias secundarias y total de atipias en semen fresco	63

DEDICATORIA

A Dios, por todo lo que me das.

A la Divina Pastora, por protegerme a diario.

A mama Mira, donde estés.

A mi padre Alexander, por su gran corazón.

A mi madre Gloria, por su apoyo incondicional.

A la Dra. Thaís Díaz, por ser una segunda madre, mil gracias.

A mi esposo Julián, por ser un pilar en mi vida.

A mis amigos, por sus consejos oportunos.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Central de Venezuela, por brindarme esta maravillosa oportunidad de continuar con mi crecimiento académico.

Al personal del Instituto de Reproducción Animal “Dr. Abraham Hernández Prado” y de la Cátedra de Reproducción Animal, por apoyarme durante la realización de este trabajo, en especial al Sr. Nelson González, muchas gracias.

A la Dra. Thaís Díaz, quien fue mi guía y amiga durante todo este tiempo, gracias profe, por ayudarme.

Al Dr. Oscar Vera, por brindarme su apoyo y ayuda, por ser pieza fundamental en este trabajo.

Al Dr. Luis A. Vásquez, gracias por su apoyo y colaboración durante la realización de este trabajo.

A José Julián García, por apoyarme de manera incondicional, mil gracias por creer en mí.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar las características seminales de toros reproductores mediante el Sistema Computarizado de Análisis Seminal (CASA), el cual proporciona información precisa, objetiva y repetible. Para ello se evaluó un total de 18 eyaculados, provenientes de cinco toros reproductores de alto valor genético de las razas Holstein Negro, Carora, Mestizo F1 Holstein x Cebú, Jersey y Holstein Rojo, con edades entre 3 y 7 años. Se evaluó la motilidad individual en semen fresco (SF) y descongelado (SD) de manera rutinaria ($57,1 \pm 5,6\%$ y $57,2 \pm 5,7\%$, respectivamente) y a través del sistema CASA ($58,2 \pm 7,0\%$ y $58,2 \pm 7,0\%$, respectivamente), no observándose diferencias significativas entre ambos métodos. Con base en patrones de velocidad se estableció que existen cuatro sub-poblaciones de espermatozoides en SF y SD: espermatozoides con movimiento rápido (18% y 7%, respectivamente), movimiento medio (40% y 37%, respectivamente), movimiento lento (32% y 45%, respectivamente) y estáticos (10% y 11%, respectivamente), no siendo significativa la interacción tipo de semen (SF *versus* SD) x eyaculado (1, 2, 3, 4, 5 eyaculados) x calidad de movimiento (rápidos, medios, lentos y estáticos), lo cual indica que la distribución de las sub-poblaciones espermáticas se mantiene entre el SF y SD. Al evaluar el efecto de la criopreservación sobre las sub-poblaciones, determinamos que los espermatozoides rápidos fueron más abundantes (18%) en SF que en SD (7%), los espermatozoides con velocidad media fueron similares (40% en SF y 37% en SD). La sub-población de espermatozoides lentos presentó mayor diferencia, siendo 32% en SF y 45% en SD. En el caso de la fracción de células espermáticas estáticas fue similar entre ambos tipos de semen (10% en SF y 11% en SD). Al evaluar la variación de las subpoblaciones en SF a través del tiempo, la sub-población de movimientos medios se mantuvo sin mayor variación, habiendo variación en las sub-poblaciones de espermatozoides rápidos y estáticos. En el SD las sub-poblaciones de espermatozoides medios y lentos fueron las que menos variaron, mientras que la de movimientos rápidos varió poco, siendo la subpoblación de estáticos la que presentó mayor variación. Con base en lo anterior, se puede concluir que el sistema CASA es un método eficiente, repetible y confiable para la evaluación seminal toros reproductores.

Palabras clave: semen, toros, evaluación seminal, CASA.

ABSTRACT

In order to evaluate seminal characteristics of bulls using the Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) system, which provides precise, objective and repeatable information, a total of 18 ejaculates from five Holstein, Carora, Crossbred F1 Holstein x Zebu, Jersey and Red Holstein bulls of high genetic value, 3 to 7 years of age, was used. Individual motility in fresh semen (FS) and semen after cryopreservation (CS) was evaluated by the conventional method ($57,1 \pm 5,6\%$ y $57,2 \pm 5,7\%$, respectively) and thorough the CASA system ($58,2 \pm 7,0\%$ y $58,2 \pm 7,0\%$, respectively) without differences between methods. Based on sperm motility patterns it was established that there are four sperm subpopulations in FS and CS: 1) spermatozoa which move rapidly (18% and 7%, respectively), 2) spermatozoa with moderate movements (40% and 37%, respectively), 3) spermatozoa with slow movements (32% and 45%, respectively) and 4) static spermatozoa (10% and 11%, respectively). The triple interaction among semen type (FS versus CS), ejaculate (1, 2, 3, 4, 5 ejaculates) and quality of movement (fast, moderate, slow and static) was not significant, which indicates that the distribution of sperm subpopulations is maintained from FS to CS. When the effect of cryopreservation was evaluated we found that the subpopulation of rapid spermatozoa was higher in FS (18%) than in CS (7%). Spermatozoa with moderate movements were similar (40% for FS and 37% for CS). The subpopulation of slow spermatozoa had the biggest difference (32% in FS and 45% in CS). Static cells subpopulations were similar between FS and CS (10% for FS and 11% for CS). The variation of different sperm subpopulations across time in FS was evaluated, with no variation in the moderate movement subpopulation, but with differences in rapid and static sperm subpopulations. In CS, moderate and slow sperm subpopulations did not change as much as the rapid sperm subpopulation, and the static sperm subpopulation varied the most. Based on these results we can conclude that the CASA system is an efficient, repeatable and trusted method to be used for seminal evaluation in bulls.

Key words: semen, bulls, seminal evaluation, CASA

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las investigaciones en el área de Reproducción Animal, se han basado en solventar los problemas reproductivos de las vacas, sin hacer mayor énfasis en los posibles problemas que el toro puede aportar a la falla en la reproducción. Es por esto, que debemos tomar en cuenta la evaluación del semental, que independientemente de la modalidad de reproducción, sea monta natural, inseminación artificial, fertilización *in vitro*, entre otros, a través de la cual el macho se incorpora al proceso reproductivo, siempre debemos contar con el aporte del mismo, para lograr obtener una nueva descendencia que sea productiva y que incremente la oferta alimenticia para la población venezolana, de una forma más eficiente y de mayor calidad.

En la actualidad los estudios andrológicos que se realizan en el país con el fin de conocer el estatus reproductivo de los toros, se han basado principalmente en la evaluación de muestras seminales, por medio de exámenes rutinarios de laboratorio, mediante la observación de la muestra por microscopía óptica. De esta manera, se obtienen valores que nos permiten clasificar al semen, siendo una valoración subjetiva; pero por otro lado, es el método más simple, rápido y económico de evaluar la calidad seminal. La evaluación del semen de toros se realiza a través de pruebas rutinarias de laboratorio, pruebas macroscópicas y microscópicas, dentro de

las cuales existen parámetros que son evaluados de forma subjetiva y que varían según la destreza o experiencia del evaluador. Así, el error humano juega un papel definitivo en la selección, a través de la calidad seminal, de los sementales, razón por la cual, se hace necesario unificar criterios mediante el uso de equipos computarizados que permitan ser más objetivos en la evaluación seminal, además de brindar mayor número de parámetros de evaluación, tales como: velocidad del espermatozoide, tamaño de la cabeza y del flagelo, entre otros, los cuales no se evalúan de forma rutinaria por lo complicado y laborioso de su valoración, parámetros que de forma directa tipifican un eyaculado, permitiendo conocer la calidad del semen de forma más apropiada, objetiva y repetible.

Sin embargo, existen otros métodos más sofisticados de evaluación seminal. En este sentido, el Sistema Computarizado de Análisis Seminal (*Computer Assisted Sperm Analysis, CASA*, por sus siglas en Inglés) proporciona información precisa, objetiva y repetible de las características de las células espermáticas, siendo una de estas características el porcentaje de células móviles presentes en una muestra de semen y la calidad media de este movimiento, lo que permite establecer parámetros reproductivos más confiables de toros reproductores. Todas estas ventajas, junto con precios cada vez más accesibles, hacen que hoy en día el uso del sistema CASA, al menos en centros de Inseminación Artificial (IA) de bovino, sea más común.

Entre las metas que se plantean en este trabajo, está evaluar, de forma estandarizada, la calidad seminal de toros reproductores, como una manera de garantizar que estos animales sean más eficientes en la reproducción, así como el aporte que éstos realizan al proceso de la fecundación. Con base a lo anteriormente expuesto se plantearon los siguientes objetivos:

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar las características seminales de toros reproductores mediante el Sistema Computarizado de Análisis Seminal (CASA).

Objetivos Específicos

- 1) Estandarizar el método de evaluación de semen utilizando el Sistema Computarizado de Análisis Seminal (CASA).
- 2) Establecer, a través del Sistema Computarizado de Análisis Seminal en el eyaculado de toros reproductores, lo siguiente:
 - a) El tipo y número de sub-poblaciones de espermatozoides.
 - b) La relación entre sub-poblaciones de espermatozoides en semen fresco y semen descongelado.
- 3) Evaluar en el tiempo el patrón de sub-poblaciones presentes en el eyaculado de toros reproductores.

CAPÍTULO III

REVISIÓN DE LITERATURA

Evaluación de Semen

Según Muiño *et al.* (2007), la motilidad espermática normalmente se valora de forma subjetiva, mediante la observación de una muestra de semen a través de un microscopio de contraste de fase, coadyuvado de una platina calentadora a 37°C. Este es el método más simple, rápido y barato de evaluar la motilidad, pero tiene el inconveniente de ser altamente subjetivo.

El método estándar para evaluar la fertilidad de machos reproductores, aparte de la evaluación directa de vacas gestantes en un rebaño, es el examen del semen, mediante su uso podemos predecir el potencial reproductivo de los sementales, dicha evaluación se realiza por medio de la observación de características macroscópicas y microscópicas (Asprón, 2004).

Características Macroscópicas

Las características macroscópicas a evaluar en semen de bovinos son: volumen, color, olor, aspecto, densidad macroscópica.

Volumen: el volumen del eyaculado se expresa en mililitros (mL), y su lectura se hace por medio de un tubo recolector graduado. Normalmente dicho valor, para el eyaculado de toros, es de aproximadamente 2 mL en animales jóvenes y en animales adultos \geq a 4 mL, llegando hasta 12 mL.

Color: esta característica se evalúa por medio de la visualización en el laboratorio. El color del eyaculado depende del contenido de riboflavina, siendo normalmente desde blanquecino marfil hasta amarillento. Una coloración rojiza, indica la mezcla con sangre fresca; si el color es pardo, indica la presencia de sangre más vieja (hemolizada), denominándose ambos tipos como hemospermia. Una coloración gris indica contaminación. Los eyaculados sin espermatozoides tienen una coloración amarillo-verdosa y son de apariencia acuosa. El pus en el eyaculado se reconoce frecuentemente por la presencia de flóculos, denominándose piospermia.

Olor: las muestras de semen recolectadas higiénicamente, de toros sanos y fértiles, tienen un débil olor *sui generis*.

Aspecto: por aspecto del semen se entiende su consistencia normal y color. El aspecto depende del número de espermatozoides/mm³, de los componentes de secreción de las glándulas accesorias y de eventuales agregados como: sangre, pus, células epiteliales y contaminación externa.

Densidad macroscópica: para la evaluación de la densidad macroscópica se han establecido criterios basados en intervalos de concentración espermática, dependiendo de la opacidad de las muestras, lo que indica mayor o menor concentración espermática. Esta evaluación debe ser verificada en la evaluación microscópica, en la cual se calcula con gran precisión la concentración espermática, mediante el uso de la cámara de

Neubauer o cualquier método de cuantificación de concentración, como el espectrofotómetro.

