

Segregación de la motilidad espermática en subpoblaciones como herramienta para mejorar el diagnóstico de la calidad seminal en verracos

Decio González-Villalobos¹ y Armando Quintero-Moreno^{1,2,*}

¹ Laboratorio de Andrología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. Venezuela.

² Área de Producción Animal, Departamento de Ciencias Agroforestales, ETS Ingenierías Agrarias, Universidad de Valladolid, 34004 Palencia, España.

Resumen

La incorporación de sistemas computarizados para la evaluación de la calidad seminal (CASA) ha hecho posible el establecimiento de métodos de evaluación de la motilidad espermática en forma objetiva, sin la necesidad del juicio discrecional del operador. Con la finalidad de evaluar la motilidad espermática mediante el CASA, agruparla en subpoblaciones espermáticas (Sp) y observar su variación por efecto del individuo y la refrigeración para optimizar y mejorar el CASA como herramienta diagnóstica, se llevó a cabo un estudio en una granja porcina en Venezuela. A partir de muestras diluidas se realizó el análisis, valorando los descriptores de motilidad en 30 eyaculados óptimos provenientes de 6 verracos. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el procedimiento FASTCLUS, ajustado con GLM del SAS® para establecer las Sp. Se determinó la presencia de tres Sp (Sp1, Sp2, Sp3), siendo la Sp3 (36,44 %) la de mayor velocidad y movimiento progresivo; la Sp2 (24,17 %) con menor velocidad y movimientos oscilatorios; y la Sp1 (39,39 %) con el movimiento más lento, pero más progresivo que la Sp2. Para analizar la distribución de las Sp en función del verraco y del tiempo de refrigeración, se realizó un análisis de Chi-cuadrado (χ^2). Se encontraron diferencias porcentuales significativas entre las Sp según el verraco ($\chi^2 \leq 0,0001$), no obstante, todos tenían excelente motilidad. El proceso de refrigeración durante 72 h afectó la Sp con mayor velocidad y progresividad ($\chi^2 \leq 0,0001$). Se concluye que el estudio de las Sp mediante el CASA es un método altamente sensible, capaz de detectar diferencias en la motilidad que no son perceptibles para un operador calificado.

Palabras Clave: Espermatozoide, semen, sistema CASA, computador, porcino.

Segregation of sperm motility into subpopulations as a tool to improve the diagnosis of semen quality in boars

Abstract

The incorporation of computer-assisted semen analysis (CASA) systems has enabled the development of objective methods for assessing sperm motility, eliminating the need for subjective operator judgment. To evaluate sperm motility using CASA, classify it into sperm subpopulations (Sp), and assess variation due

* Autor para correspondencia: armando.quintero@uva.es

Cita del artículo: González-Villalobos D., Quintero-Moreno A. (2025). Segregación de la motilidad espermática en subpoblaciones como herramienta para mejorar el diagnóstico de la calidad seminal en verracos. ITEA-Información Técnica Económica Agraria 121(4): 368-381. <https://doi.org/10.12706/itea.2025.014>



to individual differences and refrigeration, a study was conducted on a pig farm in Venezuela. Diluted samples from 30 optimal ejaculates collected from six boars were analyzed for motility descriptors. The data were processed using the FASTCLUS procedure, adjusted with the GLM procedure in SAS® to identify the Sp. Three distinct Sp were identified: Sp3 (36.44 %) exhibited the highest velocity and progressive movement; Sp2 (24.17 %) showed the lowest velocity and oscillatory movement; and Sp1 (39.39 %) had the slowest movement but was more progressive than Sp2. To evaluate the distribution of Sp across individuals and storage times, a Chi-square (χ^2) analysis was performed. Significant differences in subpopulation percentages were found among boars ($\chi^2 \leq 0.0001$), although all showed excellent motility. The 72-hour refrigeration process significantly affected the Sp with the highest velocity and progressiveness ($\chi^2 \leq 0.0001$). These results suggest that CASA-based analysis of Sp is a highly sensitive method capable of detecting differences that are not apparent to even experienced operators.

Keywords: Sperm, semen, CASA system, computer, swine.

Introducción

El espermatozoide es una célula altamente especializada y compleja, dotada de movilidad como resultado de un sofisticado proceso evolutivo. Sus características principales han demostrado ser tan eficaces que se conservan de manera uniforme en numerosos organismos, tanto vertebrados como invertebrados (Fawcett, 1970; Phillips, 1970). La estructura encargada de generar el movimiento es el flagelo, en cuyo interior se integran mecanismos moleculares capaces de producir la energía necesaria para sostener la motilidad espermática, logrando un equilibrio preciso entre la contracción activa y la fuerza generada por la flexión elástica (Lindemann *et al.*, 1992). La capacidad de movimiento del espermatozoide se considera esencial para el proceso de fecundación in vivo. Por ello, desde hace tiempo se ha asumido que la evaluación de la motilidad en una muestra de semen está relacionada con la fertilidad y prolificidad potencial de un eyaculado o de un semental en un momento determinado (Dott y Foster, 1979). Sin embargo, numerosos estudios que han intentado establecer esta relación han fracasado en demostrar una asociación sólida entre motilidad y fertilidad, probablemente debido a la baja precisión y elevada variabilidad de las observaciones, consecuencia de

la subjetividad inherente a los métodos tradicionales de evaluación de la motilidad (Amann, 1989; Gadea *et al.*, 2004; Foxcroft *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2015).

