

**EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA DE SEMEN CAPRINO  
CRIOPRESERVADO BAJO DIFERENTES MEDIOS DILUYENTES A TRAVÉS  
DEL SISTEMA CASA**

**LEONARDO HERNANDEZ CORREDOR**

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA - UNAD  
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS, PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE  
ESPECIALIZACION EN MEJORAMIENTO GENETICO**

**CUCUTA**

**2014**

**EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA DE SEMEN CAPRINO  
CRIOPRESERVADO BAJO DIFERENTES MEDIOS DILUYENTES A TRAVÉS  
DEL SISTEMA CASA**

**LEONARDO HERNANDEZ CORREDOR**

**88.223.283**

**DIRECTOR**

**ALEXANDER NIVIA OSUNA Zootecnista, MSc.**

**ASESORES**

**ARMANDO QUINTERO M.V. Ph.D.**

**DANIEL HERNANDEZ V. Zootecnista MSc.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA - UNAD  
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS, PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE  
ESPECIALIZACION EN MEJORAMIENTO GENETICO**

**CUCUTA**

**2014**

## DEDICATORIA

*A Dios, a Mi Papa, a mi Mama*

*A Diana, a Eduardo y a Tachi*

*A Don Pedro Pablo Corredor Briceño  
y a Doña María Gutiérrez viuda de Corredor,  
Gracias por enseñarme lo hermoso del campo*

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor expresa sus agradecimientos a:

La Universidad Nacional Abierta y a Distancia – (UNAD), Universidad del Zulia y Universidad Francisco de Paula Santander, sede Ocaña.

Alexander Nivia Osuna. Zootecnista, MSc; Director de proyecto. Por su gran colaboración.

Armando Quintero Moreno. Médico Veterinario. Ph.D. Asesor del proyecto de grado. Gracias por enseñarme sobre andrología animal.

Daniel Hernández Villamizar. Zootecnista. MSc; Asesor del proyecto.

Pedro Antonio López Díaz. Por su ánimo en todo momento y creer en mí.

Jorge Rubio, Pedro Hernández Corredor, por ayudarme a organizar parte de mi vida.

A la Ingeniero Agrónomo, Diana Rosales Mancipe (Mi Esposa), a Eduardo Hernández Rosales y Angie Paola Rojas Hernández, por alentarme cuando más cansado estaba. Y por permitir que les robe de su tiempo.

Al Servicio Nacional de Aprendizaje, SENA..... Regional Norte de Santander

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
1. INTRODUCCIÓN	9
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo general	12
2.2. Objetivos específicos	12
3. MARCO TEORICO	13
3.1. EVALUACIÓN SEMINAL	13
3.1.1. Características macroscópicas	13
3.1.2. Características microscópicas	14
Motilidad espermática	15
Motilidad individual progresiva	16
3.2. APLICACIÓN DE SISTEMAS COMPUTARIZADOS PARA LA VALORACIÓN SEMINAL	18
3.3 CARACTERISTICAS SEMINALES DEL MACHO CABRIO	24
3.4 DILUYENTES	25
4. ARTICULO	26
Evaluación de la motilidad espermática de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes a través del sistema CASA	
5. CONCLUSIONES	47
6. RECOMENDACIONES	49
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	51
8. ANEXOS	56

## LISTA DE TABLAS

		<b>Pág.</b>
Tabla 1	Características del eyaculado de un semental caprino obtenido mediante la vagina artificial.	14
Tabla 2	Escala para la evaluación microscópica de la motilidad individual progresiva aplicada para el semen caprino.	17

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Representación esquemática del Sistema Computarizado de Análisis Seminal	20
Figura 2. Parámetros de motilidad	22
Figura 3. Parámetros de motilidad obtenidos por el C.A.S.A. I.	22
Figura 4. Parámetros de motilidad obtenidos por el C.A.S.A. II.	23
Figura 5. Representación de los parámetros del C.A.S.A. para espermatozoides de ratas durante la capacitación <i>in vitro</i>	23

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Anexo A. Resultados CASA	56

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción caprina es una actividad que durante los últimos tiempos ha tenido un crecimiento significativo en el sector pecuario y ha servido de fuente de ingresos para los pequeños productores en la región del Norte de Santander. La explotación de esta especie se basa principalmente en la extracción de productos como carne y leche, siendo aún poco tecnificados. Para lograr el aumento en la producción de este renglón, el mejoramiento animal juega un papel importante; ya que con la introducción de razas especializadas puras o en cruzamiento, se espera mejorar los índices productivos y reproductivos ([URPA, 2007](#)).

Cabe mencionar que en nuestro país y en especial en la región norte, los programas de mejoramiento genético en la especie caprina no han tenido gran impacto, encontrándose en la actualidad unidades de producción con poca tecnificación y con mínimos lineamientos productivos. Sin embargo, con las nuevas políticas de libre comercio, las especies ovinas y caprinas han tomado un auge en su cría y sus sistemas productivos. Cambiar las formas de producción y mejorar sus índices productivos es el nuevo ideal de las asociaciones de productores que se han venido implementando. Finalmente, es de resaltar que a la fecha existen pocos estudios en el área reproductiva en relación a los caprinos ([Rubio-Parada, 2010](#)).

La introducción de técnicas como la inseminación artificial ha estado lejos de ser una tecnología accesible a los productores de la región debido a diversos factores como el costo de importar material seminal de otras partes del mundo (donde aplican programas de mejoramiento animal y donde han logrado implementar en alguna manera la técnica). De otra parte, existen pocos estudios a nivel nacional que evalúen la calidad de los animales existentes para ser incluidos en programas de reproducción. Siendo así, necesario el desarrollo de estudios reproductivos. Dentro de los análisis reproductivos que se realizan habitualmente se tiene las evaluaciones andrológicas tradicionales que incluyen en general, el análisis de

concentración espermática, motilidad y vitalidad (vivos-muertos) y anomalías morfológicas de los espermatozoides ([Hidalgo, 2004](#)). Cabe mencionar, que la evaluación rutinaria del material seminal, no es predictor del potencial reproductivo del macho, así mismo, la resistencia a los procesos de criopreservación.

No se puede predecir la funcionalidad de las poblaciones espermáticas que permanezcan viables tras la descongelación; luego no se puede estandarizar los procedimientos en los diferentes centros de procesamiento seminal y esto se ve afectado por la repetibilidad de los resultados y finalmente, la gran subjetividad de las pruebas y la alta variabilidad entre laboratorio y técnicos ([Gravance y Davis, 1995](#); [Foxcroft et al., 2008](#)).

La estandarización de las pruebas de laboratorio, es el problema que persiste en los procesos investigativos a fin de predecir la capacidad fecundante de los espermatozoides en las dosis seminales. La mejor manera de determinar la capacidad fecundante de un macho y su semen criopreservado, es por la evaluación del número de animales inseminados. Por consiguiente, este método de valoración es muy extenso, resultando muy costoso y pueden ser influenciados por el factor hembra ([Hernández, 2012](#)). Por eso se dio la necesidad de realizar un software más objetivo y con una rigidez milimétrica y que pueda evaluar varios parámetros de forma simultánea como motilidad, concentración, morfología, entre otros. De manera que generan datos más acertados y permita estimar la viabilidad fecundante seminal ([Amann, 1989](#)).

Por eso, no se escatimo esfuerzos para el desarrollo de sistemas computarizados para el análisis seminal *in vitro*, CASA (Computer Assisted Sperm Análisis), para el estudio de vitalidad, motilidad, fragmentación de DNA. Haciendo de manera más objetiva la predicción de la capacidad fecundante del semen, esto conlleva a

mejorar los estudios en cuanto a los protocolos y diluyentes para lograr la mayor supervivencia espermática post-descongelación ([Mortimer, 1997](#)).

Desde hace unos años se practican pruebas adicionales a las evaluaciones seminales normales, teniendo en cuenta la fisiología espermática con mucha precisión. Algunas de estas pruebas son: CASA motilidad espermática ([Anzar et al., 1991](#); [Quintero-Moreno et al., 2003, 2008](#)), ASMA morfometría ([Hirai et al., 2001](#); [Rubio et al., 2007](#)), test de fragmentación de DNA ([Januskauskas et al., 2003](#)), integridad de la membrana plasmática ([Jeyendran et al., 1984](#); [Quintero-Moreno et al., 2011](#)), test de penetración espermática ([Ivanova y Mollova, 1993](#)). Por lo tanto, garantizan los resultados con gran confianza logrando excelente fertilidad, pero aún los altos costos de estas técnicas lo han hecho limitada debido a que su practicidad se da en la investigación ([Ramos et al., 2002](#); [Gadea, 2005](#)).

En caprinos, la motilidad espermática decrece cuando la temperatura es baja al reducirse la actividad metabólica ([Leboeuf et al., 2000](#)). A 4-5°C los valores aceptables en la calidad espermática se mantiene por 24-72 horas, pero no se debe almacenar más de ese tiempo solo con refrigeración ([Bautista et al., 2013](#)). El inconveniente que tiene la congelación del semen caprino, son los daños en la membranas del espermatozoide, el efecto de la motilidad, el desequilibrio metabólico interno ([Cabrera et al., 2005](#); [Dorado et al., 2007](#)). Por eso técnicas como la separación del plasma seminal a través de la centrifugación y el estudio de diluyentes con la adición de glicerol, antioxidantes y diferentes fuentes de lipoproteínas están aún en investigación para entender su criopreservación ([Leboeuf et al., 2000](#); [Dorado, 2003](#); [Hidalgo et al., 2007](#); [Mara et al., 2007](#); [Dorado et al., 2007, 2009](#); [Bautista et al., 2011, 2013](#)).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general.**

Evaluar parámetros de motilidad espermática de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes a través del sistema CASA.

### **2.2 Objetivos específicos.**

Evaluar la sobrevivencia espermática de muestras de semen caprino criopreservadas bajo medios diluyentes como AndroMed® y Two Step®.

Evaluar las características seminales relacionadas con la motilidad y progresión como la velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad media (VAP), índice de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR), índice de oscilación (ALH), amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (BCF) y frecuencia de batido de la cabeza (WOB) de muestras de semen caprino criopreservadas bajo diferentes medios diluyentes mediante el sistema computarizado de análisis seminal (CASA).

### 3. MARCO TEORICO

#### 3.1 EVALUACIÓN SEMINAL

El análisis del material seminal o también denominado espermiograma incluye varias pruebas donde se evalúa una serie de factores a nivel macroscópico y microscópico, con el fin de poder clasificar la muestra como competente o no para su uso en programas de inseminación artificial ([Hafez, 2003](#)). A continuación se realizará una breve descripción de las características tanto macroscópicas como microscópicas.

##### 3.1.1. Características macroscópicas

La valoración a nivel macroscópico en primera instancia está determinada por la valoración visual del color, densidad, aspecto y presencia de algún material extraño; así como también, la medición del volumen ([Pineda, 2002](#)). El semen debe poseer algunas características como tener un color blanco; ya que según estudios tanto el color como la densidad de la muestra están en relación directa con la concentración de espermatozoides ([Grajales et al., 2011](#)). Otro de los aspectos a valorar es el aspecto del eyaculado, el cual debe ser homogéneo. Para lo cual, se puede realizar una prueba mediante la inclinación ligera del tubo de colección y dejando correr su contenido por las paredes. Esto con el fin de evidenciar grumos, lo cual estaría correlacionado principalmente con la presencia de pus, siendo un indicativo de procesos inflamatorios. El color rosado del semen indica presencia de sangre y puede deberse a lesiones del pene o del aparato reproductor ([Vale, 2001](#)).

De igual forma, se pueden encontrar muestras de material seminal de color verde-amarillento, lo cual corresponde con un pigmento llamado riboflavina que se

produce en las glándulas vesiculares y que es inocuo; esto no debe confundirse con orina, la cual tiene un olor característico ([Hafez, 2003](#)).

En cuanto al volumen de un eyaculado para la especie caprina es de 1 mL, en donde existen variaciones por diversos factores como el método de extracción seminal, el estado fisiológico del macho, raza, edad, tamaño corporal, alimentación y régimen sexual al que se le somete ([Cortes, 2002](#)).