En el caso de los bovinos, la densidad macroscópica se clasifica en:

- Azoospermico: ausencia de espermatozoides en el eyaculado.
- Oligozoospermico: ≤ 200 millones espermatozoides/mL.
- Ralo: 200–500 millones espermatozoides/mL.
- Semi-denso: 500–800 millones espermatozoides/mL.
- Denso: 800–1.500 millones espermatozoides/mL.
- Densísimo: ≥ 1.500 millones espermatozoides/mL.

Características Microscópicas

Las características microscópicas a evaluar en el semen de bovinos son: motilidad masal, motilidad individual, vitalidad, morfología, concentración espermática.

Motilidad masal: por movimiento de masa se entiende, el movimiento en onda de todos los espermatozoides, observado en los eyaculados densos. Para su evaluación se toma una gota del semen a examinar (gota de semen íntegro) con una pipeta, se coloca la gota sobre un portaobjeto a 37°C y se observa en campo claro (aumento 10X), sin colocar el cubreobjeto.

De acuerdo a Rosemberger (1981), el grado del movimiento en masa o motilidad masal (MM) se describe según la siguiente escala:

++++: Actividad cinética muy buena, remolinos intensos con ondas espermáticas apreciables.

+++ : Actividad cinética buena, remolinos apreciables aunque menos intensos.

++ : Actividad cinética regular, pocos remolinos y con menor frecuencia que la anterior.

+ : Actividad cinética deficiente, el semen no forma remolinos sino eventualmente y sin ninguna intensidad.

- : Actividad cinética ausente.

Motilidad individual: la motilidad individual de una muestra de semen se expresa como el porcentaje de células móviles bajo un campo microscópico. Esta prueba de la motilidad debe hacerse con la ayuda de un microscopio óptico (aumento 100X) a una temperatura de 37°C. El semen no diluido, está demasiado concentrado como para hacer la determinación exacta de la motilidad individual, por lo cual se diluye con una solución isotónica de NaCl al 0,9%, para poder observar individualmente a los espermatozoides.

En la evaluación de la motilidad individual de los espermatozoides se estima el porcentaje de células espermáticas con movimiento progresivo lineal (MPL), movimiento *in situ* y espermatozoides inmóviles. Para ello, se toma con una pipeta (esterilizada con aire caliente), 1 gota (de 10 µL) del semen diluido, se coloca sobre un portaobjeto a temperatura de 37°C y se

cubre con un cubreobjeto. Si se observa con el microscopio de contraste de fase a 100X, es recomendable realizar la estimación de la siguiente manera: al principio se evalúa si más de la mitad de los espermatozoides que hay en el campo poseen movimiento o no. Luego el examinador se debe concentrar en estimar el porcentaje de espermatozoides con movimiento lineal progresivo (X). Después se debe estimar el porcentaje de células con movimiento *in situ* (Y). En este sentido, el porcentaje de espermatozoides móviles se obtiene sumando X+Y.

Según la Sociedad de Teriogenología de Estados Unidos de Norteamérica (1992), la clasificación de la motilidad espermática masal y la individual puede correlacionarse (Cuadro 1), tomando como valores mínimos aceptables para monta natural, una muestra que posea una motilidad individual de 30% y una motilidad masal regular (+); mientras que para ser utilizado con fines de criopreservación, la muestra de semen deberá tener una motilidad masal regular (+) con 50% de motilidad individual.

Cuadro 1. Clasificación de la motilidad espermática de acuerdo a la Sociedad de Teriogenología de los Estados Unidos de Norteamérica

Motilidad	Excelente	Buena	Regular	Mala
Masal	+++	++	+	-
Individual	≥ 70%	50-70%	30-50%	≤ 30%

Vitalidad: esta característica mide el número de espermatozoides vivos y se expresa como el porcentaje de células muertas. Para medir la vitalidad de una muestra de semen, se utilizan colorantes vitales, tales como el colorante eosina-nigrosina, con el cual los espermatozoides muertos serán teñidos de color rojo o en rosa, mientras que los vivos quedan sin teñir, esto debido a que el colorante, cuando existe daño a nivel de la membrana celular, como en la célula espermática muerta, es capaz de atravesarla y colorearla; aquellos espermatozoides que se observan en la lámina sin teñirse, son aquellos espermatozoides que poseen una membrana celular intacta y no permeable al paso del colorante (Pérez y Pérez, 1985).

Morfología: la morfología está estrechamente relacionada con la motilidad espermática en forma más directa, y se mide en porcentaje de espermatozoides con defectos de morfología. Se necesita, al menos, un buen porcentaje de espermatozoides móviles y de ellos se espera que entre 70 a 80% posea morfología normal. Esto quiere decir, que como máximo se acepta 20 a 30% de atipias.

Palacios (2005), señala que la morfología espermática es un factor determinante en la capacidad de fertilización del semen, ya que existe una correlación entre defectos espermáticos e infertilidad. Los espermatozoides son traslucidos y virtualmente invisibles al microscopio de luz directa, por lo que se requiere del uso de colorantes que provean de un fondo oscuro para visualizarlos. La coloración vital, con eosina, azul de anilina, o

eosina–nigrosina, es la más comúnmente usada para la evaluación morfológica de semen.

La morfología se evalúa de la siguiente manera: se coloca una gota de aproximadamente 20 μ L de semen diluido sobre un portaobjetos limpio y desengrasado y se coloca una gota de colorante, se realiza el frotis en forma firme y pareja. Luego de esperar, por lo menos 10 min, para el secado del frotis, se coloca en el microscopio y se procede a contar los espermatozoides. Se cuentan 200 espermatozoides por muestra para determinar el porcentaje de espermatozoides normales, el porcentaje de espermatozoides anómalos y de éstos cuáles poseen atípicas de tipo primarias y secundarias. Con el colorante de Giemsa, los espermatozoides se visualizan de color violáceo y en el caso de tener presente su acrosoma, se puede apreciar de color violáceo más intenso. De estar ausente el acrosoma, se observa la cabeza del espermatozoide de un color homogéneo o con el tercio superior más claro.

Las malformaciones espermáticas, se pueden clasificar siguiendo diferentes criterios.

1) Uno de esos criterios clasifica las anomalías encontradas en el semen en atípicas primarias y secundarias. Esta es la clasificación más usada en la bibliografía, pero no por ello la más exacta. Las malformaciones primarias, por definición, son aquellas que se originan dentro del testículo durante la espermatogénesis y las malformaciones secundarias, son aquellas

que se originan a través de su paso por el epidídimo. Cabe destacar que, por definición, se denota el origen y no la severidad del defecto. Así tenemos como atipias primarias: microcefalias, macrocefalias, cabeza piriforme, cabeza estrecha, defectos de la pieza media, gota citoplasmática proximal, inserción abaxial de la pieza intermedia, flexión de la pieza media, enrollamiento de la pieza media y la cola, cabeza doble, pieza media doble. Entre las atipias secundarias se tiene: gota citoplasmática distal, enrollamiento final de la cola, flexión de la cola, sin acrosoma, cabezas desprendidas, cola fracturada (Hafez y Hafez, 2000).

2) Un segundo criterio las clasifica en atipias mayores y menores. Esta clasificación la propuso Bloom en 1977, llamando malformaciones mayores a aquellas que estaban asociadas con infertilidad, y malformaciones menores a aquellas que, al momento de crear el método de clasificación, no se encontraban relacionadas con la fertilidad en forma directa.

3) Y un tercer criterio que las clasifica como atípicas compensables y no compensables. Saacke *et al.* (1994) propusieron clasificar los defectos como compensables, a aquellos en los que el espermatozoide no llega a la vecindad del ovocito y no evita que otro espermatozoide realice la fertilización; por lo tanto, si se aumenta la concentración de la dosis seminal, se podría llegar a compensar este tipo de malformación, tal es el caso de espermatozoides con problemas en el sistema de locomoción. Por el contrario, un defecto no compensable es aquel en el cual el espermatozoide

está perfectamente capacitado para llegar hasta el ovocito, realiza el bloqueo de la polispermia pero es incapaz de continuar el proceso de fertilización. Dicho defecto no se puede compensar aumentando la concentración de la dosis inseminante, ya que si una muestra posee 20% de espermatozoides con este defecto, no habrá ninguna diferencia si hay 100, 1000 ó 10000 en el oviducto.

Se debe tomar en consideración que hasta una pequeña elevación de la temperatura escrotal ocasiona daños en la morfología espermática, como fue evaluado por Vogler *et al.* (1993), quienes realizaron experimentos sometiendo muestras de semen provenientes de toros Holstein, a diferentes temperaturas, concluyendo que las anomalías más comunes en los espermatozoides fueron: problemas de cola, cabezas piriformes, problemas de acrosoma y efecto daga.

En la actualidad, quizás lo más adecuado sea identificar cada una de las anomalías por su ubicación dentro de la estructura del espermatozoide y la relación de cada una de ellas con la fertilidad, para lo cual aún se requieren muchos estudios. En general, el número máximo aceptable de anomalías de cabeza se encuentra entre 15 y 20%. Con respecto a las anomalías de acrosoma y cola se puede aceptar hasta 25%. Fuese cual fuese el sistema de clasificación, se debe esperar un mínimo de 70% de espermatozoides normales en el eyaculado para poder aceptar un toro como apto reproductivamente, en cuanto al semen.

Concentración espermática: la concentración de los espermatozoides se expresa como el número de espermatozoides/mL de semen. La determinación de la concentración espermática se lleva a cabo mediante métodos semejantes al recuento de glóbulos rojos realizado en hematología. El conteo directo de células, a través del hemocitómetro o cámara de Neubauer fue diseñado para contar eritrocitos. Esta cámara de Neubauer consiste de una laminilla especial que tiene 2 cámaras de conteo. Las cámaras de conteo poseen 0,1 mm de profundidad y un área graduada en el fondo de la cámara de 1 mm². Este cuadro se divide en 25 cuadros más pequeños. Al conocerse la profundidad y el área se puede determinar el número de espermatozoides en un volumen dado.

El diluyente utilizado debe inmovilizar a los espermatozoides para que se pueda llevar a cabo el conteo. Normalmente se utiliza NaCl al 3% (solución hipertónica), lo cual hace que la célula deje de ser viable. La dilución de la muestra de semen, para determinar la concentración espermática en el caso del bovino es de 1:200 (Bearden *et al.*, 1982). Esto quiere decir que se diluye 1 volumen de semen en 199 volúmenes iguales de NaCl al 3%. Una vez diluido el semen e inmovilizados los espermatozoides, se coloca el semen diluido en la cámara de Neubauer. Para calcular la concentración de espermatozoides se utiliza la siguiente ecuación:

(Espermatozoides/mL)= Número de espermatozoides contados en 5 cuadrados (4 esquinas + el centro) x 5 x dilución (1:200) x 10 x 1000.

Según Graham (1996), las cualidades que deben tener los espermatozoides de un eyaculado fecundante son: motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar motilidad hiperactivada, integridad estructural y funcional de la membrana, integridad de las enzimas asociadas a la fecundación, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético.

Para todos estos parámetros existe gran variación en los valores que la muestra seminal presenta, por tal motivo se han establecido los valores o estándares mínimos para clasificar una muestra de semen bovino (Hafez y Hafez, 2000).

Además de estas técnicas antes descritas, también se encuentra la evaluación de semen *in vitro*, mediante esta técnica se puede evaluar la capacidad fecundante tanto de semen fresco como de semen descongelado, aunque son pruebas de alta complejidad, ya que existen diferentes atributos necesarios para que un espermatozoide pueda fecundar un óvulo (Graham y Mocé, 2005).

Evaluación de Semen asistida por Computadora (CASA)

El sistema Computarizado de Análisis Seminal (*Computer Assisted Sperm Analysis*, CASA, por sus siglas en Inglés), fue desarrollado en la Universidad de Pennsylvania por Liu y Warne en el año de 1977 y perfeccionado por Amann y Hammersatedt (1980). El sistema involucra una cámara de video conectada a un microscopio de interfase y a una

computadora que digitaliza las imágenes del tamaño y de los movimientos espermáticos. Las imágenes digitalizadas a través del tiempo permiten analizar la velocidad de las células, el movimiento rectilíneo, circular o lateral. Es un sistema internacionalmente conocido por ser un equipo rápido, certero, constante y científicamente validado. El equipo CASA permite el cálculo del conteo total de una muestra seminal, la cantidad de espermatozoides móviles y la concentración, así como también todos los valores de velocidad, movimiento lateral, progresivo y linealidad de la trayectoria espermática (Brogliatti, 2008).