Desde el punto de vista conceptual, la cinética se refiere al estudio de la velocidad en que ocurren los procesos prescindiendo de las fuerzas que lo originan (RAE, 2001). Siendo el movimiento espermático un evento susceptible de realizar mediciones objetivas de velocidad, el método clásico, basado en asignar por observación directa un valor subjetivo dentro de una escala establecida por rasgos cualitativos del movimiento de la población espermática, obviamente imposibilita determinar las variables cinéticas del movimiento espermático, y por tanto hallar diferencias objetivas que pudieran finalmente establecer conexiones significativas entre la motilidad y el potencial fecundante de los espermatozoides. El desarrollo y la aplicación de técnicas de digitalización e interpretación de imágenes por computador en el campo de la biología, ha hecho posible el establecimiento de métodos de evaluación de la motilidad espermática que proveen información de células individuales sin la necesidad del juicio discrecional del operador (Gravance y Davis, 1995). El fundamento común de estos métodos, denominados convencionalmente *Computer-Assisted Sperm Analysis*

(CASA), es el de ingresar en un computador las imágenes en secuencia de cada célula en movimiento captadas mediante una cámara acoplada a un microscopio de contraste de fases, determinando mediante un software la velocidad de cada espermatozoide, el porcentaje de espermatozoides móviles en una muestra y la asignación en grupos según el tipo de movimiento. Estos métodos más rápidos, precisos, menos susceptibles de error han abierto el campo de estudio de la cinética espermática cuyo potencial se está consolidando desde hace tiempo (Amann y Waberski, 2014).

Una de las principales ventajas del sistema CASA es su capacidad para generar datos cinéticos a partir de cientos o incluso miles de espermatozoides individuales por cada muestra analizada. Esta propiedad ha potenciado aún más su valor como herramienta analítica, al permitir la integración de dichos datos con procedimientos estadísticos multivariados de agrupamiento o análisis de clústeres, lo cual ha contribuido significativamente a una caracterización más precisa de la heterogeneidad espermática (Abaigar *et al.*, 1999; Quintero-Moreno *et al.*, 2004; Ramio *et al.*, 2008; Flores *et al.*, 2009; Martínez-Pastor *et al.*, 2011; Ibanescu *et al.*, 2018; Henning *et al.*, 2022). El análisis de *clústeres* es un procedimiento que ordena la data en grupos, de manera que todas las observaciones dentro de cada grupo son similares según los criterios sugeridos por el programa estadístico de elección. Este análisis ha permitido determinar que la población de espermatozoides en un eyaculado no es homogénea, sino que está compuesta por distintas subpoblaciones espermáticas (Sp), cada una con características específicas (Quintero-Moreno *et al.*, 2004). Esta información resalta la motilidad como un marcador objetivo de la calidad seminal, ya sea para detectar diferencias entre verracos, predecir su resistencia al procesamiento y almacenamiento en frío, o estimar

su potencial fecundante, dado que el eyaculado no se considera una población homogénea en términos de motilidad (Quintero-Moreno *et al.*, 2004; Sancho y Vilagran, 2013; Amann y Waberski, 2014). En cerdos, al igual que en otros mamíferos, se ha reportado la existencia de subpoblaciones espermáticas (Sp) diferenciadas con base en su perfil de motilidad. Sin embargo, la comunidad científica que trabaja con sistemas CASA aún no ha alcanzado un consenso respecto al método estadístico más adecuado para su identificación, por lo que resulta necesario establecer criterios comunes para este propósito (Fernández-López *et al.*, 2022).

El presente estudio tiene la finalidad de valorar la cinética espermática mediante el sistema computarizado CASA como método para mejorar la precisión de la evaluación seminal en verracos en ambiente tropical, para lo cual se establecieron Sp en función de los descriptores de motilidad, discriminados por verraco y por el tiempo de almacenamiento bajo refrigeración a 16 °C desde las 24 h hasta las 72 h.

Material y métodos

Ubicación y manejo de los animales

El estudio se realizó en la granja comercial PROPORCA, ubicada en el municipio San Francisco, estado Zulia, Venezuela (coordenadas 10° 30' 45" N, 71° 45' 42" O), dentro de una zona agroecológica clasificada como bosque seco tropical. Se utilizaron 30 eyaculados provenientes de seis verracos de la raza Pietrain, con edades entre 16 y 20 meses, destinados a la producción de semen para inseminación artificial (IA) con semen refrigerado. La recolección se llevó a cabo siguiendo una rutina establecida, con extracciones cada 5 a 7 días, hasta completar cinco evaluaciones por cada verraco. La obtención y el procesa-

miento de las muestras seminales se realizan conforme al protocolo de extracción y preparación de dosis para IA implementado en la granja (Morales *et al.*, 2012). Para la extracción del semen, se induce al verraco a montar un maniquí y se recolecta el eyaculado mediante manipulación manual, técnica conocida como “mano enguantada” (King y Macpherson, 1973). Durante el proceso, se descarta la primera fracción del eyaculado y se filtra la fracción gelatinosa.

Los verracos se mantienen en un ambiente controlado que garantiza condiciones óptimas de temperatura y humedad relativa (Calatayud-Márquez y Quintero-Moreno, 2021), y reciben una dieta basada en alimento concentrado comercial formulado específicamente para su categoría (Morales *et al.*, 2012).

Procesamiento del semen

La obtención y el procesamiento del semen fueron realizados por un operador con experiencia comprobada. Una vez extraído el eyaculado, se evaluaron los parámetros mínimos requeridos para su uso en inseminación artificial (IA). Se observaron el color, el olor y el aspecto general de la muestra. Posteriormente, se midió el volumen y se evaluó la motilidad mediante la observación directa de una gota de semen fresco colocada sobre un portaobjetos previamente calentado a 37 °C, utilizando un microscopio óptico con aumento de 400x. La motilidad se calificó según la calidad del movimiento espermático descrita por Martín-Rillo *et al.* (1996), mediante una escala de 0 a 5, donde 0 indica ausencia total de movimiento y 5 representa un movimiento óptimo, equivalente al 100 % de motilidad. La concentración espermática se determinó utilizando una cámara de Neubauer®, y el número total de espermatozoides por eyaculado se calculó multiplicando la concentración por el volumen del eyaculado.

