

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**



**“EFECTO DE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA EN LA PRODUCCIÓN
DE EMBRIONES *in vitro* EN BOVINOS”**

**Presentada por:
EDITH ANCCO GOMEZ**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**Lima - Perú
2017**

DEDICATORIA

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este momento y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi madre, por haberme apoyado en todo momento, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi padre, a pesar de nuestra distancia física, siento que estás conmigo siempre y aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos, sé que este momento hubiera sido tan especial para ti como lo es para mí.

A mis hermanas, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo, y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

¡Gracias a ustedes!

AGRADECIMIENTOS

A mi Patrocinador de tesis al Mg Sc. Edwin Mellisho Salas, por la orientación y ayuda que me brindo para la realización de esta tesis, por su apoyo incondicional y amistad que me permitieron aprender mucho. Gracias por la oportunidad brindada.

Al Mg Sc. Prospero Cabrera Villanueva, presidente de jurado de tesis, por su apoyo y contribución en brindarme material biológico del Banco Nacional de Semen de la Universidad Nacional Agraria La Molina, para el desarrollo de la tesis.

Al Ph.D. Javier Ñaupari Vasquez., por su confianza y orientaciones para cumplir el objetivo.

Al Dr. Ampelio Ferrando Perea, por su contribución y enseñanzas como persona y profesional.

A la Dra. Yeda Watanabe, de Vitrogen - Brasil, por el apoyo incondicional quien me enseñó el proceso in vitro en la producción de embriones.

Al laboratorio de biotecnología reproductiva de la facultad de Zootecnia, de la Universidad Nacional Agraria La Molina, por permitirme realizar el trabajo experimental.

A todos mis profesores de la Maestría de Producción Animal, que me enseñaron tanto, impulsándome siempre a seguir adelante.

A mis amigos del laboratorio de biotecnología reproductiva y compañeros de la maestría, por las experiencias y momentos vividos.

INDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1.	Dinámica Folicular.....	3
2.2.	Análisis clásico de semen.....	4
2.2.1.	Motilidad espermática.....	6
2.2.2.	Viabilidad espermática.....	6
2.2.3.	Morfología espermática.....	8
2.3.	Análisis computarizado de semen (CASA).....	9
2.3.1.	Parámetros de motilidad espermática.....	12
2.4.	Producción de embriones <i>in vitro</i> en bovinos.....	15
2.4.1.	Potencialidad de aplicación.....	15
2.4.3.	Etapas de la fecundación <i>in vitro</i>	20
2.5.	Predicción de la fertilidad potencial del toro.....	23
2.5.1.	Pruebas de laboratorio.....	23
2.5.2.	Pruebas de campo.....	25
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1.	Lugar.....	28
3.2.	Producción de embriones <i>in vitro</i> en bovinos.....	28
3.2.1.	Recuperación de complejo cúmulus ovocito (COCs).....	29
3.2.2.	Maduración <i>in vitro</i>	31
3.2.3.	Fecundación <i>in vitro</i>	31
3.2.4.	Cultivo <i>in vitro</i>	33
3.3.	Análisis computarizado de semen (CASA).....	34
3.3.1.	Análisis post descongelación de semen (antes).....	37
3.3.2.	Análisis post selección y capacitación <i>in vitro</i> (después).....	38
3.4.	Análisis estadístico.....	38
4.1.	Parámetros de Motilidad espermática.....	40
4.2.	Indicadores en la producción de embriones <i>in vitro</i> por toro evaluado.....	42
4.3.	Correlación entre los parámetros de movimiento espermática.....	44
IV.	CONCLUSIONES.....	49
VI.	RECOMENDACIONES.....	50
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	51
VIII.	ANEXOS.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Tasa de blastocistos y tasa de preñez, producidos en la producción de embriones in vitro con el uso de semen preseleccionado “x” y convencional en Holstein.....	19
Tabla 2: Tasa de concepción de toro (SCR) para toros Holstein, agosto de 2014.....	26
Tabla 3: Comparación de parámetros de movilidad espermática antes y después de la capacitación espermática.....	40
Tabla 4: Número y porcentaje de blastocistos en relación con los ovocitos fecundados por toro.....	43
Tabla 5: Correlación de los parámetros de motilidad antes versus después de la selección y capacitación espermática.....	44
Tabla 6: Correlación de parámetros de motilidad espermática con la producción de blastocistos.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación esquemática del sistema computarizado de análisis seminal.....	10
Figura 2: Parámetros de motilidad obtenidos por el CASA.....	12
Figura 3. Características de movimiento espermático de semen fresco diluido, previo a la congelación y semen post descongelado después de su congelación en nitrógeno líquido.	14
Figura 4. Protocolo estandarizado de análisis con el CASA y producción de embriones In Vitro.....	28
Figura 5. Ovario de matadero sujetado en mano izquierda y con la mano derecha se guía la jeringa y aguja para la aspiración de los folículos visibles.....	29
Figura 6. Clasificación de los complejos cúmulus ovocitos (COCs).....	30
Figura 7. Búsqueda y lavados de COCs previo la colocación en medio de maduración (MIV).....	30
Figura 8. COCs con células del cúmulus expandido, indicador de la maduración del ovocito (22 a 24 horas).....	31
Figura 9. Preparación de la fase de Percoll 45/90, para la selección y capacitación espermática.....	32
Figura 10. Placas de 35x15mm, gotas de maduración con MIV (izquierda) y gotas de cultivo con CIV (derecha), cultivando COCs y embriones, respectivamente.....	33
Figura 11. Grupo de blastocistos de bovino (día 7 post fecundación <i>in vitro</i>) clasificados en calidad I y II.....	34

Figura 12: Imagen de captura de las células espermáticas (ANTES) con Integrated Semen Analysis System Sperm (ISAS®, Proiser, Valencia, España).....	35
Figura 13: Imagen de captura de las células espermáticas (DESPUES) con Integrated Semen Analysis System Sperm (ISAS®, Proiser, Valencia, España).....	35
Figura 14: Representación gráfica de los parámetros cinéticos obtenidos mediante el sistema casa. VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad rectilínea; VAP: Velocidad de la trayectoria media; ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza.....	36
Figura 15: a) Velocidad lineal -VSL-del grupo control y tratado con swim up y b) Distribución de los espermatozoides por velocidad promedio –VAP (Holt <i>et al.</i> , 2007)...	42
Figura 16: Correlación de parámetros de cinética antes y después de la selección y capacitación espermática de la velocidad curvilínea (VCL).....	45
Figura 17: Correlación de parámetros de cinética antes y después de la selección y capacitación espermática de la frecuencia de batida de la cola (BCF).....	45
Figura 18: Correlación del Índice de linealidad (LIN) con el porcentaje de la producción de blastocistos.....	47

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1: Datos de parámetros de cinética espermática (ANTES).....	63
ANEXO 2: Datos de parámetros de cinética espermática (DESPUES).....	64
ANEXO 3: Producción de blastocistos por toro.....	65
ANEXO 4: Análisis de varianza para la comparación de parámetros de cinética espermática antes y después de la capacitación espermática.....	66
ANEXO 5: Correlación de los parámetros de cinética ANTES con la producción de blastocistos.....	69
ANEXO 6: Correlación de los parámetros de cinética DESPUES con la producción de blastocistos.....	70
ANEXO 7: Archivos CASA Computer Assisted Sperm Analysis (ANTES).....	71
ANEXO 8: Archivos CASA Computer Assisted Sperm Analysis (DESPUES).....	72

RESUMEN

El sistema computarizado de análisis de semen y la fertilización *in vitro* son herramientas útiles para predecir la fertilidad. El presente estudio se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de la motilidad espermática en la producción de embriones *in vitro* en bovinos, la investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Los ovarios fueron colectados del camal y transportados en termos con solución fisiológica a 35 °C. La aspiración de los complejos cúmulos ovocitos (COCs), se realizó aproximadamente dentro de 3 horas después de beneficiados los animales, se aspiraron con PBS+ 1% SFB, los folículos entre 3 a 8 mm de diámetro, con aguja n° 18, Los COCs se categorizaron de acuerdo a la morfología de las células del cúmulus ovocitos, seleccionándose los COCs de calidad A y B. colocándose en placas petri con gotas de medio maduración, donde se llevó a la incubadora a 38.5 °C y 5% de CO₂ por 22 horas, para luego ser fecundados *in vitro* por 18 horas previo tratamiento espermático con gradiente de percoll 45/90 y medio capacitante, evaluándose con el Sistema computarizado de analisis de semen parámetros de motilidad espermática como velocidad curvilínea (VCL), Velocidad media (VAP), velocidad rectilínea (VSL), índice de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR), índice de oscilación (WOB), desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y Frecuencia de batida (BCF). Una vez finalizada la etapa de fecundación, se trasladaron en un medio para cultivo, a las 48 horas se realizó la primera renovación del 50% de medio de cultivo, para el día 5 se realizó la segunda renovación del 50% de medio de cultivo. Posteriormente para el día 7 se obtuvieron los embriones en el estado de blastocisto y/o blastocisto expandido. Para la evaluación de los parámetros de motilidad espermática se utilizó un diseño de bloques completamente al azar y para la correlación de parámetros de motilidad con la producción de blastocistos se utilizó correlación de pearson. Se encontró que los parámetros de velocidad espermática como VCL, VSL y VAP son superiores estadísticamente ($P \geq 0.05$) entre 13 a 14 $\mu\text{m/s}$ y los parámetros de angularidad y oscilación de la cabeza como LIN, STR y WOB entre 6 a 8% en muestras de semen posterior a la selección y capacitación espermática en comparación a las muestras de semen post descongelado. Y estas se encuentran correlacionadas positivamente entre sí.

Palabras claves: Motilidad espermática, Blastocisto, CASA, Fertilización *in vitro*

ABSTRACT

The computerized system of semen analysis and in vitro fertilization are useful tools for predicting fertility. The present study was conducted with the objective of evaluating the effect of sperm motility on the production of embryos in vitro in cattle, the research was carried out in the Laboratory of Reproductive Biotechnology, National University Agrarian La Molina. The ovaries were collected from the slaughterhouse and transported in terms with physiological solution at 35 ° C. The aspiration of the complex oocyte cumulus (COCs), was performed within 3 hours after the animals benefited, were aspirated with PBS + 1% SFB, follicles between 3 to 8 mm in diameter, with needle # 18, COCs were Categorized according to the morphology of the oocyte cumulus cells, selecting COCs of quality A and B. placed in petri dishes with drops of medium ripening, where the incubator was taken at 38.5 °C and 5% CO₂ for 22 hours, To be fertilized in vitro for 18 hours before spermatic treatment with gradient percoll 45/90 and capacitive medium, being evaluated with the computerized semen analysis system parameters of sperm motility such as curvilinear velocity (VCL), mean velocity (VAP), velocity Straight line index (VSL), linearity index (LIN), straightness index (STR), oscillation index (WOB), lateral displacement of the head (ALH) and beat frequency (BCF). At the end of the fertilization stage, they were transferred to a medium for culture, at 48 hours the first renewal of 50% of culture medium was carried out, for day 5 the second renewal of the 50% culture medium was performed. Subsequently for day 7, the embryos were obtained in the state of blastocyst and / or expanded blastocyst. For the evaluation of sperm motility parameters a completely randomized block design was used and for correlation between motility parameters and blastocysts production we used pearson correlation. Sperm velocity parameters such as VCL, VSL and VAP were statistically higher ($P \geq 0.05$) between 13 and 14 $\mu\text{m} / \text{s}$ and head angularity and oscillation parameters such as LIN, STR and WOB were between 6 and 8% in Semen samples after selection and sperm training compared to post-thawed semen samples. And these are positively correlated with each other.

Key Words: Sperm motility, blastocyst, CASA, IVF

I. INTRODUCCIÓN

Antes de usar un toro en los programas de reproducción es recomendable conocer su fertilidad. En muchos casos no es suficiente que haya tenido algunas crías, es deseable conocer la fertilidad con un grado de exactitud, en especial cuando se usa en programas de inseminación artificial y monta natural de un gran número de hembras (Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000).

La predicción de la capacidad fecundante del esperma es técnica y económicamente muy importante, en especial cuando trabaja con reproductores que están en centrales de inseminación. Los investigadores en el mundo han desarrollado varias pruebas relacionadas con la calidad de semen y su morfología (Barth, 1992), motilidad espermática (Kjaestad *et al.*, 1993; Holt *et al.*, 1997), componentes bioquímicos del semen (Hirao, 1975), presencia de cromosoma intacto (Correa *et al.*, 1997), integridad de membrana plasmática (Perez *et al.*, 1997), concentración de espermatozoides seleccionados por swim up (Zhang *et al.*, 1998), reacción acrosómica (Januskauskas *et al.*, 2000), etc.

