



Condiciones óptimas de análisis cinético en semen fresco de toros Brahman con un sistema CASA-Mot¹

Optimal conditions for the kinematic analysis in fresh semen of Brahman bulls with a CASA-Mot system

Luis Víquez², Vinicio Barquero², Anthony Valverde³

- ¹ Recepción: 7 de junio, 2020. Aceptación: 4 de febrero, 2021. Este trabajo formó parte de la tesis de Licenciatura en Agronomía del primer autor, desarrollada en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Escuela de Agronomía, Campus Tecnológico Local San Carlos, del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Costa Rica. Como parte del proyecto de investigación inscrito en la Vicerrectoría de Investigación y Extensión, No. 5402-2151-1013. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.
- ² Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Escuela de Agronomía. Campus Tecnológico Local San Carlos. luisga.viquez@gmail.com (<https://orcid.org/0000-0002-8115-441X>); inicio1196@gmail.com (<https://orcid.org/0000-0003-0042-6178>).
- ³ Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Escuela de Agronomía, Centro de Investigación y Desarrollo en Agricultura Sostenible del Trópico Húmedo, Laboratorio de Reproducción Animal, Campus Tecnológico Local San Carlos. Apdo. Postal 223-21002 Alajuela, Costa Rica. anvalverde@tec.ac.cr (autor para correspondencia; <https://orcid.org/0000-0002-3191-6965>).

Resumen

Introducción. Las condiciones óptimas de análisis seminal permiten estandarizar los protocolos de evaluación. **Objetivo.** Evaluar el efecto de factores externos relacionados con el seminograma sobre las subpoblaciones espermáticas de bovinos de la raza Brahman. **Materiales y métodos.** El estudio se realizó con animales de dos fincas ganaderas de Alajuela, Costa Rica, de septiembre a diciembre de 2019. Se utilizaron diez toros Brahman que fueron electroeyaculados y el semen se diluyó 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 μ m) y Spermtrack[®] en diferentes tiempos de análisis (0, 3, 6 y 12 h). **Resultados.** 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 de cinética espermática ($p < 0,05$), excepto para el índice de rectitud (STR). La velocidad curvilínea fue mayor cuando se utilizó Andromed[®], pero hubo mayor progresividad con Androstar[®] ($p < 0,05$). Se identificaron cinco subpoblaciones espermáticas a partir de tres componentes principales: velocidad, progresividad y ondulación. La distribución de espermatozoides en las subpoblaciones varió ($p < 0,05$) según la durabilidad de la muestra y la cámara de recuento. **Conclusiones.** El tipo de diluyente, la temperatura de dilución, la cámara de recuento y el tiempo transcurrido tras la carga inicial del semen condicionaron las variables cinéticas del eyaculado. La movilidad y cinética del semen mejoró cuando se utilizaron alturas de cámara de 20 μ m y diluyente Androstar[®]. La existencia de subpoblaciones espermáticas en el eyaculado se vio afectada por el tipo de diluyente utilizado, el cual condicionó la presencia de diferentes patrones de movilidad, progresividad y ondulación de las células en las diferentes subpoblaciones dentro del eyaculado.

Palabras clave: espermatozoide, ganado, cámara de recuento, toro, reproducción animal.



Abstract

Introduction. The optimal conditions for semen analysis enable us to standardize the evaluation protocols. **Objective.** To evaluate the effect of external factors related to the semen analysis on the sperm subpopulations of the Brahman cattle. **Materials and Methods.** The study was conducted with animals from two cattle farms in Alajuela, Costa Rica, from September to December 2019. Ten Brahman bulls were used that were electroejaculated and the semen was diluted 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 ISAS[®]D4C counting chambers (10, 16 and 20 μ m) and Spermtrack[®] were used at different analysis times (0, 3, 6 and 12 h). **Results.** The Spermtrack[®] presented higher curvilinear velocity but lower linearity compared to the other counting chambers ($p < 0.05$). The samples durability was lower for all the sperm kinematic variables ($p < 0.05$), except for the straightness index (STR). Curvilinear velocity was higher when Andromed[®] was used, but there was greater progressivity with Androstar[®] ($p < 0.05$). Five sperm subpopulations were identified from three main components: velocity, progressiveness, and undulation. The distribution of spermatozoa in the subpopulations varied ($p < 0.05$) according to sample durability and counting chamber. **Conclusion.** The type of diluent, dilution temperature, counting chamber, and time elapsed after initial semen loading conditioned ejaculate kinematic variables. Semen motility and kinematics improved when chamber heights of 20 μ m and Androstar[®] diluent were used. The existence of sperm subpopulations in the ejaculate was affected by the type of extender used, which conditioned the presence of different motility patterns, progressiveness and cell undulation in the different subpopulations within the ejaculate.

Keywords: spermatozoa, livestock, counting chamber, bull, animal reproduction.

Introducción

La base de todo sistema de producción pecuario es la reproducción y la producción es el principal ingreso económico de una unidad de producción ganadera, tanto cárnica como lechera (Isengildina-Massa et al., 2020; Sun et al., 2019). La evaluación reproductiva y seminal de un toro, es fundamental para estimar la capacidad reproductiva potencial de un macho (Quintero-Moreno et al., 2017) y, por consiguiente, influye significativamente en el éxito de un programa reproductivo. Algunos estudios han demostrado que hasta el 30 % de los toros son infértiles o sub-fértiles (Páez & Corredor, 2014). 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). Existen factores que condicionan el análisis del semen, como el tipo de diluyente y la temperatura de dilución de las muestras (Awad, 2011; Büyükleblebici et al., 2014), el tipo y profundidad de la cámara de recuento (Del-Gallego et al., 2017; Gloria et al., 2013; Soler et al., 2012; Valverde & Madrigal-Valverde, 2018), la tasa de fotogramas o *frame rate* (Barquero et al., 2021; Castellini et al., 2011; Valverde et al., 2019b), el tiempo de captura de video (Boryshpolets et al., 2013; Valverde et al., 2019c) y el tiempo de análisis (Bompart et al., 2019). Se deben de conocer los factores externos que pueden condicionar los resultados obtenidos con los sistemas CASA, para minimizar la variación que podrían introducir en los análisis seminales (Mortimer et al., 2015; Núñez-Martínez et al., 2006; Yániz et al., 2018).

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) y número óptimo de espermatozoides por dosis (Menegatti et al., 2020), han permitido estandarizar más las técnicas rutinarias de extracción de semen en la especie bovina (Barszcz et al., 2012; Contri et al., 2010).

Los sistemas CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*) proporcionan información importante respecto de la cinética y movilidad espermática (Holt & Palomo, 1996; Soler et al., 2017; Valverde et al., 2019a) con mayor exactitud y precisión respecto de los análisis subjetivos por técnicos de laboratorio (Valverde & Madrigal-Valverde, 2019). Los resultados pueden variar con el tipo de cámara de recuento utilizada (Bompart et al., 2018; Hoogewijs et al., 2012; Peng et al., 2015; Valverde & Madrigal-Valverde, 2019), tiempo transcurrido desde la eyaculación hasta el análisis (Hahn et al., 2019), temperatura y tipo de diluyente (Arslan et al., 2019; Murphy et al., 2018) o por la dilución de la muestra (Broekhuijse et al., 2011).