El sistema Computarizado de Análisis Seminal proporciona información precisa, objetiva y repetible de las características de las células espermáticas, siendo una de estas características el porcentaje de células móviles presentes en una muestra de semen y la calidad media de este movimiento, lo que permitiría establecer parámetros reproductivos más confiables de toros reproductores. Todas estas ventajas, junto con unos precios cada vez más accesibles, hacen que hoy en día el uso del sistema CASA, al menos en centros de Inseminación Artificial (IA) de bovino, sea más común.

Debido a que los espermatozoides necesitan ser móviles y capaces de hiperactivarse para lograr alcanzar y penetrar las capas que rodean al ovocito para fecundarlo, cuando ambas células se encuentran en la ampolla del oviducto, es importante contar con un sistema de evaluación seminal que

proporcione información precisa, objetiva y repetible, sobre el porcentaje de células móviles presentes en una muestra de semen y la calidad media de ese movimiento, pudiendo evaluarse la motilidad espermática, antes y después de la criopreservación. Esto es posible hacerlo a través del sistema CASA.

La estimación visual de la motilidad es el método más simple y económico para evaluar la calidad seminal. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que es el parámetro que está mayormente influenciado por el operador.

El sistema CASA combina una cámara termostáticamente controlada, denominada cámara de Makler, en la cual se deposita una alícuota de semen y se mantiene la temperatura (37°C) durante el examen. Por otra parte, posee un sistema óptico con iluminación de contraste de fase, un detector de imágenes, un sistema de computación y un monitor de video. Este sistema permite calcular el porcentaje de espermatozoides móviles, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y la velocidad de movimiento (Brogliatti, 2008).

El uso del sistema CASA provee mediciones más objetivas y confiables de la motilidad espermática y permite, no solo evaluar motilidad espermática, sino también diferenciar sub-poblaciones en relación al tipo de motilidad espermática (espermatozoides que muestran movimientos lineales o de hiperactividad), así como morfología espermática.

Sin embargo, el sistema CASA es costoso y necesita una exacta calibración. Si bien, la motilidad es solo uno de los muchos atributos de un espermatozoide fértil, fue el primer atributo utilizado y sigue siendo el más frecuentemente usado como indicador de la función espermática (Stornelli y De La Sota, 2005).

La aparición de los sistemas informatizados de digitalización de imágenes, tales como el sistema CASA, abrió un nuevo campo en el estudio de la motilidad de los espermatozoides. Estos sistemas han automatizado y simplificado el proceso. Las imágenes obtenidas permiten evaluar varios parámetros, incluyendo la concentración, morfología y movimiento espermático. El sistema CASA establece, de una manera efectiva, medidas cuantitativas del movimiento individual de los espermatozoides, por lo que con este tipo de análisis se pueden obtener medidas correctas de la motilidad espermática que proporcionen información precisa acerca del estado funcional del axonema y de las membranas espermáticas (Mortimer, 2000).

En este sentido, Varner (2008), llevó a cabo estudios del potencial reproductivo en equinos, utilizando el sistema CASA para la evaluación del semen. El enfoque convencional para la evaluación de semen equino se remonta a varias décadas, e incluye la evaluación de la concentración espermática, volumen del eyaculado, características morfológicas, y patrones de movimiento espermático. Mientras que un análisis realizado a través del

sistema CASA, y la incorporación de algunas técnicas, pueden mejorar el valor predictivo del examen.

Asimismo, Kuster (2005), mediante el sistema CASA evaluó, en semen de bovinos, la concentración espermática y determinó que muestras con concentraciones $\geq 50\text{--}100 \times 10^6$ esp/mL, limitan la capacidad del dispositivo para realizar el análisis, o da resultados equivocados. Es por ello que, si bien el sistema CASA es una herramienta para evaluar el semen de una manera estándar, debemos tomar en consideración factores que afectan el desempeño del equipo.

A su vez, utilizar este equipo para determinar con mayor exactitud la motilidad espermática post descongelación y su vitalidad, es muy útil para determinar el número de espermatozoides/dosis de inseminación, para optimizar el uso de toros élite (Ballester *et al.*, 2007), así como para dar cabida a una eventual aplicación en el semen sexado, dado que los espermatozoides de toro luego de ser sometidos a la criopreservación sufren una alta mortalidad, lo que compromete la fertilidad, y la calidad del espermatozoide después de la descongelación.

Estimar la capacidad fecundante de las muestras seminales es sumamente importante, para ello Graham y Mocé (2005), sugieren el uso de equipos como el sistema CASA, ya que proporciona datos más precisos y objetivos sobre las muestras. De igual manera, recomiendan realizar

ensayos de laboratorio utilizando semen con parámetros CASA y llevarlos al laboratorio de fertilización *in vitro*, para medir su capacidad fecundante.

Januskauskas *et al.* (2003) realizaron estudios sobre los cambios en la membrana de espermatozoides de semen de toro congelado en relación con la viabilidad espermática, estructura de la cromatina, y la fertilidad, mediante el uso del sistema CASA y utilizando marcadores, según lo detectado por fluorometría.

En estudios realizados con el sistema de análisis seminal, Countri *et al.* (2009), evaluaron los parámetros de motilidad, temperatura de descongelación, concentración de la muestra espermática y medios utilizados para la dilución, y con base en los patrones de movimiento de los espermatozoides en el semen fresco y descongelado, concluyeron que este sistema es una herramienta muy útil para evaluar la motilidad espermática y los patrones de movimiento, debido a que proporciona datos objetivos, útiles para el proceso de criopreservación.

La motilidad y morfología de las células espermáticas son los parámetros esenciales en el examen de la calidad espermática y en el establecimiento de las correlaciones entre la calidad de los espermatozoides y la fertilidad (Verstegen and Onclin, 2002). Así tenemos que, el sistema CASA permite la evaluación objetiva de características como: movimiento, velocidad y morfología; sin embargo, el principal problema se relaciona con la estandarización y optimización de los equipos y procedimientos.

En este sentido, los diferentes instrumentos CASA han demostrado altos niveles de precisión, utilizando la metodología de clasificación espermática. Su disponibilidad nos da una herramienta muy útil para comparar objetivamente la motilidad y morfología, así como también mejorar nuestro conocimiento y capacidad para manipular los espermatozoides. Sin embargo, existen factores que se deben tomar en consideración antes de la utilización de estos analizadores como son: efecto de la velocidad de fotogramas y el número de fotogramas por campo sobre la motilidad del semen, efecto de la temperatura de descongelación, efecto de la concentración espermática, efecto del tiempo de análisis; ya que una alteración de alguno de estos parámetros, proporcionaría datos errados sobre los patrones de movimiento y velocidad espermática (Countri *et al.*, 2009).

La evaluación del semen mediante el analizador seminal CASA, posee grandes ventajas, entre ellas, la eliminación de la subjetividad e incorporación del análisis del movimiento cuantificable detallado. Brogliatti *et al.* (2004), realizaron un estudio para evaluar los parámetros de motilidad del semen fresco de toros colectados por vagina artificial (VA) y por electroeyaculador (EE).

En este estudio se evaluaron menos de 1000 espermatozoides, determinando: concentración (CONC), recorrido de velocidad media (VAP), velocidad rectilínea (VSL), la velocidad curvilínea (VCL), la amplitud lateral de

la cabeza (ALH), la frecuencia de batido (BCF), la rectitud (STR), la linealidad (LIN), y el porcentaje de células rápidas o estáticas, encontrando que no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) en VAP, VSL, VCL, ALH, STR, LIN, y el porcentaje de células rápidas y estáticas de espermatozoides recolectados por vagina artificial o aquellos recolectados por electroeyaculador. La concentración de espermatozoides en semen colectado por VA, fue significativamente superior ($P < 0,05$) a la de eyaculados colectados por EE. Los resultados del análisis indican que el semen recolectado por vagina artificial tiene características similares de patrones de movimiento a los recolectados por electroeyaculación.

El uso del sistema CASA ha permitido la evaluación de la calidad del semen colectado del epidídimo. Los espermatozoides colectados del epidídimo se consideran como una fuente potencial de genes valiosos para los bancos de genoma, sobretodo en especies como los equinos, en los cuales su valor es elevado (Goovaerts *et al.*, 2006).

Determinación de Sub-poblaciones Espermáticas

El uso del sistema CASA ha sido una herramienta en la investigación de las sub-poblaciones espermáticas en diferentes especies. El establecimiento de sub-poblaciones espermáticas se ha hecho con base a una serie de datos objetivos proporcionados por este sistema. El porcentaje de células móviles presentes en la muestra y la calidad media de ese

movimiento, permiten identificar la existencia de sub-poblaciones de espermatozoides, con distintos patrones de movimiento, que coexisten en la misma muestra de semen, lo cual es una visión más real, ya que una muestra de semen es una población heterogénea (Muiño *et al.*, 2006).

En este sentido, Dorado *et al.* (2010), determinaron la presencia de sub-poblaciones espermáticas en semen de caprinos mediante el sistema CASA, estableciendo la relación entre la distribución de las sub-poblaciones, la motilidad total y la concentración espermática, identificándose tras el análisis de agrupamiento en sub-poblaciones, que en los caprinos existen cuatro sub-poblaciones móviles bien definidas. La relación entre la distribución de las sub-poblaciones de espermatozoides, la motilidad total y la concentración de espermatozoides muestra que los espermatozoides de cada una de ellas poseen patrones completamente diferentes. Por lo tanto, el estudio de las sub-poblaciones de espermatozoides móviles podría conducir a un aumento sustancial de la información obtenida durante el análisis del semen.

Por su parte, Muiño *et al.* (2007), identificaron sub-poblaciones espermáticas según patrones de motilidad en eyaculados de toros Holstein, utilizando para ello el sistema CASA; realizando además, estudios comparativos para determinar cómo estas sub-poblaciones se comportan ante el efecto de la criopreservación, determinaron que en eyaculados de toros Holstein se identificaron cuatro sub-poblaciones espermáticas, las

cuales al ser evaluadas, luego del proceso de criopreservación, fueron diferentes significativamente que aquellas observadas en semen fresco. Asimismo, observaron que los eyaculados con mayor número de subpoblaciones de espermatozoides que poseían un patrón de movimiento rápido y progresivo, fueron también los más resistentes a la criopreservación y mostraron la mejor vitalidad después de la descongelación.

Iguer-ouada y Verstegen (2001), validaron el sistema CASA para la evaluación objetiva de semen canino, utilizando para ello semen de 42 perros adultos fértiles de raza Beagle, realizaron una descripción de los parámetros de la motilidad del semen, determinando que existen cuatro subpoblaciones espermáticas con calidad de movimiento bien definido.

Estudios sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballos, cerdos y conejos han sido realizados por Quintero (2003), con el objetivo de determinar la presencia de sub-poblaciones espermáticas, a través de pautas específicas de motilidad, utilizando para ello el sistema CASA y reportando que en el caballo existen cuatro sub-poblaciones espermáticas con patrones de movimiento bien definidos, al igual que en el conejo existen cuatro sub-poblaciones espermáticas con patrones de movimiento bien definidos, existen cuatro sub-poblaciones espermáticas con patrones de movimiento bien definidos, mientras que en el cerdo encontró que existen tres subpoblaciones espermáticas.

Asimismo, Miró *et al.* (2004), mediante estudios realizados con el sistema CASA, logró determinar la presencia de sub-poblaciones espermáticas en semen de burros Catalanes, para lo cual se basó en estudios del patrón de movimiento de los espermatozoides, estableciendo que éstos poseen cuatro tipos de sub-poblaciones espermáticas. Igualmente, Countri *et al.* (2009) han realizado estudios evaluando el efecto de los diferentes tiempos de descongelación sobre la viabilidad de los espermatozoides y de los parámetros de movimiento de las sub-poblaciones espermáticas, después de dicho proceso.

