

## Parámetros cinéticos en eyaculados bovinos de toros de raza frisona y rubia gallega

R. Muiño\*, M. Fernández\*\*, A.I. Peña\*

\* Departamento de Patología Animal. Reproducción y Obstetricia. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 27002 Lugo.España. anaipena@lugo.usc.es

\*\* Centro de Selección y Reproducción Animal de Galicia.Xenética Fontao, S.A., Fontao-Esperante, Apdo 128. 27080 Lugo (España).

### Resumen

En este trabajo se utilizaron 119 eyaculados procedentes de toros de raza Rubia Gallega y Frisona. La calidad del semen inicialmente se valoró en base a sus características macroscópicas, motilidad masal, motilidad individual y concentración espermática. Tras la evaluación, los eyaculados calificados como "no aptos para criopreservación" se descartaron, y los eyaculados seleccionados para congelación fueron analizados con un sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). El objetivo del trabajo fue establecer valores medios, en semen fresco con calidad adecuada para la criopreservación, para una serie de parámetros descriptores del movimiento espermático. Los valores obtenidos podrían ser utilizados como parámetros de referencia por laboratorios que dispongan de un equipo Sperm Class Analyzer (software SCA®2002 Movilidad, Microptic S.L., Barcelona, España).

**Palabras clave:** análisis computerizado, raza, semen fresco.

### Summary

#### Motion characteristics in bovine ejaculates from holstein and rubia gallega bulls

For this study, 119 ejaculates from Holstein and Rubia Gallega bulls were used. The semen quality was initially evaluated based on its macrosocopic characteristics, collective motility, individual motility and sperm concentration. After evaluation, the ejaculates scored as "not adequate for cryopreservation" were discarded whereas those selected for cryopreservation were analysed by using a CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) system. The aim of the present study was to establish mean values for some motility descriptors observed in bovine fresh semen with optimal quality for cryopreservation. The values obtained in this study could be used as a reference by other institutions using a Sperm Class Analyzer equipment (software SCA®2002 Movilidad, Microptic S.L., Barcelona, España).

**Key words:** computer analysis, race, fresh semen.

### Introducción

La motilidad es sólo uno de los muchos requisitos que ha de reunir un espermatozoide para ser capaz de fecundar a un ovocito, sin embargo, ha sido y todavía es el parámetro más utilizado para valorar la calidad

de un eyaculado o de una dosis de semen refrigerado o congelado. Para que la migración espermática a través del tracto genital de la hembra ocurra normalmente, y sobre todo para el establecimiento de un reservorio espermático en el oviducto, los espermatozoides han tener movimiento activo; pero

además, la motilidad es también una manifestación de integridad estructural y de competencia funcional del espermatozoide.

La motilidad espermática normalmente se valora de forma subjetiva, este es un método simple, rápido y barato. Sin embargo, es altamente subjetivo, puesto que los resultados obtenidos dependen en gran parte de la habilidad y experiencia del técnico que evalúa la muestra (Rodríguez-Martínez, 2000), y además, si se trabaja con muestras muy concentradas se tiende a sobrestimar el porcentaje de espermatozoides móviles. Por tanto, no es un método que, de forma fiable y repetible, permita predecir la capacidad fecundante de una muestra de semen (Saacke and White, 1972; Linford et al., 1976). Estos inconvenientes motivaron numerosos esfuerzos por parte de los investigadores para intentar eliminar la subjetividad inherente al examen microscópico de la motilidad (Glover, 1968; Katz and Dott, 1975; Amann and Hammerstedt, 1980; Katz and Overstreet, 1981; O'Connor et al., 1981), fruto de los cuales se desarrollaron los sistemas computerizados para el análisis de la motilidad espermática, también conocidos como sistemas CASA (Computer Assisted Sperm Analysis).

Al final del proceso, el CASA proporciona toda una serie de datos objetivos de las células móviles presentes en la muestra y la calidad media de ese movimiento (Amann, 1989; Anzar et al., 1991). Pero además, permite identificar la existencia de subpoblaciones de espermatozoides con distintos patrones de movimiento (Davis et al., 1995; Holt, 1996; Abaigar et al., 1999) que coexisten en la misma muestra de semen, lo cuál es una visión más real que la motilidad media de la muestra, puesto que una muestra de semen es una población heterogénea de espermatozoides.

A pesar de su uso generalizado en laboratorios de investigación y centros de I.A (inseminación artificial), no existe una estandarización de los equipos ni de los procedimientos empleados en los análisis (Verstegen et al., 2002). Cada laboratorio utiliza un sistema CASA diferente, con distintas especificaciones técnicas y en diferentes condiciones de trabajo (distintos medios de dilución, temperaturas, etc), lo que provoca que los resultados facilitados por los distintos centros sean muy dispares, y no sea posible comparar directamente los datos de los distintos laboratorios (Davis et al., 1993; Tardif et al., 1997).

El objetivo del presente estudio, por tanto, fue:

a) establecer unos valores medios para una serie de parámetros cinéticos obtenidos mediante un sistema CASA (en unas condiciones de trabajo definidas) para el semen fresco bovino, a partir de los resultados obtenidos tras el análisis de eyaculados bovinos previamente calificados, mediante evaluación subjetiva convencional, como de calidad "buena" o "muy buena" y "aptos para la congelación".

b) evaluar posibles influencias de la raza y/o de la edad sobre los parámetros descriptores de la motilidad espermática, mediante la comparación de los resultados obtenidos a partir del análisis de eyaculados de toros de raza Frisona y Rubia Gallega, y en ambas razas, de toros mayores y menores de 3 años.

