

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
CAMPUS TECNOLÓGICO LOCAL SAN CARLOS**

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL EN BOVINOS (*Bos indicus*) Y LA ESTRUCTURA SUBPOBLACIONAL DEL EYACULADO MEDIANTE UN SISTEMA CASA-Mot

Trabajo Final de Graduación presentado a la Escuela de Agronomía
como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura
en Ingeniería en Agronomía

LUIS GABRIEL VÍQUEZ OCONITRILLO

2020



Carrera de Ingeniería en Agronomía
Campus Tecnológico Local
San Carlos
2019 - 2023

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL EN BOVINOS (*Bos indicus*) Y LA ESTRUCTURA SUBPOBLACIONAL DEL EYACULADO MEDIANTE UN SISTEMA CASA-Mot

LUIS GABRIEL VÍQUEZ OCONTRILLO

Aprobado por los miembros del Tribunal Evaluador:

Ing. Anthony Valverde Abarca, Ph. D


Asesor Principal

Dra. Carolina Solís Garrido, M.V.


Jurado


Dr. Mauricio Maroto Hernández, M.V.Z.


Jurado

Ing. Zulay Castro Jiménez, M.G.A.


Coordinadora
Trabajos Finales de Graduación

Ing. Milton Villarreal Castro, Ph. D.


Director
Escuela de Agronomía

2020

DEDICATORIA

Quiero dedicar mi trabajo a mi familia y en especial a mis padres por todos los esfuerzos y sacrificios que tuvieron que pasar para ayudarme con mi formación académica y profesional.

A la memoria de mi querida y amada abuela Zulay Castro Rodríguez, quien siempre me motivaba y alentaba porque siempre quiso que fuese un profesional.

Y a todas las personas que han influido en mi formación personal y profesional.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por darme la vida y por permitirme estudiar y concluir esta carrera.

A mi tutor de tesis: Dr. Anthony Valverde Abarca, por haber confiado en mi persona, aceptarme en su equipo de investigación para el desarrollo de este trabajo y enseñarme a investigar.

A todos los profesores, amigos y compañeros que tuvieron disponibilidad y me brindaron su ayuda, apoyo y motivación para concluir mis estudios, y ser un gran profesional.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
INDICE DE CUADROS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xii
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS.....	xiv
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Justificación.....	2
1.2 Propósito.....	3
1.3 Objetivo general.....	3
1.4 Objetivos específicos.....	3
1.5 Hipótesis.....	4
2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1 Fisiología y producción de espermatozoides.....	5
2.2 Técnicas de reproducción asistida en especies ganaderas.....	7
2.3 Sistemas computadorizados de análisis seminal (CASA).....	8
2.4 Parámetros CASA.....	10
2.4.1 Movilidad y variables cinéticas.....	10
2.5 Evaluación de la calidad seminal.....	13
2.6 Estructura de subpoblaciones espermáticas.....	14
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1 Experimento en semen fresco.....	16
3.1.1 Descripción y manejo de los animales.....	16
3.1.2 Evaluación física general de los animales.....	17
3.1.3 Análisis andrológico.....	17
3.1.4 Características macroscópicas del eyaculado.....	20
3.1.5 Efecto del medio de dilución y temperatura del diluyente en semen fresco.....	21
3.1.6 Transporte y mantenimiento de las muestras.....	22
3.1.7 Equipo de análisis seminal.....	22
3.1.8 Preparación de diluciones para análisis.....	23
3.1.9 Efecto del tiempo de análisis sobre la movilidad del semen fresco.....	23

3.2	Experimento en semen congelado	23
3.2.1	Material de evaluación.....	23
3.2.2	Descongelamiento del semen.....	24
3.2.3	Evaluación de cinética y movilidad espermática	25
3.3	Análisis estadístico.....	28
3.3.1	Análisis multivariado	28
3.3.2	Análisis bayesiano	29
4	Resultados y discusión.....	31
4.1	Experimentos en semen fresco.....	31
4.1.1	Efecto del tipo de cámara de recuento y el tiempo de análisis tras la carga inicial del semen sobre los parámetros cinéticos	31
4.1.2	Efecto del tipo de diluyente y temperatura de dilución del semen sobre las variables cinéticas.....	35
4.2	Experimentos en semen congelado.....	38
4.2.1	Análisis de movilidad espermática.....	38
4.2.2	Estructura subpoblacional	39
4.2.3	Cinemática espermática dentro de subpoblaciones para diferentes diluyentes.....	41
4.2.4	Análisis bayesiano de subpoblaciones espermáticas	45
5	CONCLUSIONES	53
6	BIBLIOGRAFÍA.....	54
7	PRESUPUESTO.....	77
	ANEXOS	78
	ANEXO 1	79
	Kinematic subpopulations in bull spermatozoa: A comparison of classical and Bayesian approaches.....	79
	ANEXO 2.	80
	Condiciones óptimas de análisis cinético del semen fresco bovino con un sistema CASA-Mot ^{1,2}	80
	Luis Viquez ³ , Vinicio Barquero ³ , Anthony Valverde ⁴ , ✉	80

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°	Título	Página
1	22	22
2	25	25
3	28 Variables de cinética espermática obtenidas con un sistema CASA-Mot	28
4	32	32
5	34	34
6	35	35
7	37	37
8	40	40
9	43	43
10	44	44
11	47	47
12	48	48
13	50	50

INDICE DE FIGURAS

Figura N°	Título	Página
1	en la página 6	6
2	en la página 9	9
3	11	11
4	17	17
5	18	18
6	19	19
7	20	20
8	21	21
9	26	26

RESUMEN

Las condiciones óptimas de análisis seminal permiten estandarizar los protocolos de evaluación. El eyaculado es heterogéneo y se pueden identificar subpoblaciones espermáticas con diferentes patrones cinemáticos en varias especies. Sin embargo, aunque estas subpoblaciones están estadísticamente bien definidas, las diferencias estadísticas no siempre son relevantes. El objetivo del presente trabajo fue analizar la calidad espermática del semen bovino y la estructura subpoblacional de los eyaculados mediante un sistema CASA-Mot. En el experimento uno, se utilizaron diez toros Brahman que fueron electroeyaculados, diluyendo el semen con tres diluyentes comerciales: Andromed[®], Androstar[®] y BTS a dos temperaturas (37 y 29 °C). Las muestras se analizaron mediante un sistema CASA-Mot ISAS[®]v1 y se utilizaron cámaras de recuento ISAS[®]D4C (10, 16 y 20 μm) y Spermtrack[®] (20 μm) en diferentes tiempos de análisis (0, 3, 6 y 12 h). La Spermtrack[®] presentó mayor velocidad curvilínea pero menor linealidad respecto de las otras cámaras de recuento (P<0,05). La durabilidad de las muestras fue menor para todas las variables cinética (P<0,05) excepto para STR. La velocidad curvilínea fue mayor cuando se utilizó Andromed[®], pero hubo mayor progresividad con Androstar[®] (P<0,05). En el experimento dos, se evaluó el semen de diez toros después de la descongelación. Se empleó un sistema ISAS[®]v1 CASA-Mot con una tasa de adquisición de imágenes de 50 Hz y cámaras de conteo ISAS[®]D4C20. Las subpoblaciones de espermatozoides móviles se caracterizaron mediante procedimientos multivariados como el análisis de componentes principales (CP) y métodos de agrupamiento (modelo k-means). Se identificaron cuatro subpoblaciones de esperma diferentes a partir de tres componentes principales que involucraban progresividad, velocidad y movimiento ondulatorio celular. Las proporciones de las diferentes subpoblaciones de esperma variaron con el diluyente utilizado y en las dos especies. A pesar de una diferencia estadística (P <0.05) entre los diluyentes, el análisis bayesiano confirmó que solo uno de ellos (TriladyI[®]) presentó diferencias relevantes en los patrones cinemáticos en comparación con Tris-EY y OptiXcell[®]. Los diluyentes diferían en la proporción de espermatozoides en cada una de las subpoblaciones cinemáticas. Se identificaron patrones similares en *Bos taurus* y *Bos indicus*. Los resultados bayesianos indican

que las subpoblaciones SP₁, SP₂ y SP₃ fueron diferentes para los criterios de PC y estas diferencias fueron relevantes. Para velocidad, linealidad y progresividad, el SP₄ no mostró una diferencia relevante con respecto a las otras subpoblaciones espermáticas. La estandarización de protocolos de análisis seminal puede servir para determinar la relevancia biológica de estas agrupaciones celulares en el eyaculado. El enfoque clásico de agrupamiento o subpoblación de esperma, por lo tanto, puede no tener un significado biológico directo. Por lo tanto, la relevancia biológica de las subpoblaciones de esperma necesita ser reevaluada.

ABSTRACT

The optimal conditions for seminal analysis allow standardization of evaluation protocols. The ejaculate is heterogeneous and sperm subpopulations with different kinematic patterns can be identified in various species. However, although these subpopulations are statistically well defined, statistical differences are not always relevant. The objective of the present work was to analyze the sperm quality of bovine semen and the subpopulation structure of ejaculates using a CASA-Mot system. In experiment one, ten Brahman bulls were used that were electroejaculated, diluting the semen with three commercial diluents: Andromed[®], Androstar[®] and BTS at two temperatures (37 and 29 °C). The samples were analyzed using a CASA-Mot ISAS[®]v1 system and counting chambers ISAS[®]D4C (10, 16 and 20 µm) and Spermtrack[®] (20 µm) were used at different analysis times (0, 3, 6 and 12 h). The Spermtrack[®] presented higher curvilinear speed but lower linearity with respect to the other counting chambers ($P < 0.05$). The durability of the samples was lower for all kinetic variables ($P < 0.05$) except for STR. Curvilinear speed was higher when Andromed[®] was used, but there was greater progressivity with Androstar[®] ($P < 0.05$). In experiment two, the semen of ten bulls was evaluated after thawing. An ISAS[®]v1 CASA-Mot system with an image acquisition rate of 50 Hz and ISAS[®]D4C20 counting cameras were used. Motile sperm subpopulations were characterized using multivariate procedures such as principal component analysis (PC) and clustering methods (k-means model). Four different sperm subpopulations were identified from three main components involving cell progressivity, velocity, and wave motion. The proportions of the different sperm subpopulations varied with the diluent used and in the two species. Despite a statistical difference ($P < 0.05$) between the diluents, the Bayesian analysis confirmed that only one of them (Triladyl[®]) presented relevant differences in the kinematic patterns compared to Tris-EY and OptiXcell[®]. The diluents differed in the proportion of sperm in each of the kinematic subpopulations. Similar patterns were identified in *Bos taurus* and *Bos indicus*. The Bayesian results indicate that the SP1, SP2 and SP3 subpopulations were different for the PC criteria and these differences were relevant. For speed, linearity and progressiveness, SP4 did not show a relevant difference with respect to the other sperm subpopulations. The

standardization of seminal analysis protocols can be used to determine the biological relevance of these cell groups in the ejaculate. The classical sperm grouping or subpopulation approach, therefore, may not have direct biological significance. Therefore, the biological relevance of sperm subpopulations needs to be reassessed.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS

Parte de los resultados de esta tesis han sido enviados para su posible publicación a las siguientes revistas:

- **Luis Viquez**, Vinicio Barquero, Carles Soler, Eduardo R.S. Roldan, Anthony Valverde. Kinematic subpopulations in bull spermatozoa: A comparison of classical and Bayesian approaches. **Biology** (2020) **9(6)**, 138; <https://doi.org/10.3390/biology9060138>; published online: June 26, 2020 (Published) (ANEXO 1).

- **Luis Viquez**, Vinicio Barquero, Anthony Valverde. Condiciones óptimas de análisis cinético del semen fresco bovino con un sistema CASA-Mot. **Agronomía Mesoamericana** (Enviado) (ANEXO 2).

1 INTRODUCCIÓN

La palabra espermatozoide es un cultismo griego de carácter técnico. Proviene del griego **σπέρμα** *sperma* “semilla”. A partir de *sperma* se formó espermatozoide, palabra compuesta por la voz latina, seguida por el griego *zoon* “animal” y la partícula *oide* “aspecto o apariencia de”. El espermatozoide o gameto masculino, es una célula haploide altamente diferenciada, que tiene la función de transportar el genoma masculino y fusionarse con el gameto femenino (ovocito), para dar lugar a un nuevo individuo diploide.

Los espermatozoides fueron identificados por primera vez en 1679 por Anton Van Leeuwenhoek (1632-1723). Posteriormente en 1697, Hartsocker propuso la teoría del homúnculo, que consistía en la presencia dentro del espermatozoide de un hombre microscópico con una cabeza de gran tamaño (Sztein *et al.* 2018). En 1780, Lazzaro Spalanzani fue el primero en realizar una inseminación artificial con éxito en la especie canina, concluyendo que el espermatozoide es la célula de origen masculino implicada en la fecundación. Este mismo autor descubrió también que los espermatozoides enfriados con nieve no morían, sino que solo permanecían aletargados e inmóviles pues logran recuperar la movilidad posteriormente (Brinsden 2011). Los avances tecnológicos que se desarrollaron posteriormente en los siglos XIX y XX han permitido determinar la estructura del espermatozoide y su función reproductiva (Brinsden 2011).

La mejora genética de los animales de granja se ha favorecido gracias al uso de la inseminación artificial (IA). El desarrollo, progreso y aplicación de esta técnica de biotecnología reproductiva no solo ha favorecido la rápida distribución de germoplasma sino que también ha contribuido a disminuir la propagación de enfermedades (Gil 1999).

Polge, Smith y Parkes (1949) hallaron que al añadir el glicerol en el medio de suspensión de los espermatozoides se podían congelar y descongelar sin perder la movilidad de éstos. Este descubrimiento ha permitido la conservación de los espermatozoides de toro por largos periodos de tiempo (Lovelock y Polge 1954).

Durante décadas, se han desarrollado pruebas de laboratorio para predecir de forma precisa la capacidad fecundante del semen que se va a utilizar posteriormente en inseminación artificial o valorar protocolos de congelación espermática. Debido a que el propio método de IA permite determinar la capacidad fecundante de un eyaculado, este conlleva tiempo y dinero, además de que, existen factores de variación relacionados con la hembra que pueden modificar los resultados. Sin embargo, se ha demostrado que el análisis objetivo de parámetros relativos a las características funcionales, morfológicas y de morfometría de los espermatozoides permite estimar el potencial fecundante de una muestra de semen (Amann 1989). Durante la segunda mitad de la década de los 80s del siglo XX, se inició el desarrollo la tecnología CASA (*Computer-Assisted Semen Analysis*) que permite el estudio de diversas características de los espermatozoides con el propósito de predecir la calidad de una muestra seminal de manera objetiva (Amann y Waberski 2014).

Los sistemas CASA proporcionan una serie de datos respecto de la cinética y trayectoria individual de cada espermatozoide (Holt y Palomo 1996). El análisis de un elevado número de células permite identificar subpoblaciones espermáticas y cómo éstas se distribuyen en un eyaculado particular según los patrones de movimiento característicos de cada subpoblación. Esto permite tener una perspectiva más real y ajustada que la simple movilidad de una muestra de semen, porque el eyaculado se constituye por una población heterogénea de espermatozoides (Holt, O'Brien, y Abaigar 2007; Vicente-Fiel *et al.* 2013; Yániz *et al.* 2017).

1.1 Justificación

Por lo general, la evaluación de la fertilidad de los machos se realiza mediante exámenes andrológicos; sin embargo, algunas estimaciones de estos exámenes suelen basarse en criterios subjetivos de valoración seminal como por ejemplo la movilidad, ya que ésta se realiza por técnicos sin equipos especializados. La tecnología CASA permite una evaluación objetiva de las características espermáticas, lo que favorece una mayor precisión de la información reproductiva y la fertilidad potencial del macho. Además, se puede utilizar de base para estimar

dosis seminales mediante la tecnología CASA, de toros promisorios genéticamente. En Costa Rica, se recomienda que un toro cubra, en promedio, entre 25 y 30 vacas, por lo que las implicaciones en la productividad de la finca y a nivel nacional podrían verse afectadas. Por último, la literatura científica existente de análisis computadorizado de semen generalmente se basa y utilizan como modelo el *Bos taurus*.

1.2 Propósito

Este trabajo pretende constituirse en la primera investigación a nivel nacional que determine las condiciones técnicas de análisis (*set up*) del semen bovino mediante la tecnología CASA-Mot y describir la estructura subpoblacional de los eyaculados bovinos respecto de variables de movilidad y cinética de espermatozoides de toros *Bos indicus* y *Bos taurus*.

1.3 Objetivo general

Analizar la calidad espermática del semen bovino y la estructura subpoblacional de los eyaculados mediante un sistema CASA-Mot.

1.4 Objetivos específicos

Evaluar el efecto del tipo de cámaras recuento espermático, y el tipo de diluyente del semen sobre las variables de cinética espermática analizadas mediante un sistema CASA-Mot.

Estudiar el efecto de la conservación del movimiento del semen fresco en el tiempo sobre variables, progresividad y cinéticas analizadas con un sistema CASA-Mot.

Evaluar el efecto de la criopreservación espermática del semen bovino sobre la movilidad y cinética espermática.

Determinar la estructura subpoblacional de los eyaculados bovinos a partir de variables cinéticas del semen.

1.5 Hipótesis

Las condiciones técnicas de análisis de semen con sistemas CASA-Mot influyen en los resultados de evaluación seminal, así como los procesos previos a los que se ha sometido el semen para su conservación o almacenamiento en fresco.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Fisiología y producción de espermatozoides

El espermatozoide es una célula haploide altamente especializada que se produce en los túbulos seminíferos de los testículos, mediante un proceso denominado espermatogénesis (Palomino 2019). Estos túbulos se encuentran estructurados por un gran número de células epiteliales germinales llamadas espermatogonias, que son células diploides que proliferan continuamente para mantener su número. Un porcentaje de estas células sufrirán una serie de modificaciones hasta transformarse en los gametos masculinos conocido como espermatogénesis (Olivera *et al.* 2006). Sin embargo, estas células haploides ya diferenciadas carecen de capacidad fecundante y poseen escasa movilidad. Se precisa, por tanto, de una última fase de maduración durante su tránsito por el epidídimo, para desarrollar dichas características (Amann 1989).

La espermatogénesis es el proceso de proliferación, maduración y diferenciación que tiene lugar en los túbulos seminíferos y mediante el cual las espermatogonias se transforman en espermatozoides (Lawrence *et al.* 2012). La espermatogénesis en el bovino tiene una duración de 61 días, y esta dividida en dos fases: espermatocitogénesis que incluye mitosis y meiosis y espermiogénesis que a su vez constan de cuatro etapas consecutivas en las cuales, las células primordiales cambian su morfología, pierden algunas de sus organelas y se transforman en células diferenciadas (Figura 1).

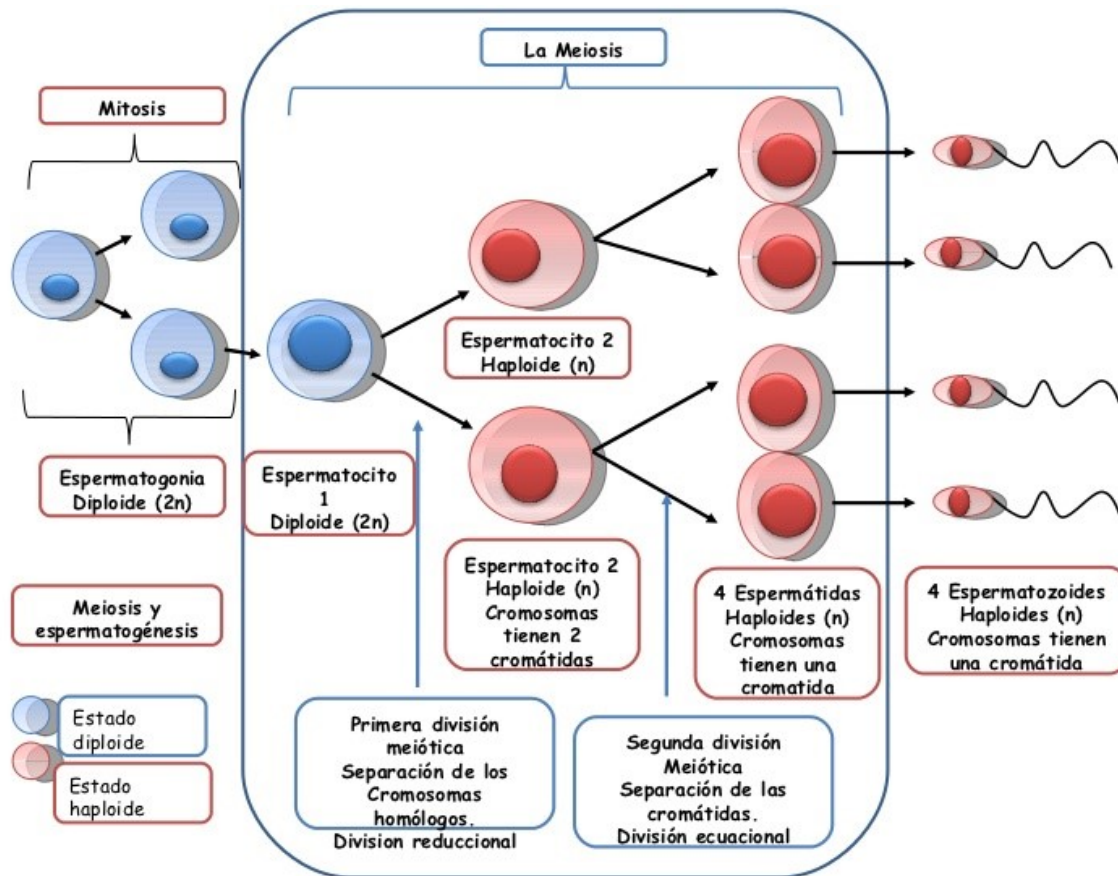


Figura 1. Esquematización del proceso de espermatogénesis con sus fases y la formación de células haploides.