El eyaculado de los caprinos presenta las siguientes características físicas y morfológicas, como se presenta en el Tabla 1.

**Tabla 1.** Características del eyaculado de un semental caprino obtenido mediante la vagina artificial.

CARACTERÍSTICA	PATRÓN NORMAL
<b>Volumen (cc)</b>	0,59
<b>Motilidad Progresiva (%)</b>	81,76
<b>Células espermáticas vivas (%)</b>	91,36
<b>Concentración (espermatozoides/cc)</b>	3,128x10 <sup>6</sup>
<b>Anormalidades primarias (%)</b>	2,2
<b>Anormalidades secundarias (%)</b>	4,13
<b>Total anomalidades (%)</b>	6,36
<b>Normales (%)</b>	93,63

Fuente: [Grajales et al., \(2011\)](#)

### 3.1.2. Características microscópicas

Dentro de la evaluación de las características microscópicas se incluye la valoración de la motilidad espermática, la determinación de la viabilidad mediante el conteo de espermatozoides vivos y muertos por una tinción supra vital y la determinación de las anomalidades morfológicas tanto de cabeza, pieza media y cola de los espermatozoides ([Rodríguez-Martínez, 2003](#)).

**Motilidad espermática.** La estimación visual del porcentaje de espermatozoides móviles es la prueba que se utiliza con más frecuencia para evaluar la viabilidad de los espermatozoides en semen fresco y descongelado. La motilidad es un buen indicador de la viabilidad espermática y por ende su relevancia para la fertilidad ([Villanova y Gatica, 2002](#)). Sin embargo, la valoración de la motilidad por sí sola, no es capaz de predecir el nivel fecundante de una muestra de semen ([Kastelic y Thundathil, 2008](#)). La valoración subjetiva por personas experimentadas es de gran valor, debido a que la información se presenta de forma inmediata, además de ser un método económico y de fácil ejecución ([Davis y Siemers, 1995](#)).

No obstante, hay que ser consciente que la subjetividad del método puede llevar a la obtención de diferentes resultados para una misma muestra ([Vázquez et al., 1997](#)). En la actualidad existe el análisis computarizado de la motilidad espermática como el Sistema Computarizado para Análisis de Semen (Computer Assisted Motility Analysis), con el propósito de tener una evaluación objetiva del movimiento del espermatozoide y la posibilidad de analizar los diferentes patrones de motilidad de las células que se encuentran en una muestra seminal, especialmente luego de haber sido procesada. Ciertos patrones de movimiento, como el movimiento lineal están significativamente correlacionados con la fertilidad del caprino *in vivo*, como se ha comprobado en muestras congeladas y descongeladas ([Silvestre et al., 2011](#)).

La determinación de la motilidad post-descongelación por sí sola, no es capaz de predecir el nivel fecundante de una muestra de semen para IA ([Chantaraprateep y Bodhipaksha, 1975](#)). Los espermatozoides maduros son esencialmente células catabólicas que tienen una serie de organelos como el axónema y las mitocondrias que aseguran los patrones de motilidad que ayudarán en la movilización del espermatozoide y a la penetración de la zona pélucida. El patrón

de movimiento espermático está modulado por numerosos factores y a su vez está íntimamente relacionado con la gestión del metabolismo energético espermático ([Rigau et al., 2001](#)).

La pérdida de la motilidad flagelar está directamente relacionada con alteraciones del axónema e indirectamente con una disminución en la producción ATP ([Rodríguez-Martínez et al., 1997](#)). Siendo la motilidad flagelar progresiva y lineal, estimulada tras la eyaculación y modulada durante el tránsito a través del tracto reproductivo de la hembra ([Davis y Siemers, 1995](#)) e implicando cambios secuenciales importantes que reflejan modificaciones en la actividad metabólica de los espermatozoides, puesto que la motilidad es la principal causa del consumo energético espermático ([Roldan et al., 1998](#)). Por lo tanto, en un eyaculado fértil deberá existir un porcentaje significativo de espermatozoides capaces de llevar a cabo estos cambios de motilidad ([Katz y Overstreet, 1981](#)). Cabe mencionar que la motilidad espermática postdescongelación se ve afectada por daños ultraestructurales, bioquímicos y cambios funcionales causados por la congelación y la descongelación ([Dorado et al., 2007](#)).

**Motilidad individual progresiva.** La motilidad progresiva es un indicativo de que los espermatozoides son viables, por ende es una de las principales pruebas que se realizan en las diferentes especies ([Squires et al., 2004](#); [Flores, 2005](#)). Su valoración está basada en la observación del movimiento individual de las células con el fin de determinar el porcentaje de células móviles en el eyaculado ([Vera, 2001](#); [Vale, 2011](#)). Fisiológicamente durante la capacitación, el espermatozoide experimenta un aumento paulatino de la motilidad, evento conocido como hipermotilidad ([Vale, 2011](#)).

Una de la metodologías para la observación de la motilidad en el microscopio se utiliza la siguiente metodología descrita así: se utiliza aumento de 40 X y se debe

diluir una gota de semen en citrato de sodio al 2,9 %, el cual debe estar a la temperatura de 37 °C para evitar el choque térmico que inmovilizarían a los espermatozoides y/o causaría su muerte ([Hernández, 2012](#)). Se procede a colocar una gota de semen diluido en un portaobjeto precalentado, se cubre con un cubreobjetos y se observa el movimiento de los espermatozoides ([Quintero-Moreno et al., 2003](#)). El movimiento normal de la célula es el que realiza en forma progresiva y en línea recta, encontrándose correlación entre el movimiento rectilíneo y la fertilidad ([Rigau et al., 2001](#); [Rodríguez-Martínez, 2007](#)). Es necesario observar varios campos en el frotis, para así tener una mejor valoración de las células móviles. Es muy importante cuidar que la muestra a evaluar no entre en contacto con material húmedo o frío, porque se comprometería la sobrevivencia de los espermatozoides y se obtendrían lecturas falsas ([Pineda, 2002](#)). En la tabla 2, se presenta la clasificación de la motilidad individual progresiva de un semen caprino.

**Tabla 2.** Escala para la evaluación microscópica de la motilidad individual progresiva aplicada para el semen caprino.

MOTILIDAD (%)	EVALUACIÓN	VALOR NÚMÉRICO
<b>80-100</b>	Muy buena	5
<b>60-80</b>	Buena	4
<b>40-60</b>	Media	3
<b>20-40</b>	Pobre	2
<b>0-20</b>	Mala	1

Fuente: [Pineda, \(2002\)](#).

### 3.2 APLICACIÓN DE SISTEMAS COMPUTARIZADOS PARA LA VALORACIÓN SEMINAL.

Desde hace unos años se practican pruebas adicionales a las evaluaciones seminales normales, teniendo en cuenta la fisiología espermática con mucha precisión. Algunas de estas pruebas son los sistemas computarizados para la valoración seminal - CASA. Este análisis computarizado de la motilidad espermática se puede realizar posterior a los procesos de congelación y descongelación del material seminal; sin embargo, es de resaltar que dicha valoración induce cambios en el flagelo del espermatozoide ocasionando una disminución de la motilidad. Al igual que otros parámetros, la motilidad progresiva de un espermatozoide es una característica importante que debe ser evaluada, ya que esta correlacionada con la fertilidad ([Mortimer, 1997](#)).

Las técnicas tradicionales de evaluación de la motilidad espermática a pesar de que son usuales, rápidas y prácticas presentan un carácter subjetivo que implica una gran variación en los laboratorios que oscila de 30 a 60 %. Esto puede ser debido a que están sujetas a diferentes interpretaciones que dependen en gran medida de la experiencia del operador, lo que ocasiona un error humano, el cual juega un papel definitivo en la selección de los reproductores ([Rodríguez-Martínez, 2003](#)).

Aunado a lo anteriormente dicho, en las últimas dos décadas se han unificado criterios a través del uso del Sistema Computarizado de Análisis Seminal (Computer Assisted Sperm Analysis, CASA, por sus siglas en Inglés), siendo más objetivo en la evaluación seminal, ya que permite brindar mayor número de parámetros de evaluación y detecta los cambios súbitos en el movimiento espermático; así como la cinemática de los espermatozoides, los cuales no son

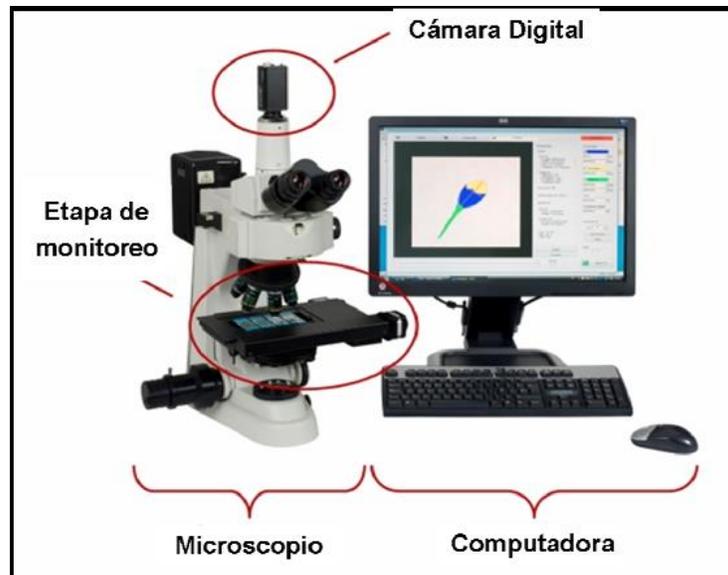
medibles u observables con el método tradicional. Siendo estos los parámetros que de forma directa tipifican un eyaculado permitiendo conocer la calidad del semen de forma más apropiada, objetiva y repetible. Por otro lado, mediante el sistema CASA, es más fácil el registro cuantitativo de los datos, permitiendo comparar los resultados con los valores estándar, lo que permite la clasificación y posterior elaboración de un pronóstico de fertilidad de los eyaculados o posteriores procesamientos de análisis estadístico para la comparación o determinación de los efectos de algunos tratamientos. Las desventajas del CASA están relacionadas con el costo del equipo, la necesidad extrema de validación y la normalización de las medidas realizadas ([Januskauskas et al., 1999](#); [Verstegen et al., 2002](#); [Rodríguez-Martínez, 2003](#)).

El CASA o el sistema de análisis computarizado (SCA®) para la evaluación de la motilidad y concentración espermática, es un módulo que proporciona una evaluación automatizada y clasificada de la concentración espermática y la motilidad ([Osorio, 2013](#)).

El software automáticamente identifica y mide los parámetros de movimiento de los espermatozoides en campos microscópicos capturados con objetivo 10 X y contraste de fase negativa (Ver Figura 1) implementando la cámara Leja®. Así mismo calcula automáticamente la concentración espermática y el porcentaje de espermatozoides clasificados en la muestra, según el tipo de motilidad: espermatozoides con motilidad progresiva y espermatozoides estáticos. Los resultados del análisis incluyen los parámetros de: Velocidad curvilínea (VCL), Velocidad media (VAP), Velocidad rectilínea (VSL), Índice de rectitud (STR), Índice de linealidad (LIN), Índice de oscilación (WOB), Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH) y Frecuencia de batido de la cabeza (BCF). De acuerdo con los protocolos estándar del laboratorio, se requiere un análisis de 500 espermatozoides, lo que normalmente

significa un análisis de 2 a 3 campos de captura. El tiempo de análisis es de 1 segundo por campo ([Bernardi et al., 2011](#)).

**Figura 1.** Representación esquemática del Sistema Computarizado de Análisis Seminal



Fuente: [http://www.microopticsl.com/eng/products/sperm\\_analysis\\_sca.html](http://www.microopticsl.com/eng/products/sperm_analysis_sca.html)

Los programas diseñados para estos equipos incluyen una serie de parámetros descriptores del movimiento espermático que son comunes a todos los sistemas CASA ([Boyers et al., 1989](#); [Farell et al., 1996](#); [Mortimer, 1997](#); [Cancel, 2000](#); [Quintero-Moreno et al., 2003](#); [Lavara, 2009](#); [Osorio 2013](#); [Amann y Waberski, 2014](#)). Algunos de los parámetros más utilizados por los anteriores autores son los siguientes: (Ver Figura 2, 3, 4 y 5)

VCL - Velocidad curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ): definida como la velocidad media medida punto a punto sobre el recorrido de la cabeza espermática. Se refiere a la distancia total

que la cabeza del espermatozoide cubre en el período de observación y es siempre, el mayor de los tres parámetros de velocidad.