En esta granja, los requisitos mínimos establecidos para la utilización de los eyaculados en la elaboración de dosis para inseminación artificial son: una motilidad igual o superior a 3,5 (equivalente al 70 %), ausencia de aglutinación o niveles ≤ 10 %, y un número total de espermatozoides por eyaculado igual o superior a 32×10^9 . Los eyaculados que cumplen con estos criterios son diluidos utilizando el diluyente comercial MR-A® (Kubus, Majadahonda, España). Posteriormente, tras un período de estabilización de 2 h en oscuridad, las dosis de inseminación se envasan en frascos plásticos desechables de 100 mL, con una concentración de 4×10^9 espermatozoides por botella, y se almacenan a 16 °C por un período máximo de cinco días.

Preparación de la muestra para análisis de la viabilidad espermática

Se pipetearon 20 μ L de semen puro recién recolectado y 100 μ L de diluyente en un tubo Eppendorf, mezclándose suavemente. A continuación, se colocó una gota de la mezcla en un portaobjetos para su evaluación microscópica. A un aumento de 100X, se valoró la motilidad individual, y con base en estos resultados se determinó si el eyaculado sería procesado.

El experimento se inició utilizando semen previamente procesado y refrigerado a 16 °C, realizándose evaluaciones a las 24 y 72 h posteriores al procesamiento para determinar la motilidad, vitalidad y presencia de anomalías espermáticas. Para la preparación de los extendidos, se utilizaron portaobjetos precalentados a 37 °C mediante una platina térmica. Se mezclaron 10 μ L de semen diluido con 10 μ L de la tinción eosina-nigrosina, homogenizando la muestra cuidadosamente antes de realizar el extendido. Posteriormente, la preparación se dejó secar al ambiente y fue almacenada para su observación bajo un microscopio óptico con un aumento de 400x.

Determinación de vitalidad, anormalidades morfológicas y alteración del acrosoma

Una vez realizada la dilución del semen, se procedió a determinar la vitalidad espermática y las anormalidades morfológicas (AM). Para ello, se analizaron al menos 200 espermatozoides por muestra, registrando el porcentaje de células vivas (no teñidas) y muertas (teñidas). Las AM se clasificaron como normales o anormales, incluyendo defectos en la cabeza (número, tamaño y forma), en la pieza intermedia (posición y apariencia) y en el flagelo (número, forma y tamaño), así como la presencia de gotas citoplasmáticas proximales y distales. Adicionalmente, se evaluó el porcentaje de espermatozoides con alteraciones acrosómicas mediante observación a un aumento de 1000x (Bamba, 1988). Todas las muestras analizadas presentaron resultados óptimos en cuanto a vitalidad, morfología y normalidad acrosómica, cumpliendo con los estándares establecidos para la especie porcina (Rozeboom, 2003). Esta evaluación confirmó que las dosis seleccionadas para el análisis de los descriptores de motilidad eran óptimas.

Determinación de la motilidad mediante CASA

Después del procesamiento y envasado, se tomaron dos dosis seminales por cada verraco, las cuales fueron transportadas bajo refrigeración a 18 °C hasta el Laboratorio de Andrología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, donde se almacenaron a una temperatura constante de 16 °C. A las 24 h posteriores al envasado, se inició el análisis de las variables cinéticas mediante el sistema CASA. Cabe destacar que cada dosis seminal fue preparada para contener 2×10^9 espermatozoides. Sin embargo, se trasladó adicionalmente una botella con diluyente para realizar ajustes en caso de que la concentración observada al microscopio excediera los 100×10^6 espermatozoides/mL.

El estudio se estructuró en dos momentos. El primer análisis se realizó a las 24 h de almacenamiento a 16 °C. El segundo se llevó a cabo a las 72 h, con el objetivo de evaluar el efecto de la refrigeración prolongada, manteniendo las muestras durante todo ese período a la misma temperatura de 16 °C.

En ambos momentos de evaluación, se tomó una botella de cada eyaculado, la cual fue homogeneizada y posteriormente calentada en baño de maría a 37 °C durante 5 min. A continuación, se pipetearon 5 μ L de semen, que fueron depositados en cámaras Leja® de 20 μ m de profundidad y capacidad para 3 μ L (Nieuw Venne, Holanda), para su observación y captura digital mediante un microscopio triocular (Olympus BX41TF, Tokio, Japón), equipado con objetivo de 10x, contraste de fases negativo y platina calefactada.

El sistema de captura de imágenes consistió en una cámara de video (Basler® A312f, Ahrensburg, Alemania) conectada a un computador con un digitalizador de imágenes de video PIP-1024 B (Matrox Electronic System Ltd., Québec, Canadá). El software utilizado para el análisis fue el Sperm-Class Analyzer, SCA® v.3.4 (2008, Microptic, Barcelona, España). Este sistema CASA analiza 25 imágenes por campo visual, tomadas y digitalizadas en un intervalo total de 0,64 s, con una frecuencia de captura de 40 ms/imagen. A partir de esta secuencia, el software rastrea la trayectoria de cada espermatozoide presente en el campo (incluidos los inmóviles) y calcula objetivamente los parámetros cinéticos individuales: velocidad curvilínea (VCL, μ m/s), velocidad rectilínea (VSL, μ m/s), velocidad promedio (VAP, μ m/s), índice de linealidad (LIN, %), índice de rectitud (STR, %), índice de oscilación (WOB, %) y desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μ m).