## Material y métodos

### Animales

Para este estudio se utilizaron 119 toros, 61 de raza Rubia Gallega y 58 de raza Frisona, de edades comprendidas entre 15 meses y

13 años. Todos los sementales se encontraban alojados en las instalaciones del Centro de Selección y Reproducción Animal de Galicia XENÉTICA FONTAO, S.A. (Fontao, Esperante, Lugo). Comenzaron su etapa como reproductores a los 15 meses de edad, estaban clasificados como 'aptos para la reproducción' y libres de toda enfermedad infecto-contagiosa.

#### Obtención y evaluación de los eyaculados

La extracción del semen se realizó mediante el uso de vagina artificial, y de cada toro se obtuvieron dos eyaculados, con un intervalo de unos 20 min entre los dos saltos. Tras la obtención del semen, se realizó una primera valoración de la calidad seminal atendiendo a las siguientes características:

- color: normalmente entre blanco y amarillo, dependiendo de la presencia de  $\beta$ -carotenos.
- fluidez: se clasificó en denso, fluido o acuoso. La mayoría de las muestras presentaban un aspecto denso o fluido. Las de aspecto acuoso se descartaron.
- volumen: determinado por lectura directa en tubos graduados de 10 ml. Se calculó el volumen medio de los dos saltos.
- motilidad en masa: se puntuaron en una escala de 0 a 5. Los eyaculados con motilidad masal inferior a 3 se desecharon. Se calculó la motilidad media para los dos saltos.
- concentración espermática: determinada por medio de un espectrofotómetro calibrado (Photometer SDM 4, Minitüb, Tiefenbach, Germany). Se calculó la concentración media para los dos saltos.

Una vez determinados el volumen y la concentración, se mezcló el semen procedente de ambos saltos y se diluyó con Biociphos (IMV®, L'aigle, France) hasta una concentración de 100 millones/ml. Tras la dilución del

semen se evaluó subjetivamente la motilidad espermática individual y aquellas muestras con motilidad inferior al 60% se desecharon. Las muestras con un porcentaje de espermatozoides móviles entre el 60 y el 80% se consideraron de calidad 'buena' y si el porcentaje de motilidad era superior al 85% se consideraron de calidad 'muy buena'. Este criterio se utilizó con el fin de no congelar la mezcla de eyaculados con una motilidad subjetiva inferior al 60%, por tanto, al descartarlos de la congelación tampoco se analizaron con el CASA.

#### Evaluación de la motilidad espermática con un sistema CASA

Para el análisis objetivo de la motilidad, tomamos una gota de 5  $\mu$ l de semen diluido previamente y lo diluimos aun más utilizando una tasa de dilución 1:5 (1 volumen de semen diluido + 4 volúmenes de Biociphos) con el fin de reducir la concentración hasta 20 millones/ml, para facilitar el análisis de la muestra con el analizador de imagen. Otros 5  $\mu$ l de semen diluidos a esta nueva concentración se depositaron entre un porta y un cubre y se evaluaron 3 campos de microscopio, seleccionados de la parte superior, media e inferior del portaobjetos, analizando aproximadamente un total de 600 espermatozoides por muestra. Se utilizó un microscopio de contraste de fases (NIKON E-600, Tokyo, Japan), con Ph1 positivo, objetivo 10 x y platina a 37 °C. Las imágenes analógicas de los espermatozoides fueron digitalizadas y analizadas utilizando el software SCA®2002 Movilidad (Microptic S.L., Barcelona, España). El patrón de análisis del SCA 2002® predeterminado para la captura de las imágenes incluía los siguientes datos: número de imágenes capturadas por segundo: 25; velocidad mínima para espermatozoides lentos: 20  $\mu$ m/s; velocidad máxima para espermatozoides lentos: 60  $\mu$ m/s; velo-

cidad máxima para espermatozoides medios 110  $\mu\text{m/s}$ ; conectividad (distancia máxima entre dos objetos de dos imágenes sucesivas para que sea considerado el mismo objeto): 15  $\mu\text{m}$ ; número mínimo de imágenes para calcular ALH: 5.

#### Parámetros analizados

##### – Parámetros de velocidad:

- Velocidad curvilínea (VCL): es la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria en función del tiempo.
- Velocidad rectilínea (VSL): es la distancia recorrida por el espermatozoide entre el primer y el último punto de su trayectoria por unidad de tiempo.
- Velocidad media (VAP): distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media por unidad de tiempo.
- Índice de linealidad de la trayectoria curvilínea (LIN): es la relación porcentual entre VSL y VCL.
- Índice de rectitud (STR): es la relación porcentual entre VSL y VAP.
- Índice de oscilación (WOB): es la relación porcentual entre VAP y VCL.

##### – Parámetros de angularidad y oscilación de la cabeza:

- Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH): es el desplazamiento que efectúa la cabeza espermática en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.
- Frecuencia de batido (BCF): es la frecuencia con la que la trayectoria curvilínea atraviesa la trayectoria lineal o media en función del tiempo.