La evaluación de motilidad espermática es comúnmente utilizado por laboratorios de análisis de semen, debido a su simplicidad, rapidez y bajo costo (Gadea *et al.*, 1998; 2004), sin embargo, la correlación con la fertilidad es muy variable, baja y en muchos casos contradictoria (Xu *et al.*, 1998 y Tardif *et al.*, 1999). La medida de motilidad espermática es subjetiva debido a que depende individualmente del observador y la precisión de la estimación de la motilidad es muy importante, siendo de alta correlación con la fertilidad, si se usa como variable el promedio de la estimación de diferentes técnicos (Foote, 2003).

El sistema computarizado de análisis de semen (CASA- Computer - Assisted Sperm Analyzer) ha sido usado para resolver este problema (reducir la variabilidad) y se ha encontrado una correlación significativa con la fertilidad (Hirai *et al.*, 2001), sin embargo, el sistema no está exento de algunos errores humanos (Verstegen *et al.*, 2002)

La fecundación *in vitro* se ha desarrollado y utilizado para la producción de crías de alto valor genético de diferentes especies (Palmer *et al.*, 1991). Esta técnica implica la maduración *in vitro* de ovocitos (IVM), fecundación *in vitro* de ovocitos (IVF) y el cultivo *in vitro* de ovocitos fecundados (IVC) hasta el estadio de blastocisto. A través de los años, muchos estudios, realizados principalmente en bovinos, han demostrado que el donante del semen influye en gran medida el resultado fecundación y cultivo de embriones (Shi *et al.*, 1990; Shamsuddin y Larsson, 1993). A los ensayos de fertilidad *in vitro* se denominan prueba de penetración espermática (Hay *et al.*, 1997; Gadea *et al.*, 1998), en la cual los espermatozoides demuestran su habilidad para penetrar la zona pelúcida y realizar una fecundación y completar su desarrollo.

La relación objetiva de un análisis computarizado con un procedimiento de fecundación *in vitro* puede ser una de las alternativas más relevantes para determinar tempranamente la capacidad fértil de los donadores de semen. En tal sentido para la presente investigación se ha planteado el siguiente objetivo; Evaluar el efecto de la motilidad espermática en la producción de embriones *in vitro* en bovinos.

Para desarrollar este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- a) Caracterizar los parámetros de motilidad (VCL, VAP, VSL, LIN, STR, WOB, ALH y BCF) del espermatozoide bovino post descongelado y post seleccionados y capacitados, previo a ser utilizados en fecundación *in vitro*.
- b) Caracterizar los indicadores en la producción de embriones *in vitro*, por toro evaluado.
- c) Estudiar la correlación entre los parámetros de motilidad (VCL, VAP, VSL, LIN, STR, WOB, ALH y BCF) evaluados en post descongelación y post selección y capacitación con la producción de embriones *in vitro* en bovinos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Dinámica Folicular

El uso de la ecografía ha confirmado el modelo teórico planteado por Rajakoski, quien propuso que los patrones de crecimiento y regresión folicular, tanto a nivel individual como el total de la población, se desarrollarían durante todo el ciclo, pero no de forma continua sino muy relacionados en el momento o día del ciclo (Rajakoski., 1960).

El seguimiento ecográfico de los folículos durante todo el ciclo permite la descripción de los niveles de crecimiento y desarrollo foliculares. En la vaca se puede enmarcar en las etapas de reclutamiento, selección y dominancia (Savio *et al.*, 1988). El reclutamiento folicular es el proceso que está bajo la responsabilidad de la FSH, los folículos antrales pequeños de 2 – 3 mm de diámetro, comienzan a crecer, iniciando así una onda de desarrollo (reclutamiento) y este proceso se relaciona temporalmente con cambios medibles de la FSH circulante (Adams *et al.*, 1992).

Aun se discute de los factores intraovarios estimulados por la FSH, los que están involucradas en el proceso de reclutamiento folicular, los factores de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) y las proteínas a las que estos se ligan han sido implicados en la amplificación de la acción de la FSH (Monget *et al.*, 1996). Los folículos desarrollan la fase de desviación y llegan a la dominancia en cuatro días de la fase de selección, creciendo de un modo muy rápido (Ginther *et al.*, 1997).

El proceso de selección se caracteriza por el bloqueo ejercido por el folículo más desarrollado sobre los restantes folículos del mismo desarrollo, este efecto se produce a través de sustancias hormonales como las inhibinas y el estradiol, las que actúan disminuyendo la liberación de FSH, de modo que los niveles insuficientes de gonadotropinas afectan esencialmente, el desarrollo de los folículos más pequeños, esta fase existe un grupo reducido de folículos que escapan al proceso de atresia. Otro mecanismo que se invoca es el de los factores paracrinicos como el de la producción del factor de crecimiento epidérmico que

reduce la capacidad de los folículos pequeños para utilizar andrógenos (Blanco y Campo, 1997).

La dominancia se refiere al desarrollo de un folículo mientras los restantes sufren un proceso de atresia fisiológica. El folículo dominante es más sensible a la acción de las gonadotropinas que los restantes, por lo que a pesar de influir negativamente en la liberación de gonadotropinas FSH, no sufre atresia (Adams *et al.*, 1993). La competencia entre los folículos por la FSH circulante es la responsable de la dominancia, cuando se elimina el folículo dominante, el subordinado más cercano al dominante ocupa su lugar (Kastelic *et al.*, 1990; Sunderland *et al.*, 1994)

La FSH es indispensable para la secreción de estrógenos foliculares ya que estimula el crecimiento y la completa diferenciación de las células de la granulosa de los folículos preovulatorios grandes para que adquieran receptores para la LH, y desarrollen su máxima actividad. Cerca del 90% del estradiol secretado por los ovarios se deriva de estos folículos estimulados por la FSH (Rivera., 1993).

Ovulación. Los folículos preovulatorio experimentan tres cambios principales durante el proceso ovulatorio: a) maduración citoplasmática y nuclear del ovocito, b) pérdida de la cohesividad de las células del montículo ovárico entre las células de la capa granulosa y c) adelgazamiento y rotura de la pared folicular externa.

Después del pico de LH que inicia el proceso de ovulación, aumenta el flujo sanguíneo hacia todas las clases de folículos. Sin embargo, el folículo destinado a ovular recibe el mayor volumen de sangre en términos absolutos. La disposición normal del ovario de los mamíferos hace posible la ovulación en cualquier punto de su superficie, excepto en el hilio (Karsh *et al.*, 1997; Hafez., 2000).

2.2. Análisis clásico de semen

El análisis de semen clásico permite realizar una primera evaluación rápida de la calidad espermática, ayudando en la predicción del potencial de fertilidad, así como en la identificación de posibles causas de infertilidad. La prueba debe incluir unos factores que evalúan diversas funciones de la célula espermática.

Aunque no hay un consenso sobre la eficacia de las diferentes pruebas utilizadas en cuanto a predicción de la fertilidad del macho. El espermiograma sigue siendo un método muy utilizado que permite valorar la calidad de las muestras seminales correspondientes a diferentes especies. No obstante, en ocasiones, los resultados de los parámetros espermáticos del espermiograma clásico pueden no ser suficientes para determinar con exactitud la capacidad fecundante de un eyaculado (Larsson y Rodriguez-Martinez, 2000).

El semen es uno de los fluidos biológicos más variables que existen (Lewis, 2007), ya que los espermatozoides son conocidos por la capacidad de cambiar su comportamiento en respuesta a sutiles cambios ambientales, como métodos de procesamiento, conservación, temperatura, etc., los científicos en reproducción animal se enfrentan a un gran reto a la hora de poder valorar la calidad seminal y comparar sus resultados con los de otros estudios o laboratorios, debido en parte a la ausencia de un protocolo estándar de valoración (Gravance *et al.*, 1998).

Existe así, una gran variabilidad de resultados debido a algunas limitaciones que requiere especial mención, la necesidad de un personal calificado para el desarrollo de determinadas pruebas de laboratorio, al haberse demostrado ampliamente la influencia del evaluador, en el resultado final de las mismas (Davis y Siemers, 1995). Otro problema es la falta de consenso entre los laboratorios a la hora de interpretar los resultados (Larsson y Rodriguez-Martinez, 2000) y, por tanto, si bien el espermiograma clásico aporta una información válida de la calidad seminal ésta no es suficiente como para poder permitirnos una mayor comprensión de todos los procesos que determinan la calidad espermática.

El análisis rutinario y clásico evalúa de una forma rutinaria diversos parámetros espermáticos como el pH, el volumen, la concentración, el movimiento espermático y la morfología, entre otros. Estos parámetros individualmente no presentan una correlación definitiva con la fertilidad, si bien su interpretación global nos permite una primera evaluación y control rutinario de la calidad seminal. Así, como resultado del análisis seminal, podemos calificar a la muestra como “apta” o “no apta” para su uso en inseminación artificial o en determinados programas de reproducción asistida (Hidalgo *et al.*, 2005).

2.2.1. Motilidad espermática

Los espermatozoides de mamíferos adquieren la capacidad de movimiento durante el transporte por el epidídimo (Yanagimachi *et al.*, 1981). La motilidad flagelar es estimulada tras la eyaculación y se modula durante el tránsito del espermatozoide a través del aparato reproductor de la hembra (Davis y Siemers, 1995). Este tránsito implica cambios secuenciales importantes en los patrones de movimiento espermático, mostrando diferencias en cuanto a la longitud de la onda flagelar (movimiento asimétrico) o cambios en el desplazamiento lateral de la cabeza (Muiño *et al.*, 2008), sugiriendo que el espermatozoide necesita primero sufrir una activación en la motilidad (hiperactivación) que le permita atravesar el tracto genital de la hembra y posteriormente, cambios estructurales en el acrosoma dándole la capacidad de fecundación (penetrar la pared del ovocito) (Turner, 2003). Por todo ello, la motilidad del espermatozoide es una característica fundamental a tener en cuenta en la evaluación de la calidad seminal.

Para la evaluación del movimiento espermático se han descrito numerosos métodos (Bonet *et al.*, 1992; WHO, 1999), desde la valoración subjetiva bajo microscopio de campo claro hasta los sistemas CASA, capaces de realizar evaluaciones objetivas tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo (WHO, 1999). La mayoría de los autores coincide en mostrar valores $\geq 60\%$ de espermatozoides con movimiento progresivo para un reproductor fértil (Muiño *et al.*, 2008).

Existen muchos factores, tanto de origen extrínseco, que influyen en la calidad del movimiento y que pueden afectar al movimiento espermático de una muestra. Entre ellos, destacamos la frecuencia de colecta, el uso y el tipo de diluyentes para su evaluación el tiempo entre la recogida y la evaluación, la temperatura o el uso de antibióticos en los diluyentes, como factores extrínsecos y la raza y edad de los animales, las alteraciones de origen testicular entre los de intrínsecos.

2.2.2. Viabilidad espermática

La viabilidad espermática refleja el grado de integridad de la membrana plasmática y acrosomal del espermatozoide, parámetro que ha sido previamente asociado con la fertilidad potencial de una muestra de esperma (Uwland, 1984).

La evaluación de la integridad de la membrana plasmática es una prueba fundamental dentro del espermograma debido a la importancia que tiene esta estructura en el mantenimiento del espermatozoide vivo (Mocé y Graham, 2008). Además, la integridad de la membrana espermática no solo es fundamental para el metabolismo espermático, sino que es imprescindible en varios eventos de la fecundación como la capacitación, la reacción del acrosoma o su fusión con el ovocito (Quintero-Moreno *et al.*, 2003).

Entre los métodos descritos para la valoración de la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide se describen técnicas tinción como la eosina-nigrosina, eosina/azul de anilina, el verde/eosina, el tripán azul/giemsá o el amarillo naftol/eritrosina, las cuales se valoran bajo microscopía de campo claro, o microscopía de ópticas de contraste de Normarski o de contraste de fases (Pursel y Johnson, 1974). Otra técnica es la microscopía electrónica, tanto de transmisión como de barrido, que debido a su alto costo y su complejidad es poco práctica (Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000).

Actualmente el desarrollo de sondas fluorescentes y la utilización de la microscopía de fluorescencia o la citometría de flujo han permitido el uso de nuevas técnicas para evaluar los daños de la membrana plasmática del espermatozoide. Un ejemplo de ello es la combinación de sondas como el diacetato de carboxifluorescencia o el SYBR-14 con el yoduro de propidio (Maxwell, 1996). Este tipo de técnicas permiten evaluar de forma más precisa la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide (Pérez-Llano *et al.*, 2003) y en consecuencia, la viabilidad de la célula espermática.