VSL - Velocidad rectilínea ( $\mu\text{m/s}$ ): velocidad media medida en una línea recta desde el principio hasta el final de la trayectoria recorrida. Se determina como la distancia en línea recta entre el primero y el último punto de la trayectoria y da el espacio recorrido en el período de observación. Es siempre el menor de los tres parámetros de velocidad en cualquier espermatozoide.

VAP - Velocidad media ( $\mu\text{m/s}$ ): velocidad media del recorrido del espermatozoide. Se determina como la distancia que el espermatozoide ha seguido en su trayectoria durante el período de observación. Este es conceptualmente el valor de velocidad más difícil de entender porque puede parecer similar a la VSL.

LIN - Índice de linealidad (%): estima la proximidad de las trayectorias de las células espermáticas a una línea recta. Se calcula como el cociente entre la velocidad media medida en una línea recta (VSL) y la velocidad media medida punto a punto a lo largo del recorrido (VCL)  $\rightarrow (VSL / VCL) \times 100$ .

STR - Índice de rectitud (%): estima la proximidad del recorrido seguido por las células espermáticas a una línea recta y se calcula como cociente entre la velocidad media medida en una línea recta desde el primer punto hasta el último de la trayectoria recorrida (VSL) y la velocidad media del recorrido del espermatozoide (VAP)  $\rightarrow (VSL / VAP) \times 100$ .

WOB - Índice de oscilación (%): estima la relación entre la trayectoria recorrida por el espermatozoide y la oscilación de la cabeza espermática y se calcula como cociente entre la velocidad media del recorrido del espermatozoide (VAP) y la velocidad media medida punto a punto sobre el recorrido de la cabeza espermática (VCL)  $\rightarrow (VAP / VCL) \times 100$ .

ALH - Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide ( $\mu\text{m}$ ): es el desplazamiento medio efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.

BCF - Frecuencia de batido de la cabeza (Hz): es la tiene en cuenta que trayectoria curvilínea atraviesa la trayectoria lineal o media en función del tiempo con su frecuencia, media en Hertzios.

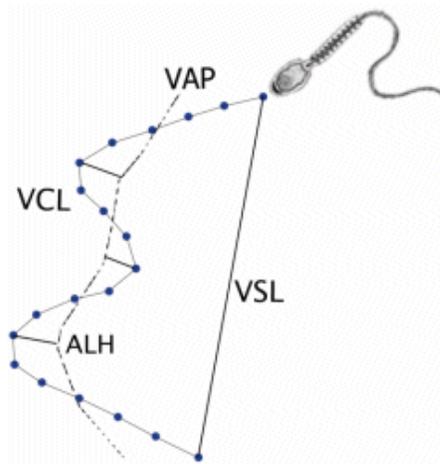


Figura 2. Parámetros de motilidad. VSL, VCL, VAP y ALH

Fuente:[http://www.micropticsl.com/eng/products/sperm\\_analysis\\_sca\\_motility\\_concentration.html](http://www.micropticsl.com/eng/products/sperm_analysis_sca_motility_concentration.html)

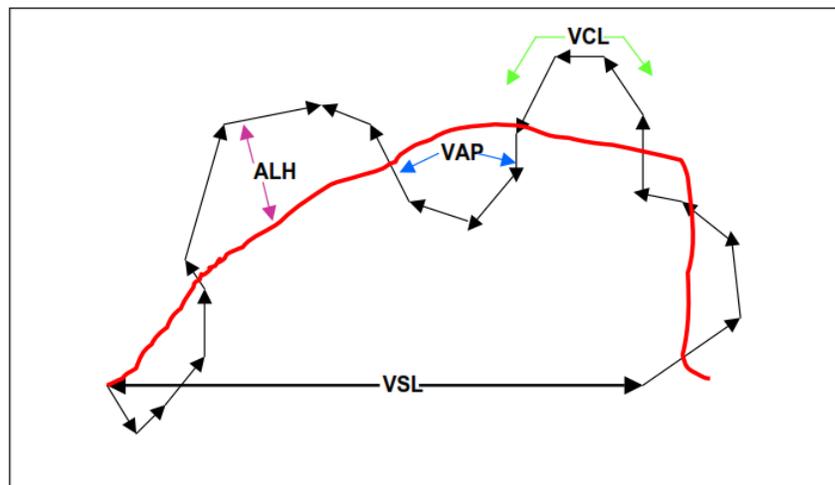


Figura 3. Parámetros de motilidad obtenidos por el C.A.S.A. I. ([Quintero-Moreno et al., 2003](#)).

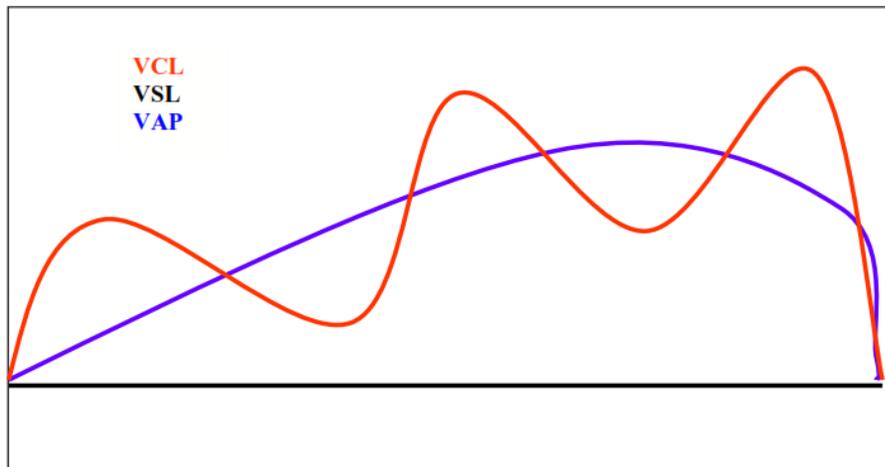


Figura 4. Parámetros de motilidad obtenidos por el C.A.S.A. II. ([Quintero-Moreno et al., 2003](#)).

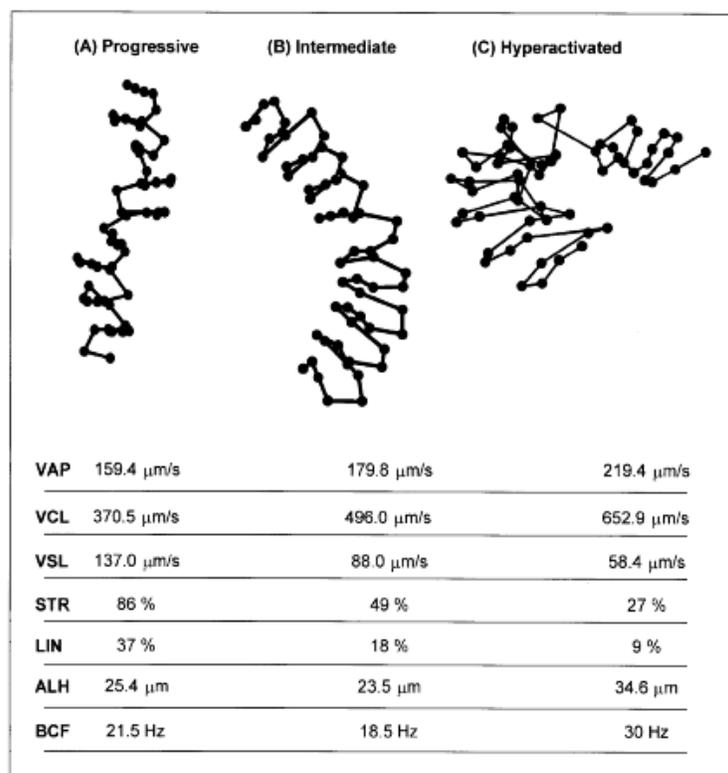


Figura 5. Representación de los parámetros del C.A.S.A. para espermatozoides de ratas durante la capacitación *in vitro* ([Cancel, 2000](#)).

El desarrollo de nuevas tecnologías *in vitro* como la citometría de flujo o los sistemas de análisis automatizados de espermatozoides CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) permiten el estudio de múltiples características funcionales y morfológicas de los espermatozoides para intentar predecir su capacidad fecundante ([Quintero-Moreno et al., 2011](#)).

### 3.3 CARACTERISTICAS SEMINALES DEL MACHO CABRIO

El eyaculado del macho caprino, está compuesto por espermatozoides y plasma seminal (secreciones del testículo, epidídimo, conductos deferentes, vesícula seminal, próstata y glándulas bulbouretrales). ([Flesh y Gadella 2000](#); [Cortes, 2002](#)).

Según [Maxwell y Evans \(1990\)](#); el plasma seminal está compuesto por agua (75%) fructosa, ácido cítrico, sorbitol, inositol, fosfolípidos, prostaglandinas, enzimas y proteínas, además de iones inorgánicos como sodio, potasio y cloro. Estos autores citando a Roy (1957) quien define que el plasma caprino es rico en fosfatasa ácida y alcalina (secretadas por la próstata) y en fosfolipasa A (secretada por las glándulas bulbouretral), ésta se activa en presencia de iones de calcio y disminuye en presencia de citratos u oxalatos.

[Hidalgo \(2004\)](#); [Gacitua y Arav. \(2005\)](#) discuten sobre la enzima fosfolipasa A, siendo la responsable de la hidrólisis (coagulación) de la yema de huevo sobre los espermatozoides caprinos, debido a la separación en lisolecitinas y ácidos grasos de las lecitinas presentes en la yema de huevo, resultando un efecto espermicida (inmovilización y muerte espermática).

El efecto de la centrifugación es eliminar el plasma seminal y de allí la fosfolipasa A ([Dorado et al., 2007](#)). Sin embargo, la eliminación del plasma conlleva el descenso de niveles de ácido cítrico, fructosa y zinc; así como, de los factores de decapitación y por tanto induce una capacitación prematura ([Maxwell y Evans, 1990](#)).

### 3.4 DILUYENTES

Según [Dubeibe et al., \(2007\)](#); [Nava y Coronado \(2010\)](#), existen gran variedad de diluyentes (comerciales o no) y métodos empleados para la criopreservación del semen caprino, cuyo objetivo primordial es prolongar la viabilidad de los espermatozoides en un tiempo limitado (refrigeración) o indefinidamente (congelación).

[Caiza de la Cueva \(1997\)](#), [Osorio \(2013\)](#) hacen un análisis a las condiciones que debe tener un medio diluyente; debe ser isotónico con el plasma seminal (320 mOsm/kg) para refrigeración, e hiperosmótico (400 mOsm/kg) para congelación. [Pineda \(2002\)](#); [Quintero-Moreno et al. \(2003\)](#); [Hafez, \(2003\)](#); [Tomas \(2007\)](#); [Nava y Coronado \(2010\)](#); [Camacho \(2011\)](#); [Grajales et al., \(2011\)](#), opinan que un diluyente debe tener la capacidad tampón y de esa manera compensar la producción de ácido láctico en el proceso de criopreservación (citrato, fosfato, bicarbonato sódico; BES, TES, TRIS, HEPES, MES y PIPES); debe el medio tener una fuente de energía como la fructosa o glucosa y logran un medio estéril con la adición de antibióticos y un crioprotector que puede ser penetrante (Proteínas de leche o la yema de huevo; azúcares como glucosa, lactosa y fructosa) o no penetrante (glicerol, dimetil-sulfóxido (DMSO), propilenglicol, etilenglicol, metanol y etanol).