En función de su VCL los espermatozoides se clasifican en estáticos ( $VCL < 20 \mu\text{m/s}$ ), móviles no progresivos y móviles progresi-

vos; y dentro de los móviles, en rápidos ( $VCL > 110 \mu\text{m/s}$ ), medios (VCL entre 60 y 110  $\mu\text{m/s}$ ) y lentos (VCL entre 20 y 60  $\mu\text{m/s}$ ).

#### Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante un GLM (Modelo Lineal General) utilizando el programa estadístico SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), en el que las variables dependientes (volumen, concentración espermática, porcentajes de motilidad y parámetros descriptores del movimiento) se consideraron en función de dos variables independientes: la raza (Rubia Gallega o Frisona) y la edad (animales mayores o menores de 3 años). Las diferencias entre razas y/o grupos de edad se consideraron significativas cuando  $P < 0.05$ .

#### Resultados

Las medias ( $\pm$  desviaciones estándar) para el volumen del eyaculado, la concentración espermática, el número total de espermatozoides y el porcentaje de motilidad subjetiva se presentan en las figuras 1-4. La raza, la edad o la interacción entre ambas, tuvieron efectos significativos sobre los cuatro parámetros evaluados. Los toros de raza Frisona mayores de 3 años produjeron mayor volumen de semen que los frisonos jóvenes, y que los toros rubios de ambos grupos de edad. En la raza Rubia Gallega no se observaron diferencias en el volumen del eyaculado entre sementales mayores y menores de 3 años. Por el contrario, la concentración espermática media fue mayor para la raza Rubia que para la Frisona, sin observarse diferencias significativas entre grupos de edad. Mediante valoración subjetiva del eyaculado también se apreció una mayor densidad en los eyaculados de los toros de raza rubia gallega que en los de raza Friso-

na (resultados no mostrados). El número total de espermatozoides por eyaculado no dependió de la raza pero sí de la edad, siendo superior en animales mayores de 3 años. La motilidad espermática, valorada por estimación subjetiva, resultó ser mayor en toros rubios que en frisones de más de 3 años, pero entre los jóvenes de ambas razas no se observaron diferencias (figura 4).

Las medias ( $\pm$  desviaciones estándar) de los parámetros descriptores de la motilidad obtenidos mediante el sistema CASA se presentan en las tablas 1-9. Los porcentajes de espermatozoides móviles, progresivos y no progresivos (tabla 1), así como los de espermatozoides rápidos y medios (tabla 2) no variaron con la raza ni con la edad de los

toros, pero se observó mayor ( $P < 0.01$ ) porcentaje de espermatozoides lentos en los toros frisones que en los rubios ( $12.67 \pm 4.22\%$  vs.  $10.38 \pm 3.65\%$ ). Con respecto a los parámetros de velocidad (tablas 3-8) o de angularidad y oscilación de la cabeza espermática (tabla 9), se observó que la raza ejercía un efecto significativo sobre alguno de ellos (tabla 10), pero no había diferencias entre los dos grupos de edad. En general se observó que en toros frisones la subpoblación de espermatozoides clasificados como rápidos describía un movimiento de mayor velocidad y de trayectoria más rectilínea (mayor VSL, VAP, LIN, WOB y menor ALH) que dicha subpoblación espermática en eyaculados de toros rubios.

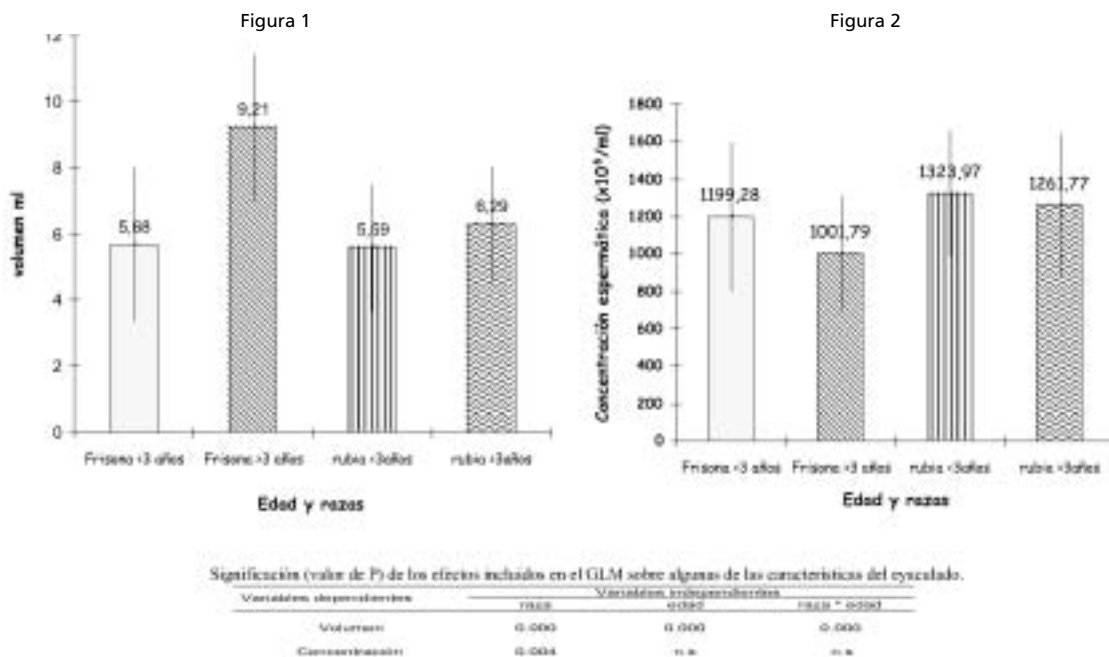


Figura 1. Medias ( $\pm$  desviación estándar) del volumen en función de la raza y edad.