El principio de llenado de cámaras de recuento puede ser por capilaridad o por desplazamiento de la gota, para cada uno existen cámaras reutilizables y desechables (Soler et al., 2012). El análisis de un elevado número de células permite identificar subpoblaciones espermáticas y cómo se distribuyen en un eyaculado particular según los patrones de movimiento característicos de cada subpoblación, porque el eyaculado se constituye por una población heterogénea de espermatozoides (Holt et al., 2007; Vicente-Fiel et al., 2013; Yániz et al., 2017).

Algunos autores han sugerido que las variables cinéticas no pueden considerarse un marcador confiable como predictor de la fertilidad de un eyaculado (Holt et al., 1997). Esto puede relacionarse con el hecho de que en la fertilidad, el efecto de la hembra es relevante y cuando el semen está en el oviducto hay relaciones de interacción que intervienen sobre la variabilidad total mostrada por esta característica, sin embargo, es poco probable que los espermatozoides con insuficiente o alterado movimiento puedan colonizar el oviducto y es más probable que conforme mayor movilidad espermática presente una muestra, los espermatozoides puedan llegar a la ampolla oviductal para la fecundación (Bravo et al., 2011; Muiño et al., 2008). Otros estudios, indicaron que las subpoblaciones espermáticas con espermatozoides rápidos y lineales, tuvieron una alta probabilidad de fecundar los ovocitos (Peña et al., 2018); por otro lado, Ibanescu et al. (2020), refirieron que las subpoblaciones con porcentajes espermáticos rápidos y porcentajes no muy altos en linealidad, pueden asociarse con una mayor fertilidad, mientras que otros autores, mencionaron que este mismo patrón en las subpoblaciones es específico de espermatozoides hiperactivos y lo relacionaron con la fertilidad (Kathiravan et al., 2011).

Cuando se estudia el efecto de la conservación del movimiento tras la carga inicial del semen a través del tiempo, la muestra seminal pierde movilidad. 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. Los análisis seminales deben llevarse a cabo rápidamente en el laboratorio luego de recolectar las muestras, para obtener la movilidad real de la muestra (Bompart et al., 2019). El análisis del semen bovino en condiciones tropicales requiere la definición de criterios de análisis en el laboratorio con el propósito de sistematizar la evaluación seminal. Además, el análisis de la estructura poblacional del eyaculado está condicionada a factores externos relacionados con el análisis del semen en el laboratorio. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de factores externos relacionados con el seminograma sobre las subpoblaciones espermáticas de bovinos de la raza Brahman.

Materiales y métodos

Descripción y localización del experimento

El desarrollo del estudio se realizó con base en los principios éticos en la investigación científica aprobados por el Comité Técnico del Centro de Investigación y Desarrollo de la Agricultura Sostenible para el Trópico Húmedo del Instituto Tecnológico de Costa Rica (CIDASTH-ITCR), de acuerdo con la sección 01/2019, artículo 1.0, DAGSC-074.

La investigación se realizó en las fincas ganaderas: La Vega, ubicada 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

Instituto Tecnológico de Costa Rica, Campus Tecnológico Local San Carlos. 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 de 2019.

Animales

Se utilizaron diez animales del PPA seleccionado a nivel genético para características de crecimiento de la raza Brahman (*Bos indicus*), cuya edad promedio fue $3,6 \pm 1,6$ años. Antes del inicio de la fase experimental, hubo un periodo de sesenta días de descanso sexual de los toros. Durante el periodo experimental, los animales se manejaron en un área de 18 ha, donde se estableció un sistema rotacional de siete apartos, con seis 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 y agua *ad libitum*, mediante abrevaderos. El manejo sanitario de los animales fue con desparasitante externo Dectomax (e.g. Doramectina), vitaminas hidrosolubles (Catosal®) y minerales (Matsuda Top Line Cría). A los toros se les realizó un diagnóstico general, que consistió en aspectos anatómicos como condición de aplomos y pezuñas, condición corporal, coloración de las mucosas y particularidades de cada animal. En el examen andrológico se valoró la condición de los órganos reproductivos externos, como los testículos, escroto, prepucio y el pene.

Recolección y procesamiento del semen

Cada toro se inmovilizó por medio una prensa hidráulica, para recolectar el semen con el método de electroeyaculación descrito por Morillo et al. (2012). Antes de utilizar el electroeyaculador, los animales se prepararon recortándoles los pelos del orificio prepucial y su limpieza, luego, se introdujo la mano enguantada por el recto para evacuar las heces contenidas en el intestino. Se revisaron los órganos vesiculares y la próstata y se procedió con un masaje transrectal de las glándulas accesorias (glándulas vesiculares y ampollas de los conductos deferentes) y próstata durante 60-120 s, para intensificar la respuesta sexual y provocar relajamiento del esfínter anal antes de introducir la sonda-electrodo. La sonda de electroeyaculación, cuyas dimensiones fueron de 40 cm de largo y 7,7 cm de diámetro, se introdujo por el recto del animal hasta posición de 90° luego de levantar la cola del toro e introducir el electrodo lubricado dirigiéndolo hacia abajo y con movimientos rotatorios. Se aplicaron estímulos a mínima intensidad y, de forma paulatina, se incrementó de acuerdo con la reacción del animal. De forma automática, se aplicaron estímulos de cuarenta ciclos durante dos segundos, 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. La recolección del semen se realizó del pene mediante un tubo colector estéril desechable (tubo Falcon® de 15 ml).

El eyaculado se diluyó en una proporción 1:1 (vol:vol), con tres diluyentes comerciales (Andromed®, Androstar® y BTS (*Beltsville Thawing Solution*); Minitube, Tiefenbach – Alemania) en tubos Falcon® de 15 ml con su respectiva identificación. Todas las muestras seminales se analizaron a dos temperaturas (37 °C y 29 °C). Las muestras seminales se trasladaron en una hielera de polipropileno al Laboratorio de Reproducción Animal, del Instituto Tecnológico de Costa Rica en el Campus Tecnológico Local San Carlos, antes de su análisis espermático.

Evaluación del semen con el sistema CASA-Mot

Las muestras de semen se diluyeron en una proporción 1:5 (vol:vol) y se examinaron de inmediato en el Laboratorio de Reproducción Animal del ITCR. Después de mezclar las muestras de semen diluido, se colocaron 3 μ l de semen en la cámara de recuento espermático. Los análisis se realizaron con el sistema CASA-Mot ISAS®v1 (Sistema Integrado de Análisis de Semen, Proiser R + D, Valencia, España), equipado con una cámara de video

(Proiser 782M, Proiser R + D), con una velocidad de cincuenta fotogramas por segundo (fps) y una resolución final de 768 x 576 píxeles. La cámara se conectó a un microscopio UB203 (UOP / Proiser R + D) con un ocular 1X, un objetivo de contraste de fase negativa 10X (AN 0.25) y una placa calefactora integrada, mantenida a 37,0 y 29,0 $\pm 0,5$ °C. La configuración del sistema CASA considerada 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 la posterior reevaluación de las trayectorias de cada célula. Se aleatorizó el orden en que se hicieron los análisis, para evitar que influyera de forma constante en los resultados obtenidos.