En este caso, se establecieron tres tiempos de descongelación de semen bovino congelado en pajuelas de 0,25 mL, analizándolo mediante un procedimiento multivariado de agrupamiento, para probar la presencia de sub-poblaciones espermáticas con pautas específicas de motilidad en el semen descongelado. El análisis estadístico agrupó los espermatozoides móviles en cuatro sub-poblaciones separadas con base en los patrones definidos de movimiento (Countri *et al.*, 2009).

Por otro lado, Muiño *et al.* (2009), evaluaron el efecto de la criopreservación sobre las sub-poblaciones espermáticas en bovinos, e identificaron las diferentes sub-poblaciones de espermatozoides con patrones de movimiento en el eyaculado de un toro *Bos taurus*, determinándose las posibles modificaciones en estas sub-poblaciones, luego

de haber sido sometidas a la criopreservación, como disminución de la velocidad y un aumento del número de células estáticas.

Quintero (2003), trabajando con semen de equinos identificó sub-poblaciones espermáticas en semen refrigerado, basándose en los patrones y las características de movimiento de las células espermáticas, determinando que existen sub-poblaciones en los eyaculados, sugiriendo que este tipo de estudio ayuda a conocer la capacidad fecundante del animal.

En otro estudio, Farrell *et al.* (1998), establecieron las características del semen bovino mediante el sistema CASA y su relación con la fertilidad en toros. Para ello, realizaron experimentos comparativos entre los resultados obtenidos por el sistema CASA y los resultados obtenidos por técnicos con experiencia en el área, utilizando 6 toros de 6 años de edad, a los cuales se le colectó semen dos veces al día, con intervalos de 3 a 4 d de colección, en un primer experimento.

Por su parte, Januskauskas *et al.* (2003) incluyeron en un experimento seis toros de 11 años de edad. En este caso, a cada muestra se le realizaron cuatro repeticiones, para determinar la correlación entre la concentración de espermatozoides por espectrofotometría y por el sistema CASA, obteniendo una alta correlación ($r= 0,91$; $P < 0,01$). Por otro lado, la motilidad obtenida a través del sistema CASA fue 52–82% *versus* 62–69%, para las mediciones subjetivas hechas por técnicos. Estos hallazgos

permiten deducir que el sistema CASA es una herramienta que tiene un alto grado de repetibilidad.

Parámetros del sistema CASA que evalúan la motilidad de los espermatozoides: Los sistemas automáticos de medición de imágenes sucesivas se basan en la captura sucesiva de imágenes de espermatozoides en movimiento, que provienen de un microscopio. Estas imágenes se digitalizan identificando las células espermáticas que contienen la primera imagen. Luego se procede al seguimiento de estas células en imágenes sucesivas y al seguimiento de trayectorias definidas, procesándose éstas matemáticamente, obteniendo así resultados numéricos precisos.

Los parámetros determinados para cada espermatozoide son: velocidad del movimiento con base en varios descriptores, la trayectoria que realiza la cabeza del espermatozoide y la frecuencia de los cambios de dirección que ésta realiza (Quintero, 2003). En este sentido, los parámetros que evalúan la velocidad de desplazamiento de los espermatozoides son los siguientes:

- a. Velocidad curvilínea (VCL): velocidad promedio de desplazamiento de la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria real. Se mide en $\mu\text{m}/\text{seg}$.
- b. Velocidad rectilínea (VSL): velocidad promedio de la cabeza del espermatozoide a lo largo de una línea recta, desde la primera hasta la última posición. Se mide en $\mu\text{m}/\text{seg}$.

- c. Velocidad promedio de desplazamiento (VAP): velocidad promedio de la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria promedio. Se mide en $\mu\text{m}/\text{seg}$.
- d. Porcentaje de linealidad (LIN): relación entre VSL y VCL. Se mide en porcentaje (%).
- e. Índice de rectitud (STR): relación entre VSL y VAP. Se mide en porcentaje (%).

Asimismo, se puede evaluar la trayectoria que realiza la cabeza del espermatozoide, a través de parámetros tales como:

- a. Índice de oscilación (WOB): relación entre VAP y VCL. Se mide en porcentaje (%).
- b. Amplitud del desplazamiento lateral de cabeza (ALH): valor promedio lado a lado de la cabeza en cada ciclo de batido. Se mide en μm .
- c. Frecuencia de batido (BCL): frecuencia con la cual la verdadera trayectoria del espermatozoide cruza la trayectoria promedio. Se mide en Hz.
- d. Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALHMed): desplazamiento medio efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea, de un lado a otro de la trayectoria media o lineal. Se mide en μm^2 .

e. Amplitud máxima del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALHMax): máximo desplazamiento medio efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea, de un lado a otro de la trayectoria media o lineal. Se mide en μm^2 .

Por otra parte, también se puede medir la frecuencia de los cambios en la dirección seguida por la cabeza del espermatozoide, a través de los siguientes parámetros:

- a. Dance (DNC): producto de la VCL por la ALHMed. Se mide en $\mu\text{m}^2/\text{seg}$.
- b. Dance medio (DNM): cociente entre ALHMed y LIN. Se mide en μm^2 .
- c. Índice de angularidad (AI): valor porcentual del ángulo que forma un segmento de la trayectoria con la siguiente. Se mide en porcentaje (%).
- d. Velocidad angular media (AV): es el resultado de $VCL \times AI/100$. Se mide en $\mu\text{m}/\text{seg}$.
- e. Desplazamiento angular medio absoluto (MADAbs): ángulo que toma la dirección de un segmento de la trayectoria y el siguiente, en valor absoluto. Se mide en grados angulares.

- f. Desplazamiento angular medio algebraico (Medang): ángulo que toma la dirección de un segmento de la trayectoria y el siguiente, teniendo en cuenta su signo, siendo positivo al sentido contrario de las agujas del reloj. Se mide en grados angulares.
- g. Menor oscilación armónica de la cabeza del espermatozoide (HLO): menor valor de la amplitud de la trayectoria curvilínea respecto a la trayectoria lineal o media. Se mide en μm .
- h. Mayor oscilación armónica de la cabeza del espermatozoide (HHI): mayor valor de la amplitud de la trayectoria curvilínea respecto a la trayectoria lineal o media. Se mide en μm .
- i. Oscilación media de la cabeza del espermatozoide (HHI): valor medio de la amplitud de la trayectoria curvilínea respecto a la trayectoria lineal o media. Se mide en μm .
- j. Máxima amplitud de la oscilación de la cabeza espermática (HMX): distancia máxima en función del tiempo empleado entre dos cruces sucesivos. Se mide en μm .
- k. Armónico básico de la oscilación de la cabeza espermática (HBS): distancia media en función del tiempo empleado entre dos cruces sucesivos. Se mide en μm .
- l. Amplitud del armónico (HY): distancia mínima en función del tiempo empleado entre dos cruces sucesivos. Se mide en μm .

Sin embargo, no todos estos parámetros se utilizan de manera rutinaria, y no todos son esenciales a la hora de la evaluación de una muestra.

Una de las ventajas que tiene el sistema CASA es la clasificación de las células espermáticas presentes en un eyaculado, en sub-poblaciones espermáticas, clasificadas de acuerdo a la velocidad. Así, Muiño *et al.* (2006) sugieren los siguientes parámetros para la clasificación:

1. Velocidad curvilínea (VCL): velocidad promedio ($\mu\text{m}/\text{seg}$) de desplazamiento de la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria real.
2. Velocidad rectilínea (VSL): velocidad promedio ($\mu\text{m}/\text{seg}$) de la cabeza del espermatozoide a lo largo de una línea recta, desde la primera hasta la última posición.
3. Velocidad promedio de desplazamiento (VAP): velocidad promedio ($\mu\text{m}/\text{seg}$) de la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria promedio.
4. Porcentaje de linealidad (LIN): relación (%) entre VSL y VCL.
5. Índice de rectitud (STR): relación (%) entre VSL y VAP.
6. Índice de oscilación (WOB): relación (%) entre VAP y VCL.

7. Amplitud del desplazamiento lateral de cabeza (ALH): valor promedio del desplazamiento (μm) lado a lado de la cabeza en cada ciclo de batido.
8. Frecuencia de batido (BCL): frecuencia (Hz) con la cual la verdadera trayectoria del espermatozoide cruza la trayectoria promedio.

Para poder determinar las sub-poblaciones espermáticas en nuestro experimento, se tomaron en cuenta los siguientes parámetros determinados por el sistema CASA: velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad promedio de desplazamiento (VAP), porcentaje de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR), amplitud del desplazamiento lateral de cabeza (ALH), frecuencia de batido (BCL). Mediante la evaluación de estos parámetros, se agrupan las subpoblaciones con base en la calidad de movimiento.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

Unidades Experimentales

Para este estudio se evaluó un total de 18 eyaculados provenientes de cinco toros reproductores de alto valor genético de las razas Holstein Negro, Carora, Mestizo F1 Holstein x Cebú, Jersey y Holstein Rojo, con edades comprendidas entre 3 y 7 años, alojados en el Instituto de Reproducción Animal (IRA) “Dr. Abraham Hernández Prado”, de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela.

Los toros fueron seleccionados por la calidad del semen, la cual se valoró inicialmente con base en sus características macroscópicas (volumen, olor, aspecto, densidad), y características microscópicas (motilidad masal, motilidad individual, morfología, concentración espermática). Luego de esta evaluación, los eyaculados calificados como no aptos para la criopreservación, se descartaron y los eyaculados seleccionados para congelación fueron analizados con el sistema CASA.

Es importante mencionar que todos los toros cumplían con un plan de vacunación; de esta forma se certificó que los animales seleccionados para el ensayo, se encontraban en óptimas condiciones de salud, además de ser animales entrenados para realizar las colectas con vagina artificial.

Procedimientos

Para la estandarización del método de evaluación seminal, se realizaron pruebas comparativas entre la evaluación seminal rutinaria realizada con el microscopio óptico y los resultados obtenidos a través del sistema CASA, con la finalidad de comprobar que ambas evaluaciones dieran resultados similares. De igual forma, se realizó un ensayo inicial con muestras seminales de los toros seleccionados, siendo las muestras evaluadas, tanto en fresco como luego de la descongelación, de manera de seleccionar los toros que entrarían en el trabajo.

Preparación de los medios de evaluación: Previo a la colecta de semen, se realizó una serie de actividades necesarias para poder llevar a cabo el trabajo, entre ellas la preparación de los medios con los cuales se realizó la evaluación del semen.

Solución No. 1 o diluyente tris-yema-glicerol: necesario para el procedimiento de criopreservación de la muestra, cuya composición se presenta a continuación:

Buffer Tris (Hidroximetil-aminometano)	24,22 gr
Ácido cítrico	13,6 gr
Fructosa	10,0 gr
Antibiótico (Lincospectin®)	3 mL (150 mg/mL)
Glicerina	60 mL
Yema de huevo	200 mL
Agua destilada	csp 1000mL
<hr/>	
Ajustar el pH entre 6,5 y 6,7	

Solución No. 2 o diluyente tris sin yema y sin glicerol: se preparó con el fin de hacer la lectura y evaluación con el sistema CASA. Este diluyente tiene la siguiente composición:

Buffer Tris (Hidroximetil-aminometano)	24,22 gr
Ácido cítrico	13,6 gr
Fructosa	10,0 gr
Antibiótico (Lincospectin®)	3 mL (150 mg/mL)
Agua destilada	csp 1000 mL
<hr/>	
Ajustar el pH entre 6,5 y 6,7	

Colección de semen: Previo a la colecta del material seminal, los sementales seleccionados para el estudio fueron bañados con agua corriente y jabón neutro, esto con la finalidad de obtener muestras más limpias y bajar el nivel de estrés del animal. Luego de este proceso se esperó 10 min aproximadamente, para el secado de los mismos, para luego ser pasados al área de colecta, en donde se procedió a realizar la extracción del semen, mediante el método de vagina artificial. Antes de la colecta de la muestra se realizaron dos montas falsas, con el fin de estimular a los animales y hacer limpieza, mediante la secreción de plasma seminal, de los conductos por los cuales pasaría el semen.