Para cada muestra evaluada se analizaron, como mínimo, cinco campos visuales, registrando al menos 1.000 espermatozoides con sus respectivas trayectorias de movimiento.

La base de datos generada por el sistema CASA fue exportada a una hoja de cálculo de Excel®, conteniendo los descriptores individuales de motilidad espermática. A partir de estos datos, se excluyeron los espermatozoides que presentaban una $VCL \geq 400 \mu\text{m/s}$, así como aquellos con una $VAP \leq 10 \mu\text{m/s}$. Este último grupo fue clasificado Sp de espermatozoides inmóviles. Posteriormente, se realizó un ajuste porcentual de esta Sp con respecto al total de espermatozoides móviles, sobre los cuales se efectuó la posterior clasificación en Sp.

Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos fueron analizados utilizando el software Statistical Analysis System® v8.2 para MS Windows® (SAS, 2004). Para identificar la presencia de Sp en el eyaculado, los descriptores de motilidad se sometieron a un análisis multivariado de agrupamiento no jerárquico (FASTCLUS). Posteriormente, se verificaron y ajustaron los resultados aplicando el Modelo Lineal General del Análisis de la Varianza (GLM) y se cuantificaron mediante el procedimiento LSMEANS.

Este procedimiento FASTCLUS ofrece una implementación eficiente del algoritmo *k-means*, diseñado para manejar grandes conjuntos de datos de variables cuantitativas, agrupando las observaciones de manera efectiva. Al aplicarse a poblaciones espermáticas, proporciona varias ventajas, ya que combina un método eficaz para identificar clústeres iniciales con un algoritmo iterativo estándar que minimiza la suma de distancias al cuadrado respecto a las medias de los clústeres. Esto permite una asignación rápida y eficiente de las observaciones a los clústeres más cercanos, lo que resulta particularmente útil cuando se trabaja con grandes volúmenes de datos, como en los estudios de poblaciones espermáticas analizadas mediante el sistema CASA (Quintero-Moreno et

al., 2004). Tras dividir los datos en varios grupos, se determinó que el número óptimo de Sp correspondía a tres. Para validar esta agrupación, se aplicó el coeficiente de determinación (R^2) a distintos números de clústeres, dado que un valor más alto de R^2 indica una mejor separación entre grupos. Sin embargo, cuando la adición de más clústeres deja de mejorar significativamente el R^2 (incremento $<5\%$), se considera que se ha alcanzado un número óptimo de grupos.

Además, al graficar la varianza explicada en función de k , se identificó el punto en el que la mejora de R^2 comienza a estabilizarse, formando un "codo" en la gráfica. Este punto sugiere el número ideal de Sp. Adicionalmente, se empleó el coeficiente de silueta como medida complementaria para evaluar la calidad del agrupamiento obtenido con el algoritmo de clasificación (Saputra et al., 2020).

Para determinar la distribución porcentual de las Sp entre verracos (1-6) y entre los tiempos de valoración (24 h vs. 72 h) se utilizó la prueba de *Chi-cuadrado* (χ^2).

Resultados y discusión

Convencionalmente, se ha asumido que, aunque una baja concentración espermática o un alto número de anomalías pueden correlacionarse con infertilidad, la alteración en la motilidad espermática tiene un impacto aún mayor cuando está presente (Turner, 2003). En este contexto, el sistema CASA permite un análisis altamente sofisticado de las características cinéticas de los espermatozoides. Este sistema ha evidenciado que la capacidad de movimiento dentro de un eyaculado es notablemente heterogénea, debido a factores como la espermatogénesis, las condiciones de ensamblaje, el grado de maduración y el tiempo de tránsito en el epidídimo (Harrison, 1996; Quintero-Moreno et al., 2004).

Los espermatozoides utilizados en este estudio provinieron de dosis seminales comerciales, ajustadas desde una concentración convencional de 4×10^9 a un rango de 1 a 3×10^9 espermatozoides, almacenadas entre 15 y 18 °C. Para activar su motilidad, las muestras se preincubaron a 37 °C. Las valoraciones se realizaron en muestras de $3 \mu\text{L}$, con una concentración máxima de 100×10^6 espermatozoides/mL, y un rango habitual de 30 a 60×10^6 , lo que permitió evaluar con precisión las trayectorias espermáticas. Se ha establecido que el intervalo óptimo de concentración para este tipo de análisis oscila entre 2 y 50×10^6 espermatozoides/mL (Yeste *et al.*, 2018). Según estos autores, concentraciones elevadas pueden aumentar el margen de error en la estimación de patrones individuales de motilidad, mientras que diluciones excesivas pueden reducir la calidad del movimiento espermático.

La tabla 1 muestra las variables cinéticas obtenidas tras aplicar el análisis multivariado FASTCLUS a 55.506 espermatozoides móviles provenientes de eyaculados de seis verracos, almacenados a 16 °C. Este análisis determinó que la forma más eficiente de subdividir la muestra fue mediante tres Sp, basándose en las variables con mayor capacidad explicativa de la variabilidad entre clústeres. Estas variables no solo caracterizan a cada Sp, sino que también permiten diferenciarlas entre sí.