Análisis de variables de cinética espermática

Cada muestra se analizó por duplicado y se consideraron siete campos en cámaras de recuento ISAS®D4C a 10, 16 y 20 μm . Para la cámara de recuento Spermtrack® de 20 μm , se tomaron nueve campos de análisis según la disposición de la posición central. Se contabilizaron al menos 600 células por muestra. Se evaluaron tres velocidades: a) velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m s}^{-1}$), es la suma de las distancias entre las posiciones del centroide de la cabeza del espermatozoide, fotograma por fotograma, dividida por unidad de tiempo, b) velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m s}^{-1}$), es la distancia en línea recta entre la primera y la última posición del espermatozoide, dividida por el tiempo transcurrido, y c) velocidad promedio de la trayectoria (VAP, $\mu\text{m s}^{-1}$), es la velocidad promediada en el tiempo de un espermatozoide a lo largo de su trayectoria promedio. Se obtuvieron tres índices adimensionales de progresividad celular: a) linealidad de la progresión hacia adelante [LIN= (VSL/VCL)x100], es la linealidad de la trayectoria curvilínea, b) índice de rectitud [STR= (VSL/VAP)x100], es una medida de la linealidad de la trayectoria promedio, y c) oscilación de la trayectoria [WOB= (VAP/VCL)x100] es una medida de oscilación de la trayectoria real sobre la trayectoria promedio. Todos los índices se expresaron en porcentaje. Además, evaluó la 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 calculó con una media móvil de 5 puntos (se puede considerar como el valor máximo o medio a lo largo de la trayectoria) y 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 de video. La configuración del software se ajustó al análisis de espermatozoides de bovino: de 10 a 80 μm^2 para el área de la cabeza y 11 μm para conectividad. Todas las variables mencionadas anteriormente, correspondieron al módulo CASA-Mot.

Ensayo comparativo entre cámaras de recuento espermático Spermtrack® e ISAS®D4C

Se utilizaron dos tipos de cámaras de recuento para el análisis de las variables de cinética espermática: la Spermtrack®, que es reutilizable y se basa en el principio de desplazamiento de la gota y la cámara ISAS® D4C que es una desechable basada en el principio de capilaridad. Las cámaras ISAS® D4C se utilizaron a tres profundidades (10, 16 y 20 μm); esto es, la altura entre el portaobjetos y el cubreobjetos de la cámara, después de precalentarlas a 37 °C. El llenado de las cámaras se realizó por capilaridad y por desplazamiento de la gota, por lo que pudo darse diferentes distribuciones celulares en función del avance capilar de la muestra. En este caso, las posibles diferencias deberían aparecer a lo largo del recorrido, analizándose las posibles modificaciones desde la posición 1 hasta la 7 en el caso de la ISAS® D4C. Para la Spermtrack® se contabilizaron nueve campos de análisis con base en la posición central como posición inicial (1).

Ensayo de conservación del movimiento espermático tras el tiempo de carga

Se realizó una evaluación de todas las variables de cinética espermática a diferentes tiempos tras la carga inicial del semen en la cámara de recuento Spermtrack®, ISAS® D4C (10, 16 y 20 μm), para analizar los cambios en las

características de la muestra conforme pasó el tiempo. Se analizaron las muestras a tiempo cero (carga inicial del semen en las cámaras de recuento) y a las 3, 6 y 12 h después. Cada vez, se cargaron las cámaras de recuento con el semen que se encontraba almacenado a 37 °C para la evaluación de la conservación del movimiento.

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.

Se realizaron procedimientos de agrupamiento para identificar subpoblaciones de esperma 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 o análisis factorial de todos los datos, para obtener un menor número de combinaciones lineales que aún conservaran la mayor cantidad de información posible de las variables originales. El número de componentes principales (CP) utilizados en el siguiente proceso del análisis, se determinó a partir del criterio de Kaiser. Se seleccionó solo aquellos con un valor propio (*eigenvalue*; varianza extraída de cada CP > 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 euclídeas 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 & 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 a nivel jerárquico con el método *Ward* (Murtagh & Legendre, 2014). Por lo tanto, el procedimiento de agrupamiento permitió la identificación de subpoblaciones de esperma, porque cada grupo contribuyó a uno 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) y luego se utilizó un procedimiento de modelos lineales generalizados (GLM) para determinar los efectos de la temperatura de análisis del semen, el medio de dilución, el tiempos de análisis y la cámara de recuento, sobre las variables cinéticas medias de espermatozoides y como efectos directos sobre estas.

Las diferencias entre medias se analizaron mediante la prueba de Bonferroni. Los resultados se presentan como $\text{media} \pm \text{error estándar de la media (EE)}$. La significación estadística se consideró en $p < 0,05$. Todos los datos se analizaron con el paquete IBM SPSS, versión 23.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

Resultados

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

Los resultados de las variables de cinética mostraron los mejores valores de velocidad para la cámara Spermtrack®, excepto la variable VSL ($19,09 \pm 0,72 \mu\text{m s}^{-1}$). Las cámaras ISAS® D4C (10, 16, y 20 μm), 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 1).

Cuadro 1. Variables de cinética espermática (media±EE) en semen fresco de toros Brahman medidas en diferentes cámaras de recuento. Laboratorio de Reproducción Animal, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Campus San Carlos, Alajuela, Costa Rica. 2020.

Table 1. Sperm kinematics variables (mean±SEM) in fresh semen of Brahman bulls measured in different counting chambers. Animal Reproduction Laboratory, Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos Campus, Alajuela, Costa Rica. 2020.

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

n / %= número de espermatozoides y porcentaje que representa cada cámara de recuento; VCL= velocidad curvilínea ($\mu\text{m s}^{-1}$); VSL= velocidad rectilínea ($\mu\text{m s}^{-1}$); VAP= velocidad promedio de la trayectoria ($\mu\text{m s}^{-1}$); 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 dentro de línea, indican diferencias entre las cámaras de recuento espermático, $p < 0,05$. n / %= number of spermatozoa and percentage represented by each counting chamber; VCL= curvilinear velocity ($\mu\text{m s}^{-1}$); VSL= straight-line velocity ($\mu\text{m s}^{-1}$); VAP= average path velocity ($\mu\text{m s}^{-1}$); LIN= linearity of forward progression (%); STR= straightness index (%); WOB= path oscillation (%); ALH= amplitude of lateral head displacement (μm); BCF= crossover frequency (Hz). SEM= standard error of the mean. ^{a-c} Different letters within rows, indicate differences between sperm counting chambers. $p < 0,05$

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, con excepción en la variable de STR, donde mejores índices se mostraron en los tiempos 3, 6 y 12. Además, se observó una muerte celular conforme pasó el tiempo entre la extracción y el análisis seminal (Cuadro 2).