Fuente: <https://pt.slideshare.net/gustavotoledo/espermatognesisok-10973881>

Espermatocitogénesis: poco antes de llegar a la pubertad, los gonocitos germinales se diferencian a espermatogonias. En esta primera etapa, las espermatogonias experimentan una serie de divisiones mitóticas para mantener su número (espermatogonias tipo A) en primer lugar y para producir espermatogonias tipo B que se dividirán nuevamente, dando espermatocitos primarios (Amann 1989; Correa *et al.* 2005).

Espermatidogénesis: en esta segunda fase comienza la primera división meiótica, mediante la cual el espermatocito primario diploide va a originar dos espermatocitos secundarios haploides. Posteriormente, se producirá la segunda meiosis en estos espermatocitos secundarios lo cual origina las espermátidas, que

son células de menor tamaño y más diferenciadas (Correa *et al.* 2005; López y Quiroga 2015).

Espermiogénesis: la espermátida esférica sufre una serie de cambios morfológicos hasta diferenciar la cabeza y la cola; sin alterarse ya la carga genética (Correa *et al.* 2005; Ortiz *et al.* 2003).

Espermiación: en esta última fase se rompen las uniones de la espermátida madura y las células de Sertoli al quedar liberada al lumen de los túbulos seminíferos. La espermátida pierde la mayor parte del citoplasma, su núcleo se condensa, y se produce la maduración del flagelo y del acrosoma (Correa *et al.* 2005).

2.2 Técnicas de reproducción asistida en especies ganaderas

La reproducción en granjas de animales generalmente se realiza mediante inseminación artificial (IA), lo que refleja la importancia de este procedimiento que se ha incrementado y desarrollado a nivel mundial después de su introducción en la primera mitad del siglo XX (Amann y Waberski 2014; Hansen 2014). Respecto a los machos, la IA implica los siguientes pasos: recolección de semen, evaluación, dilución, congelación-descongelación e inseminación.

La colección se puede realizar mediante el uso de una vagina artificial (Barszcz *et al.* 2012) o electro-eyaculación (Palmer *et al.* 2004). La vagina artificial requiere que el macho monte una hembra o un maniquí, aparte de la manipulación del pene y una vagina artificial para la extracción del semen. La ventaja de esta es que salen eyaculados muy limpios, el equipo es económicamente accesible, no obstante, la desventaja es que requiere animales dóciles y entrenados. El electro-eyaculador es un electrodo que conectado a una batería genera descargas eléctricas de no más de 20 voltios que estimulan la próstata y los nervios pélvicos e inducen la erección peneana y por consiguiente una eyaculación. Una ventaja es que no requiere animales entrenados, sin embargo, es un procedimiento invasivo para el animal (Arieta, Fernández, y Menchaca 2014).

La movilidad espermática (total y progresiva), la cinética y la concentración son las principales variables evaluadas en los centros de IA para calcular las dosis seminales. Para la dilución de las muestras, se deben definir diluyentes específicos tanto para la refrigeración como para la criopreservación de las muestras (Foote 2002). En el caso de la criopreservación, se deben definir protocolos específicos para cada especie, incluida la vitrificación (Sieme y Oldenhof 2015; Yeste 2016). Finalmente, la inseminación requiere el desarrollo de catéteres específicos (Hernández-Caravaca *et al.* 2017).

El volumen del eyaculado de un toro adulto es mayor de los cuatro mililitros y la concentración es muy variable entre eyaculados y entre toros (Guataquira 2019).

La crioconservación del semen es una técnica utilizada para la preservación de material genético, el cual se emplea en otras técnicas biotecnológicas como la Inseminación Artificial (IA), Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF), y Transferencia de Embriones (TE). Esta técnica radica en la ampliación de la viabilidad de la célula y prolonga la supervivencia de la misma por medio de la reducción de tasa metabólica (Betancourt y Bernal 2017).

Hay factores que reducen la capacidad fecundante de los toros como la valoración del semental, colecta del semen, examen macroscópico y microscópico del eyaculado, dilución del semen con el diluyente y congelamiento del mismo, con los últimos dos factores de mayor importancia en el proceso de la conservación debido a que es donde ocurre la mayor mortalidad espermática (Espinosa 2012). Las unidades de almacenamiento de semen congelado a nivel mundial son las pajillas (pajuelas) de 0,25 y 0,5 mililitros. Este volumen es el que contiene el material genético del toro (Curbelo y Rodríguez 2013; Baracaldo *et al.* 2007).

2.3 Sistemas computadorizados de análisis seminal (CASA)

Como se indicó anteriormente, la tecnología CASA ha estado disponible comercialmente desde mediados de la década de los 80's del siglo pasado y proporciona una evaluación más objetiva de las características de los espermatozoides (Holt *et al.* 2018; Soler *et al.* 2016). Los componentes principales de un sistema CASA incluyen un microscopio equipado con una placa calefactada

y un dispositivo óptico de contraste de fase negativa con una cámara de video adjunta. La señal de la cámara se envía a una computadora que tiene un software específico para diferentes tipos de análisis (Figura 2).

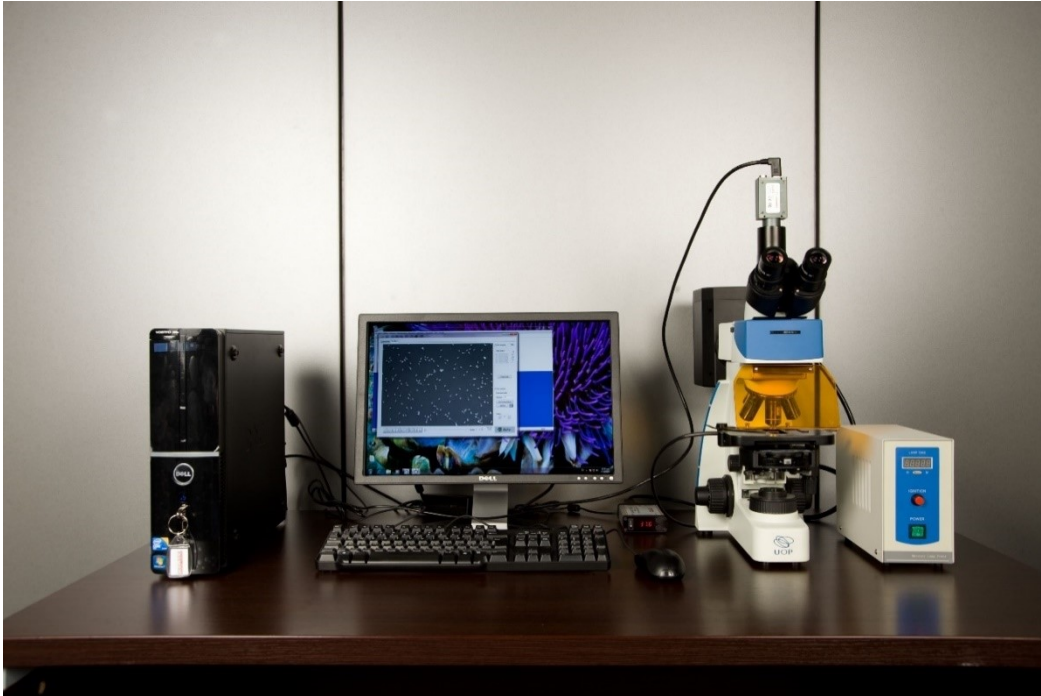


Figura 2. Equipo CASA (Computer-assisted semen analysis).

Fuente: Proiser R&D.

El análisis de la movilidad de los espermatozoides y la cinética ha sido un objetivo de la investigación del semen durante más de 25 años (Amann y Waberski 2014). Los sistemas CASA-Mot ofrecen una gran batería de parámetros de cinética además de la evaluación general de la movilidad. Durante este tiempo se ha demostrado que estos parámetros son sensibles a variaciones en *hardware* y *software*, así como a la variabilidad de las muestras de semen (Bompart *et al.* 2018; Castellini *et al.* 2011; Yeste *et al.* 2018).

En general, los parámetros obtenidos con los sistemas CASA permiten la comparación de resultados, tanto inter como intra-laboratorios, lo que hace posible detectar diferencias cuantitativas en los parámetros seminales. Esto se puede aplicar a estudios que analizan diferentes situaciones experimentales o productivas

(Palacín *et al.* 2013) y para encontrar diferencias entre machos, tratamientos e/o interacciones dentro de un experimento (Verstegen *et al.* 2002).

2.4 Parámetros CASA

2.4.1 Movilidad y variables cinéticas

La cinética del espermatozoide incluye medir la distancia entre cada punto de la cabeza para un espermatozoide dado durante el período de adquisición. Se fundamenta en la localización de las cabezas como puntos diferenciados del fondo gracias a sus características de luminosidad diferencial. Algunos sistemas son capaces, además de localizar la cola como referente para definir qué es un espermatozoide y qué no. Una vez identificadas las cabezas, y por diferentes algoritmos de cálculo se procede a la definición matemática de la trayectoria seguida por la célula en las diferentes imágenes analizadas por la unión de los puntos correspondientes al centroide de la cabeza (Figura 3).

Hay ocho parámetros estándar definidos de movilidad espermática (Bompart *et al.* 2018): 1) La velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) es la suma de las distancias entre las posiciones del centroide de la cabeza del espermatozoide fotograma por fotograma, dividida por el tiempo de análisis, 2) La velocidad en línea recta (VSL, $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) es la distancia en línea recta entre la primera y la última posición del espermatozoide, dividida por el tiempo transcurrido, 3) Velocidad promedio de la trayectoria (VAP, $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) es la velocidad promediada en el tiempo de un espermatozoide a lo largo de su trayectoria promedio, 4) Linealidad de la progresión hacia adelante ($\text{LIN} = (\text{VSL}/\text{VCL})\cdot 100$, sin dimensiones) es la linealidad de la trayectoria curvilínea, en porcentaje, 5) Rectitud ($\text{STR} = (\text{VSL}/\text{VAP})\cdot 100$, sin dimensiones) es una medida de la linealidad de la trayectoria promedio, 6) La oscilación de la trayectoria ($\text{WOB} = (\text{VAP}/\text{VCL})\cdot 100$, sin dimensiones) es una medida de oscilación de la trayectoria real sobre la trayectoria promedio y se expresa en porcentaje, 7) Amplitud de Desplazamiento Lateral de la Cabeza, (ALH, μm) es la distancia promedio de la cabeza del espermatozoide desde la trayectoria promedio de movimiento espermático donde la trayectoria promedio se calcula con la utilización de una media móvil de 5 puntos (se puede considerar como el valor

máximo o medio a lo largo de la trayectoria), y 8) La frecuencia de entrecruzamiento (BCF, Hz) es la frecuencia con la que la cabeza del espermatozoide cruza la línea de trayectoria promedio durante la adquisición (Kay y Robertson 1998).

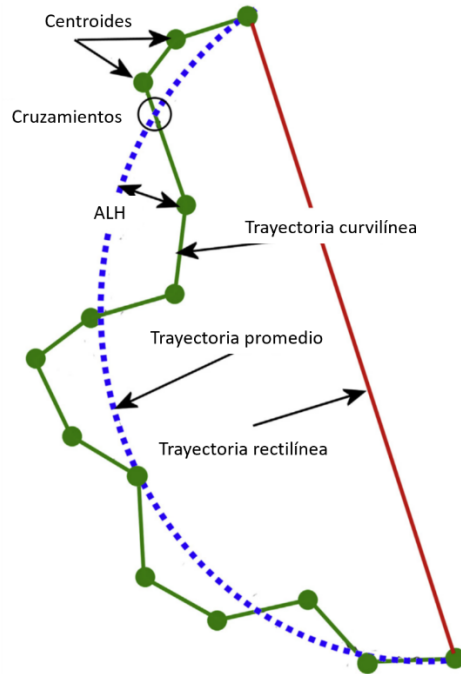


Figura 3. Parámetros cinéticos medidos por los sistemas CASA. La línea curva indica un desplazamiento neto estimado a través de la trayectoria de la célula.

Fuente: Adaptado de (Amann y Waberski 2014).

Los parámetros de movilidad se estiman con el conjunto de mediciones de posición asociadas a una trayectoria a lo largo de todo su historial y se ponen a disposición como un archivo de base de datos para el procesamiento posterior y el análisis de conglomerados. Los primeros y últimos cinco puntos de la trayectoria se descartan del análisis para evitar que el inicio de la trayectoria y los posibles errores al finalizar la captura de video de esta corrompan las estimaciones de movilidad. Se utiliza una media móvil de cinco puntos para filtrar las señales ruidosas al trazar parámetros individuales en función del tiempo. En las estadísticas de población, el análisis de la movilidad se limita a cinco segundos por espermatozoide, porque en general, las longitudes de las trayectorias son más largas para los

espermatozoides más lentos que para los espermatozoides más rápidos que abandonan el campo de visión (Urbano *et al.* 2017).

La fertilidad potencial de una muestra seminal varía en función de la concentración de espermatozoides viables, la morfometría y la morfología normal, con potencial capacitante y funcionalmente competentes, capaces de alcanzar el oviducto y de establecer un reservorio oviductal, y de llevar a cabo la fecundación del ovocito (Simonik *et al.* 2015). Si se pretende correlacionar el efecto predictivo de la evaluación del semen mediante técnicas *in vitro*, con la capacidad fecundante *in vivo*, se debería incluir el estudio de las características cinéticas, morfológicas y morfométricas de los espermatozoides, especialmente cuando se trata de dosis de semen congelado o cuando se evalúan nuevos métodos de criopreservación (Lenz *et al.* 2011, Gloria *et al.* 2013, Contri *et al.* 2010). Los parámetros funcionales y estructurales de los espermatozoides, como la movilidad, la cinética, la viabilidad, la integridad del acrosoma y el ADN, la función mitocondrial, la morfología y la morfometría (Gillan *et al.* 2005) pueden estar asociados con la fertilidad.

Para que un espermatozoide sea capaz de fecundar a un ovocito debe presentar un valor aceptable de movilidad progresiva (Boryshpolets *et al.* 2013). Dicho parámetro ha sido y sigue siendo el más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis seminal. El movimiento activo de los espermatozoides es imprescindible para la colonización del oviducto durante la fase de transporte sostenido en el tracto genital de la hembra, y para que tenga lugar la fecundación. Además, la movilidad es una manifestación de la integridad de la célula. Un eyaculado con un porcentaje bajo de espermatozoides móviles, automáticamente será descartado para su conservación (den Daas 1992; Holt y Van Look 2004). La evaluación de la movilidad ha presentado un grado de subjetividad, debido a una estimación visual del porcentaje de espermatozoides móviles totales, que ha reducido su potencial como marcador de fertilidad (Walker *et al.* 1982). La estimación subjetiva de la movilidad se ve afectada por diferentes factores como efecto técnico (Gallego *et al.* 2018; Rijsselaere *et al.* 2003, 2005; Versteegen *et al.* 2002).

2.5 Evaluación de la calidad seminal

La IA ha demostrado ser la tecnología reproductiva que más ha contribuido a acelerar el progreso genético de las diferentes especies ganaderas, especialmente del ganado vacuno de aptitud láctea; sin embargo, el éxito de esta tecnología depende de que el semen utilizado tenga una calidad adecuada (Kathiravan *et al.* 2011; Erb *et al.* 1942). Uno de los objetivos prioritarios de la industria de la IA ha sido la predicción de la capacidad fecundante del semen comercializado; con esta finalidad se han desarrollado a lo largo del tiempo diferentes métodos diagnósticos, desde la evaluación de la movilidad, concentración y morfología espermática de los eyaculados hasta la contrastación de dosis de semen congelado mediante sistemas CASA (Mortimer 2000), citometría de flujo (Egeberg *et al.* 2017) y tests de funcionalidad espermática basados en la fecundación *in vitro* (Talwar y Hayatnagarkar 2015).

Las características seminales están relacionadas con la fertilidad de las muestras (Flowers 2009). Sin embargo, la fertilidad es multifactorial y varios factores, como por ejemplo la época, el genotipo, el número de espermatozoides, el momento de la inseminación antes de la ovulación y el perfil del plasma seminal de cada toro (Vesseur *et al.* 1996; Flowers 2009) pueden influir en los resultados.

En cuanto al efecto estacional, aunque el toro no suele considerarse un reproductor estacional, también pueden producirse variaciones estacionales de la calidad del semen (Ibănescu *et al.* 2018). Las variaciones de los parámetros de espermatozoides entre los meses de verano e invierno se han atribuido parcialmente a los cambios relacionados con la termorregulación escrotal y los mecanismos de disipación de calor (Menegassi *et al.* 2015).

El estudio de métodos de recolección del semen (Ávalos *et al.* 2018), capacidad de preservación de los medios de dilución (Murphy *et al.*, 2018; Patil *et al.*, 2020), producción de dosis seminales (Bompart *et al.* 2019), número óptimo de espermatozoides por dosis (Menegatti Zoca *et al.* 2020) han permitido estandarizar más las técnicas rutinarias de extracción de semen en la especie bovina (Contri *et al.* 2010; Barszcz *et al.* 2012). Los sistemas CASA proporcionan grandes

volúmenes de datos respecto de la cinética y movilidad espermática (Holt & Palomo, 1996; Soler *et al.*, 2017; Valverde *et al.*, 2019) con mayor exactitud y precisión respecto de los análisis subjetivos por técnicos de laboratorio (Valverde y Madrigal-Valverde 2019).

Los resultados pueden ser influenciados por una serie de variaciones como el tiempo transcurrido desde la eyaculación hasta el análisis (Hahn *et al.* 2019), temperatura del diluyente (Arslan *et al.*, 2019; Murphy *et al.*, 2018), dilución de la muestra (Broekhuijse *et al.* 2011), el tipo de diluyente (Murphy *et al.*, 2018), el operario y/u observador (Gallego y Asturiano 2018), el tipo y profundidad de cámara de recuento utilizada (Bompart *et al.*, 2018; Hoogewijs *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2015; Valverde y Madrigal-Valverde, 2019c; Valverde *et al.*, 2019). Existen dos tipos de cámaras las reutilizables y las desechables, y dos formas básicas de llenado por capilaridad y por desplazamiento de gota. Por carga capilaridad están las de tipo reutilizable Neubauer, Bürker, Thoma, ISAS® R2C, y tipo desechables Leja®, Microcell®, CellVu®, ISAS® D4C. Por carga de desplazamiento de gota reutilizables Makler®, Spermtrack o desechables porta y cubreobjetos (Soler *et al.* 2012).

2.6 Estructura de subpoblaciones espermáticas

El espermatozoide es una célula dinámica, y sus procesos bioquímicos modifican la fisiología de los espermatozoides durante la maduración, la eyaculación, el transporte en el tracto genital femenino y la fertilización (Chamberland *et al.* 2001). Estos cambios fisiológicos se relacionan con el movimiento flagelar, por lo que los espermatozoides muestran diferentes patrones de movilidad en el epidídimo, plasma seminal, moco cervical y oviducto (Hamamah y Gatti 1998; Tash y Bracho 1998). Las muestras de semen son heterogéneas, lo que implica que los espermatozoides con diferentes valores de movilidad coexisten en el mismo eyaculado (Chantler *et al.* 2004; Katz y Davis 1987; Neill y Olds-Clarke 1987). Además, la morfología es heterogénea en diferentes niveles según la especie, siendo la humana una de las más heterogéneas dentro de los mamíferos (Yániz *et al.* 2015).

La visión histórica concibió el eyaculado como un conjunto de células "equivalentes" que compiten por llegar al ovocito. Sin embargo, este enfoque conceptual está en contradicción con la heterogeneidad observada. Para resolver esto, con la llegada del siglo XXI y la utilización de los parámetros cuantitativos de esperma obtenidos con la tecnología CASA y el análisis multivariado, el paradigma cambia a un enfoque de subpoblación (Quintero-Moreno *et al.* 2003; Quintero-Moreno *et al.* 2007; Valle *et al.* 2013; Valverde *et al.* 2016).