#### 4. ARTICULO

### EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA DE SEMEN CAPRINO CRIOPRESERVADO BAJO DIFERENTES MEDIOS DILUYENTES A TRAVÉS DEL SISTEMA CASA

SPERM MOTILITY EVALUATION OF GOAT SEMEN CRYOPRESERVED IN DIFFERENT MEDIA EXTENDERS BY USING A CASA SYSTEM

**Hernández-Corredor L.<sup>1,2,3</sup>; Nivia-Osuna A.<sup>1</sup>; Hernández-Villamizar D.<sup>3</sup>; Rubio-Parada J.<sup>2</sup>; Quintero-Moreno A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Universidad Nacional Abierta y a Distancia - UNAD, Bogotá

<sup>2</sup> Universidad del Zulia, Maracaibo-Venezuela.

<sup>3</sup> Grupo de Ovinos y Caprinos, SENA - Universidad Francisco de Paula Santander.

Artículo publicado en la Revista Respuesta, Diciembre, Edición 2, 2013 de la Universidad Francisco de Paula Santander.

ISSN 0122-820X

REVISTA INDEXADA AL ÍNDICE BIBLIOGRÁFICO NACIONAL – PUBLINDEX –C

#### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar los parámetros de motilidad espermática de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes a través del sistema de análisis automatizado de esperma CASA: Tratamientos (T1) Two Step®, (T2) Andromed®, (T3) Sobrenadante en Two Step®, (T4) Centrifugado en Andromed®, (T5) Centrifugado en Two Step®. Los parámetros evaluados fueron: progresividad, concentración espermática, amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH), frecuencia de batido de cabeza (BCF), velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), (VAP), índice de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR), índice de oscilación (WOB). Se realizó un ANOVA utilizando el paquete estadístico SAS (*Statistical analysis system*, versión 9,1). El Tratamiento (T5) no presentó sobrevivencia espermática postdescongelación. Se encontraron diferencias altamente significativas entre todos los tratamientos para los parámetros evaluados. Los

mejores valores de motilidad espermática fueron obtenidos en el T4 (centrifugado Andromed®) con valores de progresividad de 30,4 %, ALH (2,9  $\mu\text{m/s}$ ), BCF (12,3 Hz), STR (83,5 %) y LIN (50,8 %); mostrando una mejor respuesta al proceso de criopreservación debido a la composición del medio y al efecto de la centrifugación. Sin embargo, es necesario evaluar otros medios diluyentes con el fin de mejorar la efectividad en el proceso de criopreservación de espermatozoides caprinos para ser incorporados en programas de inseminación artificial o para la conservación en bancos de germoplasma. Resultados del presente estudio contribuyen a la estandarización del proceso de evaluación de semen en la especie caprina.

**Palabras claves:** criopreservación, motilidad, diluyentes, caprino, CASA.

## ABSTRACT

The aim of this study was evaluate sperm motility parameter of goat semen sample cryopreserved in different media extenders by using a computer assisted sperm motility analysis (CASA) system: The treatments were (T1) Two Step ®, (T2) Andromed ®, (T3) supernatant in Two Step ®, (T4) centrifuged in Andromed ®, (T5) centrifuged in Two Step ®. The parameters evaluated were: progressive motile spermatozoa, sperm concentration, progressive motile spermatozoa, mean amplitude of lateral head displacement (ALH), frequency of head displacement (BCF), curvilinear velocity (VCL), linear velocity (VSL), average path velocity (VAP), linearity coefficient (LIN), straightness coefficient (STR), wobble coefficient (WOB). One-way ANOVA was performed using the statistical package SAS (Statistical analysis system, version 9.1). The T5 treatment did not show post-thawing sperm survival. Highly significant differences between treatments were found for all evaluated parameters. The best sperm motility records were obtained by the T4 (centrifuged Andromed ®) with the values of progressive motile spermatozoa 30.4 %, ALH (2.9  $\mu\text{m/s}$ ), BCF (12.3 Hz), STR (83.5 %) and LIN (50.8 %). The T4 showed the better response to cryopreservation process, because of the medium composition and the effect of sample centrifugation. Nevertheless, it is necessary to evaluate other extenders in order to improve effectiveness in the goat sperm cryopreservation process; which in turn will be used in artificial insemination programs or their cryopreservation in gene banks. The results of this study contribute to the standardization of goat semen evaluation process.

**Keywords:** Semen cryopreservation; sperm motility; semen extender; caprine, CASA.

## INTRODUCCIÓN

Los parámetros espermáticos clásicos que se consideran en un análisis de calidad seminal incluyen en general la motilidad, concentración y vitalidad espermática; así como, las anomalías morfológicas ([Quintero-Moreno et al., 2003](#), [Marco-Jimenez et al., 2006](#), [Dorado et al., 2009](#)). Las principales razones por las cuales las pruebas de evaluación seminal rutinaria no han podido demostrar una clara relación predictiva con la resistencia a la criopreservación y con el potencial reproductivo de un semental, se debe a que no se refleja adecuadamente la fisiología o funcionalidad de la población de espermatozoides que permanecen viables y también a que existen diferencias técnicas procedimentales, lo que afecta su repetitividad ([Mortimer y Maxwell, 2004](#), [Dorado et al., 2010](#)). Otra es, que la mayoría de las pruebas utilizan técnicas de evaluación visual de gran subjetividad, por lo que generan una alta variabilidad entre laboratorios y operarios ([Gravance y Davis, 1995](#); [Foxcroft et al., 2008](#)).

La criopreservación de semen caprino presenta desafíos para los programas de conservación y bancos de germoplasma debido a la falta de un protocolo óptimo de crioconservación ([Purdy, 2006](#)). El semen de ésta especie posee enzimas del tipo fosfolipasa “A” que actúan sobre los fosfolípidos de los diluyentes normalmente utilizados, liberando lisolectinas y ácidos grasos que son tóxicos para los espermatozoides ([Pellicer-Rubio et al., 1997](#); [Pellicer-Rubio y Combarnuus, 1998](#); [Sias et al., 2005](#)). La centrifugación y eliminación del plasma seminal (lavado) es realizado para mejorar la calidad del semen criopreservado, en especial cuando se utiliza diluyentes que contienen yema de huevo o leche ([Leboeuf et al., 2000](#)). Sin embargo, se ha comprobado que centrifugar el semen puede ocasionar pérdidas o daños en los espermatozoides ([Miro et al., 2009](#)), encontrándose que existen controversias sobre la necesidad de retirar el plasma

seminal en el proceso de congelamiento ([Azerêdo et al., 2001](#); [Cabrera et al., 2005](#); [Peterson et al., 2007](#); [Sariozkan et al., 2010](#)).

Estudios reportan la utilización de diferentes tipos de diluyentes como la lecitina de soya en lugar de yema de huevo para evitar la reducción en la motilidad y obtener mejores resultados postdescongelación ([Roof et al., 2012](#)). Reportes han mostrado que diluyentes a base de la soya (Bioxcell®) obtienen resultados satisfactorios ([Gacitua y Aray, 2005](#); [Nordstoga et al., 2011](#)). De igual forma, [Sariozkan et al. \(2010\)](#) reportó mayores valores de motilidad espermática a través del sistema C.A.S.A. para espermatozoides caprinos congelados en Bioxcell® en comparación con un medio de yema de huevo a base de TRIS. Por otro lado, el centrifugado de semen no mejoró los resultados de motilidad espermática para un diluyente a base de yema de huevo ([Roof et al., 2012](#)). Reportes afirman que la lecitina de soya y yema de huevo difieren en su composición de lípidos y contenido de ácidos grasos afectando la interacción con las enzimas lipasas presentes en el contenido seminal de los caprinos ([Palacios y Wang, 2005](#); [Le Grandois et al., 2009](#)).

El desarrollo de nuevas tecnologías *in vitro* como la citometría de flujo o los sistemas de análisis automatizados de espermatozoides CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) permiten el estudio de múltiples características funcionales y morfológicas de los espermatozoides para intentar predecir su capacidad fecundante ([Quintero-Moreno et al., 2011](#)). El CASA fue propuesto por [Dott y Foster \(1979\)](#) y en la actualidad es usado en centros de andrología humana y veterinaria. [Flowers \(1997\)](#) mostró cómo el porcentaje de espermatozoides móviles únicamente proporciona una estima cuantitativa de la fertilidad y su uso se limita cuando se alcanzan valores superiores. [Broekhuijse et al. \(2012\)](#) mostraron correlaciones negativas en algunos parámetros CASA vs fertilidad. Según [Amann y Katz \(2004\)](#), consideran que la mayor velocidad resultante es lo mejor, pero no existe una evidencia biológica. Se ha reportado que diferentes parámetros tienen efectos opuestos sobre los índices de preñez y el número de animales nacidos.

Así como, la velocidad curvilínea (VCL) y frecuencia de batido de cabeza (BCF) explican la variación en los índices de preñez; mientras que la velocidad media (VAP), índice de linealidad (VSL) y la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH) explican la variación en el número de crías ([Kathiravan et al., 2010](#); [Silvestre et al., 2011](#)).

El conocimiento preciso y objetivo de las velocidades cinemática como la calidad de movimiento de los espermatozoides contenidos en las muestras de material seminal criopreservado es el mejor indicador de su calidad ([Ávila-Portillo et al., 2006](#)), ya que se ha encontrado una correlación significativa entre la motilidad y la fertilidad en bovinos ([Budworth et al., 1988](#)), equinos ([Samper et al., 1991](#)), humanos ([Hirano et al., 2001](#)), conejos ([Lavara et al., 2005](#)) y porcinos ([Vyt et al., 2008](#)). El objetivo del presente estudio fue evaluar parámetros de motilidad y progresión espermática de muestras de material seminal caprino criopreservado en diferentes medios diluyentes a través del sistema CASA.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### *Animales y colecta de semen*

Se evaluaron 5 machos caprinos de la raza Alpina entre 10 y 14 meses de edad y de fertilidad conocida adscritos a la unidad de caprinos de la Universidad Francisco de Paula Santander (UFPS), sede Ocaña. Los animales fueron mantenidos bajo una dieta estándar. La colecta de semen fue realizada por medio de electroeyaculación (Electroyac 5®). Las muestras fueron mantenidas en baño maría a 37 °C hasta su valoración.

### *Evaluación y criopreservación de muestras*

Se realizó la evaluación convencional del material seminal a nivel macroscópico [volumen (mL), pH] y microscópico [motilidad masal (%) e individual (%),

concentración espermática (spz/mL) y anomalías morfológicas (%)]. Las muestras clasificadas fueron mezcladas para formar un pool, con el fin de disminuir el efecto del macho. Posteriormente, fueron sometidas a dilución en los siguientes protocolos para su posterior criopreservación.

Tratamiento 1 (Two Step®): Semen completo en medio comercial Two Step®.

Tratamiento 2 (Andromed®): Semen completo en medio comercial Andromed®.

Tratamiento 3 (Sobrenadante en Two Step®): Sobrenadante de centrifugación de contenido seminal criopreservado en medio comercial Two Step® (solo con adición del 10 % de yema de huevo).

Tratamiento 4 (Centrifugado en Andromed®): Centrifugado de contenido seminal en medio comercial Andromed®.

Tratamiento 5 (Centrifugado en Two Step®): Centrifugado de contenido seminal en medio comercial Two Step®.

Las muestras de semen fueron diluidas en cada uno de los tratamientos a 37°C y equilibradas por un periodo de 2 horas. Seguidamente, fueron envasadas en pajillas (0,5 mL) con una concentración promedio de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL y llevadas a -110°C por 10 min para ser sumergidas en nitrógeno líquido (-196°C) para su almacenamiento.

#### *Valoración de los parámetros C.A.S.A.*

Las pajillas fueron transportadas al laboratorio de andrología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia (Venezuela) en un termo-tanque (MVE®, Milleniun), donde se procedió a realizar la valoración de los parámetros C.A.S.A. (MICROPTIC®, Versión 2002, Barcelona, España) y evaluadas bajo un aumento 100 X (Olympus BX40, Olympus Optical Co., Ltda.). Se evaluó un total

de 5 pajillas por tratamiento, previamente colocadas a 37 °C durante 5 minutos en baño maría. El análisis se realizó sobre alícuotas de semen de 5 µL en láminas Leja® (20 micras - 4 cámaras). Las imágenes fueron tomadas en un lapso de 1 segundo y la velocidad de captura de cada imagen fue de 1 cada 40 microsegundos.