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

La utilización de 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® mostró los valores más altos para estas variables, excepto la VCL, que el valor más alto lo obtuvo Andromed® (Cuadro 3).

Hubo un efecto de la temperatura y diluyente respecto a las variables cinéticas con 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 a los diluyentes Andromed® y BTS, se 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 4).

Distribución de la cinemática espermática dentro de la subpoblación entre diluyentes

Los valores para el análisis de componentes principales (CP) indicaron que había tres CP por cada diluyente. Andromed® y BTS mostraron velocidad (CP1), representada por VCL, VSL, VAP, con un efecto mayor por VAP

Cuadro 2. Efecto de la durabilidad de la muestra sobre variables de cinética espermática (media±EE) en semen fresco de toros Brahman. Laboratorio de Reproducción Animal, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Campus San Carlos, Alajuela, Costa Rica. 2020.

Table 2. Effect of durability of the sample on kinetic variables (mean±SEM) in fresh semen of Brahman bulls. Animal Reproduction Laboratory, Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos Campus, Alajuela, Costa Rica. 2020.

	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±0,59 ^a	47,61±0,72 ^b	41,46±1,31 ^c	31,89±2,53 ^d
VSL	24,79±0,33 ^a	21,40±0,41 ^b	17,53±0,74 ^c	13,45±1,42 ^d
VAP	31,55±0,33 ^a	26,65±0,40 ^b	22,08±0,73 ^c	17,31±1,41 ^d
LIN	51,70±0,49 ^a	47,37±0,60 ^b	45,63±1,09 ^b	43,25±2,10 ^b
STR	75,68±0,52 ^a	78,01±0,63 ^b	78,95±1,14 ^b	76,23±2,20 ^{ab}
WOB	62,91±0,36 ^a	57,89±0,44 ^b	55,45±0,81 ^b	54,68±1,56 ^b
ALH	2,10±0,02 ^a	2,04±0,03 ^a	1,82±0,05 ^b	1,63±0,10 ^b
BCF	7,79±0,08 ^a	8,36±0,10 ^b	7,62±0,19 ^a	5,46±0,36 ^c

n / %= número de espermatozoides y porcentaje que representa cada tiempo de análisis; VCL= velocidad curvilínea ($\mu\text{m s}^{-1}$); VSL= velocidad rectilínea ($\mu\text{m s}^{-1}$); VAP= velocidad promedio de la trayectoria ($\mu\text{m s}^{-1}$); 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 dentro de línea, indican diferencias entre los tiempos de análisis tras la carga inicial de la cámara de recuento espermático. $p < 0,05$. n / %= number of sperm and percentage that represents each analysis time; VCL= curvilinear velocity ($\mu\text{m s}^{-1}$); VSL= straight-line velocity ($\mu\text{m s}^{-1}$); VAP= average path velocity ($\mu\text{m s}^{-1}$); LIN= linearity of forward progression (%); STR= straightness index (%); WOB= path oscillation (%); ALH= amplitude of lateral head displacement (μm); BCF= crossoverfrequency (Hz). SEM= standard error of the mean. ^{a-d} Different letters within rows, indicate differences between the analysis times after the initial load of the sperm counting chamber. $p < 0,05$.

Cuadro 3. Variables de cinética espermática (media±EE) en semen fresco de toros Brahman, diluido con tres diluyentes comerciales. Laboratorio de Reproducción Animal, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Campus San Carlos, Alajuela, Costa Rica. 2020.

Table 3. Sperm kinetics variables (mean±SEM) in fresh semen of Brahman bulls, diluted with three commercial extenders. Animal Reproduction Laboratory, Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos Campus, Alajuela, Costa Rica. 2020.

	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 ($\mu\text{m s}^{-1}$); VSL= velocidad rectilínea ($\mu\text{m s}^{-1}$); VAP= velocidad promedio de la trayectoria ($\mu\text{m s}^{-1}$); 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 dentro de línea, indican diferencias entre los diluyentes comerciales. $p < 0,05$. n / %= number of sperm and percentage they represent at each diluent; VCL= curvilinear velocity ($\mu\text{m s}^{-1}$); VSL= straight-line velocity ($\mu\text{m s}^{-1}$); VAP= average path velocity ($\mu\text{m s}^{-1}$); LIN= linearity of forward progression (%); STR= straightness index (%); WOB= path oscillation (%); ALH= amplitude of lateral head displacement (μm); BCF= crossoverfrequency (Hz). BTS= Belstville Thawing Solution. SEM= standard error of the mean. ^{a-c} Different letters within rows indicate differences between commercial extenders $p < 0,05$.

Cuadro 4. Efecto de la temperatura del diluyente sobre variables de cinética espermática (media±EE) en semen fresco de toros Brahman. Laboratorio de Reproducción Animal, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Campus San Carlos, Alajuela, Costa Rica 2020.

Table 4. Effect of diluent temperature on sperm kinetic variables (mean±SEM) in fresh semen Brahman bulls. Animal Reproduction Laboratory, Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos Campus, Alajuela, Costa Rica, 2020.

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

VCL= velocidad curvilínea ($\mu\text{m s}^{-1}$); VSL= velocidad rectilínea ($\mu\text{m s}^{-1}$); VAP= velocidad promedio de la trayectoria ($\mu\text{m s}^{-1}$); 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 dentro de columna, indican diferencias entre las temperaturas del diluyente del semen para cada variable cinética. $p<0,05$. VCL= curvilinear velocity ($\mu\text{m s}^{-1}$); VSL= straight-line velocity ($\mu\text{m s}^{-1}$); VAP= average path velocity ($\mu\text{m s}^{-1}$); LIN= linearity of forward progression (%); STR= straightness index (%); WOB= path oscillation (%); ALH= amplitude of lateral head displacement (μm); BCF= crossoverfrequency (Hz). BTS= *Belstville Thawing Solution*. SEM= standard error of the mean. ^{a-b} Different letters between columns indicate differences between temperatures of semen extender for each kinetic variable. $p<0.05$.

para Andromed® y VCL para BTS, con vectores propios de 0,960 y 0,907, respectivamente, mientras que para Androstar® mostraron progresividad (CP1), representada por LIN y WOB, con un mayor efecto por WOB con un vector propio de 0,928. Al contrario, al CP1, para el componente principal dos (CP2), los diluyentes Andromed® y BTS, mostraron progresividad con un efecto mayor en LIN con vectores propios de 0,938 y 0,921, respectivamente; mientras que el diluyente Androstar® mostró velocidad, con efecto mayor por VCL de 0,896. El CP3, representado por STR y BCF, denominado ondulatorio, para los tres diluyentes fue dada principalmente por BCF (Andromed®: 0,986; Androstar®: 0,905; BTS: 0,846). Estos resultados indicaron que la velocidad y la progresividad de los espermatozoides tuvieron un efecto relativamente mayor sobre la varianza total que las otras variables (Cuadro 5).