Es necesario recordar que el requisito principal para el análisis de subpoblaciones es que los sistemas CASA proporcionen datos precisos. La combinación de secuencias de imágenes claramente adquiridas y el procesamiento sofisticado de imágenes permite obtener parámetros cinéticos y morfométricos confiables de espermatozoides, lo que se traduce en conjuntos de datos mejorados, que permiten definir mejor las estructuras de subpoblaciones reales y significativas por especies (Martínez-Pastor *et al.* 2011).

Incluso con las limitaciones del análisis tecnológico, muchos estudios han explorado el uso del análisis de conglomerados para identificar patrones subpoblacionales en muestras seminales. Varios trabajos consideran datos de cinética (Ortega-Ferrusola *et al.* 2009; Soler *et al.* 2014; Vicente-Fiel *et al.* 2013; Yániz *et al.* 2015), morfométricos (Aggarwal *et al.* 2007; Álvarez *et al.* 2008; Estes *et al.* 2009; Valverde *et al.* 2016) o una combinación de ambos (Soler *et al.* 2017; Vásquez *et al.* 2016).

Respecto a la movilidad, cada subpoblación puede caracterizarse de acuerdo con sus variables cinemáticas promedio. Por ejemplo, una subpoblación con valores de alta velocidad y alta linealidad podría definirse como "rápida, lineal", mientras que otra podría definirse como "lenta, no lineal" (Martínez-Pastor *et al.* 2011). Posteriormente, se pueden calcular las frecuencias de estas subpoblaciones, y las variaciones en estas frecuencias se pueden asociar a variaciones individuales entre los eyaculados y los machos (Núñez-Martínez *et al.* 2006), a la congelación de los espermatozoides (Martínez-Pastor *et al.* 2005), o a la fertilidad del esperma (Quintero-Moreno *et al.* 2003).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en dos escenarios diferentes temporal y espacialmente, según las evaluaciones correspondientes. En la primera fase se utilizó semen fresco y en la segunda fase se analizó el semen congelado – descongelado.

3.1 Experimento en semen fresco

El estudio se desarrolló en las fincas ganaderas de la Escuela de Agronomía del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) Campus Tecnológico Local San Carlos, ubicadas en La Vega de Florencia, San Carlos (10°25'20,98" norte; 84°31'17,57" oeste), con una altura media de 70 msnm y “La Balsa” ubicada en San Lorenzo, San Ramón (10°21'8,60" norte, 10°31'17,13" oeste), con una altura media de 180 msnm, las cuales pertenecen a la Unidad de Ganado de Carne, del Programa de Producción Agropecuaria (PPA) de la Escuela de Agronomía del ITCR. En ambas fincas, la precipitación y humedad relativa anual media fue de 3400 mm y 85 % respectivamente. El periodo de estudio se llevó a cabo de septiembre a diciembre del 2019.

Las fincas cuentan con un hato libre de brucelosis y tuberculosis y con certificado veterinario de operación (CVO) al día, mantienen un control sanitario, de vacunaciones y desparasitaciones internas y externas y se llevan registros genealógicos y productivos de los animales.

3.1.1 Descripción y manejo de los animales

Se utilizaron diez animales del hato Brahman puro (Figura 4) de la unidad productiva de carne del ITCR. La edad media de los animales fue de $3,6 \pm 1,6$ años y se encontraban aptos reproductivamente. Se consideró previamente un descanso sexual de los animales de dos meses antes de obtener eyaculados. El manejo nutricional y sanitario fue el mismo para todos los animales, en un área de 18 ha donde se estableció un sistema rotacional de 7 apartos, con 6 días de ocupación y 42 días de descanso, con pasto Ratana (*Ischaemum indicum*) y Mombaza (*Panicum máximum*), los animales estuvieron en pastoreo sin restricciones de acceso a consumo de forraje y se les suministró sal, minerales (Matsuda Top Line Cría) y

agua *ad libitum* mediante abrevaderos. El manejo sanitario de los animales fue con desparasitante externo Dectomax (e.g. Doramectina), vitaminas hidrosolubles (Catosal).

3.1.2 Evaluación física general de los animales

Se realizó un diagnóstico clínico general del estado de los animales, y se observaron características de la condición corporal y aspectos anatómicos como la circunferencia escrotal, condición de aplomos y pezuñas, coloración de las mucosas y particularidades de cada animal (edad, progenitores, grupo racial, entre otros) ver Figura 4.



Figura 4. Inmovilización de los toros reproductores (Brahman) mediante una prensa mecánica para la evaluación andrológica y electroeyaculación, en San Lorenzo, San Ramón, 2019.

3.1.3 Análisis andrológico

Se realizó una valoración andrológica inicial de cada toro por un médico veterinario mediante el uso de una prensa de inmovilización animal. Con esta valoración se tomaron datos de la evaluación física general, se evaluó la condición de los órganos reproductivos externos, como los testículos, escroto, prepucio, y el pene de los animales. En el caso de los testículos, se valoró la movilidad dentro de la bolsa escrotal, temperatura (palpable), simetría, consistencia, circunferencia

escrotal (por medio de una cinta especializada; (Figura 5) y simetría testicular. El cordón espermático y epidídimo fueron valorados por palpación directa.



Figura 5. Medición de la circunferencia escrotal (cm) mediante cinta métrica, en La Vega de Florencia, 2019.

Se evaluó la presencia/ausencia de adherencias con el prepucio, frénulo persistente, o patologías asociadas en el pene. Además, se recortaron los pelos de la zona prepucial manteniendo dos cm de pelo para protección, y se limpió la zona con papel toalla no espermaticida.

El semen se colectó por el método de electro-eyaculación (Figura 6). El proceso inicia evaluando los órganos reproductores internos introduciendo la mano cubierta con un guante, dentro del recto del animal. Se evacuaron las heces y se revisó anatómicamente la próstata, vesículas y ampullas considerando la simetría, dolor a la palpación, agrandamiento de tamaño o presencia de alguna anomalía, seguidamente se procedió con un masaje prostático durante 60-120 segundos para intensificar la respuesta sexual y provocar relajamiento del esfínter anal antes de introducir la sonda-electrodo.



Figura 6. Recolección de semen por el método de electroeyaculación, en La Vega de Florencia, 2019.

Al ser introducida la sonda-electrodo, cuyas dimensiones fueron de 40 cm de largo y 6,35 cm de diámetro, se aplicaron estímulos de 40 ciclos durante dos segundos, de forma automática, sin embargo, cuando no se obtuvo respuesta por parte del animal ni exposición del pene, se procedió a realizar ciclos manuales con una duración mayor y de manera ascendente, controlados por un médico veterinario que, además, observó el comportamiento del animal sometido a los voltajes del electro-eyaculador, mientras que otra persona fue la responsable de la recolección del semen mediante un frasco colector (tubo Falcon® de 10 ml) (Figura 7).

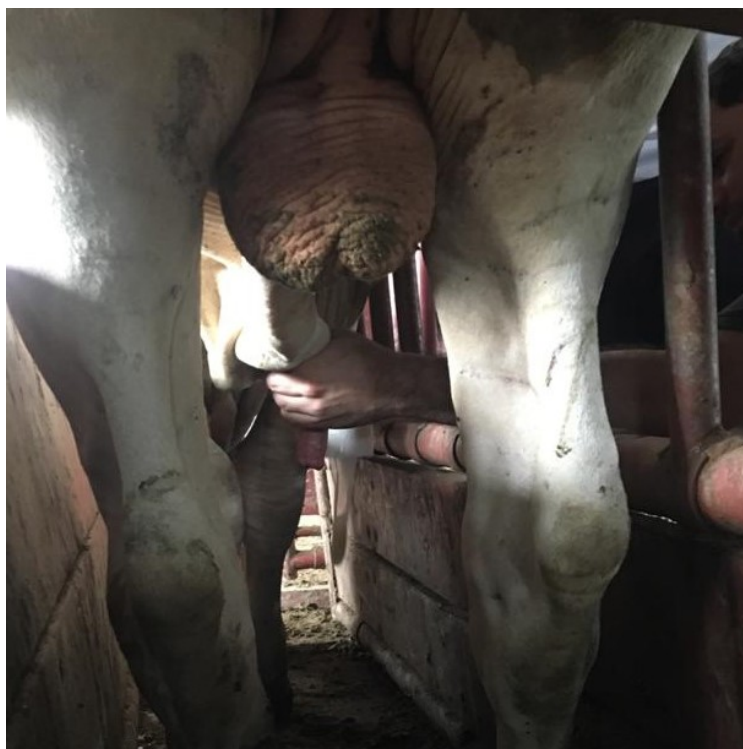


Figura 7. Proceso de recolección del semen mediante el método de electroeyaculación. Nótese la retracción del escroto del animal, en San Lorenzo de San Ramón, 2019.

Cuando el toro expuso el pene erecto, se procedió a hacer una valoración anatómica del mismo antes de la recolección del eyaculado. En los casos en que hubo eyaculación sin haber exposición del pene, se recolectó el eyaculado, pero en la bitácora de experimentos se registró la observación correspondiente. Posterior a la recolección del eyaculado se procedió a hacer la valoración de las características macroscópicas del semen.

3.1.4 Características macroscópicas del eyaculado

Se registró el volumen del eyaculado mediante un tubo Falcon® de 10,00 ml \pm 0,25 ml, la concentración espermática ($\times 10^6$ espermatozoides/ml) se evaluó con un fotómetro SDM1 calibrado para bovinos, y se agregó con una micropipeta Eppendorf® un volumen de 5,000 μ L \pm 0,005 dentro de una microcubeta de valoración.

Se registró el color del eyaculado con la clasificación de blanco cremoso, lechoso o acuoso (Páez y Corredor 2014; Veloz 2017). La movilidad masal e individual se evaluó mediante un microscopio (microscopio de contraste de fase MBL 2000, calefactado a 37 °C, HT 50), en el que se colocó una gota de semen en un portaobjetos y se observó subjetivamente el movimiento con un objetivo de 40X. La movilidad masal se evaluó mediante la escala de 1-4 (Páez y Corredor 2014), y la movilidad individual en porcentaje de 0 a 100 % (Veloz 2017) ver Figura 8.



Figura 8. Proceso de evaluación macroscópica del eyaculado obtenido de los toros, en San Lorenzo de San Ramón, 2019.

3.1.5 Efecto del medio de dilución y temperatura del diluyente en semen fresco

Cada eyaculado se diluyó en una proporción 1:1 (vol: vol), con tres diluyentes comerciales (Cuadro 1) en tubos Falcon® de 10 ml, los cuales fueron identificados con los datos del animal (código) y el tipo de diluyente.

Para la dilución del semen fresco, el diluyente se trabajó en baño maría a dos temperaturas 37 °C y 29 °C, además se analizó a temperatura ambiente en finca. Posteriormente cada tubo Falcon® de 10 ml, se depositó en una hielera de polipropileno, provista de compresas para el mantenimiento de la temperatura.

Cuadro 1. Composición química del diluyente Andromed[®], Androstar[®] y Bestville Thawing Solution (BTS).

Andromed[®]	Androstar[®]	BTS
Fosfolípidos	Glucosa	Glucosa
TRIS	Citrato de Sodio	Citrato de Sodio
Ácido cítrico	EDTA	Bicarbonato de Sodio
Glucosa	Bicarbonato de Sodio	EDTA
antioxidantes	Espectinomicina	Cloruro de Potasio
EDTA	Antioxidante	Kanamicina
Glicerina	Gentamicina	
Agua de alta pureza	Lincomicina	
Tilosina	Estabilizador de membrana	
Gentamicina		
Lincomicina		
Espectromicina		

3.1.6 Transporte y mantenimiento de las muestras

Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Andrología, del Instituto Tecnológico de Costa Rica en el Campus Tecnológico Local San Carlos, para su análisis. Cuando las muestras llegaron al laboratorio se desinfectaron para su ingreso al mismo. Se procedió a introducirlas en baño maría para el almacenamiento y mantenimiento de las temperaturas (37 °C y 29 °C) y proceder con su análisis.

3.1.7 Equipo de análisis seminal

Se utilizó un sistema CASA-Mot para caracterizar la movilidad y cinética de los eyaculados. El sistema consistió en una cámara de video Proiser HS640m (Proiser R+D, S.L. Valencia, España), con una velocidad de fotogramas de 50 fps (*frames per second*) y una resolución final de 640 x 478 píxeles. La cámara se conectó a un microscopio UB203 (UOP / Proiser R+D, S.L) con un ocular 1X y un objetivo de contraste de fase negativa 10x (AN 0,25) y una placa calefactora integrada mantenida a 37,0 ± 0,5 °C. La placa calefactora se ajustó a la temperatura de las muestras que venían a temperatura ambiente.

3.1.8 Preparación de diluciones para análisis

Las muestras seminales fueron homogenizadas y posteriormente se realizó una dilución 1:10 (vol:vol), es decir, una parte de semen con respecto a 10 partes de diluyente en cada caso, en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Las muestras se colocaron en una placa calefactora a 37 °C y se utilizaron para análisis posteriores.

3.1.9 Efecto del tiempo de análisis sobre la movilidad del semen fresco

En este experimento, se evaluó el efecto de la conservación del movimiento tras la carga inicial del semen en diferentes tiempos (0, 3, 6, 12 h) para todas las variables de cinética de los espermatozoides. Esto permitió evaluar la conservación de los espermatozoides con los diferentes diluyentes en el tiempo. Las muestras se evaluaron 20 segundos después de la carga para evitar el efecto de barrido (*drifting*).

3.2 Experimento en semen congelado

3.2.1 Material de evaluación

Se utilizaron 20 dosis seminales congeladas-descongeladas (dos pajuelas/toro) de diez toros provenientes de las siguientes razas: Brahman Rojo, Girholando, Nelore, Blonde D'Aquitaine, Speckle Park, Pardo Suizo, Braunvieh, Brangus, Holstein y Simmental, con un promedio de edad de $5,7 \pm 2,8$ años. El proceso de criopreservación utilizado se describe a continuación. Se recolectó semen de toros mediante vagina artificial, bajo un programa de extracción de dos eyaculados por semana sin cambios aparentes en la salud animal o la calidad del semen durante todo el intervalo de recolección de semen. Todos los toros fueron utilizados habitualmente para la recolección de semen con fines comerciales. Los toros estaban en un programa de recolección regular, habían pasado una evaluación estándar de solidez reproductiva y habían producido esperma con características aceptables después de la descongelación.

Las pajillas congeladas fueron importadas en Avance Genético S.A. (Zapote, Costa Rica). Dentro de los cinco a diez minutos después de la recolección, se evaluó el volumen de las muestras de semen mediante un tubo cónico graduado a 0,1 ml, movilidad bruta colocando 20 μ L de semen fresco en un portaobjetos

precalentado a 37 °C, concentración mediante un fotómetro bovino Accucell (IMV, L'Aigle, Francia) a una longitud de onda de 530 nm. El semen crudo se diluyó con un diluyente de yema de huevo Tris-citric y dos diluyentes de yema de huevo comerciales (Optidyl®-IMV, L'Aigle, Francia; Triladyl®, Minitube, Tiefenbach - Alemania) hasta una concentración final de espermatozoides vivos de 25×10^6 células /pajilla. El semen diluido se enfrió lentamente a 4 °C a una velocidad lineal de $-0,3 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ en un refrigerador. Después de enfriar el semen, se produjo el equilibrio durante cuatro a cinco minutos a la misma temperatura.

El semen se empaquetó en pajuelas de 0,25 ml, que se sellaron mediante una máquina de llenado y sellado automático (MRS 1, IMV Technologies, L'Aigle, Francia) y se congelaron en un congelador programable, Digitcool 5300 (IMV, L'Aigle, Francia) con la siguiente curva: 4 °C a $-10 \text{ }^\circ\text{C a } 5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, $-10 \text{ }^\circ\text{C a } -100 \text{ }^\circ\text{C a } 40 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, $-110 \text{ }^\circ\text{C a } -140 \text{ }^\circ\text{C a } 20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, y luego sumergido en nitrógeno líquido para el almacenamiento.

Las configuraciones técnicas de análisis para el microscopio y sistema CASA-Mot fueron las mismas que en el caso del semen fresco. Todos los análisis fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Andrología de la Escuela de Agronomía en el Campus Tecnológico Local San Carlos, ITCR.

3.2.2 Descongelamiento del semen

Todas las muestras de semen se descongelaron con el protocolo descrito por Rastegarnia *et al.* (2013) y Palomino (2019). Para la extracción de las pajuelas del termo de nitrógeno líquido se llevó la canasta hasta un nivel aproximado de 5 cm de la base del tanque. Cada cañuela se localizó doblando la lámina de identificación en ángulo de 45 ° y con pizas se retiró la pajuela a tiempo que se agitaba levemente durante 5 s antes de sumergirla en baño maría a 37 °C durante 30 s. Posterior al secado de las pajuelas, el contenido fue dispuesto en tubos eppendorf de 1,5 ml. Antes de cada análisis, se realizó una dilución 1:5 (vol:vol) en medio Bestville Thawing Solution (BTS comercial, Minitube's), descrito por Pursel & Johnson (1975) y cuya composición se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Composición química del medio Bestville Thawing Solution (BTS).

Componente	nM
Glucosa (G-6152, Sigma Aldrich)	205,00
Citrato de Sodio (G-4641, Sigma Aldrich)	20,40
Bicarbonato de Sodio (G-5761, Sigma Aldrich)	15,00
EDTA1 (ED-2SS, Sigma Aldrich)	3,60
Cloruro de Potasio (P-3911, Sigma Aldrich)	10,00
Kanamicina (K-4000, Sigma Aldrich)	0,07

pH: 7,2-7,4; Osmolaridad: 290±5 mOsm/kg 1 Ácido etilendiaminotetraacético por sus siglas en inglés (Ethylenediaminetetraacetic acid)

Fuente: Adaptado de (Valverde, 2011).

3.2.3 Evaluación de cinética y movilidad espermática

Para el análisis de movilidad y cinética se utilizó el sistema CASA-Mot ISAS[®] v1 (Proiser R+D, S.L. Valencia, España). Se utilizaron cámaras de recuento espermático desechables a diferentes profundidades (μm): ISAS[®]D4C10, ISAS[®]D4C16 e ISAS[®]D4C20 (Proiser R+D S.L.) (Figura 9) y una cámara de recuento reutilizable: Spermtrack[®] con una altura entre base y portaobjetos de 20 μm . Se utilizaron tres diluyentes comerciales y cuatro tiempos diferentes de análisis a las cero, tres, seis y doce horas.



Figura 9. Cámaras desechables ISAS D4C® (10, 16 y 20 μm) y cámara reutilizable Spermtrack® de 20 μm .

Después de homogenizar las muestras, se agregó un volumen de semen de 2,7 μL con una micropipeta dispuesta en un ángulo de 45°. El llenado de las cámaras de recuento fue por capilaridad y se consideró un tiempo de 20 s para la distribución uniforme del semen dentro de la cámara y evitar el movimiento pasivo (*drifting*). La cámara de video fue Proiser HS640m (Proiser R + D), con una frecuencia de captura de 50 imágenes por segundo (frame per second, fps) y una resolución final de 640 x 478 píxeles. La cámara se conectó a un microscopio UB203 (UOP / Proiser R + D) con un ocular de 1X, un objetivo de contraste de fase negativo 10X (AN 0,25) y una placa calefactora integrada mantenida a 37,0 $^{\circ}\text{C} \pm 0,5$. El resto de la configuración del equipo fue la que venía indicada por defecto del fabricante para el análisis de muestras de bovino. Tanto las imágenes como los datos se guardaron para su posterior reevaluación. Se aleatorizó el orden en que se hicieron los análisis, para evitar que influyera de forma constante en los resultados obtenidos. En cada cámara de recuento se capturaron 7 campos de análisis y este procedimiento se realizó para el ensayo del efecto de los tiempos de análisis sobre la y diluyentes seminales.

Las variables cinéticas que se consideraron en este estudio se encuentran en el Cuadro 3. Además, se evaluó el porcentaje del total de células móviles; y la movilidad progresiva (%), correspondiente a los espermatozoides que se mueven rápidamente en línea recta, (STR $\geq 45\%$; VAP $\geq 25 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). Se calcularon tres

relaciones de progresión, expresadas como porcentajes, a partir de las medidas de velocidad descritas anteriormente: linealidad de la progresión hacia adelante $LIN = (VSL/VCL) * 100$, índice de rectitud $STR = (VSL/VAP) * 100$ y oscilación de la trayectoria del espermatozoide $WOB = (VAP/VCL) * 100$ (Cuadro 3).

Cuadro 3. Variables de cinética espermática obtenidas con un sistema CASA-Mot

Variable	Unidades	Nombre completo
VCL	$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	Velocidad curvilínea
VSL	$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	Velocidad lineal o rectilínea
VAP	$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	Velocidad promedio de la trayectoria
LIN	%	Linealidad de la progresión (VSL/VCL)
STR	%	Índice de rectitud (VSL/VAP)
WOB	%	Oscilación de la trayectoria (VAP/VCL)
ALH	μm	Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza
BCF	Hz	Frecuencia de batido de la cola

3.3 Análisis estadístico

Se determinaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene para los datos obtenidos del análisis CASA-Mot de todas las células analizadas. Además, se utilizó papel probabilístico normal para evaluar la distribución normal.