Por otra parte, las pruebas funcionales como el test de endosmosis (HOST-test) permite evaluar la integridad de la membrana plasmática, valorando su funcionalidad al comprobar la resistencia osmótica del espermatozoide en medios hipoosmóticos (Pérez-Llano *et al.*, 2003). La célula espermática posee la capacidad de captar o liberar agua según la osmolaridad del medio extracelular, informando de la óptima funcionalidad de su membrana plasmática y de la capacidad del espermatozoide para la distribución de fluidos dentro y fuera del mismo (Quintero-Moreno *et al.*, 2003).

Respecto a la valoración de la integridad acrosómica, junto con la valoración de la integridad de la membrana espermática, ha sido uno de los parámetros seminales más estudiados debido a que juega un papel clave en la fecundación (Cabrera *et al.*, 2012), gracias a que solo los

espermatozoides que presenten un acrosoma integro podrán realizar la reacción acrosomal de manera sincronizada con la fase de penetración del oocito y, como consecuencia, fusionarse con éste para formar un embrión (Januskauskas *et al.*, 2000).

2.2.3. Morfología espermática

La cabeza de los espermatozoides de mamíferos presenta importantes variaciones en la forma entre las diferentes especies. Por ejemplo, es ovoide y discoidal en conejo, toro y cerdo, falciforme en ratón, rata y hámster, y algo aplanado y elipsoide en el hombre. En cambio, es elíptica en el caballo (Samper, 2009). En cuanto al tamaño, también existen considerables diferencias, mientras que el espermatozoide humano presenta 5-6 μm de longitud y 2,5-3,5 μm de ancho (WHO, 1999), el del caballo tiene una longitud de 6,62 μm y una anchura de 3,26 μm (Hidalgo *et al.*, 2005). Aunque en general se podría aceptar que la mayoría de los mamíferos presentan una población espermática morfológicamente homogénea (Gago *et al.*, 1999).

El eyaculado de la mayoría de animales domésticos se caracteriza por presentar un bajo porcentaje de morfoanomalías, como por ejemplo el macho cabrío (5-15% de anomalías morfológicas) (Roca *et al.*, 1992). En cambio, el eyaculado del caballo no presenta un porcentaje de anomalías morfológicas tan bajo, llegando a superar el 20% de anomalías en reproductores fértiles (Love *et al.*, 2000).

Posiblemente, la morfología espermática sea uno de los parámetros más importantes, junto con la motilidad, a evaluar en el eyaculado de nuestras especies domésticas. Existen numerosos trabajos de investigación que ponen de manifiesto la importancia de este parámetro, correlacionándolo con la motilidad espermática (Varner, 2008) y con la fertilidad (Jasko *et al.*, 1990; Kumar and Rani, 1999). Concretamente, algunas morfoanomalías han sido asociadas con una fertilidad reducida, como las anormalidades de la pieza intermedia y las colas dobladas o enrolladas en espiral (Varner, 2008). Asimismo, cualquier defecto morfológico debido a un proceso de maduración espermático incompleto (por ejemplo defectos en la cola o pequeñas diferencias geométricas en la cabeza) puede originar a su vez un movimiento anormal que incapacite al espermatozoide para su progresión en el aparato genital femenino y la posterior fecundación (Dresdner and Katz, 1981).

La morfología espermática ha sido determinada mediante numerosas técnicas, aunque el método más sencillo corresponde a la fijación de una muestra espermática con soluciones de formaldehído o glutaraldehído y el posterior conteo de espermatozoides mediante microscopía de contraste de fase (Pinart *et al.*, 1999; WHO, 1999). Igualmente se han usado diferentes técnicas de tinción para hacer valoraciones bajo microscopía de campo claro. Entre los métodos de tinción más empleados se incluyen la eosina-nigrosina, el trypan azul y giemsa, el papanicolau y el Spermac®. Al igual que existen diferentes métodos de procesamiento de la muestra, existen diferentes sistemas de evaluación y clasificación de la morfología espermática (Pinart *et al.*, 1999). No obstante, comúnmente se utilizan dos tipos de clasificación o combinaciones de estas. Así, las anomalías pueden ser clasificadas en función de la estructura espermática que está alterada (Jasko *et al.*, 1990): 1) anomalías de la cabeza, 2) de la pieza intermedia y 3) de la cola. Así también, las anomalías pueden clasificarse en función de su origen (Varner, 2008): 1) anomalías primarias, 2) secundarias y 3) terciarias.

Generalmente, los defectos primarios se consideran más severos y se creen que tienen su origen durante la espermatogénesis dentro del epitelio seminífero testicular. Este tipo de alteraciones son fácilmente detectadas mediante la evaluación morfológica y aportan una información muy valiosa ya que estas anomalías se consideran que están entre moderada y altamente relacionadas con la fertilidad de los sementales (Samper, 2009)

Aunque la valoración de las anomalías morfológicas utilizando estos métodos han demostrado ser un importante indicador de la determinación del descenso en la fertilidad en diversas especies (Chandler *et al.*, 1988), incluyendo los équidos (Brito, 2007), su subjetividad condiciona la interpretación de los resultados. Además, estos métodos subjetivos de valoración espermática presentan una gran variabilidad intra e inter laboratorios, haciendo necesario la utilización de métodos de valoración morfológicos más objetivos como los sistemas CASA (Hidalgo *et al.*, 2005).

2.3. Análisis computarizado de semen (CASA)

Desde hace varias décadas numerosos investigadores (Glover, 1968; Amann y Hammerstedt, 1980; O'Connor *et al.*, 1981) han dedicado mucho trabajo y recursos para intentar eliminar la subjetividad inherente a la evaluación microscópica de la calidad del semen. Producto de

estas investigaciones, fue el desarrollo de los sistemas computarizados para el análisis de la motilidad espermática. Desde que se introdujeron en el mercado a principios de los años 80, originalmente para la evaluación de semen humano, los sistemas CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), se han ido perfeccionando y modernizando, a la vez que su precio se fue haciendo más asequible. En consecuencia, comenzaron a utilizarse cada vez con más frecuencia en veterinaria, especialmente en la especie bovina, tanto en el ámbito de la investigación como en el de la industria como en los centros de IA.

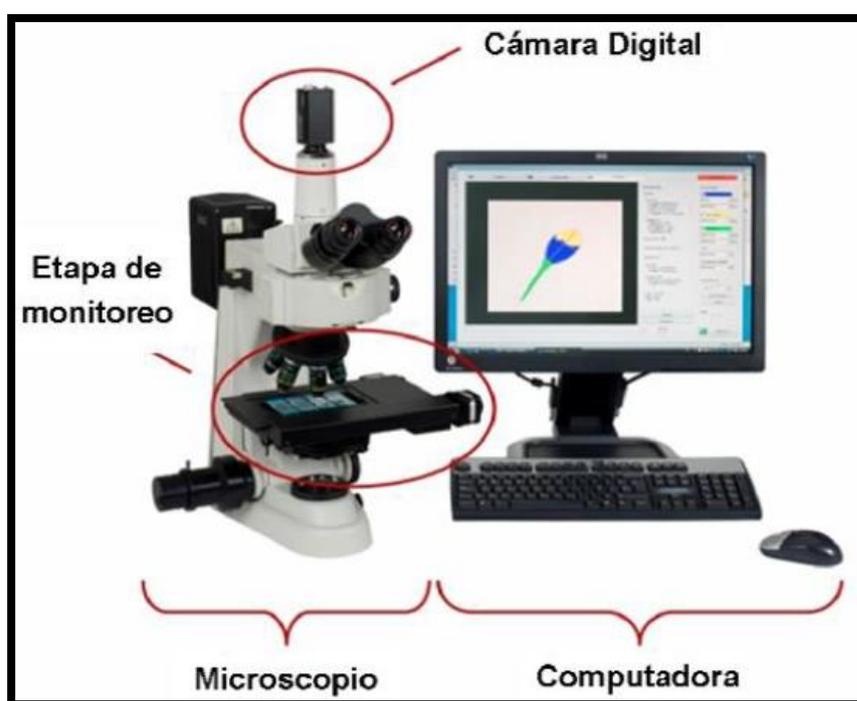


Figura 1. Representación esquemática del sistema computarizado de análisis seminal (<http://www.microopticsl.com/products/sperm-class-analyzer-casa-system>).

Un sistema CASA consta de varias unidades interdependientes: un microscopio de contraste de fases conectado a una cámara de vídeo, que envía la imagen desde el microscopio a un monitor (Ver figura 1). Posteriormente, la imagen es enviada desde el monitor a una computadora, donde un analizador digital de imagen captura varias fotografías seriadas de cada campo microscópico seleccionado, normalmente en menos de 1 segundo. El software diferencia a los espermatozoides de otras partículas que puedan aparecer en la imagen por su tamaño, y analiza la trayectoria recorrida por cada espermatozoide individual durante esa fracción de segundo (Verstegen *et al.*, 2002).

Aunque los principios básicos utilizados para el análisis de las imágenes digitalizadas son similares en los diferentes sistemas CASA que existen en el mercado, hay diferencias apreciables en sus sistemas ópticos, técnicas de captura de imagen y reconocimiento espermático, algoritmos utilizados para la reconstrucción de trayectorias y determinación de las medidas de movimiento, y también en el manejo y análisis de los datos, y consecuentemente, en los resultados finales (Davis y Siemers, 1995; Krause, 1995; Mortimer, 2000; Verstegen *et al.*, 2002).

El uso de sistemas CASA para la contrastación rutinaria de las dosis seminales ofrece notables ventajas pero también posee algunos inconvenientes. Uno de los principales es que no existe una estandarización y optimización de los equipos y de los procedimientos empleados en los análisis (Verstegen *et al.*, 2002). Los diferentes laboratorios trabajan con distintos equipos, y las características técnicas difieren de unos a otros, lo cual provoca que los resultados facilitados por los distintos centros para los mismos parámetros sean muy dispares. Existen una serie de consideraciones prácticas y biológicas que afectan a los resultados obtenidos con el CASA.

Según Verstegen *et al.* (2002) entre los principales factores de los que depende el resultado final están:

- ✓ La temperatura de análisis del semen.
- ✓ El volumen analizado.
- ✓ El tipo de cámara utilizada.
- ✓ El tiempo que transcurre entre la recogida y el análisis.
- ✓ La concentración espermática de la muestra.
- ✓ El diluyente utilizado.
- ✓ El objetivo del microscopio utilizado en el análisis, así como la iluminación, etc.

Esto significa que cada laboratorio debe estandarizar su propio equipo y establecer su propio protocolo de trabajo, teniendo en cuenta que dichos resultados serán únicamente aplicables a las muestras evaluadas con ese equipo en cuestión.

Los sistemas CASA permiten determinar la concentración espermática de la muestra a analizar. Sin embargo, Verstegen *et al.* (2002) comprobaron, utilizando muestras de semen

de distintas especies animales, que los CASA tienden a sobreestimar la concentración de espermatozoides de la muestra. Algunos autores atribuyen el error a que, debido a las colisiones espermáticas, el mismo espermatozoide puede ser contabilizado varias veces. Cuanto mayor es la tasa de dilución del semen, los problemas de sobreestimación de la concentración tienden a disminuir puesto que la posibilidad de colisión disminuye.

2.3.1. Parámetros de motilidad espermática

Los programas diseñados para motilidad espermática incluyen una serie de parámetros descriptores del movimiento espermático que son comunes a todos los sistemas CASA (Boyers *et al.*, 1989; Farell *et al.*, 1995). Algunos de los parámetros más utilizados por los diversos autores son los siguientes: Porcentajes de motilidad total o de motilidad progresiva: en función de su velocidad curvilínea (VCL) o de su velocidad media (VAP), los espermatozoides son clasificados en estáticos, móviles progresivos o móviles no progresivos; y dentro de los móviles, en rápidos, medios y lentos.

Parámetros que definen la velocidad de los espermatozoides y parámetros de angularidad y oscilación de la cabeza (Mortimer, 1997):

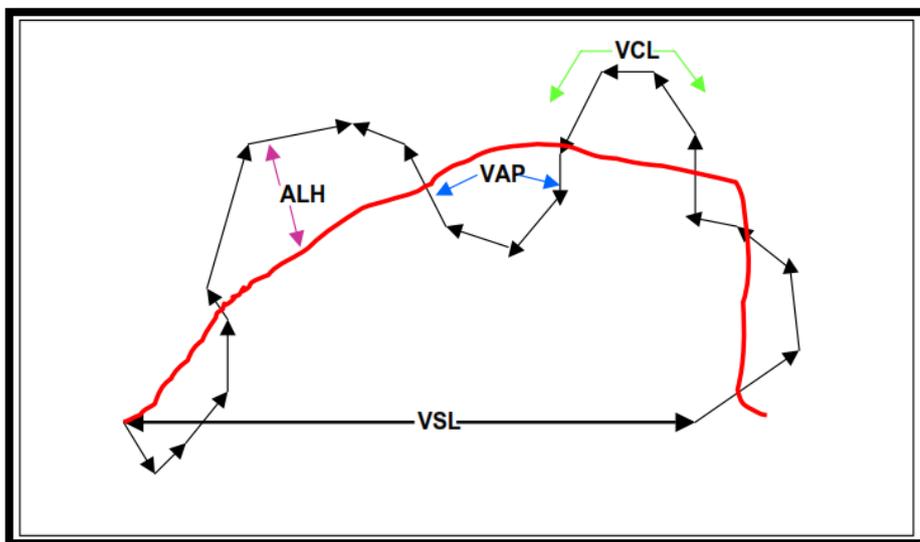


Figura 2. Parámetros de motilidad obtenidos por el CASA (Quintero-Moreno *et al.*, 2003).