Hubo diferencias significativas entre todas las subpoblaciones espermáticas en cada diluyente ($p<0,05$). La distribución de subpoblaciones no fue la misma para cada diluyente. Los valores cinéticos de cada subpoblación

Cuadro 5. Valores propios de los vectores de componentes principales (CP*) para variables cinéticas en semen fresco de toros Brahman en tres diluyentes comerciales. Laboratorio de Reproducción Animal, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Campus San Carlos, Alajuela, Costa Rica. 2020.

Table 5. Eigenvalues of the principal component vectors (PC*) for kinetic variables in fresh semen of Brahman bulls in three commercial diluents. Animal Reproduction Laboratory, Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos Campus, Alajuela, Costa Rica. 2020.

Variable	Andromed®			Androstar®			BTS		
	CP ₁	CP ₂	CP ₃	CP ₁	CP ₂	CP ₃	CP ₁	CP ₂	CP ₃
VCL	0,946				0,896		0,907		
VSL	0,613	0,684			0,656		0,619		
VAP	0,960				0,839		0,884		
LIN		0,938		0,913				0,921	
STR		0,772				0,604		0,608	0,603
WOB		0,757		0,928				0,914	
ALH	0,895				0,765		0,821		
BCF			0,986			0,905			0,846
Var Exp	38,67	33,77	13,57	34,83	31,87	18,93	34,71	33,86	18,48

Var Exp: varianza explicada en cada CP. Varianza total explicada: Andromed®= 86,01 %; Androstar®= 85,63 %; BTS= 87,05 %.

* 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. BTS: *Belstville Thawing Solution*. Var Exp: variance explained in each PC. Total variance explained: Andromed®= 86,01 %; Androstar®= 85,63 %; BTS = 87,05 %.* Expresses the most important variables in each PC. Only eigenvectors >0.6 are presented. VCL: curvilinear velocity; VSL: straight-line velocity; VAP: average path velocity; LIN: linearity of forward progression; STR: straightness index; WOB: path oscillation; ALH: amplitude of lateral head displacement; BCF: crossover frequency. BCF: beat-cross frequency. BTS: Belstville Thawing Solution.

por cada diluyente, mostraron que las variables VCL y VAP fueron los que más cambiaron entre las subpoblaciones espermáticas. Los valores más altos de VCL fueron: Andromed® (SP3, 112,41±1,12 $\mu\text{m s}^{-1}$), Androstar® (SP1, 89,22±1,31 $\mu\text{m s}^{-1}$), BTS (SP1, 90,12±1,36 $\mu\text{m s}^{-1}$); mientras que para VAP fueron: Andromed® (SP3, 46,50±0,54 $\mu\text{m s}^{-1}$), Androstar® (SP2, 51,36±0,52 $\mu\text{m s}^{-1}$) y BTS (SP3, 53,71±0,62 $\mu\text{m s}^{-1}$). Respecto del índice de linealidad, la distribución de subpoblaciones con los mayores índices de linealidad no fue la misma según el diluyente utilizado, sin embargo, la SP2 sí presentó mayor LIN, independiente del medio de dilución. Cuando el diluyente fue Andromed®, la SP1 y SP2 presentaron los valores más altos, sin embargo, con el diluyente Androstar®, la SP2 y SP4 mostraron mayor linealidad. Las subpoblaciones más lineales fueron SP2 y SP3 cuando se utilizó BTS (Cuadro 6).

Distribución de las subpoblaciones espermáticas según el tiempo de análisis y la cámara de recuento

La distribución porcentual de espermatozoides en las diferentes subpoblaciones varió en relación con la durabilidad de la muestra en el tiempo de análisis y la cámara de recuento utilizada (Cuadro 7). Cuando se analizaron los espermatozoides a las 0 y 3 h tras la carga inicial, la subpoblación 4 presentó la mayor cantidad de células con valores de 31,64 y 36,30 %, respectivamente. A las 6 h, la SP2 presentó el 39,63 % de las células, mientras que, a las 12 h tras la carga inicial la SP3 mostró el 47,65 % del total de células analizadas. La distribución

Cuadro 6. Variables de cinética espermática (medias±EE) de subpoblaciones (SP) móviles en semen fresco de toros Brahman, diluido en tres diluyentes comerciales. Laboratorio de Reproducción Animal, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Campus San Carlos, Alajuela, Costa Rica 2020.

Table 6. Sperm kinematics variables (means±SEM) of motile subpopulations (SP) in fresh semen of Brahman bulls diluted in three commercial extenders. Animal Reproduction Laboratory, Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos Campus, Alajuela, Costa Rica, 2020.

	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
Andromed®								
SP1	59,03±1,20 ^a	31,82±0,48 ^a	34,26±0,53 ^a	55,31±0,71 ^a	91,56±1,16 ^a	59,50±0,55 ^a	2,13±0,05 ^a	11,95±0,14 ^a
SP2	43,95±1,48 ^b	23,26±0,60 ^b	25,88±0,66 ^b	57,49±0,88 ^a	86,79±1,43 ^a	63,76±0,68 ^b	2,07±0,06 ^{ab}	4,33±0,18 ^b
SP3	112,41±1,12 ^c	21,48±0,49 ^b	46,50±0,54 ^c	20,41±0,72 ^b	47,75±1,17 ^b	42,58±0,56 ^c	4,98±0,05 ^c	6,35±0,14 ^c
SP4	58,44±1,02 ^a	15,67±0,41 ^c	25,95±0,46 ^b	29,19±0,61 ^c	64,01±0,99 ^c	44,87±0,47 ^d	2,33±0,04 ^d	12,23±0,12 ^a
SP5	38,95±0,80 ^d	10,05±0,33 ^d	15,79±0,36 ^d	29,56±0,48 ^c	65,64±0,78 ^c	42,09±0,37 ^c	1,92±0,03 ^b	5,74±0,10 ^d
Androstar®								
SP1	89,22±1,31 ^a	25,22±0,85 ^a	42,40±0,75 ^a	29,37±1,04 ^a	57,32±1,18 ^a	50,68±0,91 ^a	4,12±0,05 ^a	6,02±0,20 ^a
SP2	67,08±0,92 ^b	49,76±0,59 ^b	51,36±0,52 ^b	78,74±0,72 ^b	92,55±0,82 ^b	82,54±0,63 ^b	1,94±0,03 ^b	8,66±0,14 ^b
SP3	34,19±0,81 ^c	10,09±0,52 ^c	17,09±0,46 ^c	32,42±0,64 ^a	58,78±0,73 ^a	52,91±0,54 ^a	1,64±0,03 ^c	4,59±0,13 ^c
SP4	29,99±0,80 ^d	21,83±0,51 ^d	23,13±0,45 ^d	75,87±0,63 ^c	91,03±0,72 ^b	81,39±0,55 ^b	1,21±0,03 ^d	5,60±0,12 ^a
SP5	45,81±0,80 ^c	25,50±0,52 ^a	26,80±0,46 ^c	58,55±0,63 ^d	92,47±0,72 ^b	61,81±0,55 ^c	1,61±0,03 ^c	12,11±0,12 ^d
BTS								
SP1	90,12±1,36 ^a	20,37±0,75 ^a	44,55±0,77 ^a	23,01±1,06 ^a	45,58±1,20 ^a	50,96±0,95 ^a	3,97±0,05 ^a	6,64±0,30 ^a
SP2	31,55±0,87 ^b	21,05±0,48 ^a	23,08±0,50 ^b	71,26±0,68 ^b	89,00±0,77 ^b	77,49±0,60 ^b	1,30±0,03 ^b	5,57±0,14 ^b
SP3	71,12±1,08 ^c	51,54±0,60 ^b	53,71±0,62 ^c	74,42±0,85 ^c	93,02±0,96 ^c	77,99±0,76 ^b	2,30±0,04 ^c	9,37±0,18 ^c
SP4	40,07±0,94 ^d	10,82±0,52 ^c	20,06±0,53 ^d	27,38±0,73 ^d	53,67±0,83 ^d	52,22±0,65 ^a	1,96±0,04 ^d	4,60±0,16 ^d
SP5	51,43±0,92 ^c	24,96±0,51 ^d	27,49±0,52 ^c	50,17±0,72 ^c	88,65±0,81 ^b	55,02±0,64 ^c	1,86±0,04 ^d	11,78±0,15 ^c