3.3.1 Análisis multivariado

Se realizaron procedimientos de agrupamiento para identificar subpoblaciones de espermatozoides del conjunto de datos de movilidad espermática. Todos los valores para las variables cinéticas se estandarizaron para evitar cualquier efecto de escala. El primer proceso consistió en realizar un análisis de componentes principales (PCA) o análisis factorial de todos los datos para obtener un menor número de combinaciones lineales (PC) que aún conservaran la mayor cantidad de información posible de las variables originales. El número de componentes principales (PC) utilizados en el siguiente proceso del análisis se determinó a partir del criterio de Kaiser, es decir, seleccionando sólo aquellos con un valor propio (*eigenvalue*; varianza extraída de cada PC > 1). Además, se realizó la prueba de esfericidad de

Bartlett y la prueba KMO (Kaiser-Meyer-Olkin) (Spencer 2013). Como método de rotación, se utilizó el método varimax con la normalización de Kaiser (Kaiser 1958). El segundo proceso consistió en realizar un análisis no jerárquico con el modelo de k-medias (*k-means*) que utiliza distancias euclidianas de las variables cuantitativas después de la estandarización de los datos, por lo que los centros de agrupación fueron las medias de las observaciones asignadas a cada agrupación (Kaufman y Rousseeuw 2005). El análisis multivariado de grupos de k-medias se realizó para clasificar los espermatozoides en un número reducido de subpoblaciones (*clusters* o grupos) de acuerdo con sus variables cinéticas. En el proceso final, para determinar el número óptimo de grupos, los centroides finales se agruparon jerárquicamente utilizando el método Ward (Murtagh y Legendre 2014). Por lo tanto, el procedimiento de agrupamiento permite la identificación de subpoblaciones de espermatozoides porque cada grupo contribuyó a un grupo final formado por los espermatozoides unidos a los centroides. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias estadísticas en las distribuciones de observaciones (espermatozoides individuales) dentro de las subpoblaciones y luego se utilizó un procedimiento de modelos lineales generalizados (GLM) para determinar los efectos de la temperatura de análisis del semen, medio de dilución y cámara de recuento sobre las variables cinéticas medias que definían las diferentes subpoblaciones de espermatozoides. Las diferencias entre medias se analizaron mediante la prueba de Bonferroni. Los resultados se presentan como media \pm error estándar de la media (EE). La significación estadística se consideró en $P < 0,05$. Todos los datos se analizaron utilizando el paquete IBM SPSS, versión 23.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

3.3.2 Análisis bayesiano

Las diferencias en los patrones cinemáticos de los espermatozoides se estimaron con un modelo que incluyó el efecto del diluyente y de especie como un efecto permanente. El macho se incluyó como un efecto aleatorio. Todos los análisis se realizaron utilizando la metodología bayesiana. La media posterior de la diferencia entre los diluyentes (D), la región de mayor densidad posterior al 95% (HPD_{95%}) y la probabilidad de que la diferencia sea positiva cuando $D > 0$ o negativa

cuando $D < 0$ (P_0) fueron calculadas. Se utilizaron planos *a priori* para todos los efectos. Los residuos se distribuyeron *a priori* siguiendo una función de distribución normal con media 0 y varianza σ^2_e . Se consideró un tercio de la desviación estándar de cada variable como valor relevante (R), y se estimó la probabilidad de relevancia (P_R ; es decir, la probabilidad de que la diferencia sea mayor que R cuando $D > 0$ o menor que R cuando $D < 0$). Los *a priori* de las varianzas también fueron planos. Las características de las distribuciones posteriores marginales para todas las incógnitas se estimaron mediante el muestreo de Gibbs. La convergencia se probó usando el criterio Z de Geweke (Sorensen y Gianola 2002) y los errores de muestreo de Monte Carlo se calcularon usando los procedimientos de series de tiempo descritos por (Geyer 1992). El programa Rabbit, desarrollado por el Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (Valencia, España), se utilizó para todos los procedimientos.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La predicción de la fertilidad de los toros mediante el análisis del eyaculado bovino debe considerar la complejidad constitutiva de las células espermáticas (Quintero-Moreno *et al.* 2017). La evaluación reproductiva y seminal de un toro, es fundamental como estimador de la capacidad potencial reproductiva de un macho (Quintero-Moreno *et al.* 2017) y por consiguiente el éxito de un programa reproductivo. Algunos estudios han demostrado que hasta el 30 % de los toros son infértiles o poco fértiles (Páez y Corredor 2014)

4.1 Experimentos en semen fresco

Existen factores que condicionan el análisis del semen como el tipo de diluyente y la temperatura de dilución de las muestras (Büyükleblebici *et al.* 2014, Awad 2011), el tipo y profundidad de la cámara de recuento (Del Gallego *et al.* 2017; Gloria *et al.* 2013; Soler *et al.* 2012; Valverde y Madrigal-Valverde 2018), la tasa de fotogramas o *frame rate*, (Castellini *et al.* 2011; Valverde, Madrigal-Valverde, Caldeira, *et al.* 2019), el tiempo de captura de video (Boryshpolets *et al.* 2013; Valverde, Madrigal-Valverde, Lotz, *et al.* 2019) y el tiempo de análisis (Bompart *et al.* 2019). Los factores externos que pueden condicionar los resultados obtenidos con los sistemas CASA deben conocerse para minimizar la variación que podrían introducir en los análisis seminales (Mortimer, Van Der Horst, y Mortimer 2015; Núñez-Martínez, Moran, y Peña 2006; Yániz *et al.* 2018)

4.1.1 Efecto del tipo de cámara de recuento y el tiempo de análisis tras la carga inicial del semen sobre los parámetros cinéticos

Los resultados muestran para las variables de cinética los mejores valores de velocidad para la cámara Spermtrack[®], con excepción de la variable VSL ($19,09 \pm 0,72 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). Las cámaras ISAS[®] D4C 10, 16, y 20 mostraron los valores más altos en la progresividad; para la ondulación la variable ALH ($2,27 \pm 0,05 \mu\text{m}$) fue mayor en la cámara Spermtrack[®], para los valores de BCF fueron mayores en las cámaras ISAS[®]. Las cámaras D4C10 y D4C20, tuvieron datos intermedios y muy similares entre sí (Cuadro 4).

Cuadro 4. Variables de cinética espermática (media \pm EE) en semen fresco de toros Brahman medidas en diferentes cámaras de recuento, ITCR San Carlos, 2019.

Variable	Cámara			
	ISAS® D4C10	ISAS® D4C16	ISAS® D4C20	Spermtrack®
n / %	1292/21,53	1288/21,47	1890/31,5	1530/25,5
VCL	41,33 \pm 1,11 ^a	46,04 \pm 1,16 ^b	47,92 \pm 1,24 ^b	51,27 \pm 1,28 ^c
VSL	19,57 \pm 0,63 ^a	22,03 \pm 0,65 ^b	19,51 \pm 0,70 ^a	19,09 \pm 0,72 ^a
VAP	23,77 \pm 0,62 ^a	27,22 \pm 0,65 ^b	24,48 \pm 0,69 ^a	26,56 \pm 0,71 ^b
LIN	47,73 \pm 0,93 ^a	50,42 \pm 0,97 ^b	47,89 \pm 1,03 ^a	42,82 \pm 1,07 ^c
STR	78,81 \pm 0,97 ^a	78,48 \pm 1,01 ^a	77,76 \pm 1,08 ^a	72,65 \pm 1,12 ^b
WOB	57,55 \pm 0,69 ^a	60,09 \pm 0,71 ^b	59,00 \pm 0,76 ^{ab}	55,71 \pm 0,79 ^c
ALH	1,77 \pm 0,05 ^a	1,92 \pm 0,05 ^b	1,87 \pm 0,05 ^{ab}	2,27 \pm 0,05 ^c
BCF	7,81 \pm 0,16 ^a	7,90 \pm 0,17 ^a	7,38 \pm 0,18 ^b	6,78 \pm 0,18 ^c

n / %= número de espermatozoides y porcentaje que representa cada cámara de recuento; VCL = velocidad curvilínea ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); VSL = velocidad rectilínea ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); VAP = velocidad promedio de la trayectoria ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); LIN = linealidad de la progresión (%); STR = índice de rectitud (%); WOB = oscilación de la trayectoria (%); ALH = amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μm); BCF = frecuencia de entrecruzamiento (Hz). EE = error estándar de la media. ^{a-c} Letras diferentes indican diferencias entre las cámaras de recuento espermático. P < 0,05.

Al evaluar el efecto del tipo de cámara de recuento, la velocidad curvilínea en las cámaras desechables fue inferior que en la cámara reutilizable o Spermtrack®. La velocidad rectilínea y promedio no presentaron un patrón característico al analizar el efecto del tipo de cámara. Se ha descrito que al aumentar la profundidad de la cámara de recuento se incrementa la velocidad curvilínea de las células (Gloria *et al.* 2013; Valverde y Madrigal-Valverde 2019a). Este efecto coincide con lo observado en este trabajo para la cámara de ISAS® D4C 10 y 20 μm , pero no para ISAS® D4C16 μm (P > 0,05) aunque la tendencia es que se incremente con la altura de la cámara. La variación en los resultados podría explicarse por la forma en que se incorpora la muestra de semen en la cámara de recuento, ya que el desplazamiento por capilaridad a una mayor altura podría proporcionar una mejor condición física de espacio para el desplazamiento celular que a alturas de cámara menores (Contri *et al.* 2010) y con una cámara de tipo de carga de desplazamiento de gota obtuvieron muestras con mayor velocidad, pero menor progresividad que con una cámara de carga capilar (Contri *et al.* 2010). La ondulación de las células dada por la ALH fue significativamente mayor en la cámara por carga de

desplazamiento de la gota (Spermtrack®) que en las cámaras desechables cuyo principio es el avance del semen por capilaridad. Otros autores han descrito resultados similares en cámaras de recuento reutilizables y desechables con diferencias significativas entre éstas (Gloria *et al.* 2013). La frecuencia de entrecruzamiento (BCF) mostró diferencias entre los tipos de cámaras; sin embargo, la Spermtrack® presentó los valores menores ($6,78 \pm 0,18$ Hz). Este valor menor respecto de las cámaras de recuento ISAS® D4C podría explicarse debido a la tensión superficial en el perímetro entre porta y cubreobjetos ya que los espermatozoides con pérdida de la integridad de sus membranas pueden fluir por movimiento Browniano por la cámara de recuento sobreestima las variables cinéticas de los espermatozoides (Lenz *et al.* 2011). Otros autores han descrito que no se presentan diferencias significativas entre alturas de cámaras desechables, pero si en las reusables, por lo que sugieren evaluar el efecto del tipo de carga de la cámara que se va a utilizar para cada especie (Soler *et al.* 2012). Además, algunos autores, han demostrado que el efecto de *SegreSilberberg* (Segré y Silberberg 1962) regula la distribución de los espermatozoides en el medio de suspensión (Douglas-Hamilton *et al.* 2005), ya que durante el flujo de *Poiseuille* pueden presentarse diferentes capas en donde varían las velocidades de desplazamiento, y éstas son causadas por la inercia del fluido en movimiento (Segré y Silberberg 1962), lo que podría generar una discrepancia entre resultados según la altura y/o profundidad de la cámara de recuento de carga capilar. Este efecto en la cámara de ISAS® D4C 10 μm genera una presión mayor que en la de ISAS® D4C 16 y 20 μm , donde se presenta una mejor distribución y menor arrastre de espermatozoides en las cámaras más profundas.

Para el análisis de tiempos, la velocidad conformada por VCL, VSL y VAP, mostraron diferencias significativas en los cuatro tiempos de análisis. Además, se obtuvieron los mayores resultados en todas las variables en el tiempo de análisis 0 h, con excepción en la variable de STR donde se obtuvieron mejores índices en los tiempos 3, 6 y 12 h. Además, se observa un incremento en la muerte celular conforme aumenta el tiempo entre la extracción y el análisis seminal (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto de la durabilidad de la muestra sobre variables de cinética espermática (media \pm EE) en semen fresco de toros Brahman, ITCR San Carlos, 2019

Variable	Tiempo de análisis tras la carga inicial de la cámara de recuento (h)			
	0	3	6	12
n / %	3075/51,25	2284/38,07	492/8,2	149/2,48
VCL	56,75 \pm 0,59 ^a	47,61 \pm 0,72 ^b	41,46 \pm 1,31 ^c	31,89 \pm 2,53 ^d
VSL	24,79 \pm 0,33 ^a	21,40 \pm 0,41 ^b	17,53 \pm 0,74 ^c	13,45 \pm 1,42 ^d
VAP	31,55 \pm 0,33 ^a	26,65 \pm 0,40 ^b	22,08 \pm 0,73 ^c	17,31 \pm 1,41 ^d
LIN	51,70 \pm 0,49 ^a	47,37 \pm 0,60 ^b	45,63 \pm 1,09 ^b	43,25 \pm 2,10 ^b
STR	75,68 \pm 0,52 ^a	78,01 \pm 0,63 ^b	78,95 \pm 1,14 ^b	76,23 \pm 2,20 ^{ab}
WOB	62,91 \pm 0,36 ^a	57,89 \pm 0,44 ^b	55,45 \pm 0,81 ^b	54,68 \pm 1,56 ^b
ALH	2,10 \pm 0,02 ^a	2,04 \pm 0,03 ^a	1,82 \pm 0,05 ^b	1,63 \pm 0,10 ^b
BCF	7,79 \pm 0,08 ^a	8,36 \pm 0,10 ^b	7,62 \pm 0,19 ^a	5,46 \pm 0,36 ^c

n / %= número de espermatozoides y porcentaje que representa cada tiempo de análisis; VCL = velocidad curvilínea ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); VSL = velocidad rectilínea ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); VAP = velocidad promedio de la trayectoria ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); LIN = linealidad de la progresión (%); STR = índice de rectitud (%); WOB = oscilación de la trayectoria (%); ALH = amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μm); BCF = frecuencia de entrecruzamiento (Hz). EE = error estándar de la media. ^{a-d} Letras diferentes indican diferencias entre los tiempos de análisis tras la carga inicial de la cámara de recuento espermático. P <0,05.

Cuando se estudia el efecto de la conservación del movimiento tras la carga inicial del semen conforme transcurre el tiempo, la muestra seminal pierde movilidad en general. Esto es debido a que los medios de dilución aportan nutrientes a los espermatozoides, pero esos nutrientes son utilizados por las células que agotan las reservas. Cuando las muestras se recolectan, los análisis seminales deben llevarse a cabo rápidamente en el laboratorio para obtener la movilidad real de la muestra (Ávalos *et al.* 2018). La conservación del movimiento espermático ha sido estudiada en otras especies como el ciervo (Hahn *et al.* 2019). En estudios en bovino, los resultados indicados por Murphy *et al.* (2016) son coincidentes con el presente estudio donde la durabilidad de las muestras en el tiempo se disminuye y se observa una muerte prolongada de espermatozoides y una disminución en la movilidad de éstos. Independientemente de los factores de dilución, temperatura, almacenamiento, o tipo de diluyente utilizado, la movilidad de los espermatozoides

en el semen fresco se disminuye a medida que aumenta la duración del almacenamiento (O'Hara *et al.* 2010).

4.1.2 Efecto del tipo de diluyente y temperatura de dilución del semen sobre las variables cinéticas

La dilución con diferentes diluyentes mostró diferencias significativas en la progresividad, representado por las variables de LIN, STR y WOB, además de dos variables más VCL (velocidad) y ALH (ondulación), donde el diluyente Androstar® muestra los valores más altos para estas variables, exceptuando la VCL y ALH que el valor más alto lo obtuvo Andromed® (Cuadro 6).

Cuadro 6. Variables de cinética espermática (media ± EE) en semen fresco de toros Brahman diluido con tres diluyentes comerciales, ITCR San Carlos, 2019.

Variable	Diluyente		
	Androstar®	BTS	Andromed®
n / %	2317/38,62	1897/31,62	1786/29,77
VCL	40,87 ± 0,81 ^a	44,34 ± 0,92 ^b	54,24 ± 0,95 ^c
VSL	22,07 ± 0,45 ^a	21,80 ± 0,52 ^a	16,14 ± 0,54 ^b
VAP	25,23 ± 0,45 ^a	26,45 ± 0,51 ^b	24,55 ± 0,53 ^a
LIN	56,22 ± 0,67 ^a	52,00 ± 0,77 ^b	32,96 ± 0,79 ^c
STR	82,32 ± 0,70 ^a	79,59 ± 0,80 ^b	69,03 ± 0,83 ^c
WOB	64,74 ± 0,50 ^a	62,33 ± 0,57 ^b	46,52 ± 0,59 ^c
ALH	1,61 ± 0,03 ^a	1,79 ± 0,04 ^b	2,45 ± 0,04 ^c
BCF	7,37 ± 0,12 ^a	7,53 ± 0,13 ^{ab}	7,70 ± 0,14 ^b

n / %= número de espermatozoides y porcentaje que representa cada diluyente; VCL = velocidad curvilínea ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); VSL = velocidad rectilínea ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); VAP = velocidad promedio de la trayectoria ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); LIN = linealidad de la progresión (%); STR = índice de rectitud (%); WOB = oscilación de la trayectoria (%); ALH = amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μm); BCF = frecuencia de entrecruzamiento (Hz). BTS= *Belstville Thawing Solution*. EE = error estándar de la media. ^{a-c} Letras diferentes indican diferencias entre los diluyentes comerciales. P <0,05.

El diluyente debe conservar las características del eyaculado durante el periodo de almacenamiento (Carballo *et al.* 2009). La dilución de las muestras es necesaria para obtener la concentración espermática adecuada para realizar los análisis con el sistema CASA-Mot (Farrell *et al.* 1995; Bompart *et al.* 2018). Los resultados presentados con el diluyente Andromed®, coinciden con lo descrito por (Contri *et al.* 2010) ya que al utilizar un diluyente hipertónico se podría esperar valores mayores de velocidad curvilínea y ondulación y por lo tanto menor

progresividad. Una movilidad no progresiva y una rectitud espermática reducida son características de espermatozoides hiperactivados (Hyakutake *et al.* 2018). Esta progresividad, determinada por los valores de linealidad e índice de rectitud (STR), disminuye al favorecerse un mayor movimiento circular, sin embargo, *in situ* estas variables podrían cambiar y tender a aumentar porque las paredes acanaladas del oviducto limitaría el movimiento circular de los espermatozoides y podrían funcionar como una barrera biológica y de selección espermática y favorecer el movimiento progresivo lo que podría aumentar el índice de rectitud celular y esto se podría correlacionar con la fertilidad (Hyakutake, Mori, y Sato 2018; Yániz *et al.* 2018).

Hubo un efecto de la temperatura y diluyente respecto a las variables cinéticas que mostraron diferencias significativas en los diluyentes Andromed[®], Androstar[®] y BTS, sin embargo, con el BTS no hubo diferencias en LIN y ALH entre temperaturas. Con respecto al diluyente Andromed[®] y BTS obtuvieron una mayor velocidad y movimiento ondulatorio con la temperatura de 29 °C, y una mayor progresividad con la temperatura de 37 °C. Mientras que con el Androstar[®] se obtuvo una mayor velocidad, progresividad y movimiento ondulatorio con la temperatura de 29 °C (Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto de la temperatura del diluyente sobre variables de cinética espermática (media \pm EE) en semen fresco de toros Brahman, ITCR San Carlos, 2019

Variable	Diluyente					
	Andromed®		Androstar®		BTS	
	37 °C	29 °C	37 °C	29 °C	37 °C	29 °C
VCL	44,94 \pm 1,61 ^a	62,68 \pm 0,85 ^b	45,29 \pm 0,76 ^a	49,24 \pm 0,78 ^b	43,33 \pm 0,92 ^a	57,51 \pm 0,83 ^b
VSL	15,22 \pm 0,56 ^a	18,79 \pm 0,30 ^b	21,14 \pm 0,51 ^a	29,79 \pm 0,52 ^b	21,56 \pm 0,59 ^a	27,39 \pm 0,53 ^b
VAP	20,67 \pm 0,70 ^a	28,76 \pm 0,37 ^b	26,58 \pm 0,47 ^a	32,71 \pm 0,48 ^b	26,90 \pm 0,59 ^a	34,22 \pm 0,53 ^b
LIN	38,16 \pm 0,90 ^a	34,22 \pm 0,48 ^b	49,09 \pm 0,71 ^a	65,84 \pm 0,72 ^b	51,60 \pm 0,86 ^a	51,58 \pm 0,78 ^a
STR	74,22 \pm 1,22 ^a	67,27 \pm 0,64 ^b	74,29 \pm 0,65 ^a	87,33 \pm 0,67 ^b	75,18 \pm 0,85 ^a	78,23 \pm 0,77 ^b
WOB	49,96 \pm 0,63 ^a	47,26 \pm 0,33 ^b	62,12 \pm 0,54 ^a	72,20 \pm 0,55 ^b	64,63 \pm 0,62 ^a	62,83 \pm 0,56 ^b
ALH	2,08 \pm 0,07 ^a	2,69 \pm 0,04 ^b	2,11 \pm 0,03 ^a	1,50 \pm 0,03 ^b	2,00 \pm 0,04 ^a	2,06 \pm 0,03 ^a
BCF	7,61 \pm 0,20 ^a	8,24 \pm 0,11 ^b	6,08 \pm 0,12 ^a	9,08 \pm 0,12 ^b	6,23 \pm 0,15 ^a	8,67 \pm 0,14 ^b

VCL = velocidad curvilínea ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); VSL = velocidad rectilínea ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); VAP = velocidad promedio de la trayectoria ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); LIN = linealidad de la progresión (%); STR = índice de rectitud (%); WOB = oscilación de la trayectoria (%); ALH = amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μm); BCF = frecuencia de entrecruzamiento (Hz). BTS= Belstville Thawing Solution. EE = error estándar de la media. ^{a-b} Letras diferentes indican diferencias entre las temperaturas del diluyente del semen. P <0,05.