El desarrollo de nuevas tecnologías como la citometría de flujo o los sistemas de análisis automatizados de semen CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) permite el estudio de

múltiples características funcionales y morfológicas de los espermatozoides para intentar predecir su capacidad fecundante (Quintero-Moreno *et al.*, 2011).

El CASA proporciona toda una serie de datos relativos a la velocidad y trayectoria de cada espermatozoide individual (ver figura 2), con lo que permite obtener información precisa, objetiva y repetible, sobre el porcentaje de células móviles presentes en la muestra y la calidad media de ese movimiento (Amann, 1989; Anzar *et al.*, 1991).

El CASA permite identificar la existencia de subpoblaciones de espermatozoides con distintos patrones de movimiento que coexisten en la misma muestra de semen (Holt, 1996; Abaigar *et al.*, 1999). En los últimos años se ha demostrado la existencia de subpoblaciones espermáticas con distintos patrones de movimiento en los eyaculados de todas las especies estudiadas hasta la fecha, como por ejemplo, el cerdo, el mono tití, la gacela, el caballo o el perro (Quintero-Moreno *et al.*, 2003; Nuñez-Martínez *et al.*, 2006). Además, se ha observado que espermatozoides pertenecientes a distintas subpoblaciones responden de forma diferente ante procesos como la criopreservación o la exposición al efecto de agentes capacitantes (Holt, 1996; Abaigar *et al.*, 1999). En semen bovino fresco o congelado, de momento, no se ha publicado ningún estudio relativo a la identificación de subpoblaciones espermáticas con distintos tipos de movimiento.

Los espermatozoides que forman parte de un eyaculado no son uniformes en cuanto a sus características de motilidad, es decir, en el mismo eyaculado existe porcentajes de espermatozoides que se mueven de forma rápida y progresiva, otro porcentaje de espermatozoides que se mueven más lentamente, y por último, aparece un número de espermatozoides sin movimiento. Por lo tanto, si no consideramos la existencia de estas subpoblaciones en un eyaculado, tal y como se hacía hasta hace pocos años, y partimos de la base de que el eyaculado es una población homogénea, se estará perdiendo información relevante. Si esta subpoblación representa un porcentaje muy pequeño, sus características se verán enmascaradas por el resto de la población. Esto explicaría, al menos en parte, que no se haya observado correlación significativa entre parámetros cinéticos medios (por ejemplo VCL, VSL, LIN o ALH) y la fertilidad *in vivo* de una dosis seminal (Holt y Van Look, 2004).

Najjar *et al.* (2013) reporta diferencias notorias en motilidad progresiva de 3 toros vs 1 de ellos (50, 56 y 60 vs 34%), estas diferencias también se manifestaron cuando evaluaron parámetros de movilidad por CASA, para VAP = 83, 86 y 109 vs 70 $\mu\text{m/s}$), VCL (132, 138 y 187 vs 116 $\mu\text{m/s}$) y VSL (70, 75 y 89 vs 59 $\mu\text{m/s}$). La precisión de los reportes de CASA fueron concluyentes, recomendar el no uso del material seminal del cuarto toro en un programa de inseminación comercial.

Los parámetros de movilidad espermática pueden ser afectados por el método de conservación. Sohail *et al.* (2012) en búfalos y Sundararaman *et al.* (2012) en bovinos demostraron que las características de movimiento espermático son diferentes estadísticamente ($p < 0.01$) en semen fresco y refrigerado versus congelado, en casi todas sus características de movimiento (ver Figura 3).

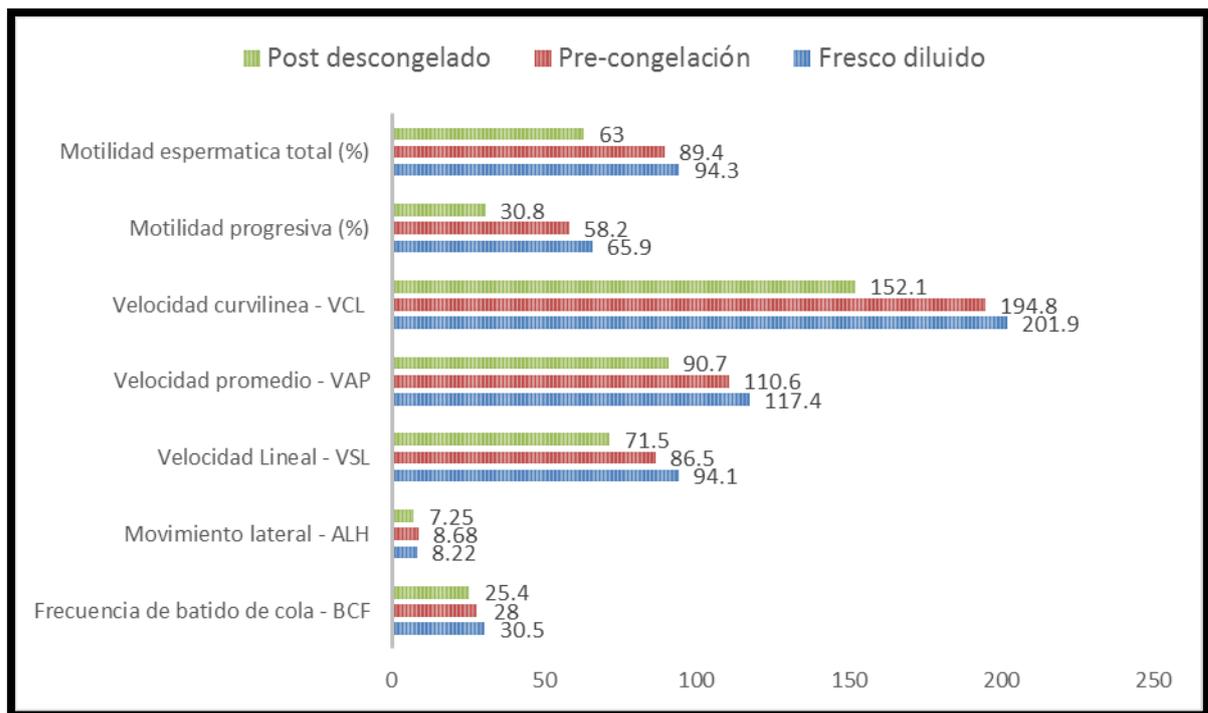


Figura 3. Características de movimiento espermático de semen fresco diluido, previo a la congelación y semen post descongelado después de su congelación en nitrógeno líquido. (Sundararaman *et al.*, 2012).

2.4. Producción de embriones *in vitro* en bovinos

Las técnicas de fecundación *in vitro* consisten, básicamente, en la exposición de ovocitos maduros a espermatozoides capacitados, de tal manera que se produzca la fecundación fuera del oviducto materno. El mayor éxito del procedimiento de fecundación *in vitro* (IVF) se demuestra al producir individuos vivos, utilizando tanto ovocitos madurados *in vivo* o *in vitro*, aunque la eficiencia de estos procesos de IVF disminuye respecto a la fecundación natural, de igual modo que cuando se utilizan ovocitos madurados *in vivo* frente a los madurados *in vitro* (Lorenzo *et al.*, 1994).

2.4.1. Potencialidad de aplicación

La aplicación de los procedimientos de producción *in vitro* (IVP) en la reproducción bovina se han incrementado en los últimos años y en un futuro pueden llegar a ser utilizados en programas de gran escala de producción comercial de embriones *in vitro*. Dentro de éste concepto, la recuperación de ovocitos es un paso necesario para poder llegar a establecer estos programas de IVP.

Embriones de valor comercial o de alto valor genético pueden ser obtenidos de animales recién sacrificados o de animales genéticamente valiosos. Para poder llegar a obtener los embriones *in vitro*, se hace necesario recuperar los ovocitos y finalizar 3 procesos biológicos: maduración y fecundación de los ovocitos y los cigotos resultantes cultivados hasta el estado de blastocisto en donde pueden ser congelados o transferidos a receptoras sincronizadas.

Los ovarios contienen un elevado número de folículos que se encuentran en diferentes estados de desarrollo (primordiales, en crecimiento, atrésicos) de los cuales, solamente una pequeña proporción va a ser utilizada durante la vida reproductiva del animal. La recolección de ovocitos permite recuperar y aprovechar folículos no ovulatorios, que bajo condiciones fisiológicas se tornarían en folículos atrésicos, con el fin de aprovechar el máximo potencial genético de una donadora por procedimientos *in vitro* (Gordon and Lu, 1990).

La producción de embriones se puede realizar mediante superovulación y fertilización *in vivo* (MOET), y con los sistemas *in vitro* que incluyen la fertilización *in vitro* (FIV) y la transferencia nuclear o clonación (Munar *et al.*, 2012)

a) *Mejoramiento genético*. La tasa anual de ganancia genética se determina por el efecto de los siguientes factores (Lohuis, 1995):

- La intensidad de selección, el cual depende de la proporción de la población que es seleccionado como padres de la siguiente generación. Una pequeña proporción de los mejores animales, no dará una alta intensidad de selección.
- La exactitud de selección, el cual depende de los métodos usados para identificar los animales superiores y mide el grado de coincidencia entre nuestra estimación del índice de valor genético de una animal y la actual habilidad genética de la característica en cuestión.
- La heredabilidad de la característica, la cual es la proporción de la variabilidad total de la producción observada entre individuos que es debido a efecto de genes aditivos, por lo tanto puede ser transmisible de una generación a otra. Una alta variabilidad, facilita el progreso genético. La heredabilidad es prácticamente una medida de la variabilidad genética.
- El intervalo entre generaciones, el cual se define como la media de edad de los padres cuando la cría nace. A mayor edad de los padres el progreso genético es menor.

La influencia de estos factores en ganancia genética por año se combina en la siguiente ecuación (Lohuis, 1995):

$$\text{Ganancia Genética/año} = \frac{\text{Intensidad de selec.} \times \text{exactitud selecc.} \times \text{variabilidad genética (h}^2\text{)}}{\text{Intervalo entre generaciones}}$$

El tipo de tecnología reproductiva que nosotros escojamos para multiplicar los individuos seleccionados en la población, podría afectar los factores que influyen la ganancia genética y determinar la tasa a la cual nosotros queremos incrementar la frecuencia de los genes deseables en la población (Lohuis, 1995).

El uso de inseminación artificial (IA) con semen de toros con prueba de progenie resulta en una ganancia genética promedio en producción de leche de 1,0 – 1,5% sobre el promedio por año. En una simulación computarizada, predice una tasa de ganancia genética de 8-9,5%

más alta que un programa de prueba de progenie, cuando la múltiple ovulación y transferencia de embriones (MOET) se incluye en un programa de prueba de progenie. El incremento de ganancia genética por año es aún más alta (22% más alta que la ganancia genética con actual prueba de progenie) cuando se produce embriones *in vitro* de donadoras jóvenes (terneras de 1 a 5 meses de edad) (Lohuis, 1995).

b) *Eficiencia reproductiva*. La producción de embriones por MOET implica:

- La necesidad de tratamiento hormonal de las donadoras, para estimular simultáneamente el desarrollo y maduración de varios folículos y la inducción de múltiple ovulación.
- La necesidad de realizar múltiples inseminaciones (≥ 2) de la donadora durante el celo inducido para asegurar la fecundación de todos los ovocitos ovulados.
- La necesidad de sincronizar el estro entre la donadora y la receptora.
- La colección (lavado) de embriones del útero de la vaca donadora, se realiza alrededor de 7 días post inseminación.

En promedio, con MOET se puede producir 5 a 6 embriones por lavado y 5 a 7 lavados por año (si la donadora solo se usa para producir embriones) y con una tasa de preñez promedio de 58- 60%. Esto da un promedio de 20 a 24 crías producidas por donadora/año (Lohuis, 1995).

Según Anchordoquy, *et al* (2013), afirma que la producción de embriones por el sistema FIV, es una alternativa para la multiplicación de donantes problema. De todas las donantes tratadas se obtuvieron embriones, siendo el promedio $10,6 \pm 10,7$ embriones por donante en un periodo de tiempo de $2,8 \pm 1,9$ meses de trabajo, cantidad comparable con la producción de embriones con el sistema MOET en vacas normales.