Se evaluó el porcentaje de espermatozoides progresivos (PRO, %), concentración de espermatozoides progresivos por dosis (spz/mL), velocidad curvilínea (VCL, µm/s), velocidad rectilínea (VSL, µm/s), velocidad media (VAP, µm/s), índice de linealidad (LIN, promedio entre VSL/VCL), índice de rectitud (STR, promedio entre VSL/VAP), índice de oscilación (WOB, promedio entre, VAP/VCL), amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH, µm/s) y frecuencia de batido de la cabeza (BCF, Hz) ([Mortimer,1997](#)).

#### *Análisis estadístico*

Se estimaron los valores promedios para cada una de las variables y se realizó un análisis de varianza. Se aplicó la comparación de medias por medio de la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ) utilizando el paquete estadístico SAS (*Statistical analysis system, versión 9,1*).

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

Como respuesta a la criopreservación de las muestras de material seminal que fueron sometidas a los diferentes protocolos, se encontró que las muestras del tratamiento 5 (Centrifugado en medio comercial Two Step®) no presentaron sobrevivencia espermática pos descongelación, siendo descartadas para su valoración por el método CASA.

La motilidad espermática post descongelación de las muestras de material seminal de los diferentes tratamientos presentó una disminución debido al efecto del medio diluyente y al protocolo de criopreservación, debido a que la composición de los medios diluyentes afecta su respuesta. Este efecto ha sido reportado por autores que han evaluado el efecto de la enzima coagulante de la yema de huevo (EYCE) y la fosfolipasa secretada al plasma seminal por las glándulas bulbo-uretrales; lo cual hidroliza la lecitina de la yema ocasionando un efecto tóxico para el espermatozoide caprino ([Gacitua y Arav, 2005](#)). Autores como [Purdy \(2006\)](#) y [Leboeuf et al. \(2000\)](#), han mostrado que al realizar el lavado del semen caprino mejora la sobrevivencia espermática post descongelación. De esta forma, [Cabrera et al. \(2005\)](#) concluyó que el lavado del material seminal es necesario realizarlo cuando la concentración de la yema de huevo es mayor al 10 %.

Por otro lado, [Konayali et al. \(2013\)](#) evaluaron la motilidad postdescongelación de semen caprino en diluyentes de Tris-yema y leche descremada al cual le incluyeron ciclodextrinas con colesterol encontrándose una mejora en el número de espermatozoides móviles y viables.

A continuación se muestran los resultados de la valoración de los parámetros de motilidad y concentración por el método CASA de las muestras de material seminal criopreservadas bajo los diferentes tratamientos, en donde se encontraron diferencias altamente significativas ( $P \leq 0,001$ ). Siendo así, el tratamiento 4 fue el que obtuvo el mayor número de espermatozoides con progresividad, mostrando un valor de 30,4 % equivalente a espermatozoides progresivos y no progresivos (12,2 y 18,2 %, respectivamente). De igual forma, este tratamiento obtuvo una mayor concentración espermática (Tabla 1). Según [Krishnakumara et al. \(2011\)](#) concluyeron que el uso de medios diluyentes libres de proteína animal como el Andromed®, presentan mejor respuesta debido a que su contenido de fosfolípidos son derivados a partir de extracto de soya.

Tabla 1. Parámetros de progresividad y concentración de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes.

PARÁMETROS		T1 Two Step®	T2 Andromed®	T3 Sobrenadante de Two Step®	T4 Concentrado en Andromed®
<b>Espermatozoides Estáticos (%)</b>	No. Spz (%)	747 <sup>c</sup> (74,1)	819 <sup>b</sup> (71,5)	381 <sup>d</sup> (70,6)	1401 <sup>a</sup> (69,6)
	Concentración (millones de Spz/mL)	22,2 <sup>c</sup>	41,9 <sup>a</sup>	20,3 <sup>d</sup>	35,9 <sup>b</sup>
<b>Espermatozoides no Progresivos (%)</b>	No. Spz (%)	172 <sup>c</sup> (17,1)	294 <sup>b</sup> (25,7)	140 <sup>d</sup> (25,9)	366 <sup>a</sup> (18,2)
	Concentración (millones de Spz/mL)	5,1 <sup>d</sup>	15,1 <sup>a</sup>	7,5 <sup>c</sup>	9,4 <sup>b</sup>
<b>Espermatozoides Progresivo (%)</b>	No. Spz (%)	89 <sup>b</sup> (8,8)	32 <sup>c</sup> (2,8)	19 <sup>d</sup> (3,5)	245 <sup>a</sup> (12,2)
	Concentración (millones de Spz/mL)	2,6 <sup>b</sup>	1,6 <sup>b</sup>	1,0 <sup>c</sup>	12,6 <sup>a</sup>
<b>Total</b>	Concentración total (millones de Spz/ml)	30,0	58,6	28,8	51,6

Superíndices diferentes (a-d) en una fila indican diferencias significativas entre los tratamientos (P<0,05)

Según [Karagiannidis et al. \(2000\)](#) evaluaron la motilidad espermática en semen fresco para las razas Alpina y Saanen con valores de 59,8 y 64,4 %, respectivamente. En otro estudio, este autor evaluó la motilidad espermática utilizando medios diluyentes como Tris y leche, obteniendo valores de 34,4 y 33,1 %, respectivamente; presentando similitud a los obtenidos en nuestro estudio.

Diferentes autores han encontrado una variabilidad en la respuesta de la motilidad espermática postdescongelación de acuerdo a diferentes factores como: el medio diluyente utilizado, protocolo de dilución y congelación y el procedimiento de evaluación. Con base en lo anterior, diversos autores reportan estos efectos: [Tuli y Holtz \(1994\)](#) en un estudio con semen congelado caprino obtuvieron un 25 % de motilidad espermática postdescongelación. [Kozdrowski et al. \(2007\)](#), evaluó la motilidad espermática postdescongelación utilizando el medio Tris con la adición de yema de huevo al 20 y 1,5 %, reportando valores de 23 y 19 %, respectivamente. Otro estudio realizado por [Dubeibe et al. \(2007\)](#) evaluaron diluyentes como el citrato de sodio y leche descremada más yema de huevo, obteniendo valores de motilidad espermática postdescongelación a las 5 horas de

0,19 y 0 %, respectivamente. [Dorado et al. \(2009\)](#) evaluó la motilidad espermática de muestras de material seminal al cual se realizó un primer lavado con el medio diluyente Biladyl® y posteriormente fueron sometidos a criopreservación con Triladyl® (20 % de yema) obteniendo un valor de 56,07 %. Por otro lado, se evaluó la motilidad espermática de semen caprino criopreservado bajo el diluyente Tris-yema con la adición de glicerol (6 %) y Dimetilsulfoxido (6 %) con valores de 23,9 y 16,6 %, respectivamente ([Silvestre et al., 2011](#)). [Roof et al. \(2012\)](#) evaluó la motilidad espermática postdescongelación con dos medios diluyentes Bioxcell® e Irvine TYB, obteniendo valores de 49,4 y 19,6 %, respectivamente. En un estudio se evaluó la motilidad espermática postdescongelación utilizando el medio diluyente Tris bajo diferentes concentraciones de yema de huevo (2 y 20 %) y leche descremada, reportando valores de 58,2, 70,1 y 69,7 %, respectivamente ([Konayali et al., 2013](#)). De igual forma, este mismo autor evaluó la adición de colesterol con ciclodextrinas (1 mg) obteniendo un valor de motilidad espermática postdescongelación de 72,6 %.

Cabe mencionar que los reportes descritos anteriormente fueron evaluados por el método CASA. Sin embargo, la literatura reporta evaluaciones de motilidad espermática en la especie caprina por el método convencional, entre ellos: [Valencia et al., \(1994\)](#) evaluaron la motilidad espermática postdescongelación con un medio diluyente de Tris-yema obteniendo valores por encima de 59 %. Por otro lado, [Vallecillo et al. \(2004\)](#) de igual forma evaluó la motilidad individual postdescongelación de espermatozoides criopreservados en el diluyente Triladyl® con 20 % de yema de huevo y centrifugado a 500 g por 6 minutos, obteniendo un valor de 60,5 %; siendo superior debido al efecto del lavado del material seminal previo a la congelación. Al adicionar ácido cítrico (0,05 %) al medio diluyente Bioxcell® se observaron valores de motilidad espermática postdescongelación de 41,8 % ([Castilho et al., 2009](#)). En otro estudio, [Nava y Coronado \(2010\)](#) evaluaron la motilidad espermática postdescongelación de muestras de material seminal criopreservadas bajo medios diluyentes como Tris-yema y Triladyl® obteniendo

valores de 38,6 y 35,3 %, respectivamente. [Daskins et al. \(2011\)](#), evaluaron el diluyente Bioxcell® con dos concentraciones (1:5 y 1:10), reportando valores de motilidad espermática de 38 y 20 %, respectivamente.

La tabla 2, muestra los resultados de valoración de la motilidad espermática para los parámetros de amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH) y frecuencia de batido (BCF) obtenidos por el método CASA. Para estas variables se encontraron diferencias altamente significativas entre tratamientos ( $P \leq 0,001$ ); obteniendo los mejores valores para semen Centrifugado en Andromed® (T4).

Tabla 2. Parámetros de ALH y BCF de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes.

PARÁMETROS		T1 Two Step®	T2 Andromed®	T3 Sobrenadante de Two Step®	T4 Concentrado en Andromed®
<b>Espermatozoides progresivos</b>	ALH ( $\mu\text{m/s}$ )	2,2 <sup>b</sup>	1,8 <sup>c</sup>	1,7 <sup>c</sup>	2,7 <sup>a</sup>
	BCF (Hz)	6,3 <sup>b</sup>	4,9 <sup>d</sup>	5,5 <sup>c</sup>	10,2 <sup>a</sup>
<b>Espermatozoides Progresivos Medios</b>	ALH ( $\mu\text{m/s}$ )	1,8 <sup>a</sup>	1,8 <sup>a</sup>	1,4 <sup>b</sup>	1,9 <sup>a</sup>
	BCF (Hz)	4,8 <sup>a</sup>	4,5 <sup>b</sup>	1,7 <sup>d</sup>	3,6 <sup>c</sup>
<b>Espermatozoides Progresivo Rápidos</b>	ALH ( $\mu\text{m/s}$ )	2,8 <sup>a</sup>	1,9 <sup>b</sup>	1,8 <sup>b</sup>	2,9 <sup>a</sup>
	BCF (Hz)	8,3 <sup>b</sup>	5,2 <sup>d</sup>	6,9 <sup>c</sup>	12,3 <sup>a</sup>

ALH: Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide; BCF: Frecuencia de batido de la cabeza. Superíndices diferentes (a-d) en una fila indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0,05$ )

Autores como [Silvestre et al. \(2011\)](#) utilizaron Tris-yema con adición de glicerol (6 %) y dimetilsulfoxido (6 %), reportando valores para ALH de 2,3 y 2,9  $\mu\text{m/s}$ , respectivamente y para BCF de 8,8 y 9,9 Hz, respectivamente; valores similares a los obtenidos en nuestro estudio. Por otro lado, [Dorado et al. \(2009\)](#) evaluó estos parámetros utilizando semen caprino en fresco y postdescongelación obteniendo valores para ALH de 5,49 y 6,06  $\mu\text{m/s}$ . Este mismo autor (2010), obtuvo valores

para ALH de 6,06 y 3,57  $\mu\text{m/s}$  y para BCF de 11 y 11,74 Hz, respectivamente, utilizando diluyentes como el Tris y leche descremada.

Tabla 3. Índices de motilidad para las muestras de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes.