Luego de colectar el semen, la muestra fue trasladada inmediatamente al laboratorio de Procesamiento de Semen, del Instituto de Reproducción Animal, colocándola dentro del baño de María, el cual se encontraba a 37°C.

Previo a la colecta de la muestra seminal, nos cercioramos que tanto la platina calentadora como el baño de María, se encontrasen a una temperatura de 37°C, ya que el semen es muy sensible a los cambios de temperatura. Dentro del baño de María se colocaron tubos de ensayo de 12 x 75 mm, con capacidad de 5 mL (3 por cada eyaculado), identificados con las letras A, B y C.

Al tubo identificado con la letra A se le agregó 980 µL de la solución N° 2, más 20 µL de semen íntegro, quedando una dilución 1:50. Esta solución fue utilizada para evaluar el semen con el sistema CASA. Esta solución, sin yema y sin glicerol, es homogénea, sin algún contenido de sustancias o partículas que pudieran ser contabilizadas como células espermáticas.

Al tubo identificado con la letra B se le agregó 980 µL de NaCl al 0,9% y 20 µL de semen íntegro (solución 1:50), volumen necesario para evaluar la motilidad individual de manera rutinaria.

Al tubo identificado con la letra C se le agregó 3980 µL de NaCl al 3% y 20 µL de semen íntegro, para obtener una solución 1:200, con el fin de determinar la concentración espermática, para luego ser ajustada a 40 millones de espermatozoides por pajuela, según lo recomendado por Muiño *et al.* (2007).

Evaluación de semen: Dentro de las características rutinarias que se evaluaron en cada muestra seminal tenemos:

Características macroscópicas:

Volumen: el volumen se expresó en mililitros (mL), y su valor se obtuvo a través de la lectura directa del tubo graduado utilizado para la colecta.

Color: se evaluó por medio de la visualización directa del eyaculado dentro del tubo colector en el laboratorio.

Olor: se percibió mediante el olfato, directamente de la muestra, en el laboratorio.

Densidad macroscópica: se evaluó por medio de la visualización directa de la muestra en el laboratorio, comprobándose esta evaluación con la valoración microscópica de la concentración espermática, mediante el uso de la cámara de Neubauer. En este caso se usó la escala descrita para densidad macroscópica en bovinos:

- Azoospermico: ausencia de espermatozoides en el eyaculado.
- Oligozoospermico: ≤ 200 millones espermatozoides/mL.
- Ralo: 200–500 millones espermatozoides/mL.
- Semi-denso: 500–800 millones espermatozoides/mL.
- Denso: 800–1.500 millones espermatozoides/mL.
- Densísimo: ≥ 1.500 millones espermatozoides/mL.

Características microscópicas

Motilidad masal: para evaluar este parámetro se tomó una gota de semen (10 µL) sin diluir, se colocó la gota sobre un portaobjeto precalentado en una platina calentadora a 37°C y se observó al microscopio óptico, con aumento 10X, sin colocar el cubreobjetos. Se evaluó, de manera subjetiva, el movimiento de las células espermáticas en su conjunto. Esta característica se valoró utilizando los siguientes parámetros:

++++: Actividad cinética muy buena; remolinos intensos con ondas espermáticas apreciables.

+++ : Actividad cinética buena; remolinos apreciables aunque menos intensos que la anterior.

++ : Actividad cinética regular; pocos remolinos y con menor frecuencia que la anterior.

+ : Actividad cinética deficiente; el semen no forma remolinos sino eventualmente y sin ninguna intensidad.

- : Actividad cinética ausente.

Motilidad individual: la evaluación de la motilidad individual se realizó con la ayuda de un microscopio óptico de campo claro, usando aumento 40X. Antes de su observación al microscopio, el semen se diluyó en NaCl⁺ al 0,9%, para esto a uno de los tubos de 12 x 75 mm, que se encontraban precalentados a 37°C (tubo B), se le agregó 980µL de NaCl⁺ al 0,9% más 20 µL de semen íntegro. Se tomó una gota (10µL) y se colocó sobre un

portaobjeto precalentado a 37°C, se cubrió la gota con un cubreobjetos, y se observó al microscopio óptico. Este parámetro se expresó en porcentaje (%).

Vitalidad: para la observación de las células espermáticas se utilizó la coloración eosina-nigrosina, con la cual los espermatozoides muertos aparecen teñidos de rojo o rosa, mientras que los vivos quedan sin teñirse. Para ello se hizo un frotis y se observó al microscopio de campo claro (aumento 40X). Se evaluaron cinco (05) campos, en los cuales se contó el número de espermatozoides muertos presentes, dicho valor se sumó y se estimó el número total de células muertas. Este parámetro se expresó en porcentaje (%) de espermatozoides vivos.

Morfología: el frotis utilizado para evaluar vitalidad también se utilizó para la evaluación de la morfología. El frotis fue observado con ayuda del microscopio de campo claro (aumento 40X), visualizando 5 campos, en los cuales se contaron 200 espermatozoides por muestra. Se contó el número y tipo de atipias, con el objeto de estimar el porcentaje (%) de espermatozoides normales. Para evaluar este parámetro se tomó en cuenta la clasificación de malformaciones espermáticas que las clasifica en atipias primarias y atipias secundarias.

Concentración espermática: para determinar la concentración espermática, se utilizó la cámara de Neubauer; para ello se diluyó el semen 1:200, ya que es la correspondiente para la especie bovina. Para la dilución se utilizó NaCl al 3%, realizándose la misma en un tubo de ensayo de 12 x

75 mm, con capacidad de 5 mL, identificado con la letra C, al cual se le añadió 3980 μL de NaCl al 3% más 20 μL de semen íntegro. Una vez diluido el semen e inmovilizados los espermatozoides, se tomó una gota (10 μL) y se procedió a llenar las celdas de la cámara de Neubauer para realizar el conteo celular. La concentración espermática se calculó mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración espermática (espermatozoides/mm}^3\text{)} = a \times b \times c \times d$$

Donde:

a= número de espermatozoides contados en 5 cuadrados.

b= 5, estima el total de cuadrantes de la cámara (n= 25 cuadros).

c= 200, ya que la dilución para el semen bovino es 1:200.

d= 10, representa la profundidad de la cámara, la cual es 0,1mm.

Posteriormente, el resultado obtenido se multiplicó por 1000 para expresar el valor de la concentración espermática en número de espermatozoides/mL.

Evaluación de Semen mediante el Sistema CASA

Una vez realizadas las pruebas rutinarias de laboratorio, se tomaron las muestras seminales y se analizaron mediante el sistema CASA (Hamilton Thorne, modelo CEROS *Sperm Analyzer*), el cual combina una cámara termostáticamente controlada, denominada cámara de Makler, en la cual se deposita una alícuota de semen y se mantiene la temperatura (37°C) durante

el examen. Por otra parte, posee un sistema óptico, un detector de imágenes, un sistema de computación y un monitor de video. A través del sistema CASA se puede calcular el porcentaje de espermatozoides móviles, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y la velocidad de movimiento. El sistema CASA posee una serie de parámetros ajustables que pueden ser modificados dependiendo de la especie a evaluar. Los parámetros utilizados para la calibración del equipo, fueron los siguientes:

- a) Captura de imágenes: 60 Hz, 30 imágenes.
- b) Detección de células: con un contraste mínimo de 80 y un mínimo de tamaño celular de 5 pixeles.
- c) Identificación de células con movimiento progresivo: se tomó una velocidad promedio de desplazamiento (VAP) de 50,0 $\mu\text{m}/\text{seg}$ y un índice de rectitud (STR) de 70%.
- d) Identificación de células con movimiento lento: se tomó un límite de VAP de 30,0 $\mu\text{m}/\text{seg}$ y una velocidad rectilínea (VSL) de 15 $\mu\text{m}/\text{seg}$.

Para la evaluación con el sistema CASA, el eyaculado se mezcló con diluyente sin yema y sin glicerol (solución N° 2, tubo A). Para determinar el volumen adecuado de diluyente, se calculó el título de dilución mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\text{Título de dilución} = \frac{\text{volumen del eyaculado} \times \text{concentración espermática} \times \text{M.I}}{40 \text{ millones de espermatozoides}}$$

Según lo recomendado por Muiño *et al.* (2007), es necesario ajustar la concentración espermática a 80×10^6 espermatozoides/mL, con la finalidad de garantizar una mejor lectura por parte del equipo computarizado. Luego de determinado el volumen del diluyente, se mezcló con el semen en un cilindro de vidrio, se tomó 5 μ L y se observó al microscopio óptico.

Posteriormente, se realizaron pruebas comparativas entre los resultados obtenidos con el sistema computarizado y los resultados derivados de las pruebas rutinarias de laboratorio; esto con la finalidad de cumplir con el primer objetivo de la investigación, estandarizar la técnica de evaluación seminal.

Determinación de sub-poblaciones espermáticas: Para determinar la presencia de sub-poblaciones espermáticas en muestras seminales bovinas y el porcentaje de espermatozoides en las sub-poblaciones, se procedió a realizar un estudio detallado de algunos parámetros, que se obtuvieron mediante el sistema CASA. Para determinar el título de dilución aplicamos la fórmula antes descrita y ajustamos los valores a 80×10^6 esp/mL. Luego se procedió a colocar 5 μ L de la muestra diluida, en la cámara doble celda especialmente diseñada para el sistema CASA, cámara de Makler, la cual fue precalentada a 37°C, sobre la misma se colocó un cubreobjetos especial

y ambas se colocaron sobre una platina calentadora portátil, para mantener la temperatura adecuada (37°C) durante la evaluación.

El análisis de motilidad, mediante el sistema CASA, se realiza a través de la captura de imágenes de espermatozoides en movimiento. Una vez realizado el análisis, la información obtenida es transferida a un procesador matemático que fragmenta la motilidad espermática en diversos descriptores de motilidad individual, que caracterizan la linealidad, angularidad del movimiento espermático y desplazamiento de la cabeza del espermatozoide. Luego de obtenida la información, ésta fue transcrita a un sistema de planillas de colección de datos.

Los parámetros evaluados, en las muestras de semen, a través del sistema CASA, fueron los siguientes:

Velocidad curvilínea (VCL): velocidad promedio de desplazamiento de la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria real, medida en $\mu\text{m}/\text{seg}$.

Velocidad rectilínea (VSL): velocidad promedio de la cabeza del espermatozoide a lo largo de una línea recta, desde la primera hasta la última posición, medida en $\mu\text{m}/\text{seg}$.

Velocidad promedio de desplazamiento (VAP): velocidad promedio de la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria promedio, medida en $\mu\text{m}/\text{seg}$.

Porcentaje de linealidad (LIN): relación (%) entre VSL y VCL.

Índice de rectitud (STR): relación (%) entre VSL y VAP.

Índice de oscilación (WOB): relación (%) entre VAP y VCL.

Amplitud del desplazamiento lateral de cabeza (ALH): valor promedio, de desplazamiento lado a lado de la cabeza, en cada ciclo de batido, medida en μm .

Frecuencia de batido (BCL): frecuencia con la cual la verdadera trayectoria del espermatozoide cruza la trayectoria promedio, medida en Hz.

Estos son los valores que el sistema CASA utiliza para agrupar las sub-poblaciones espermáticas y poder clasificar una muestra con espermatozoides con velocidad rápida, velocidad media, velocidad lenta y estática.

De cada eyaculado obtenido se procedió a congelar, de manera rutinaria, las muestras y luego de transcurridos 15 d, se evaluó el semen descongelado, mediante el sistema CASA.

Análisis Estadístico

Se utilizó análisis de correlación con el objeto de establecer el grado de similitud entre la motilidad individual medida de forma rutinaria y la motilidad individual medida a través del sistema CASA y así poder comparar ambos tipos de evaluación.

Para el análisis de distribución de sub-poblaciones espermáticas, con base en la velocidad, tanto en semen fresco como en semen descongelado y su variación luego del proceso de criopreservación, se utilizó un análisis de varianza a través del procedimiento Modelo Lineal Generalizado del Sistema de Análisis Estadísticos (SAS, 1988), que incluyó los efectos de: tipo de semen (semen fresco *versus* semen descongelado), toro anidado dentro de tipo de semen, eyaculado (1, 2, 3, 4 ó 5) y la triple interacción eyaculado x tipo de semen x calidad de movimiento (rápidos, medios, lentos y estáticos).