Las ventajas de la tecnología *in vitro* sobre el sistema MOET incluye:

- No necesita tratamiento hormonal de donadoras sexualmente maduras. Los ovocitos son recuperados directamente de los ovarios donde los folículos son desarrollados constantemente de primordiales a estados maduros, el cual se describe como ondas foliculares (Driancourt *et al.*, 1991).
- La frecuencia de recuperación de ovocitos ó OPU puede ser aproximadamente 2 veces por semana sin tratamiento hormonal, si se realiza tratamiento superestimulante la frecuencia de colección se reduce a una vez por semana. Los tratamientos hormonales son requeridos trabajamos con donadoras jóvenes pre and peri puberales (Presicce *et al.*, 1993).
- Los ovocitos pueden ser recuperados de ovarios de matadero, esto da la posibilidad de rescatar material genético de alto valor de animales que tienen que ser beneficiados. Esto abre la posibilidad de producir embriones de razas de carne o de cruces especiales determinados por el mercado, utilizando ovarios de matadero en gran escala y a costos relativamente bajos (Penny *et al.*, 1995).
- Animales de alto valor y que son infértiles (que no sean razones genéticas), pueden ser rescatadas para la producción de embriones. Varios problemas de fertilidad son relacionados con fallas en la ovulación, daño en el útero y oviducto, vejez, etc. Estos problemas pueden ser superados usando la tecnología de producción de embriones in vitro (Hasler *et al.*, 1995).
- OPU es posible realizar en animales gestante, después del primer trimestre de gestación, lo cual incrementa la recuperación de ovocitos.
- El semen puede ser usado más eficientemente. En MOET normalmente se usa dos o más dosis de semen (cada una contiene 2 a 10 millones de espermatozoides) con un requerimiento por fecundación en promedio de seis ovocitos (0.3-1.5 millones de esperma por ovocito). Para fecundación *in vitro* (IVF) se usa una tasa de 6 a 10,000 espermatozoides por ovocito (Gordon, 1994).

La eficiencia de la producción de embriones *in vitro* en términos de crías obtenidas varía grandemente de acuerdo a varios factores: edad, tipo de donadora, método de recuperación de ovocitos, frecuencia de OPU, condición corporal y estatus nutricional de la donadora, estado fisiológico de la donadora, raza, habilidad de la fecundación de los espermatozoides del toro, el método de producción *in vitro* aplicado, etc.

De esta manera IVP puede producir más crías por donadora/año. Asumiendo la capacidad promedio de 0,8 crías/ semana y un total de 42 crías / año, versus 20 a 24 crías obtenidas por MOET. Yang (2003) afirma que vía OPU, potencialmente una donadora valiosa (vaca) podría producir 15 a 20 ovocitos por semana (2 veces por semana de 7 a 10 ovocitos por colección) o cerca de 700 a 1000 ovocitos por donadora/año. Asumiendo un 30% de tasa de blastocistos y 40% de tasa de preñez, una vaca puede potencialmente dar 200 a 300 blastocistos u 80 a 120 preñeces por año.

Muchos trabajos de investigación muestran resultados de producción de embriones *in vitro* y tasa de preñez con el uso de semen convencional y sexado (ver tabla 1).

Tabla 1: Tasa de blastocistos y tasa de preñez, producidos en la producción de embriones *in vitro* con el uso de semen preseleccionado “x” y convencional en Holstein

Referencia	Obtención de ovocitos	Tipo de semen	Ovocitos (n)	Tasa de división. %	Blastocistos, % (día, 7)	Preñez en vacas %	Hembra nacidas %
Hasler, 2000	Matadero	Convenc. Cong	4606	67.4	26.0	54%	--
Raymussen, 2011	OPU	Convenc. Cong	1785	68.0	23.0	22%	50
Sebrian-Serrano et al., 2013	OPU	Convenc. Cong	110	69.0	21.8		
Morotti et al., 2014	OPU	Convenc. Cong	9438	--	29.0	41%	48
Blondin et al., 2009	OPU	Convenc. Cong	1773	68.2	22.2		
Raymussen, 2011	OPU	Sex "X" Cong	3485	67.0	23.0	10%	89
Sebrian-Serrano et al., 2013	OPU	Sex "X" Cong	103	52.4	15.5		
Wilson et al., 2005	Matadero	Sex "X" Cong	3524	--	10.6	24%	93
Blondin et al., 2009	OPU	Sex "X" Cong	487	81.2	12.9		
Morotti et al., 2014	OPU	Sex "X" Cong	880	--	41.0	46%	96

2.4.3 Etapas de la fecundación *in vitro*

a) Maduración *in vitro*

La maduración del ovocito *in vitro* que incluye la maduración nuclear y citoplasmática fue reportada en 1965 en diferentes especies (Del Campo, 1993). La meiosis permanece detenida en los ovocitos que se encuentran en los folículos hasta que estos son expuestos a gonadotrofinas que permiten su continuación. La meiosis *in vivo* es detenida por sustancias foliculares que aún no están bien definidas. Sin embargo, los ovocitos que son removidos desde los folículos, comienzan la meiosis espontáneamente. En el proceso de maduración *in vivo* de los ovocitos, intervienen la hormona folículo estimulante (FSH) en el crecimiento folicular, la hormona luteinizante (LH), que induce la maduración final y la ovulación del ovocito seleccionado (Del Campo, 1993). Para conseguir la maduración *in vitro* de los ovocitos, estos se obtienen mediante la aspiración de los folículos antrales ováricos, ya sea *in vivo* o después de obtener los ovarios tras la muerte de un animal. Después de aspirar el contenido folicular, los ovocitos recuperados se seleccionan en base a criterios de integridad de citoplasma y del cumulo celular que les rodea para pasar a cultivo de maduración (Hafez, 2000).

El tiempo del cultivo requerido para la maduración *in vitro* de los ovocitos hasta alcanzar el estadio de metafase II en bovinos, es variable y según los diferentes autores este tiempo puede oscilar entre 20 y 28 horas (Xu *et al.*, 1986; Fukui, 1990). No obstante, existen claras evidencias de que los ovocitos madurados *in vivo* tienen una competencia para el desarrollo notablemente superior a los madurados *in vitro* (Dieleman *et al.*, 2002). Sin embargo, cuando el sistema empleado tiene pequeñas imperfecciones sus efectos no se manifiestan hasta la segmentación o la formación de blastocistos y en muchos casos no se observan hasta después de la implantación. Se ha comprobado recientemente que el cultivo de los gametos y de los embriones en condiciones inapropiadas induce cambios epigenéticos en el genoma embrionario (Niemann y Wrenzycki, 2000) y en la expresión génica (Rinaudo y Schultz 2004).

b) Fecundación *in vitro*

Finalizado el periodo de maduración *in vitro*, los ovocitos madurados se encuentran aptos para ser fecundados *in vitro*. Tanto para condición *in vivo* como *in vitro*, previo a la fecundación de los ovocitos, los espermatozoides debe estar capacitado y activado. La

capacitación y activación del espermatozoide, posibilitará a este progresar a través de las células del cúmulus y penetrar la zona pelúcida (Yanagimachi, 1981). En mayor medida, el semen de toro utilizado para la fecundación *in vitro* procede de semen congelado. La preparación del semen congelado, incluye el lavado de las células espermáticas de los componentes del diluyente y crioprotectores, la separación de los espermatozoides motiles de los no motiles y la capacitación espermática (Avery y Greve, 1995). Al menos cinco metodologías han sido descritas para la separación de los componentes del diluyente seminal de las células espermáticas y su selección. Estas son: lavado por centrifugación, swim-up, gradiente de percoll, filtración en columna con lana de vidrio y migración-sedimentación (Risopatrón *et al.*, 1996). La centrifugación excesiva del semen congelado provoca alteraciones en la membrana plasmática (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1997).

La capacitación espermática involucra cambios bioquímicos en las membranas del espermatozoide, lo que permite la reacción acrosómica. Para la capacitación de espermatozoides, se emplean componentes como la heparina (Whitfield y Parkinson, 1995). Una vez que los espermatozoides han sido lavados, seleccionados y capacitados, se realiza el co-cultivo de estos con los ovocitos madurados *in vitro*.

La relación ovocito/espermatozoides es importante durante la fecundación *in vitro*. De este modo, ha podido establecerse que si el número de células espermáticas es demasiado baja en relación con el número de ovocitos, obtendremos pobres resultados de fecundación. Si por el contrario, el número de células espermáticas es demasiado alto se producen fenómenos de polispermia (Saeki *et al.*, 1995). Independientemente del medio de fecundación utilizado, la mayor parte de los protocolos de fecundación *in vitro*, utilizan entre 0.5 y 1.5 x 10⁶ células espermáticas/ml y el co-cultivo con los ovocitos madurados *in vitro*, se lleva a cabo en microgotas de 50 µl, que contienen entre 5 y 40 ovocitos (Xu *et al.*, 1987; Saeki *et al.*, 1995).

En general, se considera fecundado a aquel ovocito que ha emitido el segundo corpúsculo polar y se visualizan los pronúcleos masculino y femenino y la cola espermática (Del Campo, 1993). Sin embargo, no siempre es posible la visualización de todas las estructuras y se propone la formación de las primeras blastómeras como criterio (Fukui, 1990).

c) **Cultivo *in vitro***

En la actualidad existen tres sistemas para el cultivo de los cigotos bovinos y su posterior desarrollo *in vitro* hasta el estadio de Blastocisto. El sistema de co-cultivo, el cultivo en medios definidos y el cultivo en medios condicionados (Hernandez-Ledezma *et al.*, 1996). El sistema de co-cultivo incrementa el porcentaje de cigotos que llegan al estadio de blastocisto, en comparación a la utilización de medios de cultivo solamente. Este sistema, utiliza diferentes tipos celulares para co-cultivar con los cigotos. Estos tipos celulares aportan a los cigotos bovinos, los elementos necesarios para el desarrollo *in vitro* y la superación del estado de bloqueo 8-16 células (Abe y Hoshi, 1997).

El dióxido de carbono es un insumo muy necesario para la eficiente producción de embriones *in vitro*, el rol que juega en este procedimiento es fundamental para diversos ciclos bioquímicos, siendo el más importante las reacciones del ciclo de Krebs. También cumple la función taponadora en el medio determinado por el CO₂ disuelto, el pH y la cantidad de iones HCO₃⁻. De modo que para establecer un pH determinado se debe tener en cuenta especialmente los niveles de bicarbonato sódico y la tensión de CO₂. Cada medio tiene una concentración recomendada de bicarbonato y tensión de CO₂ para alcanzar el pH correcto. Sin embargo, se emplean otras sustancias buffers en la formulación de muchos medios en la actualidad, lo que permite una estabilidad superior del pH en el medio (Good, 1996).

El buffer usual para el cultivo de embriones es el sistema HCO₃/CO₂ (25 mM) para una atmósfera de 5% CO₂ y 5% O₂ en N₂. El sistema HCO₃⁻/CO₂ cumple también una función importante en el metabolismo de un carbono y en la formación de substratos intermediarios del ciclo de Krebs. El pH óptimo varía entre 7,3 y 7,4. El sistema HCO₃/CO₂ cumple también una función importante en el metabolismo de un carbono y en la formación como intermediario del ciclo de Krebs. El CO₂ tiene además un efecto beneficioso porque acidifica el ambiente celular (Bavister, 1995).

La importancia del pH intracelular fue claramente presentada (Busa y Nuccitelli, 1984; Bavister, 2000) el mantenimiento del pH, es de importancia para el desarrollo embrionario, porque su alteración distorsiona los mecanismos regulatorios del gradiente de H⁺, la distribución de las mitocondrias y su función. El metabolismo oxidativo se distorsiona y con él el desarrollo embrionario, particularmente a partir del estadio de mórula, cuando la

función oxidativa es de mayor importancia (Barnett y Bavister, 1996). El cultivo de embriones en estadio temprano de desarrollo de cigoto a blastocisto es muy sensitivo a la tensión de CO₂ y O₂ y el medio en el cual se cultiva. La adición de suero fetal bovino estimula el desarrollo temprano a blastocisto y su calidad (basado en el número de células ó blastomeras).

2.5. Predicción de la fertilidad potencial del toro

Estudios de evaluación seminal con la fertilidad en toros son muy variables (Zhang *et al.*, 1997; Januskauskas *et al.*, 1999). Sin embargo, se ha argumentado que los datos obtenidos *in vitro* podría conducir a cálculos del valor predictivo de la fertilidad, en comparación con las tasas de fecundidad obtenidas a través de la IA, se puede considerar predictivo (Amann y Gill, 2000; Rodríguez-Martínez, 2002).