Figure 1. Mean ( $\pm$  standard deviation) ejaculate volumes as a function of bull breed and age.

Figura 2. Medias ( $\pm$  desviación estándar) de la concentración de espermatozoides en función de la raza y edad.

Figure 2. Mean ( $\pm$  standard deviation) sperm concentration in the ejaculates as a function of bull breed and age.

Figura 3

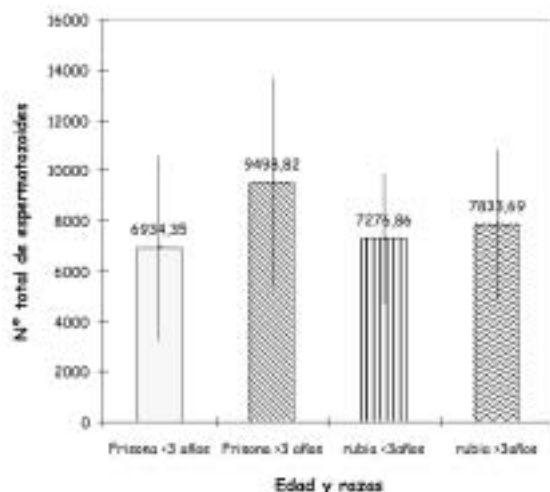
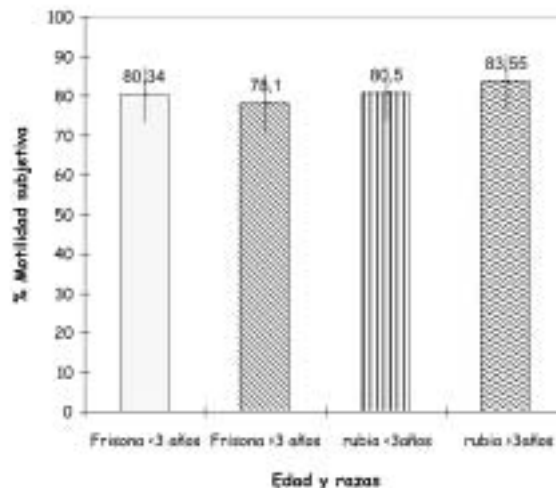


Figura 4



Significación (valor de P) de los efectos incluidos en el GLM sobre algunas de las características del eyaculado.

Variables dependientes	Variables independientes	
	raza	edad
Nº total de espermatozoides	n.s	0.014
% Motilidad subjetiva	0.030	n.s

Figura 3. Medias ( $\pm$  desviación estándar) del nº total de espermatozoides en función de la raza y edad.

Figure 3. Mean ( $\pm$  standard deviation) sperm number in the ejaculates as a function of bull breed and age.

Figura 4. Medias ( $\pm$  desviación estándar) de la motilidad subjetiva en función de la raza y edad.

Figure 4. Mean ( $\pm$  standard deviation) percentage of subjective sperm motility in the ejaculates as a function of bull breed and age.

Tabla 1. Medias ( $\pm$  desviación estándar) para el porcentaje de espermatozoides móviles, progresivos o no progresivos, en función de la raza y de la edad

Table 1. Mean ( $\pm$  standard deviation) percentages of motile spermatozoa, progressive and non progressive, as a function of bull breed and age

Raza	Edad (años)	N		Motilidad total (%)	Estáticos (%)	Móviles progresivos (%)	Móviles no progresivos (%)
Frisón	<3	29	Media ( $\pm$ DE)	91.04 $\pm$ 2.98	8.96 $\pm$ 2.98	58.59 $\pm$ 5.64	32.45 $\pm$ 4.77
	>3	29	Media ( $\pm$ DE)	90.79 $\pm$ 4.20	9.21 $\pm$ 4.20	57.28 $\pm$ 4.59	33.51 $\pm$ 5.48
Rubia Gallega	<3	30	Media ( $\pm$ DE)	89.85 $\pm$ 4.14	10.15 $\pm$ 4.14	57.60 $\pm$ 5.33	32.25 $\pm$ 5.24
	>3	31	Media ( $\pm$ DE)	91.52 $\pm$ 4.24	8.48 $\pm$ 4.24	59.35 $\pm$ 5.47	32.18 $\pm$ 5.02

Tabla 2. Medias ( $\pm$  desviación estándar) para el porcentaje de espermatozoides rápidos (VCL >110  $\mu\text{m/s}$ ), medios (VCL entre 60 y 110  $\mu\text{m/s}$ ) y lentos (VCL entre 20 y 60  $\mu\text{m/s}$ ), en función de la raza y de la edad

*Table 2. Mean ( $\pm$  standard deviation) percentages of rapid (VCL>110  $\mu\text{m/s}$ ), medium (VCL between 60 and 110  $\mu\text{m/s}$ ) and slow spermatozoa (VCL between 20 and 60  $\mu\text{m/s}$ ) in the ejaculates, as a function of bull breed and age*