En el presente estudio, las Sp se caracterizaron de la siguiente manera: Sp3 presentó los valores más altos de VSL, LIN y STR, indicando un movimiento rápido y progresivo. Sp2 mostró valores más altos de VCL y ALH, pero inferiores en VSL, LIN y STR respecto a Sp3, lo que sugiere una motilidad activa, pero con menor progresividad, posiblemente incluyendo espermatozoides hiperactivados. Sp1 agrupó a los espermatozoides más lentos, aunque con mayor progresividad que los de Sp2, probablemente correspondiendo a células en etapas de activación o cercanas al fin de su vida funcional.

Tabla 1. Media y desviación estándar de las variables cinéticas divididas en subpoblaciones espermáticas tras 24 h de refrigeración.
Table 1. Mean and standard deviation of kinetic variables divided into sperm subpopulations.

Subpoblación espermática	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
Sp1	$42,5 \pm 16,5^c$	$15,42 \pm 8,0^c$	$26,5 \pm 10,8^c$	$38,2 \pm 18,2^b$	$58,2 \pm 20,0^b$	$64,4 \pm 16,0^b$	$2,18 \pm 0,8^b$	$5,01 \pm 2,8^c$
Sp2	$102,6 \pm 22,8^a$	$30,4 \pm 13,4^b$	$61,5 \pm 17,3^b$	$29,8 \pm 11,4^c$	$50,5 \pm 19,1^c$	$61,0 \pm 15,4^b$	$4,46 \pm 1,3^a$	$6,47 \pm 2,8^b$
Sp3	$76,9 \pm 22,7^b$	$55,6 \pm 16,3^a$	$63,7 \pm 16,9^a$	$73,8 \pm 13,5^a$	$87,4 \pm 9,6^a$	$84,3 \pm 11,0^a$	$2,58 \pm 1,1^b$	$7,64 \pm 2,7^a$

a,b,c = valores con diferente superíndice indican diferencias significativas ($P \leq 0,001$); VCL = velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$); VSL = velocidad rectilínea ($\mu\text{m/s}$); VAP = velocidad promedio ($\mu\text{m/s}$); LIN = índice de linealidad (%); STR = índice de rectitud (%); WOB = índice de oscilación (%); ALH = desplazamiento lateral de la cabeza (μm); BCF = frecuencia de batido cruzado (Hz).

Este enfoque multivariado ha sido aplicado con éxito en la especie porcina (Abaigar *et al.*, 1999; Quintero-Moreno *et al.*, 2004; Rivera *et al.*, 2005; Ramio *et al.*, 2008; Flores *et al.*, 2009; Ibanescu *et al.*, 2018; Henning *et al.*, 2022). En estos estudios, el número de clústeres se establece a priori y el investigador selecciona la cantidad de Sp que mejor explique el comportamiento de los datos. En el presente experimento, la clasificación osciló entre dos y cinco Sp, optándose por tres con base en el análisis del coeficiente de determinación (R^2), el coeficiente de silueta y el método del codo (Saputra *et al.*, 2020), los cuales confirmaron esta elección.

Generalmente, la clasificación de los espermatozoides se fundamenta en parámetros como VSL, VAP, y su grado de progresividad, evaluado mediante LIN y WOB (Davis *et al.*, 1995; Martínez-Pastor *et al.*, 2011). Sin embargo, el agrupamiento de los descriptores de motilidad sigue siendo un tema debatido y en evolución (Ibanescu *et al.*, 2018). En particular, se ha cuestionado el uso del método K-means (Martínez-Pastor, 2022). Aun así, diversos estudios recientes realizados por expertos en análisis estadístico y segmentación han respaldado su validez (Saputra *et al.*, 2020; Rodríguez-Monteagudo *et al.*, 2024).

Desde hace tiempo, se ha criticado la interpretación de la motilidad como un valor unitario derivado del promedio poblacional (Quintero-Moreno *et al.*, 2004; Ibanescu *et al.*, 2018). Esto ha motivado el desarrollo de análisis más detallados a partir de los datos generados por CASA, permitiendo la clasificación en Sp. No obstante, la estandarización de estos criterios sigue siendo un reto, debido a la diversidad de sistemas CASA, cámaras, volúmenes analizados, tasas de captura y número de fotogramas por segundo (fps), así como a la cantidad de descriptores de motilidad evaluados simultáneamente (Martínez-Pastor, 2022).

Respecto a los fps, estudios en cerdos (Valverde *et al.*, 2018; Barquero *et al.*, 2021; Hackerova *et al.*, 2025) y otras especies (Castellini *et al.*, 2011; Bompart *et al.*, 2019) han demostrado que una mayor tasa de captura mejora la precisión en la medición de trayectorias espermáticas. En este experimento, el sistema CASA operó a 25 fps. Aunque esta tasa es relativamente baja, no comprometió los resultados, ya que, según Castellini *et al.* (2011), la motilidad general no se ve significativamente afectada por esta variable. Sin embargo, se ha reportado que la fps óptima para estudios en verracos oscila entre 200 y 225 (Valverde *et al.*, 2018), especialmente para estimar con mayor exactitud variables como VCL y BCF, mientras que el parámetro VSL no se afecta y los descriptores VAP, LIN, STR y WOB corresponden a parámetros que derivan de la relación VCL/VSL, por lo cual su variación va a depender de la variación de la VCL.

La selección de tres Sp fue además respaldada por trabajos previos como el de Quintero *et al.* (2004), que mostraron que la Sp más veloz no necesariamente es la más fecundante. En cambio, resaltaron la importancia de la Sp dominante con mayor progresividad y velocidad promedio (89,4 %), así como una Sp minoritaria (1,4 %) posiblemente hiperactivada. Por su parte, Abaigar *et al.* (1999), utilizando una metodología estadística distinta, también identificaron tres Sp: una rápida y progresiva (73,38 %), otra muy lenta (7,23 %) y una tercera con movimientos oscilatorios de baja progresividad (19,39 %). Hirai *et al.* (2001) encontraron una asociación entre mayor linealidad y fertilidad, aunque la prolificidad se relacionó con el porcentaje total de células móviles.