Con el objeto de medir la frecuencia de distribución de las diferentes sub-poblaciones de espermatozoides en semen fresco y semen descongelado, se utilizó un análisis de frecuencia, utilizando el Sistema de Análisis Estadístico (SAS, 1988).

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estandarización del Método de Evaluación de Semen utilizando el Sistema Computarizado de Análisis Seminal (CASA)

Para la estandarización del método de evaluación seminal, se realizó comparación de la valoración de la motilidad individual (MI) obtenida a través de la evaluación seminal rutinaria realizada con el microscopio óptico, y los resultados obtenidos a través del sistema CASA, con la finalidad de comparar ambos métodos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Comparación de resultados para motilidad individual (MI) en semen fresco entre pruebas rutinarias de laboratorio y resultados obtenidos por el sistema CASA

Toro	Raza	Muestra	MI Rutinaria (%)	MI CASA (%)
A	Holstein Negro (Ho)	1	60	59
B	Mestizo HolsteinxCebú (F1)	1	60	67
B	F1	2	60	64
B	F1	3	60	57
B	F1	4	60	50
Promedio Toro B			60	60
C	Holstein Rojo (HR)	1	70	61
C	HR	2	50	44
C	HR	3	50	52
C	HR	4	50	55
C	HR	5	60	50
Promedio Toro C			56	66
D	Carora (Cr)	1	60	63
D	Cr	2	50	54
D	Cr	3	50	49
D	Cr	4	50	54
Promedio Toro D			52	55
E	Jersey (Jr)	1	60	65
E	Jr	2	60	62
E	Jr	3	60	65
E	Jr	4	60	68
Promedio Toro E			60	65
Promedio General			57,1 ± 5,6*	58,2 ± 7,0*

*(r= 0,60; P ≤ 0,008)

Como puede observarse en el Cuadro 2, la motilidad individual en semen fresco colectado de 5 toros (1 a 5 eyaculados/toro), medida a través de la observación en microscopio óptico, como se hace rutinariamente en el laboratorio, fue de $57,1 \pm 5,6\%$; mientras que la motilidad individual medida por el sistema CASA fue de $58,2 \pm 7,0\%$. Asimismo, puede apreciarse que existe una alta correlación ($r= 0,60$; $P \leq 0,008$) entre la motilidad individual evaluada rutinariamente y la motilidad individual evaluada con el sistema CASA, por lo que podemos considerar que la evaluación a través de este sistema, nos da resultados similares a los obtenidos a través de la evaluación rutinaria, siendo además, confiables.

En relación con los resultados de la motilidad individual en semen descongelado evaluado por las pruebas rutinarias de laboratorio y los resultados obtenidos por la evaluación por el sistema CASA, se pueden observar en el Cuadro 3.

La motilidad individual en semen descongelado colectado de 5 toros (1 a 5 eyaculados/toro), medida a través de la observación en microscopio óptico, como se hace rutinariamente en el laboratorio, fue de $57,2 \pm 5,7\%$; mientras que la motilidad individual medida por el sistema CASA fue de $45,3 \pm 8,9\%$ (Cuadro 3), apreciándose que existe una baja correlación ($r= 0,24$) aunque no significativa ($P \geq 0,3$), entre la motilidad individual de semen descongelado evaluada rutinariamente y la motilidad individual de semen descongelado evaluada a través del sistema CASA, por lo que podemos

considerar que la evaluación a través del sistema CASA, nos da resultados similares a los obtenidos a través de la evaluación rutinaria.

Cuadro 3. Comparación de resultados para motilidad individual (MI) en semen descongelado entre pruebas rutinarias de laboratorio y resultados obtenidos por el sistema CASA

Toro	Raza	Muestra	MI Rutinaria (%)	MI CASA (%)
A	Holstein Negro (Ho)	1	60	49
B	Mestizo CebúxHolstein (F1)	1	60	50
B	F1	2	60	57
B	F1	3	60	55
B	F1	4	60	44
Promedio Toro B			60	52
C	Holstein Rojo (HR)	1	70	51
C	HR	2	50	42
C	HR	3	50	44
C	HR	4	50	40
C	HR	5	60	37
Promedio Toro C			56	43
D	Carora (Cr)	1	60	31
D	Cr	2	50	41
D	Cr	3	50	48
D	Cr	4	50	41
Promedio Toro D			53	40
E	Jersey (Jr)	1	60	24
E	Jr	2	60	52
E	Jr	3	60	52
E	Jr	4	60	57
Promedio Toro D			60	46
Promedio General			57,2 ± 5,7*	45,3 ± 8,9*

*(r= 0,24; P ≥ 0,3)

Distribución de Sub-poblaciones Espermiáticas

En relación a la distribución de las sub-poblaciones espermiáticas, se estableció, en primer lugar, el número de las mismas presentes en los eyaculados bovinos colectados, tanto en semen fresco como en semen descongelado, con base en parámetros de motilidad establecidos en

patrones de velocidad, tomando en consideración el porcentaje de espermatozoides que se mueven de manera rápida, media, lenta o estática (espermatozoides inmóviles), según estudios realizados previamente por Muiño *et al.* (2007). Para obtener esta distribución de sub-poblaciones espermáticas, se contabilizó y evaluó, a través del sistema CASA, un total de 53.230 espermatozoides de muestras de semen bovino fresco.

La estimación de los patrones de movimiento, con base en la evaluación de la velocidad, determinó que en semen fresco de los bovinos evaluados existen cuatro sub-poblaciones espermáticas, cada una de ellas con patrones de movimiento bien definidos (Cuadro 4).

En este sentido, se establecieron cuatro sub-poblaciones de espermatozoides: sub-población de espermatozoides rápidos, sub-población de espermatozoides medios, sub-población de espermatozoides lentos y la sub-población de espermatozoides estáticos o sin movimiento.

La distribución de esas cuatro sub-poblaciones fue muy similar entre todas las muestras evaluadas, y las diferencias entre toros se debieron, casi exclusivamente, a la proporción de espermatozoides asignada a la sub-población de los más rápidos y espermatozoides progresivos.

Cuadro 4. Distribución de las sub-poblaciones de espermatozoides en semen bovino fresco con base en la evaluación de la velocidad a través del sistema CASA

Toro	No. Muestra	No. Células contadas (n)	% Células móviles			% Total células móviles	% Células estáticas	% Células móviles progresivas
			R	M	L			
A (Ho)	1	2715	17	42	35	94	6	7
B (F1)	1	7220	26	40	28	94	5	12
B	2	749	12	52	27	91	9	5
B	3	2159	20	37	36	93	8	10
B	4	3545	9	41	13	63	37	4
Promedio Toro B			17	43	26	85	15	8
C (HR)	1	9942	24	37	36	97	3	11
C	2	413	10	34	50	94	6	4
C	3	6194	19	33	47	99	1	10
C	4	559	16	39	21	76	24	10
C	5	432	4	45	24	73	27	3
Promedio Toro C			13	38	36	87	12	8
D (Cr)	1	2884	33	29	24	86	14	18
D	2	1779	26	28	26	80	20	12
D	3	1306	15	34	49	98	2	9
D	4	2858	13	41	42	96	4	7
Promedio Toro D			22	33	35	90	10	12
E (Jr)	1	3425	23	41	32	96	3	14
E	2	2717	21	41	27	89	11	11
E	3	2646	20	45	32	97	3	12
E	4	1687	24	44	30	98	2	14
Promedio Toro E			22	43	30	95	5	13
Promedio			18	40	32	90	10	10

R= espermatozoides rápidos; M= espermatozoides medios; L= espermatozoides lentos.

Así se tiene que, del total de espermatozoides evaluados, se obtuvo que, en promedio, el 90% de ellos poseía movimiento, de los cuales 10% presentó movimiento lineal progresivo, distribuyéndose con base en la velocidad, en espermatozoides con movimiento rápido (18% del total de la muestra evaluada); espermatozoides con movimiento medio (40%); espermatozoides con movimiento lento (32% del total de la muestra) y espermatozoides estáticos (10% del total de la muestra; Cuadro 4).

Resultados similares obtuvieron Muiño *et al.* (2007), quienes reportaron que del total de espermatozoides evaluados en el ensayo, el porcentaje de espermatozoides con movimiento medio y con movimiento lento, fueron mayores que aquellos espermatozoides con movimiento rápido. Asimismo, estudios en otras especies de mamíferos han determinado que existen cuatros sub-poblaciones espermáticas, como por ejemplo, en el semen de caballo Quintero (2003) reportó que dichas sub-poblaciones poseen patrones de movimiento bien definidos; mientras que en semen de cerdos Quintero-Moreno *et al.* (2004) encontraron que existen tres sub-poblaciones espermáticas. Por su parte, Quintero-Moreno *et al.* (2007) encontraron en eyaculados de semen de conejos que coexisten cuatro subpoblaciones espermáticas con diferentes patrones de movimiento; los cuales están relacionados con el porcentaje de anomalías espermáticas; y Nuñez-Martínez *et al.* (2006) en semen de perros, encontraron que existen cuatro subpoblaciones de espermatozoides con base en los parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide y con base en su velocidad.

Además de determinar las diferentes sub-poblaciones en semen fresco, se hizo la determinación de sub-poblaciones espermáticas en semen bovino descongelado (Cuadro 5).

Cuadro 5. Distribución de las sub-poblaciones de espermatozoides en semen bovino descongelado con base en la evaluación de la velocidad a través del sistema CASA

Toro	No. Muestra	No. Células contadas	% Células móviles			% Total células móviles	% Células estáticas	% Células móviles progresivas
			R	M	L			
A (Ho)	1	225	11	38	44	93	7	4
B (F1)	1	155	11	39	21	71	28	5
B	2	840	9	48	36	93	6	5
B	3	767	10	46	40	96	4	7
B	4	946	7	37	51	95	5	5
Promedio Toro B			9	43	37	89	11	6
C (HR)	1	418	12	39	46	97	3	7
C	2	208	8	35	54	97	3	5
C	3	350	6	38	53	97	4	4
C	4	479	6	33	56	95	4	4
C	5	113	6	27	62	95	5	4
Promedio Toro C			8	34	54	96	4	5
D (Cr)	1	381	7	25	68	100	1	4
D	2	187	7	33	49	89	11	4
D	3	882	8	40	50	98	2	5
D	4	1789	7	33	39	79	11	4
Promedio Toro D			7	33	39	79	11	4
E (Jr)	1	91	8	40	50	98	2	5
E	2	1589	7	40	21	68	33	6
E	3	1569	10	42	42	94	7	6
E	4	301	13	44	39	66	4	7
Promedio Toro E			8	37	42	87	13	6
Promedio General			7	37	45	89	11	5

R= espermatozoides rápidos; M= espermatozoides medios; L= espermatozoides lentos.

En semen descongelado se presentó la misma distribución de cuatro sub-poblaciones que en el semen fresco, observándose que 89% de los espermatozoides evaluados presentó movimiento, de los cuales 5% presentó movimiento lineal progresivo, siendo su distribución, con base a la velocidad, de la siguiente manera: 7% de espermatozoides con movimiento rápido, 37% de espermatozoides con movimiento medio; 45% de espermatozoides con movimiento lento y 11% de espermatozoides estáticos (Cuadro 5).

En segundo lugar, se evaluó tanto en semen fresco (Cuadro 4) como en semen descongelado (Cuadro 5), la distribución de las células espermáticas en las sub-poblaciones y el porcentaje de espermatozoides en cada una de ellas, con base en el total de espermatozoides móviles de la muestra.

En general, en semen fresco, las sub-poblaciones en las cuales se agrupó el mayor número de espermatozoides fueron: la sub-población de espermatozoides con movimientos medios (40%) y la sub-población de espermatozoides con movimientos lentos (32%), menor porcentaje de células se ubicó en la población de espermatozoides rápidos (18%) y aún más bajo fue el porcentaje de espermatozoides estáticos (10%). Además de estas cuatro sub-poblaciones, existe un porcentaje de células que son móviles progresivas, siendo éste < 20% en todos los eyaculados.