2.5.1. Pruebas de laboratorio

La importancia de conocer la potencialidad fecundante del semen de los machos seleccionados para inseminación artificial (IA), radica en el uso a gran escala de esta biotecnología reproductiva, para producir individuos de las siguientes generaciones. Una prueba de fertilidad *in vivo* por medio de IA es muy laborioso y costoso (Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000). Por lo que, predecir esta fertilidad mediante pruebas de laboratorio, es importante biológica y económicamente.

Las técnicas de laboratorio más confiable para predecir la fertilidad potencial del semen es utilizando una combinación de pruebas, valorando diferentes atributos del espermatozoide. La integridad de la membrana espermática y su correcto funcionamiento es esencial para el metabolismo, capacitación, unión al ovocito y reacción acrosómica del espermatozoide, por lo tanto analizar esta característica puede ser útil para predecir la habilidad fecundante del semen (Brito *et al.*, 2003). La integridad de la membrana plasmática refleja la viabilidad espermática y la criopreservación daña esta membrana (Correa *et al.*, 1996), los daños incluyen hinchazón y alteración de la membrana plasmática y acrosoma, cambios en la flexibilidad de la membrana (Correa y Zavos, 1994) alteración en la entrada de calcio (Collin *et al.*, 2000) y cambios en la actividad enzimática (Jeyendran *et al.*, 1984; Hammerstedt *et al.*, 1990).

La evaluación subjetiva de motilidad espermática de semen congelado, es un parámetro simple comúnmente usado para determinar la calidad de semen y tiene una correlación muy variable con la fertilidad (Tartaglione y Ritta, 2004). Las tinción vital tales como eosina/nigrosina (EN) y trypan-blue (TB) han sido utilizados por décadas para evaluar integridad de membrana (Mayer *et al.*, 1951; Swanson y Bearden, 1951; Brito *et al.*, 2003). La prueba de endósmosis (hypoosmotic swelling test, HOST) ha sido exitosamente relacionado con la fertilidad *in vivo* (Gadea *et al.*, 1998; Perez-Llano *et al.*, 2001) e *in vitro* (Gadea y Matas, 2000). Su uso se ha extendido para evaluar la funcionalidad espermática durante almacenamiento *in vitro* (Zou y Yang, 2000) y después de procedimientos de capacitación (Lechniak *et al.*, 2002). De esta forma, el HOST es un método simple, fácil de ejecutar, de bajo costo y buena repetibilidad (Gadea, 2005). En resumen, la tinción vital es utilizada para evaluar si la membrana plasmática esta físicamente dañada, el HOST es utilizado para evaluar la actividad bioquímica de la membrana (Jeyendran *et al.*, 1984).

Otro factor que tiene que considerarse en la evaluación *in vitro* es la variación entre eyaculados. Hay diferencias tanto *in vivo* como *in vitro* entre eyaculados colectados dentro de un lapso de tiempo del mismo toro, por lo tanto, una muestra de eyaculaciones distintas tiene que ser probado y analizados por toro (Zhang *et al.*, 1997).

Resultados de fertilidad obtenidos de una muestra de semen son, estrictamente aplicables solo a la muestra analizada. En vista de la variación inherente entre los eyaculados y la tendencia de la fertilidad del macho a variar con el tiempo, parece poco probable que la fertilidad del macho se podría predecir con precisión utilizando esporádicamente en pruebas *in vitro*. Los diferentes ensayos basados en las técnicas de FIV parecen representar métodos capaces de probar la capacidad de fecundación de los espermatozoides. Usado solos o en combinación con otras pruebas, que permitan la evaluación de los donantes potenciales de semen (Larsson y Rodriguez-Martinez, 2000). La fecundación *in vitro* (IVF) puede ser un método factible para predecir confiablemente la fertilidad del semen congelado (O'Meara *et al.*, 2005).

2.5.2. Pruebas de campo

En todo el mundo, los productores de ganado están interesados en la identificación de los toros más fértiles, ya sea para su uso en IA o servicio natural, lamentablemente no se ha logrado con mucha eficiencia (Dalton, 2011)

La evaluación de la fertilidad del toro se ha centrado en la cantidad y calidad del semen depositado a la hembra. Salisbury y Vandemark (1961) sugirió por primera vez la relación entre la cantidad y calidad del semen, donde propusieron que el incremento del número de espermatozoides viables en el momento de la IA, encontraremos un aumento de la fertilidad. Posteriormente este propósito ha sido alcanzado, Sin embargo la población de hembras se convierten en un factor limitante y los aumentos en el número de espermatozoides no dan lugar al incremento de la fertilidad. Sullivan y Elliot (1968) informaron el número mínimo de espermatozoides móviles requerido para la máxima fertilidad diferían entre los toros. Mientras que den Daas *et al.* (1998) reportaron que se incrementaron el número de espermatozoides por dosis y se determinó que los toros difieren en su tasa de retención máxima.

Pace *et al.* (1981) reportaron que los aumentos de la fertilidad se obtendrán con un incremento del número de espermatozoides estructuralmente intactos y móviles. Sullivan y Elliot (1968) también determinaron que los toros de baja fertilidad requieren mayor cantidad de semen al momento de inseminar con el fin de alcanzar la máxima fertilidad.

La fertilidad se debe registrar con gran precisión y exactitud con el fin de establecer relaciones confiables a los resultados de las pruebas *in vitro*. El sistema comúnmente más utilizado para determinar la fertilidad son las denominadas tasa de no retorno al servicio, debido a su practicidad, en comparación con el diagnóstico de gestación por palpación transrectal y las evaluaciones de ultrasonido o la evaluación de los partos. La tasa de concepción de las vacas en lactación es aproximadamente del 30%, frente al 60% que presentan las vaquillas, cuando se inseminan después de la detección del estro (Rycroft., 1992).

Actualmente existen muchos reportes que indica que el toro afecta la fertilidad en ganado lechero y sus valores fenotípicos (inseminaciones) y genéticos (PTA) lo demuestran. En abril

de 2014, el Laboratorio del Programa de Mejoramiento de USDA (Animal Improvement Programs Laboratory-AIPL) reportó la evaluación de servicios de 1,531 toros Holstein de centrales de inseminación, los cuales tenían SCR (tasa de concepción de toros) promedio de +0.42, sin embargo, el límite máximo fue +14.2 correspondiendo al toro 099HO06145 en 4,442 inseminaciones y mínimo (-10.4) corresponde al toro 054HO0588 en 1,188 inseminaciones. En cuanto a valores de habilidad genética transmisible de fertilidad correspondiente a tasa de preñez de hijas (PTA-DPR) para abril de 2014, el promedio fue +1.03 para 1,276 toros Holstein evaluados, siendo el límite máximo de +4.1 (506HO0024) y el mínimo -1.9 (29HO1406) (AIPL, 2014). Estos datos soportan que el factor toro uno de los más importantes a tener en cuenta al momento de elegir el toro para mantener una adecuada fertilidad en el hato.

Tabla 2: Tasa de concepción de toro (SCR) para toros Holstein, agosto de 2014 (Animal Improvement Programs Laboratory-AIPL, agosto de 2014)

Mejores, 10 toros más fértiles

Ranking	Code	Nombre	Registro	SCR	Exact	Inseminadas
1	099HO06145	BARRY	<u>HOUSA000137205947</u>	14.2	94	4442
2	099HO07660	AXFORD	<u>HOUSA000141465409</u>	10.0	58	358
3	099HO07070	JEHOSAPHAT	<u>HOUSA000066424338</u>	8.8	85	1444
4	566HO01192	APPLE JACK RED	<u>HOUSA000139330256</u>	6.6	69	571
5	001HO10660	UNIQUE	<u>HOUSA000069716820</u>	5.7	96	6301
6	001HO11001	JAGGER-P *B/R	<u>HOUSA000071726542</u>	5.1	78	948
7	007HO12115	DECEIVER	<u>HO840003009533335</u>	5.1	82	1192
8	007HO12165	MONTROSS	<u>HOUSA000071703339</u>	5.1	83	1300
9	200HO02731	SHOWDOWN *RC	<u>HO840003004385540</u>	4.8	96	5809
10	001HO10246	GILDRI	<u>HOUSA000066757464</u>	4.6	87	1708

Los 10 toros menos fértiles

Ranking	Code	Nombre	Registro	SCR	Exact.	Inseminadas
1	054HO00588	GILBY	<u>HOUSA000069833043</u>	-10.4	82	1188
2	200HO06547	GOLDDUST	<u>HOUSA000071181673</u>	-9.2	83	1246
3	200HO06572	CHAPLIN	<u>HOCAN000107684735</u>	-8.8	82	1153
4	200HO02930	ROCKYMAN	<u>HOCAN000011565284</u>	-7.3	81	1095
5	200HO03935	THORLEY	<u>HOUSA000071703259</u>	-7.2	80	1035
6	091HO04641	FUSION	<u>HOUSA000069313715</u>	-6.5	65	490
7	200HO03934	TEACHER	<u>HOUSA000071703257</u>	-6.4	82	1225
8	200HO03818	APOLLO	<u>HOCAN000011183706</u>	-6.3	74	738
9	007HO12103	CLARENCE	<u>HOUSA000071259528</u>	-5.7	83	1232
10	007HO11480	CLASSIC-RED	<u>HOUSA000068991094</u>	-5.6	84	1322

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar

La presente investigación fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva “Carlos Rodríguez Villegas” del Departamento de Producción Animal, Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina, ubicado en el distrito de la Molina, Lima, Perú

3.2. Producción de embriones *in vitro* en bovinos

El procedimiento de producción de embriones *in vitro* fue comprobado con equipamiento y protocolos puestos entre los meses de mayo a agosto de 2013, en base a una visita de entrenamiento con personal técnico de la compañía Vitrogen®, Brasil. Los medios comerciales son previamente testeados en su laboratorio central Cravinhos, Sao Paulo, Brasil, y enviados a los distintos laboratorios de fecundación *in vitro* que trabajan en integración horizontal en Brasil, Colombia, Bolivia, Perú, España, USA, Sudáfrica y otros.

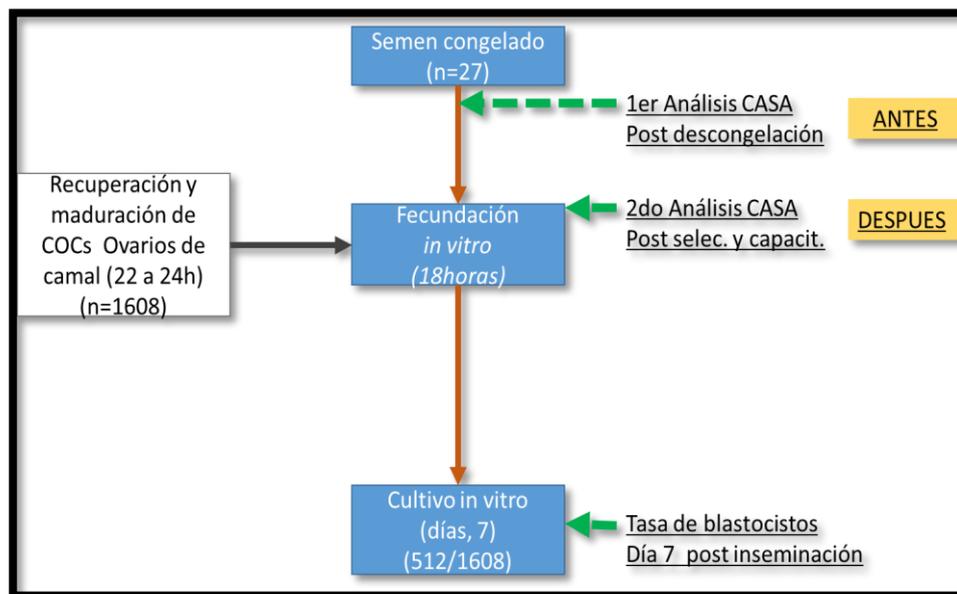


Figura 4. Protocolo estandarizado de análisis con el CASA y producción de embriones In Vitro (Fuente: Elaboración Propia).

3.2.1. Recuperación de complejo cúmulus ovocito (COCs)

Los ovarios colectados de hembras beneficiadas, fueron transportados en termos que contenían solución fisiológica a temperatura de 35°C hacia el laboratorio.

El tiempo transcurrido entre el beneficio de los animales y la llegada al laboratorio fue siempre inferior a 3 horas. Una vez en el laboratorio los ovarios fueron lavados 2 a 3 veces con solución fisiológica de 0,9% de NaCl a 35 °C y conservados en la misma solución. Los COCs fueron aspirados de los folículos de tamaño entre 3 a 8 mm con aguja 18G de 1 ½ pulgadas (Ver figura 5).