En estudios de semen refrigerado y/o criopreservado (Rivera *et al.*, 2005; Ramio *et al.*, 2008; Flores *et al.*, 2009), se identificaron cuatro Sp usando metodologías similares. Ibanescu *et al.* (2018) también identificaron

cuatro patrones de movimiento: rápidos y lineales, rápidos y no lineales, lentos y lineales, y lentos y no lineales, patrones que se han mantenido consistentes a pesar de las diferencias metodológicas.

Es importante destacar que en este estudio la clasificación se aplicó exclusivamente a espermatozoides móviles con $VAP \geq 10 \mu\text{m/s}$. Por lo tanto, existe una cuarta Sp correspondiente a células inmóviles que fue referenciada pero no incluida en los análisis estadísticos.

La variabilidad en los parámetros cinéticos, según el origen de la muestra, puede influir en la estructura del número de Sp, ya sea por especie, tipo de muestra (fresca, refrigerada o congelada), edad, entre otros factores. Se presume que la fertilidad de un eyaculado está influenciada por la abundancia de la Sp con mejores características fisiológicas. Por el contrario, un aumento en la proporción de Sp con indicadores de daño celular comprometería el potencial reproductivo del seminal (Amann y Waberski, 2014).

Para complementar el análisis, se evaluó la distribución porcentual de las Sp por animal (tabla 2). Tres verracos mostraron una clara predominancia de la Sp3, correspondiente a la subpoblación con mayor velocidad progresiva. Asimismo, la motilidad total observada visualmente (4-4,5 %) fue óptima (>3,5; 70 %) y similar entre individuos. Sin embargo, el análisis estadístico reveló diferencias porcentuales en las Sp entre eyaculados con apariencia de calidad semejante, lo que subraya la sensibilidad del sistema CASA frente a la observación subjetiva del operador.

El desafío actual radica en traducir estas diferencias en índices o marcadores predictivos del potencial reproductivo. En este sentido, Ferraz (2013) reportó que una mayor proporción de espermatozoides con alta veloci-

dad y progresividad se correlaciona con mayor éxito en pruebas de fecundación in vitro, posicionando el estudio de las Sp como herramienta clave en la selección de sementales de alto valor genético.

Es probable que los cambios en las proporciones de Sp dentro de un eyaculado estén influenciados por su procesamiento o almacenamiento (Quintero-Moreno *et al.*, 2004). En la tabla 3 se muestra el efecto del almacenamiento a 16 °C durante 72 h. Se observó una reducción porcentual y significativa de la Sp3 en un 13,74 %, mientras que la Sp2 y Sp1 aumentaron en 7,68 % y 3,06 %, respectivamente.

Dado que la Sp3 corresponde a la subpoblación de movimiento más rápido y progresivo, es razonable suponer que la refrigeración afectó negativamente la calidad cinética del eyaculado. Además, la respuesta del semen refrigerado puede variar según la estación del año y el clima (Ibanescu *et al.*, 2018; Calatayud-Márquez y Quintero-Moreno, 2021). Con base en estos hallazgos, se concluye que el almacenamiento durante 72 h afecta de manera significativa a la Sp con mayor progresividad. Esta alteración pudo ser cuantificada objetivamente gracias a la combinación del sistema CASA y el análisis multivariado de clústeres.

Finalmente, el análisis de Sp basado en datos obtenidos por CASA representa una renovación en la evaluación de la motilidad espermática. A diferencia de la evaluación subjetiva, esta metodología permite detectar variaciones con significancia estadística y relacionarlas con la calidad del semen, su capacidad de conservación y su potencial fecundante. Aunque aún no se dispone de un índice práctico que vincule directamente estos parámetros con la fertilidad, este estudio aporta un nuevo avance hacia ese objetivo.

Tabla 2. Cantidad y distribución porcentual de espermatozoides dentro de las subpoblaciones espermáticas discriminadas por verraco.
Table 2. Quantity and percentage distribution of spermatozoa within sperm subpopulations discriminated by boar.

Subpoblación espermática	TOTAL	Agrupamiento de los espermatozoides en Sp de 6 verracos utilizados					
		1	2	3	4	5	6
Sp1	21.863 (39,39 %)	3.627 (39,91 %)	4.003 (46,41 %)	3.577 (37,28 %)	2.887 (29,74 %)	3.759 (31,93 %)	4.010 (37,84 %)
Sp2	13.415 (24,17 %)	2.839 (31,24 %)	2.080 (24,11 %)	1.992 (20,76 %)	1.799 (18,53 %)	2.596 (22,05 %)	2.109 (19,90 %)
Sp3	20.228 (36,44 %)	1.994 (21,94 %)	1.620 (18,78 %)	3.337 (34,78 %)	4.514 (46,49 %)	4.915 (41,75 %)	3.848 (36,31 %)
Spmóviles	55.506 (93,46 %)	8.460 (93,09 %)	7.703 (89,30 %)	8.906 (92,81 %)	9.200 (94,76 %)	11.270 (95,73 %)	9.967 (94,05 %)
Spinmóviles	3.883 (6,54 %)	628 (6,91 %)	923 (10,70 %)	689 (7,18 %)	509 (5,24 %)	503 (4,27 %)	631 (5,95 %)
Sp _{móviles+inmóviles} (100 %)	59.389	9.088	8.626	9.595	9.709	11.773	10.598
MT	4,16	4,0	4,0	4,5	4,5	4,0	4,0

MT: motilidad total obtenida por un operador cualificado (0-5). Prueba de $\chi^2 \leq 0,0001$ (Sp x verraco).