Asimismo, en el Cuadro 5 se muestra la distribución de las sub-poblaciones espermáticas en semen de bovino descongelado. Para ello, un total de 11.290 espermatozoides provenientes de muestras de semen bovino descongelado, fue evaluado a través del sistema CASA. La estimación de los patrones de movimiento con base en la evaluación de la velocidad determinó que, al igual que en el semen fresco (Cuadro 4), existen cuatro sub-poblaciones espermáticas en el semen descongelado.

De estas observaciones se puede concluir que en el semen bovino descongelado, las sub-poblaciones espermáticas en las cuales se agrupó

mayor número de espermatozoides fueron la sub-población de espermatozoides con movimientos medios y la sub-población de espermatozoides con movimientos lentos. Asimismo, disminuyó el porcentaje de células con movimiento progresivo, siendo < 8% en todos los eyaculados evaluados.

Relación entre Sub-poblaciones de Espermatozoides en Semen Fresco (SF) y Semen Descongelado (SD)

En el Cuadro 6, se observa la relación entre sub-poblaciones de espermatozoides en semen bovino fresco (SF) y semen bovino descongelado (SD), con base en la evaluación de velocidad a través del sistema CASA.

En este sentido, y con base al análisis estadístico, se puede concluir que la interacción tipo de semen (SF *versus* SD) por eyaculado (1, 2, 3, 4, 5) por calidad de movimiento (rápidos, medios, lentos y estáticos), no fue significativa ($P > 0,4$), indicando esto que la distribución de las sub-poblaciones espermáticas se mantiene entre el semen fresco y semen descongelado, a través de los eyaculados, aunque el número de células móviles en el semen descongelado disminuye, como consecuencia del proceso de congelación. De igual manera, se puede apreciar que en el semen fresco el número de células con movimiento progresivo, es mayor que este mismo tipo de células en el semen descongelado.

Cuadro 6. Relación entre sub-poblaciones de espermatozoides en semen bovino fresco (SF) y semen bovino descongelado (SD) con base en la evaluación de la velocidad a través del sistema CASA

TORO	Muestra	%Células móviles en SF	%Células móviles en SD	%Células móviles progresivas SF	%Células móviles progresivas SD
A (Ho)	1	59	12	7	4
B (F1)	1	67	50	12	5
B	2	64	57	5	5
B	3	57	55	10	7
B	4	50	44	4	5
Promedio Toro B		60	52	8	6
C (HR)	1	61	51	11	7
C	2	44	42	4	5
C	3	52	44	10	4
C	4	55	40	10	4
C	5	50	37	3	4
Promedio Toro C		52	44	8	5
D (Cr)	1	63	31	18	4
D	2	54	41	12	4
D	3	49	48	9	5
D	4	54	41	7	4
Promedio Toro D		55	40	12	4
E (Jr)	1	65	24	14	2
E	2	62	55	11	9
E	3	65	52	12	6
E	4	68	57	14	7
Promedio Toro E		65	47	13	6
Promedio General		58	39	10	5

(P > 0,4)

Similares hallazgos fueron obtenidos en perros por Nuñez-Martínez *et al.* (2006), quienes evaluaron, a través del sistema CASA, el efecto de la criopreservación sobre el porcentaje de células con movimiento lineal progresivo, concluyendo que existe mayor porcentaje de espermatozoides con movimiento lineal progresivo, en muestras de semen fresco que en aquellas muestras que han sido sometidas a cambios de temperatura.

Asimismo, Nuñez–Martínez *et al.* (2006) explican que al ocurrir el proceso de criopreservación, suceden cambios estructurales a nivel celular, que pueden ocasionar daño irreversible en los espermatozoides y por lo tanto afectar la motilidad del mismo.

Efecto de la Criopreservación sobre las Sub-poblaciones de Espermatozoides en Semen Fresco (SF) y Semen Descongelado (SD)

En el Cuadro 7, se muestra la variación en las sub-poblaciones espermáticas en semen fresco y semen descongelado.

En general, la criopreservación tiene efecto sobre el porcentaje de células en cada una de las sub-poblaciones espermáticas, habiendo diferencias significativas (Cuadro 7; $P < 0,0001$) para la triple interacción eyaculado (1, 2, 3, 4, ó 5) x tipo de semen (semen fresco *versus* semen descongelado) x calidad de movimiento (rápidos, medios, lentos y estáticos), determinando de esta manera, que ocurren cambios en la distribución de sub-poblaciones de espermatozoides entre el semen fresco y el semen descongelado, como consecuencia del proceso de la criopreservación, lo cual afectó el porcentaje de espermatozoides en las sub-poblaciones espermáticas.

En el caso del semen fresco, la sub-población de espermatozoides rápidos, es más abundante (18%), que en semen descongelado (7%), lo que implica que el proceso de criopreservación tiene un efecto directo sobre la velocidad de las células espermáticas, afectando de manera directa los

espermatozoides. Esto se debe a que cuando los espermatozoides son congelados y descongelados se ven sometidos a varios ciclos de deshidratación e hidratación, lo que resulta en cambios significativos a nivel intracelular, ocasionando daños. Por otra parte, en el proceso de congelación puede ocurrir formación de cristales intracelulares que causan daños de la membrana celular (Stornelli y de la Sota, 2005; Countri *et al.*, 2009).

Cuadro 7. Efecto de la criopreservación sobre las sub-poblaciones en semen bovino fresco (SF) y semen bovino descongelado (SD)

Toro	No. Muestra	%Células rápidas		%Células medias		%Células lentas		%Células estáticas	
		SF	SD	SF	SD	SF	SD	SF	SD
A (Ho)	1	17	11	42	38	35	44	6	7
B (F1)	1	26	11	40	39	28	21	5	28
	2	12	9	52	48	27	36	9	6
	3	20	10	37	46	36	40	8	4
	4	9	7	41	37	13	51	37	5
Promedio Toro B		17	9	43	43	26	37	15	11
C (HR)	1	24	12	37	39	36	46	3	3
C	2	10	8	34	35	50	54	6	3
C	3	19	6	33	38	47	53	1	4
C	4	16	6	39	33	21	56	24	4
C	5	4	6	45	27	24	62	27	5
Promedio Toro C		13	8	38	34	36	54	12	4
D (Cr)	1	33	7	29	25	24	68	14	1
D	2	26	7	28	33	26	49	20	11
D	3	15	8	34	40	49	50	2	2
D	4	13	7	41	33	42	39	4	11
Promedio Toro D		22	7	33	33	35	54	10	6
E (Jr)	1	23	8	41	40	32	50	3	2
E	2	21	7	41	40	27	21	11	33
E	3	20	10	45	42	32	42	3	7
E	4	24	13	44	44	30	39	2	4
Promedio Toro E		22	8	43	37	30	42	5	14
Promedio General		18	7	40	37	32	45	10	11

(P < 0,0001)

En lo que respecta a la sub-población de espermatozoides con velocidad media, los porcentajes fueron similares, 40% en semen fresco y 37% en semen descongelado. Por el contrario, la sub-población espermática en la cual existió la mayor diferencia en el porcentaje de células, fue en la sub-población de espermatozoides lentos, siendo en semen fresco de 32% y 45% en semen descongelado. En el caso de la fracción de células espermáticas estáticas, fue de 10% en semen fresco, manteniéndose en 11% en semen descongelado. Con base en lo anterior, se puede concluir que la criopreservación afecta el movimiento de las células espermáticas, promoviendo que células que tenían un movimiento rápido o medio, bajen su velocidad y por lo tanto aumente la fracción de células con movimiento lento.

Resultados similares obtuvo Muiño *et al.* (2007), quienes evaluando en toros reproductores el efecto de la criopreservación sobre el porcentaje de las sub-poblaciones en semen descongelado, encontraron diferencias significativas ($P < 0,01$) en la distribución de las sub-poblaciones espermáticas, habiendo mayor variación en la distribución de las sub-poblaciones de espermatozoides rápidos y estáticos.

Variación de las Sub-poblaciones Espermáticas en el Tiempo

En el Cuadro 8, se aprecia la variación a través del tiempo, en el patrón de distribución de las sub-poblaciones espermáticas presentes en semen bovino fresco.

Cuadro 8. Variación en el tiempo del patrón de las sub-poblaciones presentes en el semen fresco de toros reproductores

TORO	No. Muestra	%Células rápidas	%Células medias	%Células lentas	%Células estáticas
B (F1)	1	26	40	28	5
B	2	12	52	27	9
B	3	20	37	36	8
B	4	9	41	13	37
Promedio Toro B		17	43	26	15
C (HR)	1	24	37	36	3
C	2	10	34	50	6
C	3	19	33	47	1
C	4	16	39	21	24
C	5	4	45	24	27
Promedio Toro C		13	38	36	12
D (Cr)	1	33	29	24	14
D	2	26	28	26	20
D	3	15	34	49	2
D	4	13	41	42	4
Promedio Toro D		22	43	35	10
E (Jr)	1	23	41	32	3
E	2	21	41	27	11
E	3	20	45	32	3
E	4	24	44	30	2
Promedio Toro E		22	43	30	5
Promedio General		18	40	32	10

Es importante destacar que se eliminó el toro A de este análisis, ya que del mismo, solo se obtuvo un eyaculado. En el Cuadro 8, se puede observar que hubo variación en el porcentaje de células con movimiento rápido, a través del tiempo durante el cual se colectaron las muestras. Sin embargo, se mantienen las mismas cuatro sub-poblaciones anteriormente descritas.

En todo caso, en todos los toros, en semen fresco, fue la sub-población de espermatozoides con movimientos medios, la que se mantuvo sin mayor variación a lo largo del período durante el cual se hicieron las colectas. Por el contrario, hubo mayor variación en las sub-poblaciones de espermatozoides rápidos y estáticos. En el caso de la sub-población de espermatozoides lentos, la variación dentro de cada toro, fue menor (Cuadro 8).

Asimismo, puede observarse en el Cuadro 9, que en el semen descongelado, en todos los toros, las sub-poblaciones de espermatozoides medios y lentos fueron las que variaron menos, similar a lo que sucede en el semen fresco, y al igual que en el semen fresco, fueron las sub-poblaciones con el mayor número de células. En el caso de la sub-población de espermatozoides con movimientos rápidos, no tuvo mayor variación a través del tiempo, diferente a la sub-población de espermatozoides estáticos, la cual presentó variación marcada a través del tiempo.

Cuadro 9. Variación en el tiempo del patrón de las sub-poblaciones presentes en el semen bovino descongelado de toros reproductores

TORO	No. Muestra	%Células rápidas	%Células medias	%Células lentas	%Células estáticas
B (F1)	1	11	39	21	28
B	2	9	48	36	6
B	3	10	46	40	4
B	4	7	37	51	5
Promedio Toro B		9	43	37	11
C (HR)	1	8	35	54	3
C	2	6	38	53	4
C	3	12	39	46	3
C	4	6	33	56	4
C	5	6	27	62	5
Promedio Toro C		8	34	54	4
D (Cr)	1	7	25	68	1
D	2	7	33	49	11
D	3	8	40	50	2
D	4	7	33	49	11
Promedio Toro D		7	33	54	6
E (Jr)	1	2	22	63	13
E	2	7	40	21	33
E	3	10	42	42	6
E	4	13	44	39	4
Promedio Toro E		8	37	42	14
Promedio General		8	37	47	9

Morfología Espermática

El espermatozoide bovino se caracteriza por poseer una cabeza oval y aplanada, una pieza intermedia y una cola. La cola, como en las demás especies, está formada por el cuello, que une la cabeza con los segmentos principal, medio y caudal de la cola (Hafez, 2002). En el bovino, el mínimo porcentaje aceptado de espermatozoides normales es 70% (Saacke *et al.*,

1994), o lo que es igual, no mayor de 30% de atipias totales en semen que debe ser sometido a criopreservación, debido a que gran número de espermatozoides, luego del proceso de congelación presentan daño celular. Cuando los espermatozoides son congelados y descongelados se ven sometidos a varios ciclos de deshidratación e hidratación lo que resulta en cambios significativos en la morfología (Stornelli y de la Sota, 2005). Además de la formación de cristales a nivel intracelular que pueden producir alteración del citoplasma, ocasionando muerte celular (Countri *et al.*, 2009).