Raza	Edad (años)	N		Rápidos (%)	Medios (%)	Lentos (%)
Frisona	<3	29	Media ( $\pm$ DE)	55.91 $\pm$ 12.19	23.38 $\pm$ 7.79	11.74 $\pm$ 4.25
	>3	29	Media ( $\pm$ DE)	50.89 $\pm$ 14.27	27.23 $\pm$ 12.65	12.67 $\pm$ 4.22
Rubia Gallega	<3	30	Media ( $\pm$ DE)	54.98 $\pm$ 12.07	24.59 $\pm$ 8.64	10.28 $\pm$ 2.82
	>3	31	Media ( $\pm$ DE)	53.37 $\pm$ 12.43	27.77 $\pm$ 10.43	10.38 $\pm$ 3.65

Tabla 3. Medias ( $\pm$  desviación estándar) para la velocidad curvilínea en la población total de espermatozoides analizados (VCL total) o en subpoblaciones de espermatozoides lentos (VCL lentos), medios (VCL medios) o rápidos (VCL rápidos), en función de la raza y de la edad

*Table 3. Mean ( $\pm$  standard deviation) values of curvilinear velocity (VCL) for the whole sperm population (VCL total) and for subpopulations of slow (VCL lentos), medium (VCL medios) and rapid spermatozoa (VCL rápidos) in the ejaculates, as a function of bull breed and age*

Raza	Edad (años)	N		VCL total ( $\mu\text{m/s}$ )	VCL lentos ( $\mu\text{m/s}$ )	VCL medios ( $\mu\text{m/s}$ )	VCL rápidos ( $\mu\text{m/s}$ )
Frisona	<3	29	Media ( $\pm$ DE)	128.89 $\pm$ 16.90	38.69 $\pm$ 3.26	91.35 $\pm$ 5.94	162.20 $\pm$ 11.86
	>3	29	Media ( $\pm$ DE)	126.01 $\pm$ 19.95	40.81 $\pm$ 2.25	93.51 $\pm$ 2.80	161.01 $\pm$ 13.05
Rubia Gallega	<3	30	Media ( $\pm$ DE)	127.78 $\pm$ 13.85	40.02 $\pm$ 1.95	94.62 $\pm$ 1.79	158.55 $\pm$ 9.44
	>3	31	Media ( $\pm$ DE)	128.34 $\pm$ 15.95	39.88 $\pm$ 1.94	94.28 $\pm$ 2.42	160.76 $\pm$ 10.89

Tabla 4. Medias ( $\pm$  desviación estándar) para la velocidad rectilínea en la población total de espermatozoides analizados (VSL total) o en subpoblaciones de espermatozoides lentos (VSL lentos), medios (VSL medios) o rápidos (VSL rápidos), en función de la raza y de la edad

*Table 4. Mean ( $\pm$  standard deviation) values of straight line velocity (VSL) for the whole sperm population (VSL total) and for subpopulations of slow (VSL lentos), medium (VSL medios) and rapid spermatozoa (VSL rápidos) in the ejaculates, as a function of bull breed and age*

Raza	Edad (años)	N		VSL total ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL lentos ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL medios ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL rápidos ( $\mu\text{m/s}$ )
Frisona	<3	29	Media ( $\pm$ DE)	82.14 $\pm$ 11.79	17.33 $\pm$ 2.99	54.24 $\pm$ 6.63	106.69 $\pm$ 9.10
	>3	29	Media ( $\pm$ DE)	78.57 $\pm$ 15.06	17.63 $\pm$ 2.88	56.59 $\pm$ 5.34	102.21 $\pm$ 12.86
Rubia Gallega	<3	30	Media ( $\pm$ DE)	77.68 $\pm$ 11.12	16.77 $\pm$ 2.60	55.50 $\pm$ 4.19	98.38 $\pm$ 10.88
	>3	31	Media ( $\pm$ DE)	78.46 $\pm$ 12.14	16.54 $\pm$ 2.81	56.76 $\pm$ 5.91	99.23 $\pm$ 10.68

Tabla 5. Medias ( $\pm$  desviación estándar) para la velocidad media en la población total de espermatozoides analizados (VAP total) o en subpoblaciones de espermatozoides lentos (VAP lentos), medios (VAP medios) o rápidos (VAP rápidos), en función de la raza y de la edad

*Table 5. Mean ( $\pm$  standard deviation) values of average path velocity (VAP) for the whole sperm population (VAP total) and for subpopulations of slow (VAP lentos), medium (VAP medios) and rapid spermatozoa (VAP rápidos) in the ejaculates, as a function of bull breed and age*