Se ha descrito que la temperatura óptima para evaluación del semen bovino debe ser 37 °C, sin embargo, al profundizar el efecto de la temperatura de análisis del semen fresco bovino, las temperaturas de 37 °C respecto de temperaturas menores (29 °C), provocaron una menor velocidad celular, pero, la linealidad y progresividad de los espermatozoides se favoreció a temperaturas más elevadas (37 °C). Resultados similares fueron descritos en ciervo (Hahn *et al.* 2019), y en humano (Thijssen *et al.* 2014), donde compararon el semen a dos temperaturas de análisis (23 °C y 35 °C). Otros trabajos han descrito que la temperatura de almacenamiento no tiene ningún efecto sobre la integridad de las membranas, y que la temperatura ambiente favorece movilidad de los espermatozoides (Murphy *et al.* 2016), lo que es concomitante con lo encontrado en el presente trabajo. Además, es posible que a temperaturas superiores a 30 °C, la célula incremente su metabolismo y favorezca un mayor gasto energético al disminuir las reservas de ATP lo que podría afectar negativamente la movilidad de los espermatozoides (Storey 2008).

4.2 Experimentos en semen congelado

La criopreservación se usa con frecuencia en la producción animal y existen varias fuentes de variación en el éxito de la supervivencia del semen durante este procedimiento (Watson 2000). Aunque es bien sabido que la fertilidad del padre está relacionada con la movilidad de los espermatozoides y los patrones cinemáticos (Yániz *et al.* 2018), los efectos de la calidad del semen en la eficiencia reproductiva en el ganado aún no se comprenden por completo (Rodríguez-Martínez 2003). Existe una variación individual en la congelación del semen y dicha variación puede explicarse, al menos en parte, por los patrones de subpoblaciones (SP) de espermatozoides móviles en la eyaculación (Davis *et al.* 1995).

4.2.1 Análisis de movilidad espermática

La movilidad total media (%) (\pm EE) de muestras criopreservadas en los diferentes diluyentes fue $51,50 \pm 8,38$ (OptiXcell®), $53,83 \pm 3,78$ (Triladyl®) y $58,38 \pm 4,63$ (Tris-EY) con un rango general de 18 - 79%. La movilidad progresiva de los espermatozoides (%) para OptiXcell®, Triladyl® y Tris-EY fue, respectivamente,

36,33 ± 6,81, 40,83 ± 2,44 y 37,75 ± 4,39. La movilidad total promedio (% , media ± EE) para los toros *Bos taurus* y *Bos indicus* fue 58,33 ± 3,05 y 49,88 ± 6,45, respectivamente. La movilidad progresiva (%) para las dos especies fue 41,92 ± 2,09 (*Bos taurus*) y 32,75 ± 5,56 (*Bos indicus*).

4.2.2 Estructura subpoblacional

Después del análisis de conglomerados multivariados (modelo de k-medias), se identificaron cuatro subpoblaciones (SP) de espermatozoides móviles con diferentes patrones cinemáticos. Los datos resumidos para la cinemática de las subpoblaciones se presentan en el Cuadro 8. Se pueden resumir de la siguiente manera: la subpoblación 1 (SP₁) incluía esperma con velocidad media (valores intermedios de VCL, VSL y VAP) y movilidad lineal y progresiva (inferida del LIN intermedio y valores STR). Esta población incluía el 20,02 % del total de espermatozoides móviles. La subpoblación 2 (SP₂) contenía esperma activo, rápido, lineal y progresivo, como lo indica el mayor valor de VCL, VSL y VAP, junto con los valores más altos de LIN y STR, y el valor intermedio de BCF. Además, el valor de ALH fue el más bajo visto en todas las subpoblaciones, lo que indica un movimiento con pocas características ondulatorias. Alrededor del 28,29 % del total de espermatozoides móviles fueron asignados a esta subpoblación. La subpoblación 3 (SP₃) incluía el 19,14 % del esperma total y estaba representada por espermatozoides móviles lentos con la velocidad más baja pero no ondulatoria según lo revelado por los valores de VAP, VCL, VSL y BCF. Esta población tenía una movilidad progresiva menor que las otras subpoblaciones según lo indicado por los valores de LIN y ALH. La subpoblación 4 (SP₄) contenía el 32,54 % de la población total de espermatozoides móviles, y estas células tenían la movilidad más alta y la movilidad progresiva, pero los movimientos eran ondulantes, como lo indican los altos valores de VCL, ALH y BCF, junto con el valor más altos de WOB (Cuadro 8).

Cuadro 8. Variables cinemáticas (media \pm EE) de las cuatro subpoblaciones (SP) de |espermatozoides definidas en muestras de semen de toro 60 minutos después de la descongelación, ITCR San Carlos, 2019.

Variable	SP ₁	SP ₂	SP ₃	SP ₄
n (%)	1300 (20,02)	1837 (28,29)	1243 (19,14)	2113 (32,54)
VCL	120,93 \pm 1,21 ^a	140,10 \pm 1,02 ^b	108,41 \pm 1,23 ^c	141,78 \pm 0,95 ^b
VSL	77,30 \pm 1,12 ^a	118,29 \pm 0,94 ^b	52,60 \pm 1,14 ^c	105,79 \pm 0,87 ^d
VAP	86,97 \pm 1,01 ^a	120,03 \pm 0,85 ^b	67,37 \pm 1,03 ^c	106,67 \pm 0,79 ^d
LIN	60,90 \pm 0,58 ^a	80,80 \pm 0,49 ^b	49,56 \pm 0,59 ^c	75,39 \pm 0,46 ^d
STR	82,05 \pm 0,49 ^a	92,73 \pm 0,41 ^b	77,37 \pm 0,50 ^c	95,72 \pm 0,39 ^d
WOB	70,36 \pm 0,44 ^a	83,75 \pm 0,37 ^b	62,42 \pm 0,45 ^c	76,87 \pm 0,34 ^d
ALH	3,71 \pm 0,04 ^a	3,28 \pm 0,03 ^b	3,89 \pm 0,04 ^c	3,93 \pm 0,03 ^c
BCF	9,17 \pm 0,10 ^a	8,97 \pm 0,08 ^a	8,13 \pm 0,10 ^b	11,32 \pm 0,08 ^c

n= número de células. SP1: velocidad media y linealidad progresiva; SP2: rápida, linealidad-progresiva y oscilatoria; SP3: lenta no lineal, no progresiva y no ondulatoria; SP4: rápida lineal-progresiva y ondulatoria. Número de espermatozoides = 6493. VCL = velocidad curvilínea ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); VSL = velocidad rectilínea ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); VAP = velocidad promedio de la trayectoria ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); LIN = linealidad de la progresión (%); STR = índice de rectitud (%); WOB = oscilación de la trayectoria (%); ALH = amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μm); BCF = frecuencia de entrecruzamiento (Hz). EE = error estándar de la media. ^{a-d} Letras diferentes indican diferencias entre las subpoblaciones de espermáticas. P <0,05.

La criopreservación puede provocar alteraciones en la calidad del semen debido al aumento del estrés oxidativo que a su vez puede generar cambios en la movilidad de los espermatozoides y los patrones cinemáticos, fragmentación del ADN, alteraciones en el momento de la capacitación o la reacción del acrosoma (Walczak-Jedrzejowska *et al.* 2013). La evaluación de estos cambios es muy difícil, si no imposible, cuando se emplea un análisis clásico de la calidad del semen y, por lo tanto, el uso de la tecnología CASA es importante para la mejora de las evaluaciones de la calidad del esperma (Mortimer, Mortimer, y Horst 2015; Núñez-Martínez, Moran, y Peña 2007; Peña *et al.* 2005; Yániz *et al.* 2018). Los sistemas CASA-Mot han demostrado una mayor precisión en la evaluación de la movilidad en comparación con los métodos subjetivos (Amann y Waberski 2014). Además, estos sistemas proporcionan abundante información sobre muchas variables cinemáticas para cada espermatozoide (Martínez-Pastor *et al.* 2011; Valverde *et al.* 2019) que pueden usarse como base para el análisis de la heterogeneidad de las poblaciones de espermatozoides. Sin embargo, una estrategia utilizada por los centros de inseminación artificial es compensar el daño a los espermatozoides al

aumentar el número de células de espermatozoides móviles en las dosis de inseminación, y esto puede enmascarar la relevancia de las subpoblaciones espermáticas.

En toros, se ha sugerido que las subpoblaciones espermáticas con mayores porcentajes de espermatozoides rápidos, pero no lineales parecen tener una mayor capacidad de fertilización (Ibanescu *et al.* 2020). Otro trabajo indica que los movimientos espermáticos rápidos y no lineales son específicos de los espermatozoides hiperactivados (Kathiravan *et al.* 2011). Los resultados de otros estudios sugieren que las subpoblaciones espermáticas que contiene espermatozoides rápidos y lineales es el que tiene una mayor probabilidad de interacción espermatozoide-ovocito (Peña *et al.* 2018). A pesar de estos intentos de vincular la estructura y la función de la subpoblación, incluida la fertilidad de los espermatozoides, los abundantes datos proporcionados por los sistemas CASA-Mot para procedimientos multivariados, y la subpoblación resultante, aún son insuficientes para clasificar una eyaculación en relación con su calidad. Además, la clasificación de las subpoblaciones a través de los procedimientos de agrupación clásicos sigue siendo incierta e incluso controvertida. Esto se relaciona con la observación de que los procedimientos multivariados de agrupación encontrarán varios patrones cinemáticos en el conjunto de datos, incluso si no hay agrupaciones naturales en los datos (Altman y Krzywinski 2017).

4.2.3 Cinemática espermática dentro de subpoblaciones para diferentes diluyentes

Los resultados del análisis de componentes principales revelaron tres CP en todos los diluyentes. CP₁ en OptiXcell®, Triladyl® y Tris-EY se denominó "progresividad" y estuvo representado por LIN, STR y WOB. Los vectores propios más grandes correspondían a LIN (OptiXcell®: 0,931; Triladyl®: 0,977) o WOB (Tris-EY: 0,942). CP₂ mostró un componente de "velocidad", con valores altos para VCL y ALH. El mayor efecto se debió al VCL en todos los diluyentes (OptiXcell®: 0,960; Triladyl®: 0,915; Tris-EY: 0,899). CP₃, representado por STR y BCF, fue nombrado "movimiento ondulatorio". Se relaciona principalmente con BCF (OptiXcell®: 0,801; Triladyl®: 0,952) o STR (Tris-EY: 0,844). Estos resultados indican que la

progresividad de los espermatozoides tiene un efecto relativamente mayor en la varianza total que las otras variables (Cuadro 9).

Hubo diferencias entre las subpoblaciones de esperma dentro de cada diluyente ($P < 0,05$) con VCL y LIN que exhibieron diferencias más altas entre las subpoblaciones. La distribución de subpoblaciones no fue la misma para cada diluyente. Los valores más altos de VCL se observaron en SP₂ para OptiXcell® ($165,50 \pm 1,20 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), SP₃ para Triladyl® ($168,80 \pm 1,27 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) y en SP₄ Tris-EY ($168,04 \pm 0,97 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). Para LIN, los valores más altos estaban en SP₂ en OptiXcell® ($87,16 \pm 0,53 \%$), SP₁ en Triladyl® ($85,91 \pm 0,61 \%$) y SP₂ en Tris-EY ($88,45 \pm 0,57 \%$). Cuando se comparó cada subpoblación de espermatozoides entre diluyentes, se encontraron diferencias cinemáticas ($P < 0,05$). Las variables con las mayores diferencias entre los diluyentes para todos los SP fueron VCL, LIN y WOB (Cuadro 10).

Cuadro 9. Vectores propios de componentes principales (PC) * para variables cinemáticas de espermatozoides de toro diluidos en tres diluyentes comerciales, ITCR San Carlos, 2019.

Variable	OptiXcell®			Triladyl®			Tris-EY		
	CP ₁	CP ₂	CP ₃	CP ₁	CP ₂	CP ₃	CP ₁	CP ₂	CP ₃
VCL		0,960			0,915			0,899	
VSL		0,737		0,819			0,728		
VAP		0,888		0,723			0,761	0,610	
LIN	0,931			0,977			0,827		
STR	0,641		0,621	0,737					0,844
WOB	0,899			0,909			0,942		
ALH	-0,646	0,624			0,912			0,884	
BCF			0,801			0,952			0,668
Var Exp	37,51	35,26	16,59	46,50	29,18	14,48	38,14	30,51	21,33

Var Exp: varianza explicada en cada CP. Varianza total explicada: OptiXcell® = 89,36 %; Triladyl® = 90,16 %; Tris-EY = 89,98 %. Expresa las variables más importantes en cada CP. Solo se presentan valores propios > 0,6. VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad rectilínea; VAP: velocidad promedio de la trayectoria; LIN: linealidad de la progresión; STR: índice de rectitud; WOB: oscilación de la trayectoria; ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; BCF: frecuencia de entrecruzamiento.

Cuadro 10. Variables cinemáticas (medias \pm EE) de subpoblaciones (SP) espermáticas móviles de toro en diferentes diluyentes comerciales, ITCR San Carlos, 2019.

	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
OptiXcell®								
SP ₁	120,62 \pm 1,51 ^{aβ}	74,41 \pm 1,35 ^{aβ}	77,17 \pm 1,32 ^{aβ}	59,36 \pm 0,67 ^{aβ}	91,87 \pm 0,53 ^{aβ}	62,48 \pm 0,57 ^{aβ}	3,96 \pm 0,05 ^{aβ}	11,38 \pm 0,13 ^{aβ}
SP ₂	165,50 \pm 1,20 ^{bβ}	144,29 \pm 1,07 ^{bβ}	143,07 \pm 1,04 ^{bβ}	87,16 \pm 0,53 ^{bβ}	97,52 \pm 0,42 ^{bβ}	86,77 \pm 0,45 ^{bβ}	3,80 \pm 0,04 ^{aβ}	10,00 \pm 0,10 ^{bβ}
SP ₃	128,03 \pm 1,95 ^{cβ}	43,81 \pm 1,74 ^{cβ}	81,97 \pm 1,70 ^{aβ}	31,53 \pm 0,86 ^{cβ}	50,71 \pm 0,68 ^{cβ}	62,23 \pm 0,73 ^{cβ}	4,49 \pm 0,06 ^{bβ}	6,73 \pm 0,17 ^{cβ}
SP ₄	86,70 \pm 1,36 ^{dβ}	74,24 \pm 1,22 ^{aβ}	77,73 \pm 1,19 ^{aβ}	83,07 \pm 0,60 ^{dβ}	92,64 \pm 0,48 ^{aβ}	88,08 \pm 0,51 ^{dβ}	2,05 \pm 0,05 ^{cβ}	6,76 \pm 0,12 ^{cβ}
Triladyl®								
SP ₁	129,45 \pm 1,20 ^{aν}	111,73 \pm 1,19 ^{aν}	111,19 \pm 1,02 ^{aν}	85,91 \pm 0,61 ^{aν}	97,22 \pm 0,66 ^{aν}	86,06 \pm 0,47 ^{aν}	3,29 \pm 0,04 ^{aν}	8,62 \pm 0,11 ^{aν}
SP ₂	74,94 \pm 1,57 ^{bν}	31,09 \pm 1,57 ^{bν}	42,28 \pm 1,35 ^{bν}	41,45 \pm 0,80 ^{bν}	72,34 \pm 0,87 ^{bν}	55,77 \pm 0,62 ^{bν}	2,97 \pm 0,06 ^{bν}	7,56 \pm 0,15 ^{bν}
SP ₃	168,80 \pm 1,27 ^{cν}	79,89 \pm 1,56 ^{cν}	96,62 \pm 1,34 ^{cν}	46,80 \pm 0,80 ^{cν}	80,53 \pm 0,87 ^{cν}	57,38 \pm 0,62 ^{bν}	6,17 \pm 0,06 ^{cν}	8,80 \pm 0,15 ^{aν}
SP ₄	158,77 \pm 1,10 ^{dν}	120,00 \pm 1,09 ^{dν}	119,45 \pm 0,94 ^{dν}	75,78 \pm 0,56 ^{dν}	97,66 \pm 0,61 ^{aν}	75,52 \pm 0,43 ^{cν}	4,31 \pm 0,04 ^{dν}	14,13 \pm 0,10 ^{cν}
Tris-EY								
SP ₁	108,68 \pm 1,64 ^{aδ}	30,28 \pm 1,65 ^{aδ}	66,08 \pm 1,54 ^{aδ}	25,85 \pm 0,88 ^{aδ}	43,95 \pm 0,62 ^{aδ}	59,21 \pm 0,78 ^{aδ}	3,94 \pm 0,06 ^{aβ}	6,54 \pm 0,17 ^{aδ}
SP ₂	137,08 \pm 1,07 ^{bδ}	122,67 \pm 1,07 ^{bδ}	124,09 \pm 1,00 ^{bδ}	88,45 \pm 0,57 ^{bβ}	95,11 \pm 0,40 ^{bδ}	90,79 \pm 0,51 ^{bδ}	2,85 \pm 0,04 ^{bν}	8,39 \pm 0,11 ^{bδ}
SP ₃	74,15 \pm 1,14 ^{cδ}	45,17 \pm 1,15 ^{cβ}	48,47 \pm 1,07 ^{cδ}	58,92 \pm 0,61 ^{cδ}	88,19 \pm 0,43 ^{cδ}	64,62 \pm 0,54 ^{cδ}	2,66 \pm 0,04 ^{cδ}	8,49 \pm 0,12 ^{bν}
SP ₄	168,04 \pm 0,97 ^{dδ}	118,06 \pm 0,97 ^{dν}	118,09 \pm 0,90 ^{dν}	70,01 \pm 0,52 ^{dδ}	96,56 \pm 0,37 ^{dν}	70,22 \pm 0,46 ^{dδ}	4,96 \pm 0,03 ^{dδ}	12,62 \pm 0,10 ^{cδ}

VCL = velocidad curvilínea ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); VSL = velocidad rectilínea ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); VAP = velocidad promedio de la trayectoria ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); LIN = linealidad de la progresión (%); STR = índice de rectitud (%); WOB = oscilación de la trayectoria (%); ALH = amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μm); BCF = frecuencia de entrecruzamiento (Hz). SP: subpoblación. EE = error estándar de la media. Número de espermatozoides = 6493. ^{a-d} Dentro de la misma columna y diluyente, diferentes superíndices indican diferencias entre las subpoblaciones. ^{$\beta\delta$} Dentro de la misma columna y subpoblación, diferentes superíndices indican diferencias entre los diluyentes. P <0,05.

Durante la congelación y descongelación, la variación se relaciona, por ejemplo, con el efecto del diluyente, que puede influir en los patrones cinemáticos de los espermatozoides. La raza y la variación interindividual después de la descongelación pueden relacionarse con diferencias en las propiedades de la membrana plasmática en respuesta a la congelación y descongelación.

El enfoque multivariado de los componentes principales y el análisis de conglomerados realizado para varias especies subraya que las eyaculaciones son heterogéneas, ya que contienen espermatozoides con diferente movilidad y patrones cinemáticos (Abaigar *et al.* 1999; Quintero-Moreno *et al.* 2003; Chantler *et al.* 2004; Flores *et al.* 2008; Bravo *et al.* 2011; Yániz *et al.* 2018; Ortega-Ferrusola *et al.* 2009; Valverde *et al.* 2019; Soler *et al.* 2017; Caldeira *et al.* 2019; Valverde, *et al.*, 2017; Abraham-Peskir y Roberts 2004). En el presente estudio, se identificaron cuatro subpoblaciones de esperma diferentes, descritas a partir de tres componentes principales que representaban la velocidad, la progresividad y el movimiento ondulatorio celular. Las proporciones de las diferentes subpoblaciones variaron con el diluyente utilizado. El grupo de espermatozoides rápidos y lineales no siguió un patrón consistente entre las subpoblaciones. En cualquier caso, las muestras diluidas con Triladyl® mostraron la mayor actividad cinemática. En este estudio, a pesar de las diferencias ($P < 0,05$) entre los diluyentes, el análisis bayesiano reveló que solo Triladyl® presentó diferencias relevantes en comparación con Tris-EY y OptiXcell® para estos patrones cinemáticos. Los resultados indican que la distribución de la subpoblación también fue diferente entre las especies bovinas. Por el contrario, otros estudios han indicado que la distribución de la subpoblación de esperma no fue diferente dentro de las especies (Valverde *et al.* 2016). Mientras que, para las dos razas de toros (*Bos taurus*), la estructura general de la subpoblación de esperma mostró poca variación entre los individuos.