PARÁMETROS		T1 Two Step®	T2 Andromed®	T3 Sobrenadante de Two Step®	T4 Concentrado en Andromed®
<b>Espermatozoides Móviles</b>	VCL $\mu\text{m/s}$	39,1 <sup>b</sup>	20,3 <sup>d</sup>	21,9 <sup>c</sup>	46,1 <sup>a</sup>
	VSL $\mu\text{m/s}$	24,1 <sup>a</sup>	9,4 <sup>d</sup>	15,6 <sup>c</sup>	21,7 <sup>b</sup>
	VAP $\mu\text{m/s}$	30,5 <sup>a</sup>	13,8 <sup>d</sup>	18,1 <sup>c</sup>	27,5 <sup>b</sup>
	LIN (%)	61,6 <sup>b</sup>	46,3 <sup>d</sup>	71,3 <sup>a</sup>	47,0 <sup>c</sup>
	STR (%)	79,0 <sup>b</sup>	68,4 <sup>c</sup>	86,2 <sup>a</sup>	78,7 <sup>b</sup>
	WOB (%)	77,9 <sup>b</sup>	67,7 <sup>c</sup>	82,7 <sup>a</sup>	59,7 <sup>d</sup>
<b>Espermatozoides Lentos</b>	VCL $\mu\text{m/s}$	15,2 <sup>c</sup>	15,8 <sup>b</sup>	13,4 <sup>d</sup>	16,5 <sup>a</sup>
	VSL $\mu\text{m/s}$	6,2 <sup>c</sup>	7,5 <sup>a</sup>	7,7 <sup>a</sup>	7,1 <sup>b</sup>
	VAP $\mu\text{m/s}$	9,9 <sup>bc</sup>	10,8 <sup>a</sup>	9,8 <sup>c</sup>	10,0 <sup>b</sup>
	LIN (%)	40,4 <sup>d</sup>	47,6 <sup>b</sup>	57,8 <sup>a</sup>	43,0 <sup>c</sup>
	STR (%)	62,4 <sup>d</sup>	69,4 <sup>c</sup>	79,0 <sup>a</sup>	70,9 <sup>b</sup>
	WOB (%)	64,8 <sup>c</sup>	68,7 <sup>b</sup>	73,2 <sup>a</sup>	60,7 <sup>d</sup>
<b>Espermatozoides Medios</b>	VCL $\mu\text{m/s}$	34,5 <sup>b</sup>	33,0 <sup>c</sup>	23,0 <sup>d</sup>	35,2 <sup>a</sup>
	VSL $\mu\text{m/s}$	16,7 <sup>a</sup>	14,5 <sup>b</sup>	12,0 <sup>d</sup>	12,5 <sup>c</sup>
	VAP $\mu\text{m/s}$	24,2 <sup>a</sup>	21,8 <sup>b</sup>	16,3 <sup>d</sup>	19,1 <sup>c</sup>
	LIN (%)	48,3 <sup>b</sup>	43,9 <sup>c</sup>	52,1 <sup>a</sup>	35,6 <sup>d</sup>
	STR (%)	68,8 <sup>b</sup>	66,4 <sup>c</sup>	73,5 <sup>a</sup>	65,6 <sup>d</sup>
	WOB (%)	70,3 <sup>b</sup>	66,1 <sup>c</sup>	70,9 <sup>a</sup>	54,3 <sup>c</sup>
<b>Espermatozoides Rápidos</b>	VCL $\mu\text{m/s}$	103,7 <sup>a</sup>	39,5 <sup>d</sup>	92,1 <sup>b</sup>	79,6 <sup>c</sup>
	VSL $\mu\text{m/s}$	79,3 <sup>a</sup>	15,3 <sup>d</sup>	76,8 <sup>b</sup>	40,4 <sup>c</sup>
	VAP $\mu\text{m/s}$	89,8 <sup>a</sup>	22,4 <sup>d</sup>	84,0 <sup>b</sup>	48,4 <sup>c</sup>
	LIN (%)	76,5 <sup>b</sup>	38,8 <sup>d</sup>	83,4 <sup>a</sup>	50,8 <sup>c</sup>
	STR (%)	88,3 <sup>b</sup>	68,5 <sup>d</sup>	91,5 <sup>a</sup>	83,5 <sup>c</sup>
	WOB (%)	86,6 <sup>b</sup>	56,7 <sup>d</sup>	91,1 <sup>a</sup>	60,8 <sup>c</sup>

VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad rectilínea; VAP: Velocidad media; LIN: Índice de linealidad; STR: Índice de rectitud; WOB: Índice de oscilación.

Superíndices diferentes (a-d) en una fila indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0,05$ )

La tabla 3 muestra los índices de motilidad espermática en donde se encontraron diferencias altamente significativas entre tratamientos para los parámetros evaluados ( $P \leq 0,001$ ). Se encontró que el T1 (Two step®) obtuvo los mayores valores para los parámetros VCL, VSL y VAP comparado con los demás tratamientos. Para los parámetros LIN, STR y WOB el tratamiento T3 (Sobrenadante de Two Step®) obtuvo los mayores valores. Según estudios

reportan que valores altos para VCL y ALH son indicativos de espermatozoides hiperactivados ([Kathiravan et al., 2010](#)). Así mismo, valores altos de VCL y ALH para un diluyente con yema de huevo como el Two step® en el presente estudio, podría sugerir una tendencia a la hiperactivación de los espermatozoides caprinos postdescongelados, probablemente relacionado por la inclusión de proteínas de origen animal. Afirmación que contrasta con lo reportado por [Januskauskas et al. \(2003\)](#) al evaluar dichos parámetros con semen bovino. Según el estudio de [Leite et al. \(2010\)](#) valores altos de VSL en diluyentes con lecitina de soya y ALH en diluyentes con yema de huevo presentan variabilidad en sus valores, debido a las diferencias de densidad y viscosidad de los diluyentes. Afirmación que se corrobora con los valores obtenidos en cada uno de los tratamientos evaluados en nuestro estudio.

Según [Bravo et al. \(2011\)](#), el índice de rectitud (STR) define los espermatozoides que son considerados progresivos cuando el valor es superior a 80 %. Para nuestro estudio, el tratamiento T2 (Andromed®), fue el que presentó un menor valor comparado con los demás tratamientos.

Para el parámetro índice de linealidad (LIN) según el estudio de [Cox et al. \(2006\)](#) determinaron que existe una alta correlación con los demás parámetros de motilidad evaluados por el sistema CASA para semen caprino, demostrando que valores mayores a 50 % en espermatozoides evaluados *In Vitro* presentan una excelente migración. Adicionalmente, parámetros como LIN y ALH parecen ser indicadores de la hiperactivación de los espermatozoides ([Peña y Linde-Forsberg, 2000](#)). Sin embargo, para [Quintero-Moreno et al. \(2003\)](#) un valor bajo (menor a 50 %) para el parámetro LIN está correlacionado a la hiperactivación espermática.

En conclusión, en nuestro estudio los mejores valores de motilidad espermática evaluados por el método CASA fueron obtenidos para las muestras de material seminal caprino centrifugadas en el medio diluyente Andromed®, mostrando una

mejor respuesta al proceso de criopreservación, encontrándose que la composición del medio diluyente afecta el grado respuesta. Por otro lado, el efecto de la centrifugación sobre el semen diluido mejoró los índices de motilidad y sobrevivencia espermática sometidos a la criopreservación. Sin embargo, es necesario evaluar otros medios diluyentes con el fin de mejorar la efectividad en el proceso de criopreservación de espermatozoides caprinos para ser incorporados en programas de inseminación artificial o para la conservación en bancos de germoplasma. Resultados del presente estudio contribuyen a la estandarización y al proceso de evaluación de semen en la especie caprina.

## BIBLIOGRAFÍA

Amann, R. y Katz, D. 2004. Reflections on CASA after 25 years. *Journal Androl.* 25:317–325.

Ávila-Portillo, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L.; Gómez, C.; Delgado, L.; Gómez, C., Lozano, J. y Reguero, M. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* Vol. 57 No. 4. (291-300).

Azerêdo, G., Esper, C. y Resende, K. 2001. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Rumin Res*; 41:257– 63.

Bag, S.; Joshi, A.; Naqvi, S.; Rawat, P. y Mittal J. 2002. Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 72: 175–183.

Bravo, J., Montanero, J., Calero, R. y Roy, T. 2011. Relación entre variables subjetivas e informatizadas del movimiento espermático del morueco. *Arch. Zootec.* 60 (232): 1087-1094.

Broekhuijse, M., Sostaric, E., Feitsma, H. y Gadella, M. 2012. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *J ANIM SCI*, 90:779-789

Budworth, R., Amann, R. y Chapman, R. 1988. Relationships between computerized measurements of motion of frozenthawed bull spermatozoa and fertility. *J. Androl.* 9:41–54.

Cabrera, F., Gonzalez, F., Batista, M., Calero, P., Medrano, A. y Gracia A. 2005. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (*Capra hircus*). *Reprod Domest Anim*;40:191–5.

Caiza de la Cueva F; Rigau T.; Bonet S; Miro J; Briz M.; Rodríguez J. 1997. Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: effects of ouabain. *Theriogenology*, 47: 765-784.

Camacho, O. 2011. Criocapacitación de espermatozoides caprinos, procesados con dos diluyentes. Tesis de grado. Universidad Veracruzana. 54 p

Castilho, E., Guimarães, J., Martins, L., Oliveira, R.; Facioni, S. y Borela C. 2009. Uso de própolis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. *R. Bras. Zootec.*, v.38, n.12, p.2335-2345.

Cox, F.; Alfaro, V., Montenegro, V.; Rodriguez-Martinez, H. 2006. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus, *Theriogenology* 66: 860–867.

Daskin, A., Kulaksiz, R., Akçay, E. y Erol, H. 2011. The Effect of Different Dilution Rates of Angora Buck Semen Frozen with Bioxcell Extender on the Post-thaw Quality. *J Fac Vet Med Univ Erciyes* 8(1), 23-26.

Dott, H. y Foster, G. 1979. The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. *Journal Reprod Fertil* ;55:161-166.

Dorado, J. 2003. Respuesta a la congelación-descongelación del esperma de macho cabrío. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba. Facultad de Veterinaria.

Dorado, J., Hidalgo, M., Muñoz, A. y Rodríguez, I. 2009. Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. *Animal Reproduction Science* 112 : 150–157.

Dorado, J., Hidalgo, M., Muñoz, A. y Rodríguez, I. 2010. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. *Animal Reproduction Science* 121 (2010) 115–123

Dubeibe, D., Pinzón, B.; Salazar, P. y Serrano, C. 2007. Comparación de dos diluyentes para el congelamiento de semen caprino de la raza santandereana. *Rev Col Cienc Pec*; 20:4, 535.

Flesh, F. y Gadella, B. 2000 Dynamics of the mammalian sperm membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 1469:197–235.

Flowers, W. 1997. Management of boars for efficient semen production. *Journal Reprod Fertil* 52: 67-68.

Foxcroft, G., Dyck, M., Ruiz-Sanchez, A., Novak, S. y Dixon W. 2008. Identifying useable semen. *Theriogenology* 70(8):1324-36.

Gacitua, H. y Arav, H. 2005. Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen *Theriogenology* 63 931–938

Gravance, C., y Davis, R. 1995. Automated Sperm Morphometry Analysis (ASMA) in the Rabbit. *Journal Andrology*. 16:88-93

Hirano, Y., Shibahara, H. Obara, H., Suzuki, T., Takamizawa, S., Yamaguchi, C., Tsunoda, H. y Sato. I. 2001. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computeraided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. *J. Assist. Reprod. Genet.* 18:213–218.

Januskauskas A., Johannisson A., y Rodriguez-Martinez H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*; 60:743–58.

Kathiravan, P., Kalatharan, J., Karthikeya, G., Rengarajan, K. y Kadirvel, G. 2010. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull Fertility using computer-aided system – A review. *Reprod Domest Anim*; no. doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01603.x

Katz, D. y Overstreet, J. 1981. Sperm motility assessment by video-micrography. *Fertil. Steril.* 35, 188.

Karagiannidis, A.; Varsakeli, S. y Karatzas, G. 2000. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in greece *Theriogenology* 53, pp 1285-1293.

Krishnakumara, S., Whitesideb, D., Elkinb, B. y Thundathila, J. 2011. Evaluation of an animal protein-free semen extender for cryopreservation of epididymal sperm from North American bison (*Bison bison*) *Theriogenology* 76 252–260

Kraemer, M., Fillion, C., Martin-Pont, B., Auger, J. 1998. Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis. *Human Reprod.* 13: 611-9.