VCL= velocidad curvilínea ($\mu\text{m s}^{-1}$); VSL= velocidad rectilínea ($\mu\text{m s}^{-1}$); VAP= velocidad promedio de la trayectoria ($\mu\text{m s}^{-1}$); 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. Número de espermatozoides= 6000. ^{a-c} Letras diferentes indican diferencias entre las subpoblaciones de espermáticas por diluyente. $p<0,05$. VCL= curvilinear velocity ($\mu\text{m s}^{-1}$); VSL= straight-line velocity ($\mu\text{m s}^{-1}$); VAP= average path velocity ($\mu\text{m s}^{-1}$); LIN= linearity of forward progression (%); STR= straightness index (%); WOB= path oscillation (%); ALH= amplitude of lateral head displacement (μm); BCF= crossover frequency (Hz). SEM= standard error of the mean. Number of spermatozoa= 6000. ^{a-c} Different letters indicate differences between sperm subpopulations per diluent. $p<0,05$.

de espermatozoides por subpoblación también fue diferente según la altura de la cámara de recuento utilizada; cuando la cámara fue de 10 μm (D4C10) la subpoblación 4 presentó el mayor porcentaje de células con un valor de 31,89 %, al utilizar la cámara de 16 μm (D4C16), la SP3 agrupó al 33,70 % de las células y con las cámaras de 20 μm (D4C20 y Spermtrack®), en ambos casos, presentaron la mayor distribución de células en la SP2 con valores de 38,15 y 34,84 %, respectivamente (Cuadro 7).

Cuadro 7. Distribuciones porcentuales de cada subpoblación espermática en semen fresco de toros Brahman, según el tiempo de análisis y la cámara de recuento. Laboratorio de Reproducción Animal, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Campus San Carlos, Alajuela, Costa Rica 2020.

Table 7. Percentage distributions of each sperm subpopulation in fresh semen of Brahman bulls, according to the analysis time and counting chamber. Animal Reproduction Laboratory, Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos Campus, Alajuela, Costa Rica, 2020.

	Subpoblación (% de espermatozoides)			
	SP ₁	SP ₂	SP ₃	SP ₄
	Tiempo de análisis (h)			
0	14,24 ^{act}	27,32 ^{bct}	26,80 ^{ca}	31,64 ^{dca}
3	16,72 ^{af}	24,82 ^{bff}	22,59 ^{cf}	36,30 ^{dff}
6	20,33 ^{af}	39,63 ^{bff}	32,52 ^{cf}	7,52 ^{dff}
12	21,48 ^{af}	17,45 ^{bff}	47,65 ^{cf}	13,42 ^{dff}
	Cámara de recuento			
ISAS® D4C10	22,29 ^{al}	15,40 ^{bl}	30,42 ^{cl}	31,89 ^{cl}
ISAS® D4C16	21,82 ^{al}	28,42 ^{be}	33,70 ^{ce}	16,07 ^{de}
ISAS® D4C20	15,24 ^{at}	38,15 ^{bt}	23,70 ^{ct}	22,91 ^{dt}
Spermtrack®	25,10 ^{ap}	34,84 ^{bq}	14,84 ^{cp}	25,23 ^{ap}

Cada fila indica el porcentaje de espermatozoides en cada subpoblación espermática. Cluster: suma de porcentaje para cada tiempo de análisis= 100, y cámara de recuento= 100. Número total de espermatozoides para cada tiempo: 0 h= 3075; 3 h= 2284; 6 h= 492; 12 h= 149. Número total de espermatozoides para cada cámara: D4C10= 1292, D4C16= 1288, D4C20 = 1890, Spermtrack®= 1530. ^{a,b,c,d} Diferentes superíndices indican diferencias dentro de fila con respecto a cada subpoblación espermática. ^{α,β,γ,δ} Diferentes superíndices indican diferencias dentro de columna para cada tiempo de análisis. ^{λ,μ,ν,ψ} Superíndices diferentes indican diferencias dentro de columna para cada cámara de recuento. Prueba de Chi cuadrado (χ^2). $p < 0,05$. Each row indicates the percentage of spermatozoa in each sperm subpopulation. Cluster; sum of percentage for each analysis time= 100, and counting chamber= 100. Total number of sperms for each time: 0 h= 3075; 3 h= 2284; 6 h= 492; 12 h= 149. Total number of sperms for each chamber: D4C10= 1292, D4C16= 1288, D4C20= 1890, Spermtrack®= 1530. ^{a, b, c, d} Superscript indicates differences within row regarding sperm subpopulation. ^{α,β,γ,δ} Different superscripts indicate differences within the row regarding sperm subpopulation. ^{α,β,γ,δ} Different superscript indicate differences within column for each analysis time. ^{λ,μ,ν,ψ} Different superscript indicate differences within column for each counting chamber; Chi squared (χ^2) test. $p < 0.05$.

Discusión

Al evaluar el efecto del tipo de cámara de recuento, la velocidad curvilínea en las cámaras desechables (ISAS® D4C) 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 & Madrigal-Valverde, 2019). Dicho efecto se observó en este trabajo con las cámaras de 10 y 20 μm , pero no con la de 16 μm ($p > 0,05$), aunque la tendencia fue que esta variable se incrementó con la altura de la cámara. La variación en los resultados podría explicarse por la forma en que se incorporó 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).

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. Se han descrito resultados similares en cámaras de recuento reutilizables y desechables con diferencias significativas entre estas (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, lo que sobreestima la valoración de las variables cinéticas de los espermatozoides (Lenz et al., 2011). Otros autores han descrito que no se presentaron diferencias significativas entre alturas de cámaras desechables, pero sí en las reusables, por lo que siguieren evaluar el efecto del tipo de carga de la cámara que se va a utilizar para cada especie (Soler et al., 2012).