4.2.4 Análisis bayesiano de subpoblaciones espermáticas

El análisis bayesiano de los datos mostró que VCL, VAP, LIN y BCF exhibieron diferencias relevantes entre Tris-EY y Triladyl®, que VCL y VAP presentaron diferencias relevantes entre Tris-EY y OptiXcell®, mientras que solo WOB mostró

diferencias relevantes entre Triladyl® y OptiXcell®. En los otros casos, a pesar de que las diferencias son significativas ($P < 0,05$) entre todos los diluyentes (VSL) o al menos dos diluyentes (LIN, WOB), no fueron relevantes (Cuadro 11).

Cuadro 11. Variables cinemáticas de espermatozoides de toro y distribuciones posteriores marginales estimadas de diferencias entre diluyentes comerciales Tris-EY, Triladyl® y OptiXcell®, ITCR San Carlos, 2019.

Variable	Media \pm d.e.	CV	D^1	HPD _{95%} ²	P_0 ³	P_R ⁴
VCL	127,92 \pm 44,94	36,56				
D ₁ -D ₂			-12,91	-34,03, 6,82	0,07	0,63
D ₁ -D ₃			-2,36	-22,61, 16,83	0,40	0,91
D ₂ -D ₃			10,55	-13,81, 35,41	0,86	0,30
VSL	4,47 \pm 2,86	63,93				
D ₁ -D ₂			0,06	-0,16, 0,27	0,72	0,00
D ₁ -D ₃			0,08	-0,12, 0,27	0,79	0,00
D ₂ -D ₃			0,02	-0,18, 0,26	0,58	0,00
VAP	86,95 \pm 46,48	56,22				
D ₁ -D ₂			-11,74	-34,32, 12,04	0,13	0,59
D ₁ -D ₃			-8,35	-29,68, 11,32	0,19	0,71
D ₂ -D ₃			3,39	-21,56, 27,76	0,62	0,18
LIN	4,43 \pm 2,83	64,05				
D ₁ -D ₂			-0,06	-0,29, 0,14	0,28	1,00
D ₁ -D ₃			0,08	-0,12, 0,27	0,79	0,00
D ₂ -D ₃			0,14	-0,08, 0,36	0,89	0,00
STR	93,81 \pm 40,68	44,58				
D ₁ -D ₂			-6,97	-21,37, 5,78	0,13	0,46
D ₁ -D ₃			-6,37	-21,84, 7,48	0,17	0,50
D ₂ -D ₃			0,61	-14,05, 15,91	0,53	0,20
WOB	4,60 \pm 2,87	62,61				
D ₁ -D ₂			0,08	-0,20, 0,35	0,75	0,00
D ₁ -D ₃			0,03	-0,24, 0,29	0,62	0,00
D ₂ -D ₃			-0,05	-0,35, 0,22	0,35	1,00
ALH	65,45 \pm 23,77	37,43				
D ₁ -D ₂			-3,59	-12,97, 4,72	0,19	0,22
D ₁ -D ₃			-6,32	-15,92, 3,38	0,08	0,09
D ₂ -D ₃			-2,73	-13,49, 7,03	0,25	0,28
BCF	4,14 \pm 2,97	71,97				
D ₁ -D ₂			-0,15	-0,56, 0,30	0,22	1,00
D ₁ -D ₃			0,17	-0,23, 0,62	0,82	0,00
D ₂ -D ₃			0,32	-0,16, 0,80	0,93	0,00

d.e: desviación estándar. D₁, Tris-EY; D₂, Triladyl®; D₃, OptiXcell®; 1D: distribución marginal media posterior de la diferencia; 2HPD_{95%}, región de mayor densidad posterior al 95%; 3P₀, la probabilidad de que la diferencia sea mayor que cero cuando D>0 y la probabilidad de que la diferencia sea menor que cero cuando D<0; 4P_R, la probabilidad de que la diferencia sea mayor que R cuando D>0 y menor que R cuando D<0. Número de espermatozoides = 6493. d.e: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%). VCL = velocidad curvilínea ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); VSL = velocidad rectilínea ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); VAP = velocidad promedio de la trayectoria ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); LIN = linealidad de la progresión (%); STR = índice de rectitud (%); WOB = oscilación de la trayectoria (%); ALH = amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μm); BCF = frecuencia de entrecruzamiento (Hz).

El análisis bayesiano de los datos (distribución posterior) al comparar *Bos taurus* y *Bos indicus* mostró que incluso cuando se identificaron diferencias ($P < 0,05$) a raíz de estadísticas frecuentistas (distribución de confianza), estas diferencias entre variables cinemáticas se consideraron no relevantes (Cuadro 12).

Cuadro 12. Parámetros descriptivos y características de las distribuciones posteriores marginales estimadas de diferencias para las variables cinemáticas de esperma de toro entre *Bos taurus* y *Bos indicus*, ITCR San Carlos, 2019.

Variable	Media \pm d.e.	CV	D^1	HPD _{95%} ²	P_0^3	R ⁴	P_R^5
VCL	126,56 \pm 44,93	36,54	11,65	-3,16, 26,55	0,95	15,00	0,30
VSL	4,47 \pm 2,86	64,06	0,03	-0,13, 0,20	0,66	15,53	0,00
VAP	85,61 \pm 46,48	56,91	8,57	-10,70, 9,55	0,84	13,57	0,26
LIN	4,42 \pm 2,83	64,15	0,10	-0,06, 0,27	0,88	7,94	0,00
STR	93,00 \pm 40,69	45,03	2,13	-10,37, 14,89	0,64	6,34	0,22
WOB	4,58 \pm 2,87	62,82	0,02	-0,19, 0,23	0,60	5,79	0,00
ALH	65,09 \pm 23,76	37,82	-0,16	-8,71, 7,49	0,46	-0,49	0,52
BCF	4,13 \pm 2,97	72,15	0,18	-0,18, 0,56	0,85	1,23	0,00

d.e: desviación estándar. ¹ D : distribución marginal media posterior de la diferencia $Bt-Bi$, donde Bt es *Bos taurus* y Bi es *Bos indicus*; ²HPD_{95%}, región de mayor densidad posterior al 95%; ³ P_0 , la probabilidad de que la diferencia sea mayor que cero cuando $D > 0$ y la probabilidad de que la diferencia sea menor que cero cuando $D < 0$; ⁴R, valor relevante estimado como 1/3 de desviación estándar; ⁵ P_R , la probabilidad de que la diferencia sea mayor que R cuando $D > 0$ y menor que R cuando $D < 0$. Número de espermatozoides = 6493. d.e: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%). VCL = velocidad curvilínea ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); VSL = velocidad rectilínea ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); VAP = velocidad promedio de la trayectoria ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); LIN = linealidad de la progresión (%); STR = índice de rectitud (%); WOB = oscilación de la trayectoria (%); ALH = amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μm); BCF = frecuencia de entrecruzamiento (Hz).

La aplicación de herramientas de análisis bioestadístico para el estudio de las variables cinemáticas de los espermatozoides reveló la existencia de subpoblaciones de espermatozoides en la eyaculación (Holt *et al.* 1996; Martínez-Pastor *et al.* 2005; Dorado *et al.* 2010; Gallego *et al.* 2015; Vásquez *et al.* 2016, van der Horst, Maree, y du Plessis 2018; Ibănescu, *et al.* 2018; Valverde *et al.* 2019; Valverde *et al.* 2019;), pero su importancia y relevancia biológica no parece ser completamente clara (Martínez-Pastor *et al.* 2011; Muiño *et al.* 2007; Quintero-Moreno, Rigau, y Rodríguez-Gil 2007; Rubio-Guillén *et al.* 2007; Soler, Alambiaga,

et al. 2017). Estos hallazgos, de diversa relevancia biológica de las subpoblaciones de espermatozoides en la eyaculación, refuerzan la idea de que una estructura subpoblacional específica, representada por espermatozoides con diferentes patrones cinemáticos, debe ser revisada. Otros autores han sugerido que algunas subpoblaciones de espermatozoides pueden verse afectadas por un tratamiento (Ledesma *et al.* 2017) o por procesos específicos (por ejemplo, congelación-descongelación) que indican que algunos SP de espermatozoides pueden tener relevancia biológica (Ibanescu *et al.* 2020), mientras que otros que, coexisten en la misma muestra, no pueden (Harrison 1996; Holt, Moore, y Hillier 1985; Ledesma *et al.* 2017; Martínez-Pastor *et al.* 2011).

Cuando se analizó la relevancia de las diferencias entre las subpoblaciones de espermatozoides, los análisis bayesianos de datos mostraron diferencias relevantes entre las siguientes comparaciones de SP: SP₁-SP₂ (para VSL y LIN); SP₁-SP₃ (todas las variables cinemáticas excepto VCL, WOB y BCF); SP₁-SP₄ (para VSL); SP₂-SP₃ (todas las variables excepto VSL); SP₂-SP₄ (para STR, WOB, ALH y BCF). Por lo tanto, las subpoblaciones SP₁, SP₂ y SP₃ mostraron diferencias ($P < 0,05$) para la mayoría de las variables cinemáticas al usar el enfoque clásico, y estas diferencias también fueron reveladas por el enfoque bayesiano. Por otro lado, la comparación SP₃-SP₄ no mostraron diferencias relevantes para ninguna variable cinemática. Aunque la subpoblación SP₄ mostró diferencias con respecto a SP₂ o SP₃, tales diferencias deben considerarse no relevantes para VCL, VSL, VAP, LIN, WOB o BCF (Cuadro 13).

Cuadro 13. Variables cinemáticas de esperma de toro y distribución marginal posterior estimada de las diferencias entre las subpoblaciones móviles de espermatozoides, ITCR San Carlos, 2019.

Variable	Media±d.e.	CV	D^1	HPD _{95%} ²	P_0^3	P_R^4
VCL	125,80±42,89	35,32				
SP ₁ -SP ₂			-21,49	-24,78, -18,36	0,00	0,00
SP ₁ -SP ₃			11,92	8,52, 15,28	1,00	0,04
SP ₁ -SP ₄			-20,72	-23,77, -17,69	0,00	0,00
SP ₂ -SP ₃			33,41	30,22, 36,42	1,00	1,00
SP ₂ -SP ₄			0,77	-2,09, 3,39	0,70	0,00
SP ₃ -SP ₄			-32,64	-35,67, -29,59	0,00	0,00
VSL	4,47±2,86	64,01				
SP ₁ -SP ₂			-0,10	-0,31, 0,10	0,18	1,00
SP ₁ -SP ₃			-0,04	-0,27, 0,17	0,35	1,00
SP ₁ -SP ₄			-0,02	-0,21, 0,18	0,44	1,00
SP ₂ -SP ₃			0,05	-0,15, 0,26	0,69	0,00
SP ₂ -SP ₄			0,08	-0,10, 0,26	0,80	0,00
SP ₃ -SP ₄			0,03	-0,17, 0,22	0,59	0,00
VAP	83,35±39,79	49,71				
SP ₁ -SP ₂			-41,54	-44,49, -38,55	0,00	0,00
SP ₁ -SP ₃			24,36	21,05, 27,47	1,00	1,00
SP ₁ -SP ₄			-27,97	-30,99, -25,18	0,00	0,00
SP ₂ -SP ₃			65,89	62,87, 68,75	1,00	1,00
SP ₂ -SP ₄			13,57	10,91, 16,01	1,00	0,49
SP ₃ -SP ₄			-52,32	-55,01, -49,32	0,00	0,00
LIN	4,45±2,83	63,72				
SP ₁ -SP ₂			-0,05	-0,26, 0,14	0,31	1,00
SP ₁ -SP ₃			-0,10	-0,33, 0,11	0,18	1,00
SP ₁ -SP ₄			0,07	-0,11, 0,27	0,78	0,00
SP ₂ -SP ₃			-0,05	-0,26, 0,15	0,31	1,00
SP ₂ -SP ₄			0,12	-0,05, 0,30	0,92	0,00
SP ₃ -SP ₄			0,18	-0,02, 0,38	0,96	0,00
STR	90,76±36,09	40,54				
SP ₁ -SP ₂			-33,46	-36,10, -30,82	0,00	0,00
SP ₁ -SP ₃			19,10	16,19, 21,90	1,00	1,00
SP ₁ -SP ₄			-19,89	-22,46, -17,33	0,00	0,00
SP ₂ -SP ₃			52,55	49,95, 55,23	1,00	1,00
SP ₂ -SP ₄			13,56	11,13, 15,88	1,00	1,00
SP ₃ -SP ₄			-38,99	-41,68, -36,60	0,00	0,00
WOB	4,59±2,87	62,64				
SP ₁ -SP ₂			0,08	-0,13, 0,28	0,77	0,00
SP ₁ -SP ₃			0,04	-0,18, 0,27	0,64	0,00
SP ₁ -SP ₄			0,06	-0,13, 0,27	0,74	0,00
SP ₂ -SP ₃			-0,03	-0,24, 0,17	0,37	1,00

SP ₂ -SP ₄			-0,01	-0,20, 0,17	0,44	1,00
SP ₃ -SP ₄			0,02	-0,18, 0,23	0,58	0,00
ALH	63,52±20,85	33,42				
SP ₁ -SP ₂			-19,84	-21,34, -18,26	0,00	0,00
SP ₁ -SP ₃			10,78	9,05, 12,39	1,00	1,00
SP ₁ -SP ₄			-14,73	-16,27, -13,25	0,00	0,00
SP ₂ -SP ₃			30,62	29,09, 32,16	1,00	1,00
SP ₂ -SP ₄			5,11	3,82, 6,42	1,00	1,00
SP ₃ -SP ₄			-25,51	-26,96, -24,03	0,00	0,00
BCF	4,16±2,96	71,49				
SP ₁ -SP ₂			0,32	0,11, 0,53	1,00	0,00
SP ₁ -SP ₃			0,01	-0,22, 0,24	0,53	0,00
SP ₁ -SP ₄			0,03	-0,18, 0,23	0,62	0,00
SP ₂ -SP ₃			-0,31	-0,54, -0,10	0,00	1,00
SP ₂ -SP ₄			-0,29	-0,47, -0,09	0,00	1,00
SP ₃ -SP ₄			0,02	-0,18, 0,23	0,58	0,00

d.e: desviación estándar. ¹D: distribución marginal media posterior de la diferencia Bt-Bi, donde Bt es *Bos taurus* y Bi es *Bos indicus*; ²HPD_{95%}, región de mayor densidad posterior al 95%; ³P₀, la probabilidad de que la diferencia sea mayor que cero cuando D > 0 y la probabilidad de que la diferencia sea menor que cero cuando D < 0; ⁴R, la probabilidad de que la diferencia sea mayor que R cuando D > 0 y menor que R cuando D < 0. Número de espermatozoides = 6493. d.e: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%). VCL = velocidad curvilínea ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); VSL = velocidad rectilínea ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); VAP = velocidad promedio de la trayectoria ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$); LIN = linealidad de la progresión (%); STR = índice de rectitud (%); WOB = oscilación de la trayectoria (%); ALH = amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μm); BCF = frecuencia de entrecruzamiento (Hz).

Las subpoblaciones de espermatozoides deben evaluarse a partir de un criterio de utilidad en relación con la importancia biológica. Este es el primer estudio en el que se ha llevado a cabo una evaluación de la relevancia estadística de las subpoblaciones en eyaculados. Los resultados bayesianos indicaron que SP₁, SP₂ y SP₃ eran diferentes y que estas diferencias eran relevantes. La relevancia biológica de estas subpoblaciones puede conducir a una invalidación de la definición clásica del grupo o subpoblación de espermatozoides. La relevancia puede relacionarse con la fertilidad. La variabilidad de los espermatozoides en una eyaculación puede correlacionarse con la variabilidad de la fertilidad entre los hombres (Holt y Van Look 2004), y una menor movilidad también puede asociarse con tasas de fertilidad más bajas (Yániz *et al.* 2018). Si la velocidad es un componente principal que explica la varianza cinemática de las subpoblaciones de espermatozoides, y la velocidad puede relacionarse con la fertilidad, entonces debemos aclarar aún más la relevancia biológica de estas subpoblaciones.

La distinción entre especies y entre razas debe tenerse en cuenta y también implementarse en este tipo de análisis. Estudios anteriores han considerado estas distinciones y las comparaciones realizadas entre especies con respecto a la cinemática (Bompart *et al.* 2019) y la morfología han identificado diferencias (Beletti *et al.* 2005). El hecho de que existan diferencias entre las especies sugiere que se pueden requerir nuevos enfoques cuando se maneja la eyaculación. En cualquier caso, estas diferencias deben ser relevantes desde el punto de vista biológico y las diferencias estadísticas pueden no ser suficientes como criterio. Por lo tanto, es necesario examinar más a fondo la cuestión de la relevancia biológica en el análisis de las subpoblaciones de esperma y desarrollar medios para explorar el significado biológico de los conjuntos de datos de células agrupadas que se derivan de análisis automáticos de semen.

5 CONCLUSIONES

Los parámetros cinéticos de los espermatozoides de toro pueden ser afectados por el tipo de cámara utilizada y el tiempo transcurrido tras la carga inicial. El tipo de diluyente y la temperatura de dilución condicionan las variables cinéticas de los espermatozoides.

La existencia de subpoblaciones espermáticas en el eyaculado se condiciona por factores externos al momento de realizar los análisis por lo que habría que determinar las condiciones óptimas de evaluación por CASA-Mot para establecer la relevancia biológica de éstas y que los resultados sean comparables en el tiempo. Los nuevos enfoques para el análisis de subpoblaciones cinemáticas de esperma pueden no tener un significado biológico directo y, por lo tanto, la relevancia biológica de las subpoblaciones de esperma debe ser reevaluada.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Abaigar, T; Holt, W; Harrison, R; del Barrio, G. 1999. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biology of reproduction* 60(1):32-41.
- Aggarwal, R; Ahlawat, S; Kumar, Y; Panwar, P; Singh, K; Bhargava, M. 2007. Biometry of frozen–thawed sperm from eight breeds of Indian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 68(4):682-686. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.03.028>.
- Altman, N; Krzywinski, M. 2017. Points of Significance: Clustering. s.l., Nature Publishing Group, vol.14. p. 545-546 DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.4299>.
- Álvarez, M; García-Macías, V; Martínez-Pastor, F; Martínez, F; Borragán, S; Mata, M; Garde, J; Anel, L; De Paz, P. 2008. Effects of cryopreservation on head morphometry and its relation with chromatin status in brown bear (*Ursus arctos*) spermatozoa. *Theriogenology* 70(9):1498-1506. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.097>.
- Amann, R; Waberski, D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81(1):5-17.e3. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.theriogenology.2013.09.004>.
- Amann, R. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *Journal of andrology* 10(2):89-98.
- Arieta, R; Fernández, J; Menchaca, J. 2014. Métodos de extracción de semen bovino. *Revista Electrónica de Veterinaria. REDVET.* 15(5):1-8.
- Arslan, H; Herrera, C; Malama, E; Siuda, M; Leiding, C; Bollwein, H. 2019. “Effect of the addition of different catalase concentrations to a TRIS-egg yolk extender on quality and *in vitro* fertilization rate of frozen-thawed bull sperm” (en línea). *Cryobiology* 91(July):40-52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.10.200>.

- Ávalos, A; González, J; Vargas, A; Herrera, J. 2018. Recolección y manipulación seminal *in vitro*. s.l., s.e. 58 p.
- Awad, M. 2011. Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa (en línea). *Animal Reproduction Science* 123(3-4):157-162. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.01.003>.
- Baracaldo, M; Barth, A; Bertrand, W. 2007. Steps for Freezing Bovine Semen : From Semen Collection to the Liquid Nitrogen Tank (en línea). *IVIS Reviews in Veterinary Medicine* IVIS Ed :1-11. Disponible en www.ivis.org.
- Barszcz, K; Wiesetek, D; Wasowicz, M; Kupczynska, M. 2012. Bull Semen Collection and Analysis for Artificial Insemination. *Journal of Agricultural Science* 4(3):1-10. DOI: <https://doi.org/10.5539/jas.v4n3p1>.
- Beletti, M; Costa, L; Viana, M. 2005. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. *Animal Reproduction Science* 85(1-2):105-116. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.019>.
- Betancourt, L; Bernal, J. 2017. Comparación del efecto de los porcentajes de inclusion de proteína en el diluyente de Triladyl sobre la motilidad individual y vitalidad espermática en el semen bovino criopreservado (en línea). s.l., s.e. 46 p. Disponible en <http://repositorio.ucundinamarca.edu.co:8080/xmlui/handle/123456789/859>.
- Bompart, D; García-Molina, A; Valverde, A; Caldeira, C; Yániz, J; Núñez de Murga, M; Soler, C. 2018. CASA-Mot technology: how results are affected by the frame rate and counting chamber. *Reproduction, Fertility and Development* 30(6):810-819. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD17551>.
- Bompart, D; Vázquez, R; Gómez, R; Valverde, A; Roldán, E; García-Molina, A; Soler, C. 2019. Combined effects of type and depth of counting chamber, and rate of image frame capture, on bull sperm motility and kinematics. *Animal Reproduction Science* :106169. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106169>.