Raza	Edad (años)	N		VAP total ( $\mu\text{m/s}$ )	VAP lentos ( $\mu\text{m/s}$ )	VAP medios ( $\mu\text{m/s}$ )	VAP rápidos ( $\mu\text{m/s}$ )
Frisona	<3	29	Media ( $\pm$ DE)	100.24 $\pm$ 13.82	24.73 $\pm$ 3.06	67.99 $\pm$ 6.15	128.48 $\pm$ 10.03
	>3	29	Media ( $\pm$ DE)	96.96 $\pm$ 17.48	25.40 $\pm$ 2.70	70.42 $\pm$ 4.21	125.09 $\pm$ 13.54
Rubia Gallega	<3	30	Media ( $\pm$ DE)	96.24 $\pm$ 11.98	24.45 $\pm$ 2.24	69.92 $\pm$ 3.72	120.72 $\pm$ 10.63
	>3	31	Media ( $\pm$ DE)	97.07 $\pm$ 14.08	24.16 $\pm$ 2.46	70.38 $\pm$ 4.95	122.21 $\pm$ 11.74

Tabla 6. Medias ( $\pm$  desviación estándar) para la linearidad en la población total de espermatozoides analizados (LIN total) o en subpoblaciones de espermatozoides lentos (LIN lentos), medios (LIN medios) o rápidos (LIN rápidos), en función de la raza y de la edad

*Table 6. Mean ( $\pm$  standard deviation) values of linearity (LIN) for the whole sperm population (LIN total) and for subpopulations of slow (LIN lentos), medium (LIN medios) and rapid spermatozoa (LIN rápidos) in the ejaculates, as a function of bull breed and age*

Raza	Edad (años)	N		LIN total (%)	LIN lentos (%)	LIN medios (%)	LIN rápidos (%)
Frisona	<3	29	Media ( $\pm$ DE)	63.81 $\pm$ 4.34	43.50 $\pm$ 5.35	59.32 $\pm$ 5.59	65.88 $\pm$ 4.63
	>3	29	Media ( $\pm$ DE)	62.18 $\pm$ 4.25	43.05 $\pm$ 5.16	60.48 $\pm$ 4.93	63.38 $\pm$ 4.97
Rubia Gallega	<3	30	Media ( $\pm$ DE)	60.69 $\pm$ 4.39	41.81 $\pm$ 5.24	58.66 $\pm$ 4.28	61.98 $\pm$ 5.02
	>3	31	Media ( $\pm$ DE)	60.99 $\pm$ 3.47	41.38 $\pm$ 5.81	60.13 $\pm$ 5.26	61.64 $\pm$ 3.85

Tabla 7. Medias ( $\pm$  desviación estándar) para el índice de rectitud en la población total de espermatozoides analizados (STR total) o en subpoblaciones de espermatozoides lentos (STR lentos), medios (STR medios) o rápidos (STR rápidos), en función de la raza y de la edad

*Table 7. Mean ( $\pm$  standard deviation) values of straightness (STR) for the whole sperm population (STR total) and for subpopulations of slow (STR lentos), medium (STR medios) and rapid spermatozoa (STR rápidos) in the ejaculates, as a function of bull breed and age*

Raza	Edad (años)	N		STR total (%)	STR lentos (%)	STR medios (%)	STR rápidos (%)
Frisona	<3	29	Media ( $\pm$ DE)	81.94 $\pm$ 2.61	69.75 $\pm$ 4.98	79.61 $\pm$ 3.74	83.05 $\pm$ 2.95
	>3	29	Media ( $\pm$ DE)	80.93 $\pm$ 2.78	69.11 $\pm$ 4.34	80.21 $\pm$ 3.24	81.59 $\pm$ 3.30
Rubia Gallega	<3	30	Media ( $\pm$ DE)	80.57 $\pm$ 2.75	68.28 $\pm$ 4.87	79.32 $\pm$ 2.54	81.39 $\pm$ 3.14
	>3	31	Media ( $\pm$ DE)	80.75 $\pm$ 2.09	68.11 $\pm$ 5.28	80.47 $\pm$ 3.34	81.14 $\pm$ 2.21



Tabla 8. Medias ( $\pm$  desviación estándar) para el índice de oscilación en la población total de espermatozoides analizados (WOB total) o en subpoblaciones de espermatozoides lentos (WOB lentos), medios (WOB medios) o rápidos (WOB rápidos), en función de la raza y de la edad  
 Table 8. Mean ( $\pm$  standard deviation) values of wobble index (WOB) for the whole sperm population (WOB total) and for subpopulations of slow (WOB lentos), medium (WOB medios) and rapid spermatozoa (WOB rápidos) in the ejaculates, as a function of bull breed and age

Raza	Edad (años)	N		WOB total (%)	WOB lentos (%)	WOB medios (%)	WOB rápidos (%)
Frisona	<3	29	Media ( $\pm$ DE)	77.81 $\pm$ 3.38	62.19 $\pm$ 4.03	74.38 $\pm$ 4.07	79.27 $\pm$ 3.51
	>3	29	Media ( $\pm$ DE)	76.76 $\pm$ 2.99	62.12 $\pm$ 3.88	75.29 $\pm$ 3.46	77.57 $\pm$ 3.48
Rubia Gallega	<3	30	Media ( $\pm$ DE)	75.26 $\pm$ 3.47	61.04 $\pm$ 3.73	73.90 $\pm$ 3.74	76.08 $\pm$ 3.93
	>3	31	Media ( $\pm$ DE)	75.49 $\pm$ 3.01	60.52 $\pm$ 4.57	74.60 $\pm$ 3.86	75.93 $\pm$ 3.49

Tabla 9. Medias ( $\pm$  desviación estándar) para la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza en la población total de espermatozoides analizados (ALH total) o en subpoblaciones de espermatozoides lentos (ALH lentos), medios (ALH medios) o rápidos (ALH rápidos), en función de la raza y de la edad