El estudio de la morfología espermática es muy importante en la valoración de la fertilidad de los animales, a los fines de establecer porcentajes de espermatozoides normales y poder clasificar las anomalías, además de tener un valor definido en el estudio de las patologías testiculares (degeneración testicular, orquitis, hipoplasia, etc.) y en el estudio de los defectos hereditarios de los espermatozoides, ya que existe una alta correlación entre los defectos espermáticos y la infertilidad.

Al realizar el análisis de las muestras de este estudio, se tomó en consideración la evaluación de atipias, descartándose aquellos eyaculados que poseían > 30% de atipias. Como se observa en el Cuadro 10, las muestras evaluadas presentaron el porcentaje de atipias requerido para que las mismas fuesen sometidas al proceso de criopreservación. En este sentido, se observa que la muestra que poseía mayor porcentaje de atipias

totales era de 23,5%, lo que implica que todas las muestras se encontraban en los rangos establecidos para la criopreservación.

Cuadro 10. Porcentaje de atipias primarias, atipias secundarias y total de atipias en semen fresco

TORO	No. Muestra	% Atipias Primarias	% Atipias Secundarias	% Total Atipias
A (Ho)	1	4,5	5,5	10
B (F1)	1	12	5	17
B	2	11	15	26
B	3	3	6	9
B	4	11,5	4,5	16
Promedio Toro B		9,3	7,6	17
C (HR)	1	5,5	12	17,5
C	2	8,5	10	18,5
C	3	14,5	9	23,5
C	4	6	4	10
C	5	9,5	4	13,5
Promedio Toro C		8,8	7,8	7,8
D Cr	1	4,5	7,5	12
D	2	3,5	12	15,5
D	3	8,5	6,5	15
D	4	4	1,5	5,5
Promedio Toro D		5	6,8	12
E Jr	1	8,5	11,5	20
E	2	11	7	18
E	3	9	5,5	14,5
E	4	5	3,5	8,5
Promedio Toro E		8,3	6,8	13,2
Promedio General		8	7	15

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El presente trabajo presenta un método de evaluación seminal, a través del cual la estimación de la calidad de los sementales bovinos se hace de forma más objetiva, como una manera de garantizar que el semental bovino sea más eficiente en la reproducción.

En el presente trabajo, se llevó a cabo la estandarización del método de evaluación de semen utilizando el Sistema Computarizado de Análisis Seminal (CASA), en el laboratorio de Procesamiento de Semen del Instituto de Reproducción Animal "Dr. Abraham Hernández Prado", no obteniéndose diferencias entre la motilidad individual medida a través de pruebas rutinarias ($57,1 \pm 5,6\%$) y la motilidad individual medida a través del sistema CASA ($58,2 \pm 7,0\%$), obteniéndose una alta correlación entre ambos métodos ($r=0,60$; $P \leq 0,008$), indicando que este último método es un instrumento que se puede utilizar en la evaluación rutinaria de semen fresco en el laboratorio.

Se estableció, a través del sistema CASA, que en el eyaculado de toros reproductores existen cuatro sub-poblaciones espermáticas, con patrones de movimientos bien definidos: sub-población de espermatozoides con velocidad rápida, sub-población de espermatozoides con velocidad media, sub-población de espermatozoides lentos y sub-población de espermatozoides estáticos; no observándose cambios en los patrones de sub-poblaciones, entre semen fresco y semen descongelado ($P > 0,4$), lo cual quiere decir que la distribución de las sub-poblaciones espermáticas se

mantiene a través del proceso de congelación, aunque el número de células móviles en el semen descongelado disminuye, como consecuencia del proceso de congelación.

Con base en la evaluación del patrón de movimiento, se estableció la distribución de las sub-poblaciones espermáticas en semen fresco, obteniéndose que 90% de los espermatozoides evaluados poseía movimiento, de los cuales 10% presentó movimiento lineal progresivo, distribuyéndose con base en la velocidad, en: espermatozoides con movimiento rápido (18% del total de la muestra evaluada); espermatozoides con movimiento medio (40%); espermatozoides con movimiento lento (32% del total de la muestra) y espermatozoides estáticos (10% del total de la muestra).

Igualmente, en semen descongelado se presentó la misma distribución de sub-poblaciones que en el semen fresco, observándose que 89% de los espermatozoides evaluados presentó movimiento, de los cuales 5% presentó movimiento lineal progresivo, siendo su distribución, con base a la velocidad, de la siguiente manera: 7% de espermatozoides con movimiento rápido, 37% de espermatozoides con movimiento medio; 45% de espermatozoides con movimiento lento y 11% de espermatozoides estáticos.

La criopreservación afectó el porcentaje de espermatozoides en las sub-poblaciones espermáticas, habiendo diferencias en el número de espermatozoides con movimiento rápido entre semen fresco (18%) y semen

bovino descongelado. Con relación a la sub-población de espermatozoides con velocidad media, el porcentaje fue similar. Por el contrario, en semen fresco se observó que fue menor la sub-población de espermatozoides con movimiento lento (32%); mientras que en semen descongelado fue mayor (45%). El porcentaje de células espermáticas estáticas aumentó luego de la criopreservación.

Con relación a la variación en el tiempo de las sub-poblaciones espermáticas, con base en la evaluación del patrón de movimiento en semen fresco, se pudo apreciar que la sub-población de espermatozoides rápidos disminuyó o se mantuvo en el tiempo, al igual que la sub-población con velocidad media que se mantuvo en el tiempo. Mientras que la sub-población de espermatozoides con velocidad lenta se mantuvo en el tiempo. El porcentaje de espermatozoides estáticos aumentó en dos de los toros (B y C), mientras que en los toros (D y E), se mantuvo.

Igualmente, en semen descongelado la sub-población con velocidad rápida varió a través del período de colectas, disminuyendo en el tiempo (toros B y C), manteniéndose (toro D) o aumentando (toro E). Con relación a la sub-población con velocidad media se mantuvo en el tiempo. Mientras que la sub-población de espermatozoides con velocidad lenta fue fluctuante y el porcentaje de espermatozoides estáticos aumentó al pasar el tiempo (toros B y C), mientras que se mantuvo en los toros D y E.

Finalmente, la implementación de estos métodos informáticos atenúa en gran parte el factor subjetivo del análisis seminal y garantiza una mejor correlación con la capacidad fecundante del espermatozoide, disminuyendo el factor subjetivo del análisis seminal, por lo tanto, se recomienda el uso del sistema CASA como pieza fundamental en la evaluación de las muestras seminales como un método de rutina en los Centros de Inseminación Artificial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amann, R. and Hammerstedt, R. 1980. Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biology of Reproduction*. 23: 647-656.
- American Society of Theriogenology. 1992. Parameters for evaluation of sperm motility. 5th edition. Pp. 78-92.
- Asprón, M. 2004. Manejo reproductivo del ganado bovino. IVISO. Pp. 19-22.
- Ballester, J., Saravia, F. and Håård, M. 2007. Post-thaw viability of bull AI-doses with low-sperm numbers. *Theriogenology*. 68: 934-943.
- Bearden, J., McCallow, G. and Smith, P. 1982. Sperm dilutions for appropriate routine of semen evaluation. *Theriogenology*. 33: 157-160.
- Bloom, A. 1977. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press. *Animal Reproduction*. Pp.: 61-81.
- Brogliatti, M. 2008. Inseminación artificial a tiempo fijo: el por qué de los intentos fallidos. Centro de Inseminación Artificial La Argentina Chica. 10: 22-25. www.produccion-animal.com.ar
- Brogliatti, M., Garcia, C. and Cavia, R. 2004. CASA parameters of fresh bull semen collected by artificial vagina or electroejaculation in Argentina. *Reproduction, Fertility and Development*. 17: 156-159.
- Countri, A., Valorz, C. and Faustini, M. 2009. Effect of semen preparation on CASA results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*. 74: 424-435.
- Dorado, J., Molina, I. and Muñoz, A. 2010. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Florida goats. *Theriogenology*. 74: 795-804.
- Farrel, P., Presicce, C. and Brockett, C. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*. 49: 871-879.

- Goovaerts, I., Goovaerts, J. and Van Soom, J. 2006. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton–Thorne analyzer indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. *Theriogenology*. 66: 323-330.
- Graham, J. 1996. Cryopreservation in stallion spermatozoa. *The Veterinary Clinics of North America*. 12: 131-147.
- Graham, J. and Mocé, J. 2005. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*. 64: 492-504.
- Hafez, E.S.E and Hafez, B. 2000. Espermatozoides y Plasma Seminal. En: *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 7ª edición. Interamericana McGraw - Hill. México. Pp. 98-100.
- Iguer-ouada, M. and Verstegen, J. 2001. Evaluation of the “Hamilton Thorne computer-based automated system” for dog semen analysis. *Theriogenology*. 57: 149-179.
- Januskauskas, A., Johannisson, A. and Rodriguez-Martinez, H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*. 60: 743-758.
- Kuster, C. 2005. Sperm concentration determination between hemacytometric and CASA systems: Why they can be different? *Theriogenology*. 64: 614-617.
- Miró, J., Lobo, V. and Quintero-Moreno, A. 2004. Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen. *Theriogenology*. 72: 1706-1716.
- Mortiner, S. 2000. CASA-Practical aspects. *Journal of Andrology*. 21: 515-524.
- Muñoz, R., Fernández, M. y Peña, A.I. 2006. Parámetros cinéticos de eyaculados bovinos de toros de raza Frisona y Rubia Gallega. *ITEA: Información Técnica Económica Agraria*. 102: 55-66.
- Muñoz, R., Fernández, M., Areán, H., Viana, J.L., Fernández, A. y Peña, A.I. 2007. Influencia de la raza y la edad en parámetros cinéticos de

eyaculados bovinos. www.aida-itea.org/jornada37/6_reproduccion/1_semen_bov_porc_cunicola/repr_sb1_muino.pdf. Visitada el día 19/07/2007.

- Muñoz, R., Tamargo, C., Hidalgo, A. and Peña, A.I. 2009. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Animal Reproduction Science*. 109: 27-39.
- Nuñez-Martínez, I., Moran, J.M. and Peña, F.J. 2006. A step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulation in canine ejaculate: changes after cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animal*. 41: 408-415.
- Palacios, C.J. 2005. Técnicas para la evaluación de la capacidad fecundante de espermatozoides. *Memorias Posgrado de Reproducción Bovina*. CGR. Colombia 235-242.
- Pérez, F. and Pérez, F. 1985. Dilución del esperma. *Reproducción Animal, Inseminación Artificial y Transplante de Embriones*. Editorial Científico-Médica, Barcelona, España. Capítulo 6: 215-249.
- Saacke, R., Nadir, R. and Nebel, L. 1994. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization and embryo quality in ruminants. *Theriogenology*. 41: 45-50.
- Quintero, A. 2003. Estudio de la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria. Pp. (1-151)
- Quintero-Moreno, A., Rigaut, T. and Rodríguez-Gil, J.E. 2004. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology*. 61: 673-690.
- Quintero-Moreno, A., Rigaut, T. and Rodríguez-Gil, J.E. 2007. Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulations in rabbit semen and to predict semen fertility and litter size. *Reproduction in Domestic Animals* 42: 312-319.
- Rosenberger, G. 1981. *Exploración Clínica de los Bovinos*. Primera Edición. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. Pp. 281-319.

- SAS. 1988. In: SAS/STAT™ User's guide (Release 6.03 Ed.) SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Stornelli, M.A. y De la Sota, R.L. 2005. Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. Instituto de Teriogenología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Pp.: 15-22.
- Varner, D.D. 2008. Developments in stallion semen evaluation. Theriogenology. 70: 448-462.
- Verstegen, J. and Onclin, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology. 57: 149-179.
- Vogler, C., Bame, J. and Dejarnette, J. 1993. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. Theriogenology. 41: 45-50.