- Boryshpolets, S; Kowalski, R; Dietrich, G; Dzyuba, B; Ciereszko, A. 2013. Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology* 80(7):758-765. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.06.019>.
- Bravo, J; Montanero, J; Calero, R; Roy, T. 2011. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams. *Animal Reproduction Science* 129(1):22-29. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.10.005>.
- Brinsden, P. 2011. The evolution of ART. In *Donnez, J; Kim, SS (eds.)*. Cambridge, Cambridge University Press. p. 1-10 DOI: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511921896.004>.
- Broekhuijse, M; Šostarić, E; Feitsma, H; Gadella, B. 2011. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. *Theriogenology* 76(8):1473-1486. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.040>.
- Büyükleblebici, S; Tuncer, P; Bucak, M; Eken, A; Sariözkan, S; Taşdemir, U; Endirlik, B. 2014. Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. *Animal Reproduction Science* 150(3-4):77-83. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.006>.
- Caldeira, C; Hernández-Ibáñez, S; Valverde, A; Martin, P; Herranz-Jusado, J; Gallego, V; Asturiano, J; Dzyuba, B; Pšenička, M; Soler, C. 2019. Standardization of sperm motility analysis by using CASA-Mot for Atlantic salmon (*Salmo salar*), European eel (*Anguilla anguilla*) and Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Aquaculture* 502:223-231. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.001>.
- Carballo, D; Canseco, R; García, R; Montiel, F. 2009. Comparacion de dos diluyentes comerciales para criopreservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo. s.l., s.e. p. 7.

- Castellini, C; Dal Bosco, A; Ruggeri, S; Collodel, G. 2011. What is the best frame rate for evaluation of sperm motility in different species by computer-assisted sperm analysis? *Fertility and Sterility* 96(1):24-27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.096>.
- Castellini, C; Dal Bosco, A; Ruggeri, S; Collodel, G. 2011. What is the best frame rate for evaluation of sperm motility in different species by computer-assisted sperm analysis? *Fertility and Sterility* 96(1):24-27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.096>.
- Chamberland, A; Fournier, V; Tardif, S; Sirard, MA; Sullivan, R; Bailey, JL. 2001. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology* 55(3):823-35.
- Chantler, E; Abraham-Peskir, J; Roberts, C. 2004. Consistent presence of two normally distributed sperm subpopulations within normozoospermic human semen: a kinematic study. *International Journal of Andrology* 27(6):350-359. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2004.00498.x>.
- Chantler, E; Abraham-Peskir, J; Roberts, C. 2004. Consistent presence of two normally distributed sperm subpopulations within normozoospermic human semen: a kinematic study. *International Journal of Andrology* 27(6):350-359. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2004.00498.x>.
- Contri, A; Valorz, C; Faustini, M; Wegher, L; Carluccio, A. 2010. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology* 74(3):424-435. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.theriogenology.2010.02.025>.
- Correa, Y; Núñez, D; Marín, I; Tovar, J; Ruíz, A. 2005. Detención de la espermatogénesis. *Ginecol Obstet Mex* 73:500-508.
- Curbelo, M; Rodríguez, Z. 2013. Relevamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en Uruguay. s.l., s.e. 32 p.
- den Daas, N. 1992. Laboratory assessment of semen characteristics. *Animal*

- Reproduction Science 28(1-4):87-94. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(92\)90095-U](https://doi.org/10.1016/0378-4320(92)90095-U).
- Davis, RO; Drobnis, EZ; Overstreet, JW. 1995. Application of multivariate cluster, discriminate function, and stepwise regression analyses to variable selection and predictive modeling of sperm cryosurvival. *Fertility and sterility* 63(5):1051-7. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)57547-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)57547-5).
- Dorado, J; Molina, I; Muñoz-Serrano, A; Hidalgo, M. 2010. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Florida goats. *Theriogenology* 74(5):795-804. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.004>.
- Douglas-Hamilton, DH; Smith, NG; Kuster, CE; Vermeiden, JPW; Althouse, GC. 2005. Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. *Journal of andrology* 26(1):115-22.
- Egeberg, DL; Holm, T; Holm, J; Skakkebaek, NE; Juul, A; Jørgensen, N; Almstrup, K. 2017. Clinica Chimica Acta Validation of image cytometry for sperm concentration measurement: Comparison with manual counting of 4010 human semen samples. *Clinica Chimica Acta* 468:114-119. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.02.014>.
- Erb, RE; Andrews, FN; Hilton, JH. 1942. Seasonal Variation in Semen Quality of the Dairy Bull. *Journal of Dairy Science* 25(9):815-826. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(42\)95343-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(42)95343-8).
- Espinosa, WD. 2012. "Efecto de la adición de un surfactante natural (aloe vera) al diluyente triladyl® para crioconservación de semen bovino en toros reproductores de agso-genes, quito-pichincha. *Journal of Al-Nahrain University Science* 15(2):22-30. DOI: <https://doi.org/10.22401/jnus.15.2.31>.
- Esteso, M; Fernández-Santos, M; Soler, A; Montoro, V; Martínez-Pastor, F; Garde, J. 2009. Identification of Sperm-Head Morphometric Subpopulations in Iberian Red Deer Epididymal Sperm Samples. *Reproduction in Domestic Animals* 44(2):206-211. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.01029.x>.

- Farrell, P; Trouern-Trend, V; Foote, RH; Douglas-Hamilton, D. 1995. Repeatability of measurements on human, rabbit, and bull sperm by computer-assisted sperm analysis when comparing individual fields and means of 12 fields (en línea). *Fertility and Sterility* 64(1):208-210. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)57685-7](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)57685-7).
- Ferraz, M; Morató, R; Yeste, M; Arcarons, N; Pena, AI; Tamargo, C; Hidalgo, CO; Muiño, R; Mogas, T. 2014. Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to invitro sperm-oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. *Theriogenology* 81(8):1067-1072. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.033>.
- Flores, E; Taberner, E; Rivera, MM; Peña, A; Rigau, T; Miró, J; Rodríguez-Gil, JE. 2008. Effects of freezing/thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. *Theriogenology* 70(6):936-945. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.056>.
- Flowers, W. 2009. Selection for boar fertility and semen quality--the way ahead. *Society of Reproduction and Fertility supplement* 66:66-78.
- Foote, RH. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science* 80(E-suppl_2):1-10. DOI: https://doi.org/10.2527/animalsci2002.80E-Suppl_21a.
- Gallagher, MT; Smith, DJ; Kirkman-Brown, JC. 2018. CASA: tracking the past and plotting the future. *Reproduction, Fertility and Development* 30(6):867-874. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD17420>.
- Del Gallego, R; Sadeghi, S; Blasco, E; Soler, C; Yániz, JL; Silvestre, MA. 2017. Effect of chamber characteristics, loading and analysis time on motility and kinetic variables analysed with the CASA-mot system in goat sperm (en línea). *Animal Reproduction Science* 177:97-104. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.12.010>.
- Gallego, V; Asturiano, JF. 2018. Sperm motility in fish: Technical applications and perspectives through CASA-Mot systems. *Reproduction, Fertility and*

- Development 30(6):820-832. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD17460>.
- Gallego, V; Herranz-Jusado, JG; Rozenfeld, C; Pérez, L; Asturiano, JF. 2018. Subjective and objective assessment of fish sperm motility: when the technique and technicians matter. *Fish Physiology and Biochemistry* :1-11. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0505-1>.
- Gallego, V; Vílchez, MC; Peñaranda, DS; Pérez, L; Herráez, MP; Asturiano, JF; Martínez-Pastor, F. 2015. Subpopulation pattern of eel spermatozoa is affected by post-activation time, hormonal treatment and the thermal regimen. *Reproduction, Fertility and Development* 27(3):529-543. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD13198>.
- García-Herreros, M. 2016. Sperm subpopulations in avian species: a comparative study between the rooster (*Gallus domesticus*) and Guinea fowl (*Numida meleagris*). *Asian Journal of Andrology* 18(6):889-894. DOI: <https://doi.org/10.4103/1008-682X.188448>.
- Geyer, C. 1992. Practical Markov Chain Monte Carlo. *Statistical Science* 7(4):473-483. DOI: <https://doi.org/10.1214/SS/1177011137>.
- Gil, J. 1999. Evaluation of post-thaw sperm quality in the bull and ram with special emphasis on semen processing. s.l., Swedish University of Agricultural Sciences. 29 p.
- Gillan, L; Evans, G; Maxwell, WMC. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63(2):445-457. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.024>.
- Gloria, A; Carluccio, A; Contri, A; Wegher, L; Valorz, C; Robbe, D. 2013. The effect of the chamber on kinetic results in cryopreserved bull spermatozoa. *Andrology* 1(6):879-885. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00121.x>.
- Guataquira, L. (2019). Evaluación *in vitro* del semen en bovinos. s.l., Universidad Cooperativa de Colombia, Facultad de Ciencias de la Salud, Medicina Veterinaria y Zootecnia, Villavicencio.

- Hahn, K; Failing, K; Wehrend, A. 2019. Effect of temperature and time after collection on buck sperm quality. *BMC Veterinary Research* 15(1):1-7. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2135-y>.
- Hamamah, S; Gatti, JL. 1998. Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. *Human Reproduction* 13 Suppl 4:20-30.
- Hansen, PJ. 2014. Current and Future Assisted Reproductive Technologies for Mammalian Farm Animals. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 752:1-22. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8887-3_1.
- Harrison, RAP. 1996. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *In* *Reproduction, Fertility and Development*. s.l., CSIRO. p. 581-594 DOI: <https://doi.org/10.1071/RD9960581>.
- Hernández-Caravaca, I; Llamas-López, PJ; Izquierdo-Rico, MJ; Soriano-Úbeda, C; Matás, C; Gardón, JC; García-Vázquez, FA. 2017. Optimization of post-cervical artificial insemination in gilts: Effect of cervical relaxation procedures and catheter type. *Theriogenology* 90:147-152. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.theriogenology.2016.11.027>.
- Holt, C; Holt, R; Moore, H; Reed, H; Curnock, R. 1997. Objectively Correlate Results Measured Boar Sperm Motility With the Outcomes of Two Fertility Trials. *Journal of Andrology* 18(3):312-323.
- Holt, C; Holt, W; Moore, H. 1996. Choice of operating conditions to minimize sperm subpopulation sampling bias in the assessment of boar semen by computer-assisted semen analysis. *Journal of Andrology* 17(5):587-596. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1996.tb01837.x>.
- Holt, W; Van Look, K. 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction* 127(5):527-535. DOI: <https://doi.org/10.1530/rep.1.00134>.
- Holt, W; Moore, H; Hillier, S. 1985. Computer-assisted measurement of sperm

swimming speed in human semen: correlation of results with *in vitro* fertilization assays**Supported by Medical Research Council grant G8203374SB. Fertility and Sterility 44(1):112-119. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)48687-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)48687-5).

Holt, W V.; Cummins, JM; Soler, C. 2018. Computer-assisted sperm analysis and reproductive science; a gift for understanding gamete biology from multidisciplinary perspectives. Reproduction, Fertility and Development 30(6):iii-v. DOI: https://doi.org/10.1071/RDv30n6_FO.

Holt, W V; Van Look, KJW. 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. Reproduction 127(5):527-535. DOI: <https://doi.org/10.1530/rep.1.00134>.

Holt, W V; O'Brien, J; Abaigar, T. 2007. Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. Reproduction, fertility, and development 19(6):709-18.

Holt, W V; Palomo, M. 1996. Optimization of a continuous real-time computerized semen analysis system for ram sperm motility assessment, and evaluation of four methods of semen preparation. Reproduction, Fertility and Development 8(2):219. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD9960219>.

Hoogewijs, MK; De Vlieghe, SP; Govaere, JL; De Schauwer, C; De Kruif, A; Van Soom, A. 2012. Influence of counting chamber type on CASA outcomes of equine semen analysis. Equine Veterinary Journal 44(5):542-549. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2011.00523.x>.

van der Horst, G; Maree, L; du Plessis, S. 2018. Current perspectives of CASA applications in diverse mammalian spermatozoa. Reproduction, Fertility and Development 30(6):875-888. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD17468>.

Hyakutake, T; Mori, K; Sato, K. 2018. Effects of surrounding fluid on motility of hyperactivated bovine sperm. Journal of Biomechanics 71(February):183-189. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2018.02.009>.

- Ibănescu, I; Leiding, C; Bollwein, H. 2018. Cluster analysis reveals seasonal variation of sperm subpopulations in extended boar semen. *Journal of Reproduction and Development* 64(1):33-39. DOI: <https://doi.org/10.1262/jrd.2017-083>.
- Ibănescu, I; Leiding, C; Bollwein, H. 2018. Cluster analysis reveals seasonal variation of sperm subpopulations in extended boar semen. *Journal of Reproduction and Development* 64(1):33-39. DOI: <https://doi.org/10.1262/jrd.2017-083>.
- Ibanescu, I; Siuda, M; Bollwein, H. 2020. Motile sperm subpopulations in bull semen using different clustering approaches – Associations with flow cytometric sperm characteristics and fertility. *Animal Reproduction Science* 215:106329. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106329>.
- Isengildina-Massa, O; Cao, X; Karali, B; Irwin, SH; Adjemian, M; Johansson, RC. 2020. When does USDA information have the most impact on crop and livestock markets? *Journal of Commodity Markets* :100137. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcomm.2020.100137>.
- Kaiser, HF. 1958. The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. *Psychometrika* 23:187-200.
- Kathiravan, P; Kalatharan, J; Karthikeya, G; Kadirvel, K; Rengarajan, G. 2011. Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System - A Review. *Reproduction in Domestic Animals* 46(1):165-172. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01603.x>.
- Katz, DF; Davis, R. 1987. Automatic analysis of human sperm motion. *Journal of Andrology* 8(3):170-81.
- Kaufman, L; Rousseeuw, P. 2005. Finding groups in data : an introduction to cluster analysis. New Jersey, USA, Wiley. 342 p. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470316801>.
- Kaufman, L; Rousseeuw, PJ. 2005. Finding groups in data : an introduction to

- cluster analysis. New Jersey, USA, Wiley. 342 p. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470316801>.
- Kay, VJ; Robertson, L. 1998. Hyperactivated motility of human spermatozoa: a review of physiological function and application in assisted reproduction. *Human reproduction update* 4(6):776-86.
- Lawrence, T; Fowler, V; Novakofski, J. 2012. *Gametes Fertilization and Embryonic Growth in Mammals*. UK, CABI. p. 368.
- Ledesma, A; Zalazar, L; Fernández-Alegre, E; Hozbor, F; Cesari, A; Martínez-Pastor, F. 2017. Seminal plasma proteins modify the distribution of sperm subpopulations in cryopreserved semen of rams with lesser fertility. *Animal Reproduction Science* 184:44-50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.06.015>.
- Lenz, RW; Kjelland, ME; VonderHaar, K; Swannack, TM; Moreno, JF. 2011. A comparison of bovine seminal quality assessments using different viewing chambers with a computer-assisted semen analyzer. *Journal of Animal Science* 89(2):383-388. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3056>.
- López, LXR; Quiroga, CFP. 2015. La vitamina A: reguladora de la espermatogénesis. *Revista Investigación en Salud Universidad de Boyacá* 2(1):63. DOI: <https://doi.org/10.24267/23897325.130>.
- LOVELOCK, JE; POLGE, C. 1954. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. *The Biochemical journal* 58(4):618-622. DOI: <https://doi.org/10.1042/bj0580618>.
- Martinez-Alborcia, MJ; Valverde, A; Parrilla, I; Vazquez, JM; Martinez, EA; Roca, J. 2012. Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from Boar Ejaculate. *PLoS ONE* 7(5). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036550>.
- Martinez-Pastor, F; Garcia-Macias, V; Alvarez, M; Herraes, P; Anel, L; de Paz, P. 2005. Sperm Subpopulations in Iberian Red Deer Epididymal Sperm and Their

- Changes Through the Cryopreservation Process¹. *Biology of Reproduction* 72(2):316-327. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.032730>.
- Martinez-Pastor, F; Garcia-Macias, V; Alvarez, M; Herraез, P; Anel, L; de Paz, P. 2005. Sperm Subpopulations in Iberian Red Deer Epididymal Sperm and Their Changes Through the Cryopreservation Process¹. *Biology of Reproduction* 72(2):316-327. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.032730>.
- Martínez-Pastor, F; Tizado, E; Garde, J; Anel, L; de Paz, P. 2011. Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology* 75(5):783-795. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.theriogenology.2010.11.034>.
- Martínez-Pastor, F; Tizado, EJ; Garde, JJ; Anel, L; de Paz, P. 2011. Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology* 75(5):783-795. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.theriogenology.2010.11.034>.
- Menegassi, SRO; Barcellos, JOJ; Dias, EA; Koetz, C; Pereira, GR; Peripolli, V; McManus, C; Canozzi, MEA; Lopes, FG. 2015. Scrotal infrared digital thermography as a predictor of seasonal effects on sperm traits in Braford bulls. *International Journal of Biometeorology* 59(3):357-364. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00484-014-0847-z>.
- Menegatti Zoca, S; Shafii, B; Price, W; Utt, M; Harstine, B; McDonald, K; Cruppe, L; DeJarnette, M; Peters, L; Moraes Vasconcelos, JL; Dalton, J. 2020. Angus sire field fertility and *in vitro* sperm characteristics following use of different sperm insemination doses in Brazilian beef cattle. *Theriogenology* 147(xxxx):146-153. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.021>.
- Morillo, M; Salazar, S; Castillo, E. (2012). Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. Maracay, VE, s.e.
- Mortimer, D; Mortimer, S; Horst, G der. 2015. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian Journal of Andrology* 17(4). DOI: <https://doi.org/10.4103/1008-682X.154312>.

- Mortimer, S. 2000. CASA—Practical Aspects. *Journal of Andrology* 21(4):515-524. DOI: <https://doi.org/10.1002/J.1939-4640.2000.TB02116.X>.
- Mortimer, ST; Van Der Horst, G; Mortimer, D. 2015. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian Journal of Andrology* 17(4):545-553. DOI: <https://doi.org/10.4103/1008-682X.154312>.
- Muino, R. 2008. Universidade de santiago de compostela facultade de veterinaria Departamento de Patoloxía Animal. s.l., s.e.:11/157.
- Muiño, R; Peña, AI; Rodríguez, A; Tamargo, C; Hidalgo, CO. 2009. Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. *Theriogenology* 72(6):860-868. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.06.009>.
- Muiño, R; Rivera, MM; Rigau, T; Rodriguez-Gil, JE; Peña, AI. 2008. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *Animal Reproduction Science* 109(1-4):50-64. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.028>.
- Muiño, R; Tamargo, C; Hidalgo, CO; Peña, AI. 2007. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Animal Reproduction Science* 109(1-4):27-39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.10.007>.
- Murphy, C; Holden, S; Murphy, E; Cromie, A; Lonergan, P; Fair, S. 2016. The impact of storage temperature and sperm number on the fertility of liquid-stored bull semen. *Reproduction, Fertility and Development* 28(9):1349-1359. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD14369>.
- Murphy, E; Eivers, B; O'Meara, C; Lonergan, P; Fair, S. 2018. Effect of increasing equilibration time of diluted bull semen up to 72 h prior to freezing on sperm quality parameters and calving rate following artificial insemination. *Theriogenology* 108:217-222. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.018>.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.034>.

Murtagh, F; Legendre, P. 2014. Ward's Hierarchical Agglomerative Clustering Method: Which Algorithms Implement Ward's Criterion? *Journal of Classification* 31(3):274-295. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00357-014-9161-z>.

Murtagh, F; Legendre, P. 2014. Ward's Hierarchical Agglomerative Clustering Method: Which Algorithms Implement Ward's Criterion? *Journal of Classification* 31(3):274-295. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00357-014-9161-z>.

Neill, JM; Olds-Clarke, P. 1987. A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. *Gamete Research* 18(2):121-140. DOI: <https://doi.org/10.1002/mrd.1120180204>.

Núñez-Martínez, I; Moran, J; Peña, F. 2006. A Three-Step Statistical Procedure to Identify Sperm Kinematic Subpopulations in Canine Ejaculates: Changes after Cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals* 41(5):408-415. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00685.x>.