Konayly, C., Tomas, C., Blanch, E., Gomez, E., Graham, j. y Moce, E. 2013. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins

prior to freezing to improve cryosurvival. *Cryobiology* En: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.06.001>

Kozdrowski, R., Dubiel, A., Bielas, W. y Dziecioł, M. 2007. Two Protocols of Cryopreservation of Goat Semen with the Use of Computer-Assisted Semen Analysis System. *Acta Vet. Brno*, 76: 601-604 doi:10.2754/avb200776040601

Lavara, R., Moce, E., Lavara, F., Viudes de Castro, M. y Vicente, S. 2005. Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology* 64:1130–1141.

Lavara, R. 2009. Estimación de los parámetros genéticos y calidad seminal de los parámetros genéticos de producción y calidad seminal en una línea paternal de conejos. Universidad Politecnica de Valencia, 67 p.

Leboeuf, B., Restall, B. y Salamon, S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci*; 62:113– 41.

Leite, T., Do Vale Filho V., De Arruda, R., De Andrade, A., Emerick, L., Zaffalon, F., Martins, J. y De Andrade, V. 2010. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Anim Reprod Sci*; 120: 31–8.

Le Grandois, J., Marchioni, E., Zhao, M., Giuffrida, F., Ennahar, S., y Bindler, F. 2009. Investigation of natural phosphatidylcholine sources: separation and identification by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS2) of molecular species. *J Agric Food Chem* 2009;57:6014 –20.

Marco-Jimenez, F., Garzón, D., Peñaranda, D., Pérez, L., Viudes De Castro, M., Vicente, J. Y Asturiano, J. 2006. Cryopreservation of european spermatozoa: effect of dilution ratio, foetal bovine serum supplementation and cryoprotectants. *Cryobiology*. Volume 53, Issue 1, August, Pages 51–57

Marín-Briggiler, I., Tezón, J., Miranda, P., Vazquez-Levin, M. 2002. Effect of incubating human sperm at room temperature on capacitation-related events. *Fertil Steril*. 77: 252-59.

Mortimer, S. y Mortimer, D. 1990. Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J. Androl*. 11, 195.

Mortimer, D. 1994. *Practical Laboratory Andrology*. Oxford University press. Sydney IVF. Australia

Mortimer, S. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update*. Sep-Oct;3(5):403-39.

Mortimer, S, y Maxwell, W. 2004. Effect of medium on the kinetics of frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction* 127, 285–291.

Miro, J., Taberner, E., Rivera, M., Peña, A., Medrano, A., Rigau, T. y Peñalba, A. 2009. Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen *Theriogenology*;72:1017–22.

Nava, A. y Coronado, L. 2010. Comparación de dos Diluyentes de Base Tris (Hidroximetilaminometano) Sobre la Motilidad del Semen Caprino Congelado-Descongelado. Tesis UDO. Monagas. 49 P

Nordstoga, A., Söderquist, L., Ådnøy, T. y Paulenz, H. 2011. Fertility results after vaginal deposition of frozen-thawed buck semen diluted with two different extenders using one- or two-step procedures. *Reprod Domest Anim*; 46:82– 6.

Palacios, L. y Wang, T. 2005. Egg-yolk lipid fractionation and lecithin characterization. *J Am Oil Chem Soc.*; 82:571– 8.

Pellicer-Rubio, M., Magallon, T. y Combarrous Y. 1997. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biol Reprod*; 57:1023–31.

Pellicer-Rubio, M. y Combarrous, Y. 1998. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *Jornal Reprod Fertil*; 112:95–105.

Peña, A. y Linde-Forsberg, C. 2000. Effects of Equex, one or two step dilution and two freezing thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa, *Theriogenology*, 5: 859–875.

Peterson, K., Kappen, M., Ursem, P., Nothling, J., Colenbrander, B. y Gadella, M. 2007. Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. *Theriogenology*; 67:863–71.

Purdy, P. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res*; 63:215–25.

Quintero-Moreno, A., Miró, J., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E. 2003 Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*. 59, 1973-1990.

Quintero-Moreno A., Rubio-Guillen J. 2008. Evaluación de la calidad espermática en toro mediante tecnología informática. *Desarrollo Sostenible de la Ganadería de Doble Propósito*. Capítulo LVIII, 707 714.

Quintero-Moreno A., González D., Garde J.J., Esteso M., Fernández-Santos MR., Carvalho JL., Mejía W., León G. 2009. Valoración Morfométrica de la cabeza del espermatozoide del cerdo doméstico según su edad. *Revista Científica, FCV-LUZ*, XIX: 153-158.

Quintero-Moreno, A., Rubio-Guillén J., González-Villalobos D., Gutiérrez JC., Madrid-Bury N. y López-Brea JJ. 2011. Identification of cryodamage on plasma membrane Integrity in bull spermatozoa and its relationship With field fertility. *Revista Científica, FCV-LUZ*, Vol. XXI, Nº 5, 403 – 407.

Roof, D., Bowley, S., Price, L. y Matsas, D. 2012. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology* 77, 412–420.

Samper, J., Hellander, J. y Crabo. B. 1991. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 44:107–114.

Sariozkan, S., Bucak, M., Tuncer, P., Tasdemir, U., Kinet, H. y Ulutas, A. 2010. Effects of different extenders and centrifugation/ washing on postthaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm. *Theriogenology*; 73:316 –23.

Sias, B., Ferrato, F., Pellicer-Rubio, M., Forgerit, Y., Guillouet, P., Leboeuf, B. y Carriere, F. 2005. Cloning and seasonal secretion of the pancreatic lipase-related protein 2 present in goat seminal plasma. *Biochim Biophys Acta*; 1686:169–80.

Silvestre, F., Bezerra, T., Castelo, A., Oliveira, R., Lima, G., Peixoto, G., Bezerra, A., Silva. A. 2011. Objective assessment of the cryoprotective effects of dimethylformamide for freezing goat semen. *Cryobiology* 63: 263–266.

Tardif, S., Laforest J.P., Cormier N., Bailey J.L. 1999. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology* 52: 447-459.

Tomas, C. 2007. nuevos protocolos para la crioconservación de espermatozoides de macho cabrío. Universidad Politécnica de Valencia, España, 46 p.

Tuli, R. y Holtz, W. 1994. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and got-release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology* 42 (3): 547-555.

Valencia, J.; González, G., González, M. y Trejo, A. 1994. Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas de 0,25 ml y 0,5 ml y descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. *Vet Méx.*, 25 (2) 127-131.

Vallecillo, A.; Trigo, P.; Delgado, J.; Cabello, A.; Santos, E. y Tenorio, T. 2004. effects of cryopreservation on sperm motility in blanca serrana andaluza goat. *South African Journal of Animal Science*, 34: 116-118.

Vyt, P., Maes, D., Quinten, C., Rijsselaere, T., Deley, W., Aerts, M., De Kruif, A. y Van Soom, A. 2008. Detailed motility examination of porcine semen and its predictive value towards reproductive performance in sows. *Vlaams Diergeneeskd. Tijdschr.* 77:291–298.

White, D., Phillips, M., Bedford, M. 1990. Factors affecting the acrosome reaction in human spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 90: 71-80.

Zarazaga, L.; Guzman, J.; Dominguez, C.; Perez, M. y Prieto R. 2009. Effects of season and feeding level on reproductive activity and semen quality in Payoya buck goats. *Theriogenology* 71, 1316–1325.

## 5. CONCLUSIONES

Las pruebas de calidad de semen que son rutinariamente utilizadas en los programas de inseminación artificial facilita la determinación del porcentaje de espermatozoides motiles usualmente estimada de forma subjetiva y la concentración de espermatozoides por mililitro de eyaculado estimado de forma objetiva por medio del conteo de células. Estos parámetros consideran la valoración clásica del espermatozoide que incluye también la vitalidad espermática; sin embargo, no existe una clara relación de predicción con la resistencia a los procesos de criopreservación y con el potencial reproductivo del animal. Existen diferentes métodos como los métodos CASA, ANDROVISION, IVOS y CEROS que son software que permiten predecir la fertilidad del espermatozoide de forma objetiva y unos bajos sistemas *In Vitro*. El análisis de semen por medio del sistema CASA permite la diferenciación de espermatozoides individuales de acuerdo a sus características de motilidad evitando la variación entre valoraciones, ya que promueve la oportunidad de valorar múltiples características sobre una muestra de espermatozoides con una alta tasa de repetibilidad.

El método CASA incluye la interpretación de los parámetros como velocidad media (VAP), índice de linealidad (LIN), frecuencia de batido de cabeza (BCF) y la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH), deben ser correlacionados entre ellos para hacer una descripción más acertada de la motilidad espermática en una evaluación seminal de individuos de la especie caprina.

La evaluación espermática pos descongelación se ve influenciada por diferentes factores entre ellos el efecto del individuo, método de extracción seminal, tipo de diluyente, protocolo de congelación, entre otros. Un factor de gran importancia

radica en la composición química del medio diluyente y agente crioprotector debido a la respuesta espermática, lo que favorece la sobrevivencia espermática y por ende en aumento en la respuesta a la criopreservación y tasas de fecundación. El medio diluyente que presentó una mejor respuesta al proceso de criopreservación fue el Andromed®, debido a su composición química.

## 6. RECOMENDACIONES

Los criopreservación de material seminal en las especies de interés zootécnico han presentado un gran auge; sin embargo, en la especie caprina aún se continúan realizando estudios para lograr mejores tasas de sobrevivencia espermática postdescongelación. Uno de los mayores esfuerzos es ahondar en el conocimiento para la búsqueda del tipo de diluyente a ser utilizado en los procesos de crio preservación y desarrollar técnicas que mejoren su eficiencia.

Para disminuir el efecto tóxico causado durante el proceso de criopreservación de material seminal caprino se debe trabajar con diluyentes que no incluyan proteína animal o con en caso contengan una bajo porcentaje de adicción de yema de huevo.

Los métodos de evaluación de material seminal por el método convencional han sido utilizados durante muchos años; sin embargo en los últimos tiempos métodos de evaluación como el sistema computarizado de análisis espermático CASA, han permitido evaluar con más exactitud los movimientos del espermatozoide, con el fin de correlacionarlos con la fertilidad. La evaluación de material seminal en la especie caprina ha presentado bajos reportes, por lo cual se hace necesario ahondar en evaluaciones por este método con el fin de determinar el efecto racial y ambiental sobre dichos parámetros.

Es necesario realizar estudios que contemplen la evaluación de otros tipos de diluyentes para ser utilizados en los procesos de criopreservación de semen en la especie caprina. De igual forma, se requiere adelantar estudios que evalúen los niveles de oxidantes, inclusión de diferentes fuentes de proteína, protocolos de congelación (tiempos y gravedades de centrifugación). Lo anterior con el fin de mejorar los índices de fertilidad de la especie caprina.

En cuanto a la valoración de semen caprino por el método CASA se debe profundizar en el estudio de características de los equipos como la cámara utilizada, la tasa de adquisición de la imagen, la resolución, ampliación del objetivo, tiempo de muestreo, el algoritmo de suavizado, número de células, la lámina y los campos examinados, y la temperatura de análisis, ya que puede influenciar los resultados.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Amann, R. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.* 2 (10), 89-98.

Amann R, Waberski D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential Developments. *Theriogenology* 81: 5–17.

Anzar, M.; Hassan, M.M.; Graham, E.F.; Deyo, R.C.M.; Singh, G. 1991. Efficacy of the Hamilton Thorn motility analyzer (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen. *Theriogenology*, 36: 307-317.

Bautista, M., Niño, T., Santana, M., Alamo, D., Castro, N., Reyes, R., González, F., Cabrera, F., Gracias, A. 2011. influence of the criopreservation temperature (37, 20, 4 -196) and the mixing of semen over sperm quality of majorera bucks. *Reprod.Domest.Anim.*46, 281-288.