Algunos autores han demostrado que el efecto de *SegreSilberberg* (Segré & 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, las cuales son causadas por la inercia del fluido en movimiento (Segré & 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 generó una presión mayor que en la de ISAS® D4C 16 y 20 μm , donde se presentó una mejor distribución y menor arrastre de espermatozoides en las cámaras más profundas.

En estudios en bovino, los resultados indicados por Murphy et al. (2016) fueron coincidentes con el presente estudio, donde la movilidad de las muestras disminuyeron conforme el tiempo y se observó una muerte prolongada de espermatozoides y una disminución de la cinética celular. Independiente de los factores de dilución, temperatura, almacenamiento o tipo de diluyente utilizado, la movilidad de los espermatozoides en el semen fresco se disminuyó a medida que aumenta la duración del almacenamiento (O'Hara et al., 2010).

El diluyente debe conservar las características del eyaculado durante el periodo de almacenamiento (Viquez et al., 2020). La dilución de las muestras es necesaria para determinar la concentración espermática adecuada para realizar los análisis con el sistema CASA-Mot (Bompart et al., 2018; Farrell et al., 1995). Los resultados presentados con el diluyente Andromed®, coincidieron con lo descrito por Contri et al. (2010), ya que al utilizar un diluyente hipertónico se podrían 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), disminuyeron al favorecerse un mayor movimiento circular, sin embargo, estas variables *in situ* podrían cambiar y tender a aumentar, debido a que las paredes acanaladas del oviducto limitarían el movimiento circular de los espermatozoides y podrían funcionar como una barrera biológica y de selección espermática que favorece el movimiento progresivo, lo que podría aumentar el índice de rectitud celular y esto se podría correlacionar con la fertilidad (Hyakutake et al., 2018; Yániz et al., 2018).

Se ha descrito que la temperatura óptima para evaluación del semen bovino debe ser 37 °C; sin embargo, al analizar el efecto de la temperatura de análisis del semen fresco bovino, 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 se describieron en macho cabrío (Hahn et al., 2019) y en humano (Thijssen et al., 2014), donde compararon el semen a dos temperaturas de análisis (23 y 35 °C). Otros trabajos han descrito que la temperatura de almacenamiento no tuvo ningún efecto sobre la integridad de las membranas y que la temperatura ambiente favoreció la 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, lo que favorece un mayor gasto energético y disminuye las reservas de ATP, lo cual podría afectar de forma negativa la movilidad de los espermatozoides (Storey, 2008).

La distribución de valores propios en el análisis de componentes principales varió según el tipo de diluyente utilizado. Es probable que la composición química de los medios de dilución, condicionen una distribución diferente en los patrones cinemáticos de los eyaculados. Esto podría explicar las diferencias encontradas en las

subpoblaciones espermáticas según el tipo de diluyente utilizado. Además, el hecho de que un primer componente principal esté explicado por la velocidad y en otro caso por la linealidad, podría ser un indicio de que los medios de dilución condicionen la movilidad y cinética de los eyaculados. Esto generaría un patrón de diferencias entre las subpoblaciones espermáticas posteriores (Viquez et al., 2020). Es posible que al haber variables cinéticas que se confundan entre los componentes principales, como por ejemplo en el caso del Andromed[®], las diferencias entre las subpoblaciones espermáticas sean más difíciles de encontrar o incluso no sean relevantes a nivel biológico.

Las diferencias encontradas entre las subpoblaciones para las variables de cinética, podrían estar condicionadas por los valores propios que explican los componentes principales. La VSL medida en el semen diluido con el Andromed[®], se confundió entre los componentes principales 1 y 2. Al determinar las subpoblaciones espermáticas, éstas presentaron menores diferencias entre sí, para todas las variables de cinética, respecto de los otros diluyentes utilizados, con resultados muy similares a los resultados descritos en semen de toros Holstein (Muiño et al., 2008). La capacidad de fertilización del semen bovino podría explicarse en los conjuntos celulares que mayor movimiento activo y progresivo presenten (Muiño et al., 2009).

Si se considera el movimiento activo explicado por la velocidad promedio y la progresividad explicada por el índice de linealidad, las subpoblaciones que presentaron este patrón en los diluyentes Androstar[®] y BTS fueron las SP2 y SP3, respectivamente. En el caso del Andromed[®], aunque hubo una menor velocidad promedio de las células, el patrón de movimiento activo se presentó en la SP1. Esto podría indicar que existe una variabilidad dentro del eyaculado, condicionada a factores externos como el tipo de diluyente que afecta a algunas subpoblaciones. En otros conjuntos celulares dentro del mismo eyaculado, se observaron diferentes patrones de movilidad, progresividad y ondulación de las células, lo que refuerza la idea de la heterogeneidad del eyaculado, incluso en animales de una misma raza.

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. Las cámaras de 20 μm , permitieron un movimiento menos restrictivo que las de alturas menores.

El semen debería analizarse en las primeras tres horas después de ser extraído. El tipo de diluyente y la temperatura de dilución condicionaron las variables cinéticas de los espermatozoides. El Androstar[®] y BTS presentaron valores aceptables para las variables de cinética y la temperatura ambiental (29 °C) favoreció mejores valores de cinética espermática. La existencia de subpoblaciones espermáticas en el eyaculado, se vio afectada por factores externos como el tipo de diluyente utilizado al momento de realizar los análisis. El tipo de diluyente condicionó para que se presentaran diferentes patrones de movilidad, progresividad y ondulación de las células en las diferentes subpoblaciones dentro del eyaculado.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la coordinación de la Unidad de Ganado de Carne del Programa de Producción Agropecuaria (PPA) de la Escuela de Agronomía (Dr. Milton Villarreal Castro) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) por aportar los animales y las muestras de semen. Se agradece a Arturo Huertas y Jose Antonio Núñez por la logística, manejo y el mantenimiento de las condiciones de bienestar animal de los toros. A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) del ITCR, proyecto inscrito No. 5402-2151-1013 y a la Fundación para el Fomento y Promoción de la Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Costa Rica (FITTACORI) por financiar este trabajo.