Table 9. Mean ( $\pm$  standard deviation) values of the amplitude of the lateral head displacement (ALH) for the whole sperm population (ALH total) and for subpopulations of slow (ALH lentos), medium (ALH medios) and rapid spermatozoa (ALH rápidos) in the ejaculates, as a function of bull breed and age

Raza	Edad (años)	N		ALH total $\mu$ m	ALH medios $\mu$ m	ALH rápidos $\mu$ m	BCF total Hz	BCF medios Hz	BCF rápidos Hz
Frisona	<3	29	Media ( $\pm$ DE)	4.10 $\pm$ 0.49	3.11 $\pm$ 0.30	4.49 $\pm$ 0.44	8.85 $\pm$ 0.78	7 $\pm$ 1.03	9.48 $\pm$ 0.91
	>3	29	Media ( $\pm$ DE)	4.11 $\pm$ 0.44	3.09 $\pm$ 0.19	4.63 $\pm$ 0.32	9.24 $\pm$ 0.50	7.37 $\pm$ 1.35	9.86 $\pm$ 0.57
Rubia Gallega	<3	30	Media ( $\pm$ DE)	4.28 $\pm$ 0.47	3.18 $\pm$ 0.20	4.72 $\pm$ 0.42	8.80 $\pm$ 0.60	7.20 $\pm$ 0.94	9.38 $\pm$ 0.64
	>3	31	Media ( $\pm$ DE)	4.20 $\pm$ 0.39	3.15 $\pm$ 0.21	4.72 $\pm$ 0.34	8.83 $\pm$ 0.74	7.32 $\pm$ 1.22	9.44 $\pm$ 0.76

## Discusión

Los toros de razas lecheras se sabe que, en general, producen eyaculados de mayor volumen que los de razas de aptitud cárnica (Cole y Cupps, 1984). Los resultados del presente estudio claramente confirman este hecho, especialmente en el caso de toros mayores de 3 años. La concentración espermática, sin embargo, fue mayor en eyaculados de toros rubios que en los de frisonas, y por tanto, el número total de espermatozoides del eyaculado resultó ser similar para ambas razas. Esto probablemente indica

que la diferencia entre las dos razas en el volumen de eyaculado se debe más a una diferencia en la cantidad de plasma seminal, emitido por las glándulas sexuales accesorias durante la eyaculación, que a una diferencia en la producción testicular. De hecho, el número total de espermatozoides presentes en el eyaculado no se vio influido por la raza, pero sí por la edad del toro. Aunque en el presente estudio no se evaluó la circunferencia escrotal o el grado de consistencia del parénquima testicular, sería de esperar que, en general, los sementales de

Tabla 10. Significación (valor de P) del efecto de la raza sobre algunos parámetros descriptores del movimiento de los espermatozoides

Table 10. Significance (P values) of the breed effect on some of the sperm movement descriptors

Raza	Significación
VCL medios	0.003
VSL rápidos	0.006
VAP rápidos	0.013
LIN total	0.005
LIN rápidos	0.001
WOB total	0.002
WOB rápidos	0.000
ALH rápidos	0.024

más de 3 años presentasen un mayor desarrollo testicular que los toros jóvenes, muchos de cuales no habrían completado su crecimiento corporal ni la maduración de sus órganos genitales. El tamaño y el peso del parénquima testicular son parámetros altamente correlacionados con el número total de células de Sertoli (Berndtson *et al.*, 1987), con la producción espermática (Coulter *et al.*, 1976; Madrid *et al.*, 1988), y con la calidad del semen (Bailey *et al.*, 1996) y fertilidad in vivo del semental (Elmore *et al.*, 1976; Coulter and Foote, 1979).

En este trabajo, la motilidad individual media del semen fresco, determinada subjetivamente, osciló entre el 78 y el 83%, mientras que el valor objetivo determinado por el CASA varió entre el 89-91%. Mediante evaluación subjetiva se tendió a subestimar el porcentaje de células móviles aproximadamente en un 10%, y esto probablemente fue debido a que los espermatozoides con menor velocidad, que el CASA clasifica como lentos, visualmente fueron considerados inmóviles. Aunque en semen fresco se han descrito variaciones de entre el 30 y el 60% en la estimación subjetiva de la motilidad en función de la experiencia del técnico (Budworth *et al.*, 1988; Amann, 1989), ésta no ha sido una fuente de variación en este estudio,

puesto que todas las muestras fueron valoradas por la misma persona.

El porcentaje de espermatozoides móviles de un eyaculado o de una dosis de semen congelado está correlacionado con la capacidad fecundante de esa muestra, pero normalmente explica una fracción muy pequeña de la variación en la fertilidad de ese semen. Sin embargo, Farrell *et al.* (1998) observaron que si se incluían colectivamente varios parámetros determinados con un sistema CASA, especialmente aquellos que mostraban mayores diferencias entre toros, en una ecuación de regresión múltiple, la correlación con la fertilidad del semen permitía explicar hasta el 98% de su varianza.