Figura 5. Ovario de matadero sujetado en mano izquierda y con la mano derecha se guía la jeringa y aguja para la aspiración de los folículos visibles

El contenido folicular fue colectado en un tubo cónico de 50 ml (Falcon ®), conteniendo medio a base de Dullbecco's PBS suplementado con 1% de suero fetal bovino y 80ug/ml de gentamicina, el cual se dejó decantar por 5 minutos para favorecer la sedimentación del material sólido (células del complejo cúmulus ovocitos). manteniendo en agua de baño maría a 37 °C. Luego con pipeta Pasteur se aspiró el fondo del tubo colocando el material en placas Petri de 90 x 15mm, previamente cuadrículada la base para facilitar la búsqueda y diluida con medio PBS suplementado con 1% de suero fetal bovino y 80ug/ml de gentamicina.

Los COCs fueron visualizados bajo un microscopio estereoscópico entre 20 a 40X, inmediatamente transferidos a una placa de 35x 10 mm (Falcon ®) (ver figura 7) conteniendo medio H-199® (Vitrogen, Brasil), para ser clasificados bajo un aumento de 40X. Los COCs fueron evaluados por su morfología y clasificados dentro de 4 categorías (De Loos *et al.*, 1989 y Sato *et al.*, 1990): (1) completamente rodeados por ≥ 3 capas células del cúmulus con citoplasma homogéneo, (2) ovocitos parcialmente por células del cúmulus y citoplasma irregular, (3) ovocitos desnudos y (4) ovocitos rodeado por fibrina, con aspecto de tela de araña. Los COCs se clasificaron como viables (calidad A y B) y no viables (calidad C y D) (Ver figura 6), para los procesos de maduración y fecundación *in vitro*.

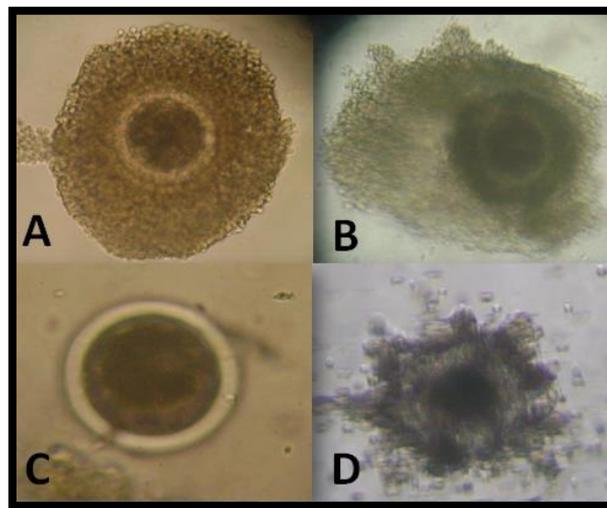


Figura 6. Clasificación de los complejos cúmulus ovocitos (COCs)



Figura 7. Búsqueda y lavados de COCs previo la colocación en medio de maduración (MIV)

3.2.2. Maduración *in vitro*

Después de la recuperación y clasificación, los COCs de calidad A y B (viables) fueron lavados tres veces en medio transporte H-199® y tres veces en medio de maduración MIV® (Vitrogen, Brasil). Se colocaron 8 a 10 COCs por microgota de medio MIV®, que previamente fue equilibrada como mínimo por 2 horas en condiciones de 5% CO₂ en aire, 38,5 °C y humedad sobre 90%.

La maduración de los ovocitos se realizó en microgotas de 70 µl de medio de maduración MIV® cubierta con aceite mineral estabilizada (Sigma M3516) en placas de cultivo de 35x10 mm (Falcon®) y finalmente se llevó a la incubadora a 5% CO₂ en aire, 38,5 °C y humedad sobre 90% por 22 a 24 horas.

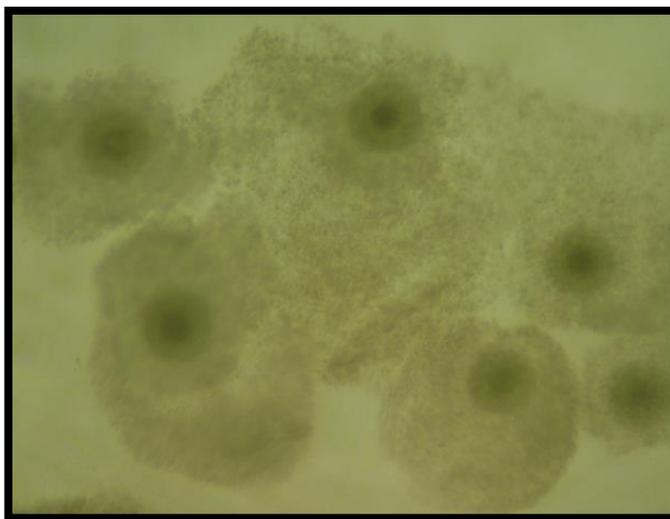


Figura 8. COCs con células del cúmulus expandido, indicador de la maduración del ovocito (22 a 24 horas)

3.2.3. Fecundación *in vitro*

Después de las 22 a 24 horas de maduración (Ver figura 8), los ovocitos fueron retirados del medio de maduración y lavados tres veces en medio de fecundación FIV® (Vitrogen, Brasil) y seguidamente fueron colocados en grupos de 8 a 10 en microgotas de 70 µl de medio de fecundación FIV® en placas petri (Falcon®) de 35x10 mm, cubiertos con aceite mineral, previamente incubados a 38.5°C y 5% CO₂ por 2 horas, posteriormente se adicionó 4 a 5 µl de suspensión de espermatozoide seleccionados y capacitados en medio FIV®.

Para la preparación de la capacitación de los espermatozoides se realizó utilizando una pajilla de 0,5 ml de semen congelado de toros provenientes del Banco Nacional de Semen de la Universidad Nacional Agraria La Molina, se descongeló en agua en baño María a 37 °C por 30 segundos. Para seleccionar y capacitar los espermatozoides se utilizó el método de Percoll 90/45, en un microtubo de 1,5ml se colocó 500 µl de percoll 45 (Vitrogen, Brasil) en el gradiente superior (rosado), 500 µl de percoll 90 (Vitrogen, Brasil) en el gradiente inferior (transparente) y en la parte superior 200 µl de semen (Ver figura 9), se llevó a la primera centrifugación a 3000 RPM por 15 minutos. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante, al pellet se le adicionó 500 µl de medio de fecundación FIV® (Vitrogen, Brasil) y nuevamente se llevó a centrifugar a 3000 RPM por 5 minutos. Seguidamente el pellet (porción rica en espermatozoides) se procedió a analizar la cantidad y calidad de los espermatozoides con el sistema computarizado de análisis de semen (CASA), para estandarizar a una concentración final de 20×10^6 espermatozoides motiles por ml, siendo la dosis espermática por ovocito de 8 a 10,000, sembrada en 4 a 5 µl a las microgotas de fecundación que poseen 8 a 10 ovocitos maduros, donde se llevó a la incubadora a 5% CO₂ en aire 38,5 °C y humedad sobre 90% por 18 horas.

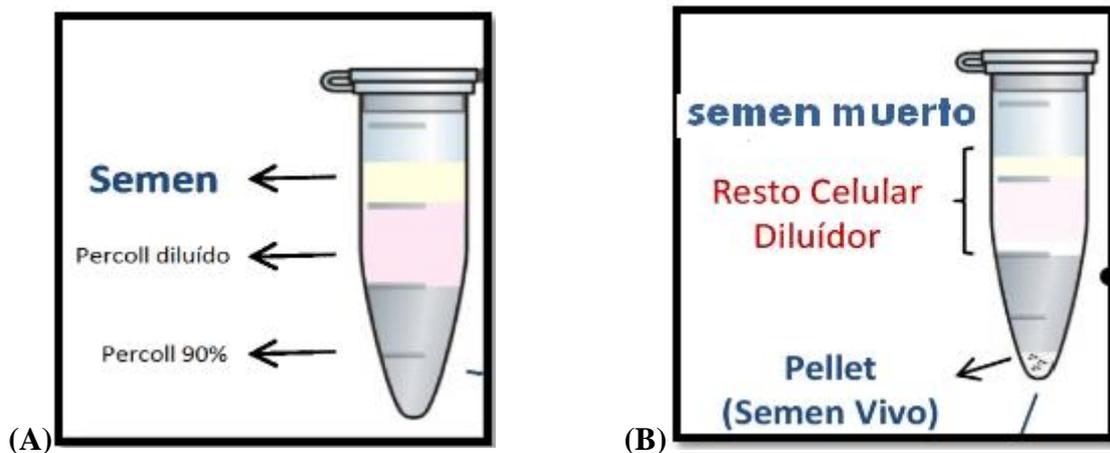


Figura 9. A) Preparación de la fase de Percoll 45/90, para la selección y capacitación espermática, B) Ubicación de espermatozoides en el fondo del microtubo conico post centrifugación en fase de percoll.

3.2.4. Cultivo *in vitro*

Aproximadamente 18 horas post inseminación, se desnudaron los ovocitos casi completamente por pipeteo en las mismas gotas de medio de fecundación y se lavaron tres veces en medio de cultivo CIV® (Vitrogen, Brasil) antes de transferirlos a microgotas de medio de cultivo CIV de 70 µl (8 a 10 ovocitos), cubiertas de aceite mineral. Las placas de cultivo 35x10mm (Falcon®) fueron incubadas a 38,5°C, 5% CO₂, y 90% de humedad (Ver figura 10). A las 48 horas del cultivo se realizó la primera renovación del 50% de medio de cultivo CIV® y la evaluación de división embrionaria, así mismo se retiró el restante de las células del cúmulus. El día 4 del cultivo se realizó la segunda renovación del 50% de medio de cultivo CIV®. Posteriormente para el día 6 de cultivo (día 7, de fecundación) se obtuvieron los embriones en el estado de blastocisto y/o blastocisto expandido (Ver figura 11).

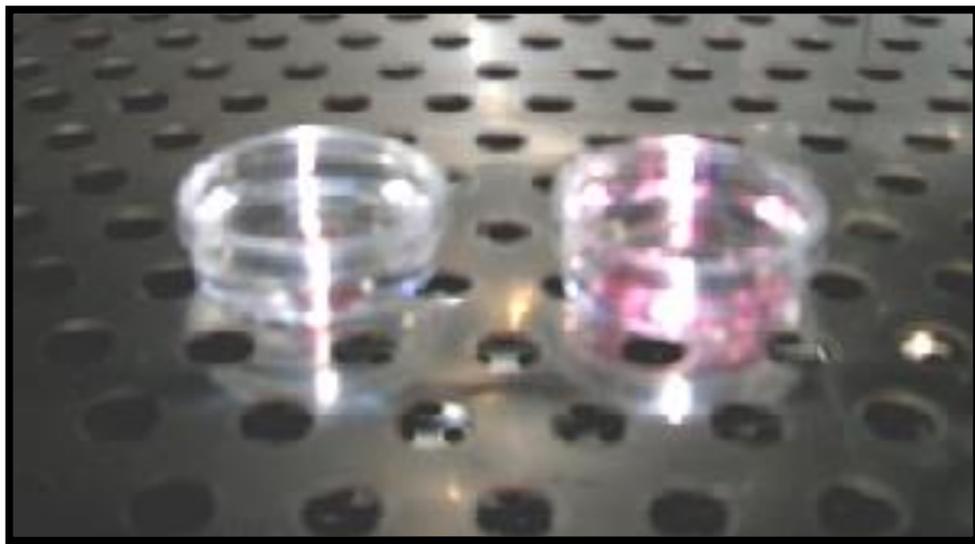


Figura 10. Placas de 35x15mm, gotas de maduración con MIV (izquierda) y gotas de cultivo con CIV (derecha), cultivando COCs y embriones, respectivamente

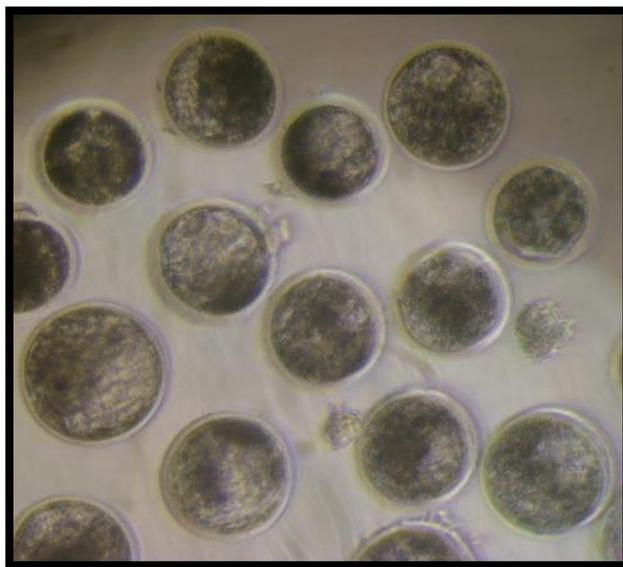


Figura 11. Grupo de blastocistos de bovino (día 7 post fecundación *in vitro*) clasificados en calidad I y II

3.3. Análisis computarizado de semen (CASA)

La motilidad se valoró de forma objetiva empleando el equipo de análisis de imagen Integrated Semen Analysis System Sperm (ISAS®, Proiser, Valencia, España). Este equipo consta de un microscopio trinocular (UB203i, Proiser, España) equipado con un objetivo de 10x y contraste de fase negativo y conectado a una videocámara (ISAS 782M, Proiser, España) que transmite las imágenes microscópicas hasta una tarjeta capturadora de video ubicada en el interior de un PC, para posteriormente ser procesadas por el software del módulo de movimiento del ISAS. Antes de cada valoración se ajustaron los parámetros de iluminación y contraste con el fin de optimizar las capturas de las células espermáticas (ver figura 12,13), según metodología (Ortega-fergusola *et al.*, 2009).