Referencias

- Arslan, H. O., 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. *Cryobiology*, *91*, 40–52. <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* (1ª Ed.). Universidad Autónoma Metropolitana.
- Awad, M. M. (2011). Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, *123*(3–4), 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.01.003>
- Barquero, V., Viquez, L., Calderón-Calderón, J., & Valverde, A. (2021). Frecuencia de fotogramas óptima para evaluar la cinética espermática de verracos con un sistema CASA-Mot. *Agronomía Mesoamericana*, *32*(1), 1–18. <https://doi.org/10.15517/am.v32i1.41928>
- 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. <https://doi.org/10.5539/jas.v4n3p1>
- 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. <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*, *209*, Article 106169. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2019.106169>
- Boryshpolets, S., Kowalski, R. K., Dietrich, G. J., Dzyuba, B., & Ciereszko, A. (2013). Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology*, *80*(7), 758–765. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.06.019>
- Bravo, J. A., Montanero, J., Calero, R., & Roy, T. J. (2011). Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams. *Animal Reproduction Science*, *129*(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.10.005>
- Broekhuijse, M. L. W. J., Šoštarić, E., Feitsma, H., & Gadella, B. M. (2011). Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. *Theriogenology*, *76*(8), 1473–1486.e1. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.040>
- Büyükleblebici, S., Tuncer, P. B., Bucak, M. N., Eken, A., Sariözkan, S., Taşdemir, U., & Endirlik, B. Ü. (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. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.006>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.096>

- 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. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2010.02.025>
- Del-Gallego, R., Sadeghi, S., Blasco, E., Soler, C., Yániz, J., & Silvestre, M. (2017). Effect of chamber characteristics, loading and analysis time on motility and kinetic variables analysed with the CASA-mot system in goat sperm. *Animal Reproduction Science*, *177*, 97–104. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2016.12.010>
- Douglas-Hamilton, D. H., Smith, N. G., Kuster, C. E., Vermeiden, J. P. W., & Althouse, G. C. (2005). Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. *Journal of Andrology*, *26*(1), 115–122. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15611575>
- Farrell, P., Trouern-Trend, V., Foote, R. H., & 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. *Fertility and Sterility*, *64*(1), 208–210. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7789564>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00121.x>
- 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. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2135-y>
- 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. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1997.tb01925.x>
- 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. <https://doi.org/10.1071/RD9960219>
- Holt, WV, 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), 709–718. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17714625>
- Hoogewijs, M. K., De Vlieghe, S. P., Govaere, J. L., 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. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2011.00523.x>
- Hyakutake, T., Mori, K., & Sato, K. (2018). Effects of surrounding fluid on motility of hyperactivated bovine sperm. *Journal of Biomechanics*, *71*(February), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2018.02.009>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106329>
- Isengildina-Massa, O., Cao, X., Karali, B., Irwin, S. H., Adjemian, M., & Johansson, R. C. (2020). When does USDA information have the most impact on crop and livestock markets? *Journal of Commodity Markets*, *22*, Article 100137. <https://doi.org/10.1016/j.jcomm.2020.100137>
- Kaiser, H. F. (1958). The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. *Psychometrika*, *23*, 187–200.

- Kathiravan, P., Kalatharan, J., Karthikeya, G., Rengarajan, K., & Kadirvel, 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. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01603.x>
- Kaufman, L., & Rousseeuw, P. (2005). *Finding groups in data: an introduction to cluster analysis*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470316801>
- Lenz, R. W., Kjelland, M. E., VonderHaar, K., Swannack, T. M., & Moreno, J. F. (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. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3056>
- Menegatti, S., Shafii, B., Price, W., Utt, M., Harstine, B., McDonald, K., Cruppe, L., DeJarnette, M., Peters, L., Moraes Vasconcelos, J. L., & 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, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.021>
- Morillo, M., Salazar, S., & Castillo, E. (2012). *Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino*. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas.
- Mortimer, S. T., Van Der Horst, G., & Mortimer, D. (2015). The future of computer-aided sperm analysis. *Asian Journal of Andrology*, 17(4), 545–553. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.154312>
- Muñoz, R., Peña, A. I., Rodríguez, A., Tamargo, C., & Hidalgo, C. O. (2009). Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. *Theriogenology*, 72(6), 860–868. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.06.009>
- Muñoz, R., Rivera, M. M., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J. E., & Peña, A. (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. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.028>
- 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. <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. <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. <https://doi.org/10.1007/s00357-014-9161-z>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00685.x>
- O'Hara, L., Hanrahan, J. P., Richardson, L., Donovan, A., Fair, S., Evans, A. C. O., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.009>
- Páez, E., & Corredor, E. (2014). Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *Ciencias y Agricultura*, 11(2), 49–59.

- Patil, S., Kumar, P., Singh, G., Bala, R., Jerome, A., Patil, C. S., Kumar, D., Singh, S., & Sharma, R. K. (2020). 'Semen dilution effect' on sperm variables and conception rate in buffalo. *Animal Reproduction Science*, 214, Article 106304. <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. <https://doi.org/10.1111/rda.13349>
- 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), 307–313. <https://doi.org/10.3109/19396368.2015.1063175>
- Quintero-Moreno, A., Mayorga-torres, B. J. M., & Maya, W. D. C. (2017). Semen Analysis As a Tool To Predict the Reproductive Potential in Bulls. *Journal of Veterinary Andrology*, 2(1), 30-37. http://cesica.org/publicaciones/index.php/journal_veterinary_andrology/article/view/24
- 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. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S1698-031X\(12\)70069-9](https://doi.org/10.1016/S1698-031X(12)70069-9)
- Soler, C., Valverde, A., Bompert, D., Fereidounfar, S., Sancho, M., Yániz, J., Garcia-Molina, A., & Korneenko-Zhilyaev, Y. . (2017). New methods of semen analysis by casa. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*, 52(2). <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.2.232eng>
- Spencer, N. (2013). *Essentials of multivariate data analysis*. Chapman and Hall/CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b16344>
- Storey, B. T. (2008). Mammalian sperm metabolism: Oxygen and sugar, friend and foe. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5–6), 427–437. <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*, 25, Article 100323. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2019.09.008>
- Thijssen, A., Klerkx, E., Huyser, C., Bosmans, E., Campo, R., & Ombelet, W. (2014). Influence of temperature and sperm preparation on the quality of spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*, 28(4), 436–442. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.12.005>
- Valverde, A., Castro-Morales, O., Madrigal-Valverde, M., & Soler, C. (2019a). Sperm kinematics and morphometric subpopulations analysis with CASA systems: A review. *Revista de Biología Tropical*, 67(6), 1473–1487. <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. <https://doi.org/10.15517/ma.v29i2.29852>
- 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. <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.34145>
- Valverde, A., Madrigal-Valverde, M., Caldeira, C., Bompert, D., Núñez de Murga, J., Arnau, S., & Soler, C. (2019b). 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. <https://doi.org/10.1111/rda.13320>

- Valverde, A., Madrigal-Valverde, M., Lotz, J., Bompart, D., & Soler, C. (2019c). Effect of video capture time on sperm kinematic parameters in breeding boars. *Livestock Science*, 220, 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.12.008>
- Vicente-Fiel, S., Palacín, I., Santolaria, P., & Yániz, J. L. (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. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.04.002>
- Viquez, L., Barquero, V., Soler, C., Roldan, E.R.S., & Valverde, A. (2020). Kinematic sub-populations in bull spermatozoa: A comparison of classical and bayesian approaches. *Biology (Basel)*, 9, Article 138. <https://doi.org/10.3390/biology9060138>
- Yániz, J., Silvestre, M., Santolaria, P., & Soler, C. (2018). CASA-Mot in mammals: an update. *Reproduction, Fertility, and Development*, 30(6), 799–809. <https://doi.org/10.1071/RD17432>
- Yániz, J., Soler, C., Alquézar-Baeta, C., & Santolaria, P. (2017). Toward an integrative and predictive sperm quality analysis in *Bos taurus*. *Animal Reproduction Science*, 181, 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.03.022>