_____. 2007. Sperm indexes obtained using computer-assisted morphometry provide a forecast of the freezability of canine sperm. *International Journal of Andrology* 30(3):182-189. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00743.x>.

O'Hara, L; Hanrahan, JP; Richardson, L; Donovan, A; Fair, S; Evans, ACO; Lonergan, P. 2010. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology* 73(4):541-549. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.009>.

Olivera, M; Agr, S; Ruiz, T; Tarazona, A; Giraldo, C. 2006. ENSAYO El espermatozoide , desde la eyaculación hasta la fertilización. 19:426-436.

Ortega-Ferrusola, C; Macías García, B; Suárez Rama, V; Gallardo-Bolaños, J; González-Fernández, L; Tapia, J; Rodríguez-Martínez, H; Peña, F. 2009. Identification of Sperm Subpopulations in Stallion Ejaculates: Changes after

- Cryopreservation and Comparison with Traditional Statistics. *Reproduction in Domestic Animals* 44(3):419-423. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01097.x>.
- Ortíz, E; Uría, E; Silva-olivares, A. 2003. Estudio de la ultraestructura de la espermatogénesis de *Anadara tuberculosa* (Sowerbi 1833) (Mollusca: Pelecipoda:Arcidae). *Hidrobiológica* 13(2):145-150.
- Páez, E; Corredor, E. 2014. Evaluación de la aptitud reproductiva del toro Breeding Soundness Evaluation of the Bull. *Ciencias y Agricultura* 11(2):49-59.
- Palacín, I; Vicente-Fiel, S; Santolaria, P; Yániz, J. 2013. Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram. *Small Ruminant Research* 112(1-3):128-135. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.smallrumres.2012.12.014>.
- Palmer, CW; Amundson, SD; Brito, LFC; Waldner, CL; Barth, AD. 2004. Use of oxytocin and cloprostenol to facilitate semen collection by electroejaculation or transrectal massage in bulls. *Animal Reproduction Science* 80(3-4):213-223. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.07.003>.
- Palomino, S. 2019. Repositorio institucional unasam (en línea). s.l., s.e. 83 p. Disponible en http://repositorio.unasam.edu.pe/bitstream/handle/UNASAM/3263/T033_31680721_M.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Patil, S; Kumar, P; Singh, G; Bala, R; Jerome, A; Patil, CS; Kumar, D; Singh, S; Sharma, RK. 2020. 'Semen dilution effect' on sperm variables and conception rate in buffalo. *Animal Reproduction Science* 214:106304. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106304>.
- Peña, A; Adán, S; Quintela, L; Becerra, J; Herradón, P. 2018. Relationship between motile sperm subpopulations identified in frozen-thawed dog semen samples and their ability to bind to the zona pellucida of canine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals* 53:14-22. DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.13349>.
- Peña, F; Saravia, F; García-Herreros, M; Núñez-Martínez, I; Tapia, J; Johannisson,

- A; Wallgren, M; Rodríguez-Martínez, H. 2005. Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality. *Journal of Andrology* 26(6):716-723. DOI: <https://doi.org/10.2164/jandrol.05030>.
- Peng, N; Zou, X; Li, L. 2015. Comparison of different counting chambers using a computer-assisted semen analyzer. *Systems biology in reproductive medicine* 61(5):307-13. DOI: <https://doi.org/10.3109/19396368.2015.1063175>.
- Pursel, V; Johnson, L. 1975. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci* 40(1):99-102.
- Quintero-Moreno, A; Mayorga-torres, BJM; Maya, WDC. 2017. Semen Analysis As a Tool To Predict the Reproductive Potential in Bulls. *Journal of Veterinary Andrology* 2((1)):8.
- Quintero-Moreno, A; Miró, J; Teresa Rigau, A; Rodríguez-Gil, JE. 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 59(9):1973-90.
- Quintero-Moreno, A; Rigau, T; Rodríguez-Gil, J. 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(3):312-319. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00785.x>.
- Ramió, L; Rivera, MM; Ramírez, A; Concha, II; Peña, A; Rigau, T; Rodríguez-Gil, JE. 2008. Dynamics of motile-sperm subpopulation structure in boar ejaculates subjected to «*in vitro*» capacitation and further «*in vitro*» acrosome reaction. *Theriogenology* 69(4):501-512. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.10.021>.
- Rastegarnia, A; Shahverdi, A; Topraggaleh, TR; Ebrahimi, B; Shafipour, V. 2013. Effect of different thawing rates on post-thaw viability, Kinematic parameters and chromatin structure of buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Cell Journal* 14(4):306-313.

- Rijsselaere, T; Van Soom, A; Maes, D; Kruif, A de. 2003. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology* 60(8):1553-1568. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00171-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00171-7).
- Rijsselaere, T; Van Soom, A; Tanghe, S; Coryn, M; Maes, D; de Kruif, A. 2005. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. *Theriogenology* 64(3):706-719. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.theriogenology.2005.05.021>.
- Rodríguez-Martínez, H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: Still Utopia? *In* *Reproduction in Domestic Animals*. s.l., s.e. p. 312-318 DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00436.x>.
- Rubio-Guillén, J; González, D; Garde, J; Estes, M; Fernández-Santos, M; Rodríguez-Gil, J; Madrid-Bury, N; Quintero-Moreno, A. 2007. Effects of Cryopreservation on Bull Spermatozoa Distribution in Morphometrically Distinct Subpopulations. *Reproduction in Domestic Animals* 42(4):354-357. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00788.x>.
- Segré, G; Silberberg, A. 1962. Behavior of macroscopic rigid spheres in Poiseuille flow. Part 2: experiment and interpretation. *Journal of Fluid Mechanics* 14(1958):136-157. DOI: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Shi, L; Nascimento, J; Berns, M; Botvinick, E. 2006. Computer-based tracking of single sperm. *Journal of Biomedical Optics* 11(5):054009. DOI: <https://doi.org/10.1117/1.2357735>.
- Sieme, H; Oldenhof, H. 2015. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Methods in Molecular Biology* 1257:277-287. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5_10.
- Simonik, O; Sichtar, J; Krejcarikova, A; Rajmon, R; Stadnik, L; Beran, J; Dolezalova, M; Biniova, Z. 2015. Computer assisted sperm analysis – the relationship to bull field fertility, possible errors and their impact on outputs: a review. *Indian J. Anim. Sci.* 85:3-11.

- Soler, C; Alambiaga, A; Martí, MA; García-Molina, A; Valverde, A; Contell, J; Campos, M. 2017. Dog sperm head morphometry: its diversity and evolution. *Asian journal of andrology* 19(2):149-153. DOI: <https://doi.org/10.4103/1008-682X.189207>.
- Soler, C; Carmen Fuentes, M del; Sancho, M; García, A; de Murga, MN; de Murga, JN. 2012. Efecto de la cámara de recuento utilizada sobre los parámetros espermáticos, analizados con el ISASv1® (en línea). *Revista Internacional de Andrología* 10(4):132-138. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1698-031X\(12\)70069-9](https://doi.org/10.1016/S1698-031X(12)70069-9).
- Soler, C; Contell, J; Bori, L; Sancho, M; García-Molina, A; Valverde, A; Segarvall, J. 2017. Sperm kinematic, head morphometric and kinetic-morphometric subpopulations in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Asian Journal of Andrology* 19(2):154-159. DOI: <https://doi.org/10.4103/1008-682X.188445>.
- Soler, C; Cooper, T; Valverde, A; Yániz, J. 2016. Afterword to Sperm morphometrics today and tomorrow special issue in *Asian Journal of Andrology*. *Asian Journal of Andrology* 18(6):895-897. DOI: <https://doi.org/10.4103/1008-682X.188451>.
- Soler, C; Fuentes, M; Sancho, M; García, A; Núñez de Murga, M; Núñez de Murga, J. 2012. Effect of counting chamber on seminal parameters, analyzing with the ISASv1®. *Revista Internacional de Andrología* 10(4):132-138. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1698-031X\(12\)70069-9](https://doi.org/10.1016/S1698-031X(12)70069-9).
- Soler, C; García, A; Contell, J; Segervall, J; Sancho, M. 2014. Kinematics and Subpopulations' Structure Definition of Blue Fox (*Alopex lagopus*) Sperm Motility using the ISAS® V1 CASA System. *Reproduction in Domestic Animals* 49(4):560-567. DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.12310>.
- Soler, C; Picazo-Bueno, J; Micó, V; Valverde, A; Bompart, D; Blasco, FJ; Lvarez, JG; García-Molina, A. 2018. Effect of counting chamber depth on the accuracy of lensless microscopy for the assessment of boar sperm motility. *Reproduction, Fertility and Development* 30(6):924-934. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD17467>.

- Soler, C; Valverde, A; Bompard, D; Fereidounfar, S; Sancho, M; Yániz, J; Garcia-Molina, A; Korneenko-Zhilyaev, Y. 2017. New methods of semen analysis by casa. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya (Agricultural Biology)* 52(2). DOI: <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.2.232eng>.
- Sorensen, D; Gianola, D. 2002. *Likelihood, Bayesian, and MCMC Methods in Quantitative Genetics*. New York, NY, Springer New York, (Statistics for Biology and Health). DOI: <https://doi.org/10.1007/b98952>.
- Spencer, N. 2013. *Essentials of multivariate data analysis*. New York, NY, USA, Chapman and Hall/CRC Press. 172 p. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/b16344>.
- Spencer, NH. 2013. *Essentials of multivariate data analysis*. New York, NY, USA, Chapman and Hall/CRC Press. 172 p. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/b16344>.
- Storey, BT. 2008. Mammalian sperm metabolism: Oxygen and sugar, friend and foe. *International Journal of Developmental Biology* 52(5-6):427-437. DOI: <https://doi.org/10.1387/ijdb.072522bs>.
- Sun, Z; Scherer, L; Tukker, A; Behrens, P. 2019. Linking global crop and livestock consumption to local production hotspots. *Global Food Security* . DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2019.09.008>.
- Sztejn, JM; Takeo, T; Nakagata, N. 2018. History of cryobiology, with special emphasis in evolution of mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 82:57-63. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2018.04.008>.
- Talwar, P; Hayatnagarkar, S. 2015. Sperm function test. *Journal of human reproductive sciences* 8(2):61-9. DOI: <https://doi.org/10.4103/0974-1208.158588>.
- Tan, P; Steinbach, M; Karpatne, A; Kumar, V. 2018. *Cluster Analysis: Basic Concepts and Algorithms*. s.l., Pearson. p. 125-146.
- Tash, JS; Bracho, GE. 1998. Identification of Phosphoproteins Coupled to Initiation

- of Motility in Live Epididymal Mouse Sperm. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 251(2):557-563. DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9516>.
- Thijssen, A; Klerkx, E; Huyser, C; Bosmans, E; Campo, R; Ombelet, W. 2014. Influence of temperature and sperm preparation on the quality of spermatozoa (en línea). *Reproductive BioMedicine Online* 28(4):436-442. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.12.005>.
- Urbano, L; Masson, P; VerMilyea, M; Kam, M. 2017. Automatic Tracking and Motility Analysis of Human Sperm in Time-Lapse Images. *IEEE Transactions on Medical Imaging* 36(3):792-801. DOI: <https://doi.org/10.1109/TMI.2016.2630720>.
- Urbano, LF; Masson, P; VerMilyea, M; Kam, M. 2017. Automatic Tracking and Motility Analysis of Human Sperm in Time-Lapse Images. *IEEE Transactions on Medical Imaging* 36(3):792-801. DOI: <https://doi.org/10.1109/TMI.2016.2630720>.
- Valle, RR; Arakaki, PR; Carvalho, FM; Muniz, JAPC; Leal, CLV; García-Herreros, M. 2013. Identification of sperm head subpopulations with defined pleiomorphic characteristics in ejaculates of captive Goeldi's monkeys (*Callimico goeldii*). *Animal Reproduction Science* 137(1-2):93-102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.12.007>.
- Valverde, A. 2011. Influencia de los espermatozoides afuncionales en la criopreservación de los funcionales en la especie porcina. s.l., Universidad de Murcia. 117 p.
- Valverde, A; Areán, H; Fernández, A; Bompart, D; García-Molina, A; López-Viana, J; Soler, C. 2019. Combined effect of type and capture area of counting chamber and diluent on Holstein bull sperm kinematics. *Andrologia* 51(4):1-10. DOI: <https://doi.org/10.1111/and.13223>.
- Valverde, A; Arenán, H; Sancho, M; Contell, J; Yániz, J; Fernández, A; Soler, C. 2016. Morphometry and subpopulation structure of Holstein bull spermatozoa:

- variations in ejaculates and cryopreservation straws. *Asian Journal of Andrology* 18(6):851-857. DOI: <https://doi.org/10.4103/1008-682X.187579>.
- Valverde, A; Castro-Morales, O; Madrigal-Valverde, M; Soler, C. 2019. Sperm kinematics and morphometric subpopulations analysis with CASA systems: A review. s.l., Universidad de Costa Rica, vol.67. p. 1473-1487 DOI: <https://doi.org/10.15517/rbt.v67i6.35151>.
- Valverde, A; Madrigal-Valverde, M. 2018. Computer-assisted semen analysis systems in animal reproduction. *Agronomía Mesoamericana* 29(2):469-484. DOI: <https://doi.org/10.15517/ma.v29i2.29852>.
- Valverde, A; Madrigal-Valverde, M. 2019. Assessment of counting chambers on boar sperm parameters analyzed by a CASA-Mot system. *Agronomy Mesoamerican* 30(2):447-458. DOI: <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.34145>.
- Valverde, A; Madrigal-Valverde, M. 2019. Assessment of counting chambers on boar sperm parameters analyzed by a CASA-Mot system. *Agronomy Mesoamerican* 30(2):447-458. DOI: <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.34145>.
- Valverde, A; Madrigal-Valverde, M. 2019. Evaluación de cámaras de recuento sobre parámetros espermáticos de verracos analizados con un sistema CASA-Mot. *Agronomía Mesoamericana* 30(2):447-458. DOI: <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.34145>.
- Valverde, A; Madrigal-Valverde, M; Caldeira, C; Bompart, D; Núñez de Murga, J; Arnau, S; Soler, C. 2019. Effect of frame rate capture frequency on sperm kinematic parameters and subpopulation structure definition in boars, analyzed with a CASA-Mot system. *Reproduction in Domestic Animals* 54(2):167-175. DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.13320>.
- Valverde, A; Madrigal-Valverde, M; Castro-Morales, O; Gadea-Rivas, A; Johnston, S; Soler, C. 2019. Kinematic and head morphometric characterisation of spermatozoa from the Brown Caiman (*Caiman crocodilus fuscus*). *Animal Reproduction Science* 207:9-20. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.06.011>.

- Valverde, A; Madrigal-Valverde, M; Lotz, J; Bompart, D; Soler, C. 2019. Effect of video capture time on sperm kinematic parameters in breeding boars. *Livestock Science* 220:52-56.
- Vásquez, F; Soler, C; Camps, P; Valverde, A; García-Molina, A. 2016. Spermogram and sperm head morphometry assessed by multivariate cluster analysis results during adolescence (12-18 years) and the effect of varicocele. *Asian Journal of Andrology* 18(6):824-830. DOI: <https://doi.org/10.4103/1008-682X.186873>.
- Veloz, DMV. 2017. "Evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistema CASA (análisis seminal asistido por computadora) y su respuesta con la fertilidad por inseminación artificial. s.l., s.e. 1-75 p.
- Verstegen, J; Iguer-Ouada, M; Onclin, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57(1):149-179. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00664-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00664-1).
- Vesseur, PC; Kemp, B; Den Hartog, LA. 1996. Factors influencing the proportion of offspring from a second insemination in sows. *Animal Reproduction Science* 41:255-265.
- Vicente-Fiel, S; Palacín, I; Santolaria, P; Yániz, JL. 2013. A comparative study of sperm morphometric subpopulations in cattle, goat, sheep and pigs using a computer-assisted fluorescence method (CASMA-F). *Animal Reproduction Science* 139(1-4):182-189. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.04.002>.
- Walczak-Jedrzejowska, R; Wolski, J; Slowikowska-Hilczer, J. 2013. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Central European Journal of Urology* 66(1):60-67. DOI: <https://doi.org/10.5173/cej.2013.01.art19>.
- Walker, JS; Winet, H; Freund, M. 1982. A Comparison of Subjective and Objective Sperm Motility Evaluation. *Journal of Andrology* 3(3):184-192. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1982.tb00667.x>.

- Watson, PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science* 60-61:481-92.
- Yániz, J; Palacín, I; Caycho, K; Soler, C; Silvestre, M; Santolaria, P. 2018. Determining the relationship between bull sperm kinematic subpopulations and fluorescence groups using an integrated sperm quality analysis technique. *Reproduction, Fertility and Development* 30(6):919-923. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD17441>.
- Yániz, J; Palacín, I; Vicente-Fiel, S; Sánchez-Nadal, J; Santolaria, P. 2015. Sperm population structure in high and low field fertility rams. *Animal Reproduction Science* 156:128-34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.03.012>.
- Yániz, J; Soler, C; Santolaria, P. 2015. Computer assisted sperm morphometry in mammals: A review. *Animal Reproduction Science* 156:1-12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.03.002>.
- Yániz, JL; Silvestre, MA; Santolaria, P; Soler, C. 2018. CASA-Mot in mammals: An update. *Reproduction, Fertility and Development* 30(6):799-809. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD17432>.
- Yániz, JL; Soler, C; Alquézar-Baeta, C; Santolaria, P. 2017. Toward an integrative and predictive sperm quality analysis in *Bos taurus* (en línea). *Animal Reproduction Science* 181:108-114. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.03.022>.
- Yeste, M. 2016. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology* 85(1). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.047>.
- Yeste, M; Bonet, S; Rodríguez-Gil, JE; Rivera Del Álamo, MM. 2018. Evaluation of sperm motility with CASA-Mot: which factors may influence our measurements? *Reproduction, Fertility and Development* 30(6):789-798. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD17475>.

7 PRESUPUESTO

La presente tesis de Licenciatura se incluyó dentro del proyecto de investigación “**Desarrollo de la metodología de análisis integrado de semen en ganado *Bos indicus***”, financiado por la Fundación para el Fomento y Promoción de la Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Costa Rica (FITTACORI), del Ministerio de Agricultura y Ganadería, con el código F22-19, a desarrollarse durante el periodo 2019-2020. Este proyecto también se encuentra inscrito, además, ante la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) del Instituto Tecnológico de Costa Rica bajo el código No. 5402-2151-1014.

ANEXOS

ANEXO 1

KINEMATIC SUBPOPULATIONS IN BULL SPERMATOOZOA: A COMPARISON OF CLASSICAL AND BAYESIAN APPROACHES.

Luis Víquez ¹, Vinicio Barquero ¹, Carles Soler ^{2,3}, Eduardo R.S. Roldan ⁴, Anthony Valverde ^{1,*}

¹ Costa Rica Institute of Technology, School of Agronomy, San Carlos Campus, 223-21002 Alajuela, Costa Rica.

² University of Valencia, Department of Cellular Biology, Functional Biology and Physical Anthropology, Campus Burjassot, C/Dr Moliner, 50, 46100, Burjassot, Spain.

³ Proiser R+D, Av. Catedrático Agustín Escardino, 9, Building 3 (CUE), Floor 1, 46980 Paterna, Spain.

⁴ Department of Biodiversity and Evolutionary Biology, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC) Madrid, Spain.

* Corresponding author. Email: anvalverde@tec.ac.cr School of Agronomy, Costa Rica Institute of Technology, 223-21002 Alajuela, Costa Rica.

Running Title: Bull sperm subpopulations

Biology (2020) **9(6)**, 138; <https://doi.org/10.3390/biology9060138>; published online: June 26, 2020

ANEXO 2.

CONDICIONES ÓPTIMAS DE ANÁLISIS CINÉTICO DEL SEMEN FRESCO BOVINO CON UN SISTEMA CASA-MOT^{1,2}

Luis Víquez³, Vinicio Barquero³, Anthony Valverde⁴. ✉

- 1 Este trabajo formó parte de la tesis de Licenciatura en Agronomía del primer autor, desarrollada en el Laboratorio de Andrología de la Escuela de Agronomía, Campus Tecnológico Local San Carlos, del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Costa Rica.
- 2 Este trabajo formó parte del proyecto de investigación inscrito en la Vicerrectoría de Investigación y Extensión, No. 5402-2151-1014. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.
- 3 Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Escuela de Agronomía. Campus Tecnológico Local San Carlos. luisga.viquez@gmail.com; inicio1196@estudiantec.cr
- 4 Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Escuela de Agronomía, Centro de Investigación y Desarrollo en Agricultura Sostenible del Trópico Húmedo, Laboratorio de Andrología, Campus Tecnológico Local San Carlos. Apdo. Postal 223-21002 Alajuela, Costa Rica. ✉anvalverde@tec.ac.cr (autor para correspondencia)

Enviado: 05 de junio de 2020 a *Agronomía Mesoamericana*