Tabla 3. Distribución porcentual de las subpoblaciones espermáticas en función del tiempo de refrigeración (24 h y 72 h) a 16 °C.

Table 3. Percentage distribution of sperm subpopulations as a function of cooling time (24 h and 72 h) at 16 °C.

Subpoblaciones espermáticas	Tiempo de refrigeración		Diferencia
	24 h	72 h	
Sp1	39,52 %	42,58 %	+3,06
Sp2	20,53 %	28,21 %	+7,68
Sp3	42,95 %	29,21 %	-13,74

Sp = subpoblaciones espermáticas. Prueba de $\chi^2 \leq 0,0001$ (Sp₁₋₂₋₃ × Tiempo de refrigeración, 24 h y 72 h).

Conclusiones

El presente estudio permitió validar la existencia de tres subpoblaciones espermáticas en semen de verraco refrigerado a 16 °C durante 72 h, mediante el análisis de variables cinéticas obtenidas con el sistema CASA. Se evidenció un efecto deletéreo del almacenamiento sobre la subpoblación caracterizada por un movimiento rápido y progresivo, lo que sugiere una disminución en el potencial fecundante tras la refrigeración. Además, se identificaron diferencias en los patrones de motilidad entre verracos, pese a que sus espermogramas clásicos no mostraron variaciones apreciables según la evaluación convencional. Estos hallazgos destacan la utilidad del análisis de subpoblaciones como una herramienta complementaria para detectar diferencias en la calidad seminal que no son perceptibles mediante métodos tradicionales. La combinación de CASA con análisis estadísticos multivariados permite una evaluación más precisa y objetiva de la motilidad espermática, aportando información relevante para la optimización del manejo reproductivo en porcicultura.

Declaración de autoría

- Decio González-Villalobos: Investigación, redacción del borrador original y revisión, y edición final del mismo.
- Armando Quintero-Moreno: conceptualización, adquisición de fondos, investigación, análisis formal, redacción del borrador original y revisión, y edición final del mismo.

Agradecimientos

Se agradece a la empresa Productora Occidental Porcina C.A. (PROPORCA) por facilitar el uso de sus instalaciones y sus verracos para realizar este experimento.

Referencias bibliográficas

- Abaigar T., Holt W.V., Harrison R.A., del Barrio G. (1999). Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhor*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biology of Reproduction* 60(1): 32-41. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.1.32>

- Amann R.P. (1989). Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *Journal of Andrology* 10: 89-98. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1989.tb00066.x>
- Amann R.P., Waberski D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81(1): 5-17. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.004>
- Bamba K. (1988). Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology* 29: 1245-1251. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90004-0](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90004-0)
- 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>
- Bompart D., Vázquez R.F., 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. 209: 106169. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106169>
- Calatayud-Márquez D., Quintero-Moreno A. (2021). Características seminales de verracos alojados en ambiente controlado ubicado en trópico cálido. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú* 32(4): e19112. <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i4.19112>
- Castellini C., Dal Bosco A., Ruggeri S., Collodel J. (2011). What is the best frame rate for evaluation of sperm motility in different species by computer-assisted sperm analysis? *Fertility and Sterility* 96: 24-27. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.096>
- Davis R.O., Drobnis E.Z., Overstreet J.W. (1995). Application of multivariate cluster, discriminate function and stepwise regression analyses to variable selection and predictive modeling of sperm cryosurvival. *Fertility and Sterility* 63(5): 1051-1057. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)57547-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)57547-5)
- Dott H.M., Foster G.C.A. (1979). The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. *Reproduction* 55(1): 161-166. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0550161>
- Fawcett D.W. (1970). A comparative view of sperm ultrastructure. *Biology of Reproduction* 2(Suppl. 2): 90-127. https://doi.org/10.1095/biolreprod2.Supplement_2.90
- Fernández-López P., Garriga J., Casas I., Yeste M., Bartumeus F. (2022). Predicting fertility from sperm motility landscapes. *Communications Biology* 5(1): 1027. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03954-0>
- Ferraz M.A. (2013). Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to *in vitro* sperm-oocyte interaction and field fertility of frozen-thawed semen from Holstein bulls. (Tesis de máster). Universidad Politécnica de Valencia. <https://riunet.upv.es/handle/10251/40228>
- Flores E., Fernández-Novell J.E., Peña A., Rodríguez-Gil J.E. (2009). The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. *Theriogenology* 72: 784-797. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.05.013>
- Foxcroft G.R., Dyck M.K., Ruiz-Sanchez A., Novak S., Dixon W.T. (2008). Identifying useable semen. *Theriogenology*. 70(8): 1324-1336. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.015>
- Gadea J., Sellés E., Marco M.A. (2004). The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Reproduction in Domestic Animals* 39: 303-308. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00513.x>
- Gravance C.G., Davis R.O. (1995). automated sperm morphometry analysis (ASMA) in the rabbit. *Journal of Andrology* 16: 88-93. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1995.tb01736.x>
- Hackerova L., Pilsova A., Pilsova Z., Zelenkova N., Hegrova P.T., Klusackova B., Chmelikova E., Sedmikova M., Simonik O., Postlerova P. (2025). Boar sperm motility assessment using computer-assisted sperm analysis: current practices, limitations, and methodological challenges. *Animals* 54(2): 167-175. <https://doi.org/10.3390/ani15030305>