Los parámetros medios descriptores del movimiento espermático obtenidos en este estudio con el SCA 2002® para semen fresco bovino, son aplicables y repetibles en cualquier laboratorio de análisis seminal, siempre y cuando se utilicen las mismas razas y grupos de edad, así como el mismo equipo de análisis y las mismas condiciones de trabajo. Los resultados obtenidos tras el análisis de las mismas muestras de semen en distintos laboratorios y/o con diferentes equipos pueden ser muy dispares. Estas diferencias son debidas a que los distintos laboratorios pue-

den utilizar distintos settings (nº de imágenes por segundo, límites de tamaño, límites de velocidad para espermatozoides inmóviles, lentos, etc.) y distintas condiciones de análisis (temperatura, diluyentes, tamaño de muestra), pero fundamentalmente se deben a que los distintos equipos a veces utilizan algoritmos muy diferentes para calcular el mismo parámetro cinético, con lo cual es muy probable que en realidad se estén calculando parámetros distintos (Holt et al., 1994). Por otra parte, el usuario es una fuente de variabilidad tan o incluso más importante que la impuesta por las diferencias técnicas existentes entre los distintos equipos (Holt et al., 1994).

En definitiva, los valores medios de los parámetros descriptores del movimiento espermático descritos en este estudio se pretende que sirvan de consulta para los laboratorios de análisis de semen bovino y los centros de IA siempre que dispongan de las mismas razas y del mismo sistema CASA utilizado en este trabajo.

## Bibliografía

- Abaigar T, Holt WV, Harrison RAP, 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. *Biol. Reprod.* 60: 32-41.
- Amann RP, Hammerstedt RH, 1980. Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biol. Reprod.* 23: 647-656.
- Amann RP, 1989. Can the fertility potencial of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.* 10: 89-98.
- Anzar M, Hassan MM, Graham EF, Deyo RCM, Singh G, 1991. Efficacy of the Hamilton Thorn motility analyzer (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen. *Theriogenology* 36: 307-317.
- Bailey T, Monke D, Hudson R, Wolfe D, Carson R, Riddell M, 1996. Testicular shape and its relationship to sperm production in mature Holstein bulls. *Theriogenology* 46: 881-887.
- Berndtson W, Igboeli G, Pickett B, 1987. Relationship of absolute numbers of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young bulls. *J. Anim. Sci.* 64: 241-246.
- Budworth RP, Amann RP, Chapman PL, 1988. Relationships between computerized measurements of motion of frozen thawed bull spermatozoa and fertility. *J. Androl.* 9: 41-54.
- Cole HH, Cupps PT, 1984. Reproducción de los Animales Domésticos. Ed. Acribia, Zaragoza, pp. 221-223.
- Coulter G, Rounsaville T, Foote RH, 1976. Heritability of testicular size and consistency in Holstein bulls. *J. Anim. Sci.* 43: 10-11.
- Coulter G, Foote R, 1979. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive traits in cattle. *Theriogenology* 11: 297-311.
- Davis RO, Katz DF, 1993. Operational standards for CASA instruments. *J. Androl.* 14: 385-394.
- Davis RO, Drobris EZ, Overstreet JW, 1995. Applications of multivariate cluster, discriminant function and stepwise regression analysis to variable selection and predictive modeling of sperm cryosurvival. *Fertil. Steril.* 63: 1051-1057.
- Elmore R, Bierschwal C, Youngquist R, 1976. Scrotal circumference measurements in 764 beef bulls. *Theriogenology* 6: 485-494.
- Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH, 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 49: 871-879.
- Glover FA, 1968. Physical method of measuring the mobility of bull sperm. *Nature* 219:1263.
- Holt WV, Watson PF, Curry M, Holt CH, 1994. Reproducibility of computer-aided semen

- analysis: comparison of five different systems used in a practical workshop. *Fertil. Steril.* 62 (6): 1277-1282.
- Holt WV, 1996. Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. *Reprod. Dom. Anim.* 31: 17-24.
- Katz DF, Dott HM, 1975. Methods of measuring swimming speed of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 45: 263.
- Katz DF, Overstreet JW, 1981. Sperm motility assessment by video-micrography. *Fertil. Steril.* 35: 188.
- Linford E, Glover FA, Bishop C, Stewart DL, 1976. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *J. Reprod. Fertil.* 47(2): 283-291.
- Madrid N, Ott R, Rao D, Parret D, Vanderwert W, Willms C, 1988. Scrotal circumference, seminal characteristics and testicular lesions of yearling Angus bulls. *Am. J. Vet. Res.* 49: 579-584.
- O'Connor MT, Amann RP, Saacke RG, 1981. Comparisons of computer evaluations of spermatozoal motility with Standard laboratory tests and their use for predicting fertility. *J. Anim. Sci.* 53(5): 1368-1376.
- Rodríguez-Martínez H, 2000. Evaluación del semen congelado: Métodos tradicionales y de actualidad. *Topics in Bull Fertility*. Chenoweth PJ (ed.) International Veterinary Information service. Ithaca, New York. USA.
- Saacke RG, White JM, 1972. Semen quality tests and their relationship to fertility. *Proc. 4<sup>th</sup> NAAB Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod.*, p. 22.
- Tardif AL, Farell PB, Trouern-Trend V, Foote RH, 1997. Computer-Assited sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. *J. Dairy Sci.* 80: 1606-1612
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K, 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57: 149-179.
- (Aceptado para publicación el 30 de agosto de 2005).