Bautista, M., Niño, T., Santana, M., Alamo, D., Castro, N., Reyes, R., González, F., Cabrera, F., Gracias, A. 2013. Post-thaw quality of buck semen samples cooled at 5°C up to 2 days before cryopreservation. *Small Ruminant Res.* 46, 281-288. [h](#)

Bernardi, S., Allende, R., Mazzeo, R., Monti, J., Marini, P. 2011. Evaluación de los cambios ocasionados en espermatozoides bovinos por variaciones en el manejo de las dosis durante su manipulación en inseminación artificial. *InVet* 13 (2), pp: 25-38.

Boyers, S.P., Davis R., Katz D.F. Automated semen analysis. *Curr. Probl. Obstet. Gynecol. Fertil.* 1989, 12, 172-200.

Cancel, A.; Danelle, L.; Mendola, P. y Perreault, D. 2000. Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. *Human reproduction* vol. 15 no. 6 pp 1322-1328

Chenoweth, P. 1997. Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull. In: Youngquist: *Current therapy in large animal.* 1th Edition. Saunders. *Theriogenology.* Pp.: 217.

Chantarapruteep, P., y Bodhipaksha, P. 1975. Studies on semen of the Thai swamp buffalo for artificial insemination. *Thai Veterinary Medicine Association* 26, pp.: 37–62.

Cortes, S. 2002. Efectos de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino. *Universidad Complutense de Madrid.* 202 p.

Davis, R. y Siemers, R. 1995. Derivation and reliability of kinematics measures of sperm motion. *Reprod Fertil Dev* 7, pp.: 857-869.

Dorado, F., Rodriguez, I., Hidalgo, M. 2007. Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two freezing extender base on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology* 68, 168-177

Farrel P, Foote R, McArdle M, Trouern-Trend V, Tardif A. 1996. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analyses (CASA). *J Androl*, v.17, p.293-300.

Flores, H. 2005. Efecto del enfriado lento hasta -5°C previo a la congelación sobre la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide porcino. Tesis nivel Maestría. Cuahutitlán Izcalli, edo. Méx. UNAM.

Gadea J. 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*, 63:431-444.

Grajales H, Tovia N, Duica A. 2011. Guía técnica de producción ovina y caprina: Manejo y control reproductivo. Bogotá: Corpoica.

Hafez, B. 2003. *Reproduction in farm animals*. 8th edition. Baltimore/USA. LEA & FEBIGER. Pp.: 09.

Hernández, A. 2012. Valoración funcional de semen crio preservado de toros mediante análisis computarizado e integridad de la cromatina espermática. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela. 61 p.

Hidalgo, M., 2004. Estudio del efecto de la congelación-descongelación sobre los parámetros morfométricos del espermatozoide de macho cabrío. Universidad de Córdoba. Tesis Doctoral. 225p.

Hidalgo, M., Rodriguez, I., Dorado, J. 2007. The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Anim. Reprod. Sci.*100, 61-72

Hirai, M., Boersma, A., Hoeflich, A., Wolf, E., Foll, J., Aumuller, R., Braun, J. 2001. Objectively Measured Sperm Motility and Sperm Head Morphometry in Boars (*Sus scrofa*): Relation to Fertility and Seminal Plasma Growth Factors. *J Androl* 22:104–110

Ivanova, M. y Mollova. M. 1993. Zona-penetration in vitro test for evaluating boar sperm fertility. *Theriogenology*, 40: 397-410

Januskauskas, A., Gil, J., Soderquist, L., Haard, M.G., Haard, M.C., Johannisson, A. Rodriguez-Martinez, H. 1999. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology* 52, pp.: 641-58.

Jeyendran R.S., Van Der Ven H.H., Perez-Pelaez M., Crabo B.G., Zaneveld L.J.D. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.* 70, 219-228.

Kastelic, J., y Thundathil, J. 2008. Breeding Soundness Evaluation and Semen Analysis for predicting bull fertility. *Reprod Dom Anim* 43 (Suppl 2), pp.: 368-373.

Katz, D, y Overstreet, J. 1980. Mammalian sperm movement in vitro secretions of the male and female genital tracts. In: Testicular development, structure and function. Eds: A. Steinberger and E. Steinberger. Raven Press, New York, pp.: 481-489.

Katz, D, y Overstreet, J. 1981. Sperm motility assessment by video-micrography. *Fertil. Steril.* 35, 188.

Lavara, R. 2009. Estimación de los parámetros genéticos y calidad seminal de los parámetros genéticos de producción y calidad seminal en una línea paternal de conejos. Universidad Politecnica de Valencia, 67 p.

Liu, D., Martic, M., Clarke, G., Dunlop, M., Baker, H. 1999. An important role of actin polymerization in the human zona pellucida induced acrosome reaction. *Mol. Hum. Reprod.* 5, pp.: 941-949.

Mara, L., Dattena, M., Pilichi, S., Sanna, D., Branca, A. Cappai, P. 2007. Effect of different diluents on goat semen fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 102, 152-157.

Maxwell, W. y Evans, O. 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras. El acribia S.A. (Madrid). *Can.* 34 : 19-32.

O'Connell, M, McClure, N, Lewis, S. 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod.* 17: 704-709.

Osorio C, 2013. Valoración computarizada de la integridad funcional de la membrana plasmática, motilidad y morfología espermática en semen criopreservado de búfalo. Programa de Maestría en Reproducción Animal. LUZ.Maracaibo. 106p.

Pineda, D. 2002. Biotecnología en la reproducción de animales domésticos. ISBN. 958-33-2425-6. UNARIÑO.

Quintero-Moreno, A. 2003. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria. (Tesis Doctoral). 164 pp.

Quintero-Moreno, A., Rubio-Guillén J., González-Villalobos D., Gutiérrez JC., Madrid-Bury N. y López-Brea JJ. 2011. Identification of cryodamage on plasma membrane Integrity in bull spermatozoa and its relationship With field fertility. Revista Científica, FCV-LUZ Vol. XXI, Nº 5, 403 - 407.

Ramos L, Hendriks JM, Peelen P, Braat D, Wetzels A. 2002. Use of Computerized Karyometric Image Analysis for Evaluation of Human Spermatozoa. J Androl. 23:882–888

Rigau, T., Farré, M., Ballester, J., Mogas, T., Peña, A., Rodríguez-Gil, J. 2001. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. Theriogenology 56, pp.: 801-815.

Rodríguez-Martínez, H., Larsson, B., Pertoft, H. 1997. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. Reprod Fertil Dev 9, pp.: 297-308.

Rodríguez-Martínez, H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia. Reprod Dom Anim 38, pp.: 312–318.

Rodríguez-Martínez, H. 2007. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. Soc Reprod Fert (suppl 1) 64, pp.: 39-54.

Roldan, E., Cassinello, J., Abaigar, T., Gomendio, M. 1998. Inbreeding fluctuating asymmetry, and ejaculate quality in an endangered ungulate. Proc Roy Soc B 265, pp.: 243-248.

Rubio-Parada, J. 2010. La Caprinocultura y su importancia socioeconómica en el área metropolitana de San José de Cúcuta. Tesis Maestría. UNET. San cristobal. 105 p.

Rubio-Guillén J, González D, Garde J, Esteso M, Fernández-Santos M, Rodríguez-Gil J, Madrid-Bury N, Quintero-Moreno A. 2007 Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometricall y distinct subpopulations. Reprod Dom Ani, 42: 354-357.

Squires, E., Keith, S. y Graham, J. 2004. Evaluation for protective cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 62, pp.: 1056-1065.

URPA. 2007. Agenda Interna de Competitividad. Regional Norte de Santander. Departamento Nacional de Planeación. 52 p.

Vale, W. 2011. Avances biotecnológicos en reproducción de búfalos. En: *Tecnología en Marcha, Revista Especial*, Vol. 24, N° 5, pp: 89-104.

Vázquez, J., Martínez, E., Roca, J., Blanco, O., Lucas, X., Matas, C. 1997. Utilización del analizador de imágenes para la evaluación de la motilidad de los espermatozoides de verraco. En: *IV Simposium Internacional de Reproducción e IA porcina*. Madrid. pp 83-90.

Vera, O. 2001. Evaluación seminal comparativa pre y postcongelación en machos bovinos. En: *Reproducción Bovina*. C. González- Stagnaro (Ed). Edics. Astro Data S. A. Fundación GIRARZ. Maracaibo-Venezuela. Cap: XII: 1 – 11.

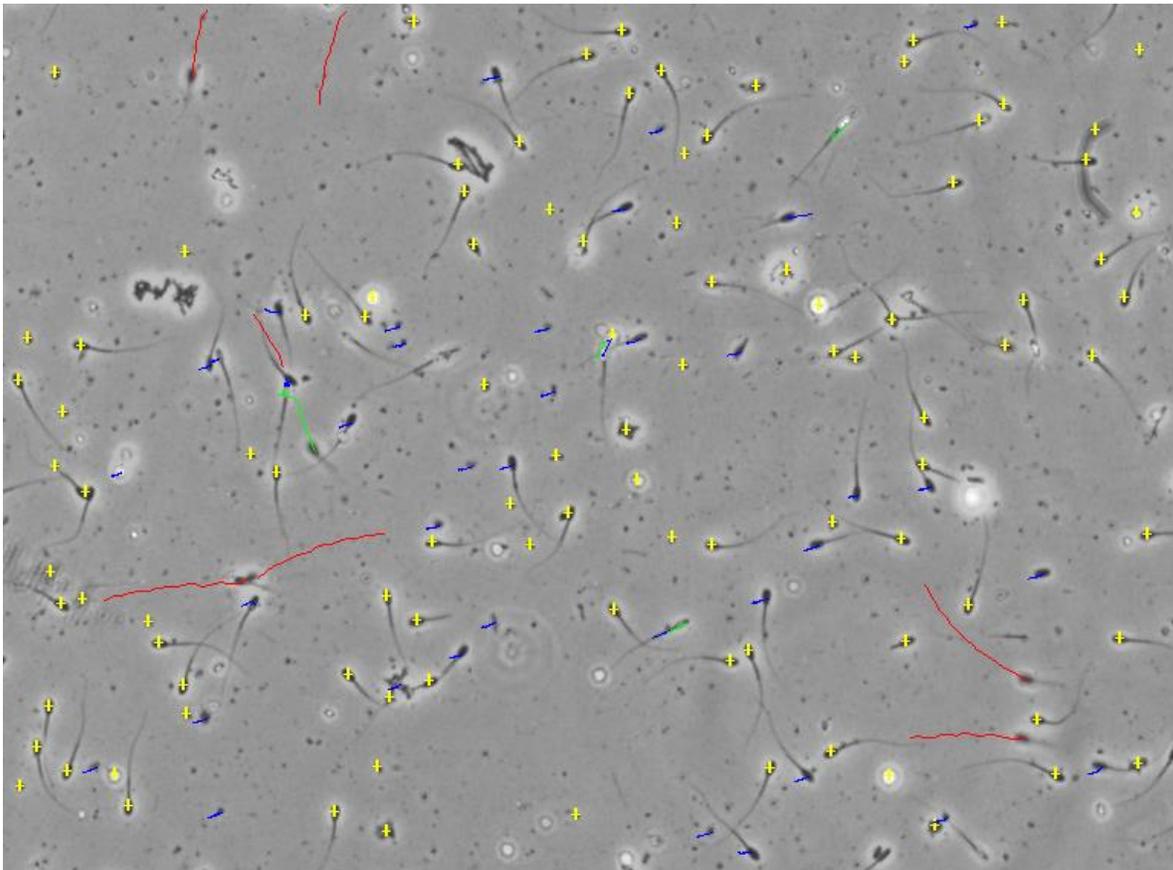
Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K. 2002. Computer Assisted Semen Analyzers in Andrology Research and Veterinary Practice. *Theriogenology*, 57, pp.: 149-179.

Villanova, L. y Gatica, R. 2002. ¿Puede el análisis per se predecir realmente la fertilidad potencial en toros? *Revista Científica, FCV-LUZ*, Vol XII (3), pp.: 202-208.

## 8. ANEXOS

### Resultados CASA

La captura de imágenes de evaluación seminal de los diferentes medios de congelación caprina.



Leyenda de colores de las imágenes

* Movilidad progresiva rápida (tipo a)	* Movilidad no progresiva (tipo c)
* Movilidad progresiva lenta (tipo b)	* Inmóviles

Fotografía 1. Resultados CASA