- Harrison R.A. (1996). Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reproduction, Fertility and Development* 8(4): 581-594. <https://doi.org/10.1071/rd9960581>
- Henning H., Franz J., Batz-Schott J., Le Thi X., Waberski D. (2022). Assessment of chilling injury in boar spermatozoa by kinematic patterns and competitive sperm-oviduct binding *in vitro*. *Animals* 12: 712. <https://doi.org/10.3390/ani12060712>
- Hirai M., Boersma A., Hoefflich A., Wolf E., Föll J., Aumüller R., Braun J. (2001). Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. *Journal of Andrology* 22: 104-110. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02159.x>
- Ibanescu J., Leiding C., Bollwein H. (2018). Cluster analysis reveals seasonal variation of sperm subpopulations in extended boar semen. *Journal of Reproduction and Development* 64(1): 33-39. <https://doi.org/10.1262/jrd.2017-083>
- Jung M., Rüdiger K., Schulze M. (2015). *In vitro* measures for assessing boar semen fertility. *Reproduction in Domestic Animals* 50 (Suppl. 2): 20-24. <https://doi.org/10.1111/rda.12533>
- King G.J., Macpherson J.W. (1973). A comparison of two methods for boar semen collection. *Journal of Animal Science* 36: 563-565. <https://doi.org/10.2527/jas1973.363563x>
- Lindemann C.B., Orlando A., Kanous K.S. (1992). The flagellar beat of rat sperm is organized by the interaction of two functionally distinct populations of dynein bridges with a stable central axonemal partition. *Journal of Cell Science* 102: 249-260. <https://doi.org/10.1242/jcs.102.2.249>
- Martínez-Pastor F., Tizado E.J., Garde J.J., Anel L., de Paz P. (2011). Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology* 75(5): 783-795. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.034>
- Martínez-Pastor F. (2022). What is the importance of sperm subpopulations? *Animal Reproduction Science* 246: 106844. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106844>
- Martín-Rillo S., Martínez E., García-Artiga C., de Alba C. (1996). Boar semen evaluation in practice. *Reproduction in Domestic Animals* 35: 519-526.
- Morales B., Quintero-Moreno A., Osorio-Meléndez C., Rubio-Guillén J. (2012). Valoración de la biometría de la cabeza del espermatozoide mediante análisis computarizado en semen de cerdo recién colectado y refrigerado. *Revista de la Facultad de Agronomía Universidad del Zulia (LUZ)*. 29: 413-431.
- Phillips D.M. (1970). Insect sperm: their structure and morphogenesis. *Journal of Cell Biology* 44(2): 243-277. <https://doi.org/10.1083/jcb.44.2.243>
- Quintero-Moreno A., Rigau T., Rodríguez-Gil J.E. (2004). Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology* 61(4): 673-690. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00248-6](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00248-6)
- RAE (2001). Diccionario de la lengua española. Real Academia Española. Disponible en <http://www.rae.es/rae.html> (Consultado el 06/07/2024).
- Ramio L., Rivera M.M., Ramírez A., Concha I.I., Peña A., Rigau T., Rodríguez-Gil J.E. (2008). Dynamics of motile-sperm subpopulation structure in boar ejaculates subjected to "in vitro" capacitation and further "in vitro" acrosome reaction. *Theriogenology* 69: 501-512. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.10.021>
- Rivera M.M., Quintero-Moreno A., Barrera X., Palomo M.J., Rigau T., Rodríguez-Gil J.E. (2005). Natural Mediterranean photoperiod does not affect the main parameters of boar-semen quality analysis. *Theriogenology* 64: 934-946. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.01.001>
- Rodríguez-Monteagudo M., Avello-Martínez R., Avello-Rodríguez A. (2024). Análisis de clúster para la clasificación de pacientes atendidos en consulta de infertilidad. *Revista Cubana de Informática Médica* 16(1): e692
- Rozeboom K. (2003). Quality assurance of semen. En: *Leman Swine Conference* (Ed. Allen D.), pp. 171-179. Retrieved from the University Digital Conservancy. <https://hdl.handle.net/11299/146366>

- Sancho S. y Vilagran I. (2013). The boar ejaculate: sperm function and seminal plasma analyses. En: *Boar Reproduction: Fundamentals and New Biotechnological Trends*. 1ra Ed (Eds. Bonet S., Casas I., Holt W., Yeste M.). pp. 471-516. Springer-Verlag Berlin. Alemania. https://doi.org/10.1007/978-3-642-35049-8_9
- Saputra D.M., Saputra D., Oswari L.D. (2020). Effect of distance metrics in determining K-value in k-means clustering using elbow and silhouette method. *Advances in Intelligent Systems Research*. 172: 341-346. <https://doi.org/10.2991/aisr.k.200424.051>
- SAS. (2004). *Statistical Analysis Software*. SAS Institute Inc. SAS/STAT ® 9.1 User's Guide. Cary, NC. USA.
- Turner R.M. (2003). Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? *Journal of Andrology* 24: 790-803. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb03123.x>
- Valverde A., Madrigal M., Caldeira C., Bompart D., Núñez de Murga J., Arnau S., Soler C. (2018). Effect of frame rate capture frequency on sperm kinematic parameters and subpopulation structure definition in boars, analysed with a CASA Mot system. *Reproduction in Domestic Animals* 54: 167-175. <https://doi.org/10.1111/rda.13320>
- Yeste M., Bonet S., Rodríguez-Gil J.E., Rivera Del Álamo M.M. (2018). Evaluation of sperm motility with CASA-Mot: which factors may influence our measurements? *Reproduction, Fertility and Development* 30(6): 789-798. <https://doi.org/10.1071/rd17475>
- (Aceptado para publicación el 5 de noviembre de 2025)