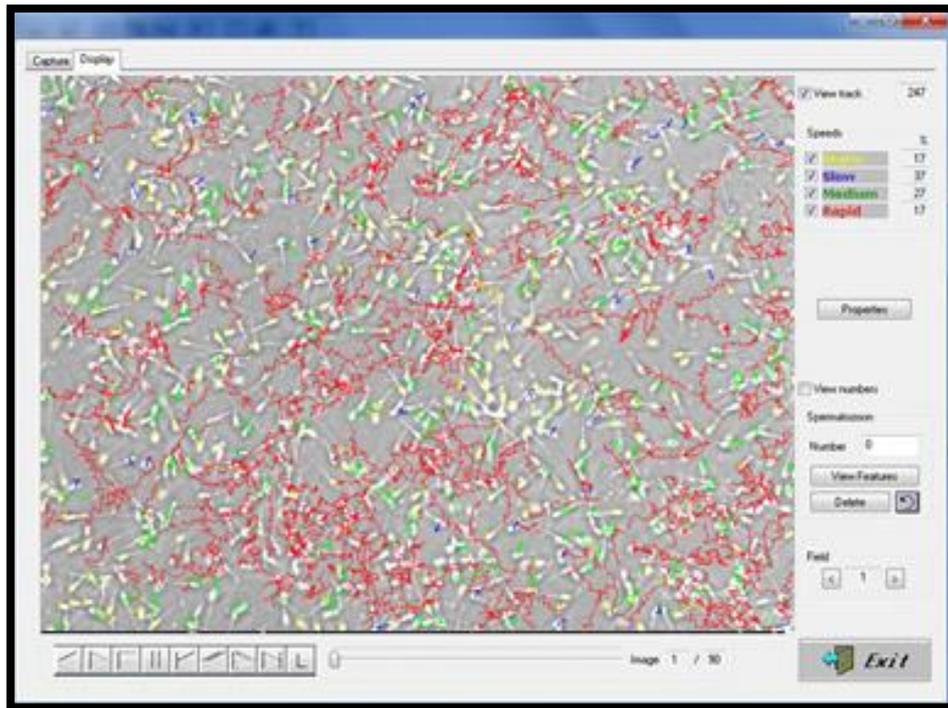


Figura 12: Imagen de captura de las células espermáticas (ANTES) con Integrated Semen Analysis System Sperm (ISAS®, Proiser, Valencia, España).

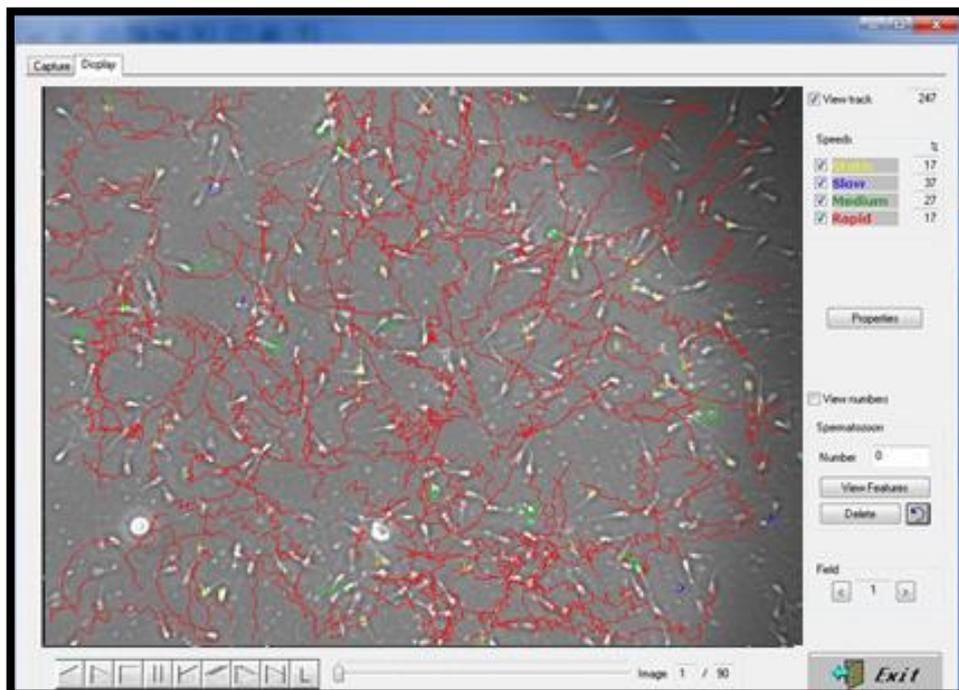


Figura 13: Imagen de captura de las células espermáticas (DESPUES) con Integrated Semen Analysis System Sperm (ISAS®, Proiser, Valencia, España).

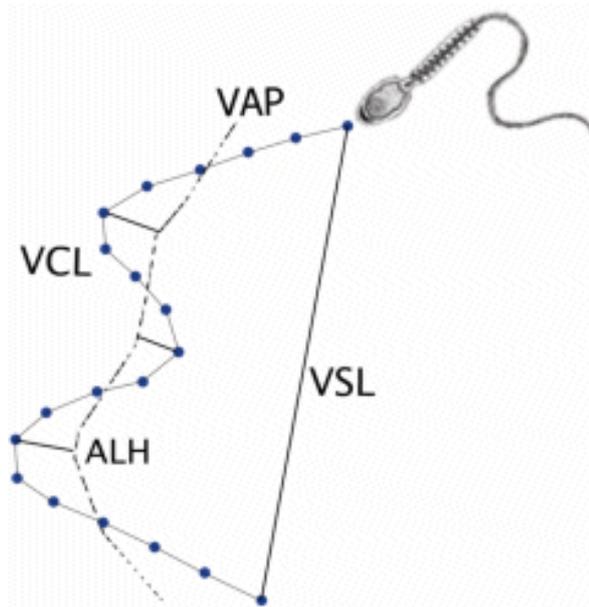


Figura 14: Representación gráfica de los parámetros cinéticos obtenidos mediante el sistema casa. VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad rectilínea; VAP: Velocidad de la trayectoria media; ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza.

En cada análisis, se colocó 5 μl de muestra de semen post descongelado y post capacitado en una cámara Spermtrack® (Proiser, España) atemperado a 37°C. A continuación, al menos cuatro campos microscópicos fueron capturados aleatoriamente en una misma muestra con el fin de obtener un mínimo de 200 espermatozoides analizados por muestra. Una vez realizadas las capturas, las trayectorias espermáticas (ver figura 14). Los parámetros cinéticos calculados por ISAS®, CASA han sido descritos por varios autores (Álvarez-Lledó, 2003; Mortimer, 1997):

- Velocidad curvilínea del espermatozoide (**VCL**, $\mu\text{m/s}$): 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.
- Velocidad rectilínea del espermatozoide (**VSL**, $\mu\text{m/s}$): 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.

- Velocidad de la trayectoria media del espermatozoide (**VAP**, $\mu\text{m/s}$): 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.
- Índice de Linealidad del espermatozoide (**LIN**, %): 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) $\rightarrow (VSL / VCL) \times 100$.
- Índice de rectitud del espermatozoide (**STR**, %): 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) $\rightarrow (VSL / VAP) \times 100$.
- Índice de Oscilación del espermatozoide (**WOB**, %): 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) $\rightarrow (VAP / VCL) \times 100$.
- Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (**ALH**, $\mu\text{m/s}$): 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.
- Frecuencia de batido de la cabeza del espermatozoide (**BCF**, Hz): Frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa la línea media en función del tiempo.

3.3.1. Análisis post descongelación de semen (antes)

El semen congelado en pajillas de 0,5 ml conservado en nitrógeno líquido (- 196 C) fue descongelado en baño maría a 37 °C por 30 segundos. Inmediatamente después del proceso

de descongelación se procedió a colocar 5 µl de muestra de semen en una cámara Spermtrack® (Proiser, España) atemperado a 37°C. Analizándose los parámetros de motilidad por el sistema computarizado de análisis de semen ISAS®, como velocidad curvilínea (VCL), Velocidad media (VAP), velocidad rectilínea (VSL), índice de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR), índice de oscilación (WOB), desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y Frecuencia de batida (BCF).

3.3.2. Análisis post selección y capacitación *in vitro* (después)

El semen seleccionado y capacitado utilizando el método de Percoll 90/45 centrifugando la muestra dos veces a 3000 RPM por 15 y 5 minutos y diluido con medio de fecundación FIV®, previo a la inseminación a las microgotas de medio de fecundación conteniendo ovocitos maduros, se procedió a colocar 5 µl de muestra de semen en una cámara Spermtrack® (Proiser, España) atemperado a 37°C. Analizándose los parámetros de motilidad por el sistema computarizado de análisis de semen ISAS®, como velocidad curvilínea (VCL), Velocidad media (VAP), velocidad rectilínea (VSL), índice de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR), índice de oscilación (WOB), desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y Frecuencia de batida (BCF).

3.4. Análisis estadístico

- a) Para caracterizar los parámetros de motilidad como VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF, de espermatozoides de bovinos post descongelado (ANTES) y pos seleccionado y capacitados (DESPUES), para el procedimiento de fecundación *in vitro* se utilizó una estadística descriptiva y un Diseño de Bloques completamente al azar (Calzada, 1982), donde el modelo aditivo lineal es el siguiente:

$$y_{ij} = \mu + t_i + b_j + (t * b)_{ij}$$

y_{ij} = Parámetros de motilidad obtenidos del *i*-ésimo tratamiento y la *j*-ésima muestra

μ = Media general

t_i = Efecto del *i* – ésimo tratamiento (antes y después)

b_j = Efecto de la *j*-ésima muestra (pajillas)

$(t * b)_{ij}$ = Error experimental

Para la comparación de medias se utilizó la prueba de Duncan ($P \leq 0.05$)

- b) Para caracterizar los indicadores en la producción de embriones por toro se utilizó un diseño completamente al azar (Calzada., 1982), y para la comparación de medias se utilizó una prueba de Duncan.

$$y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

y_{ij} = Variables obtenidas del i -ésimo tratamiento y la j -ésima muestra

μ = Media general

t_i = Efecto del i -ésimo tratamiento (Toros)

e_j = Error experimental

- c) Para evaluar el efecto de la motilidad espermática (parámetros VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF.) con la producción de embriones *in vitro*, se utilizó una correlación de Pearson. Siendo la fórmula es la siguiente:

$$\rho_{X,Y} = \frac{\sigma_{XY}}{\sigma_X \sigma_Y} = \frac{E[(X - \mu_X)(Y - \mu_Y)]}{\sigma_X \sigma_Y},$$

Dónde:

σ_{XY} : Es la covarianza de (Parámetros de motilidad, Producción de blastocistos)

σ_X : Es la desviación típica de la variable X (Parámetros de motilidad)

σ_Y : Es la desviación típica de la variable Y (Producción de blastocistos)

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Parámetros de Motilidad espermática

Nuestros resultados indican que los parámetros de velocidad espermática como VCL, VSL y VAP y los parámetros de angularidad y oscilación de la cabeza como LIN, STR y WOB fueron superiores estadísticamente ($P \leq 0.05$) en espermatozoides post seleccionados y capacitados (después) versus los post descongelados (antes) como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3: Comparación de parámetros de movilidad espermática antes y después de la capacitación espermática.

PARAMETROS DE MOTILIDAD	Unid.	Nº	(post descongelación) ANTES	(post selección) DESPUES
Velocidad curvilínea (VCL)	$\mu\text{m/s}$	27	$80,97 \pm 13,69^b$	$94,63 \pm 19,18^a$
Velocidad rectilínea (VSL)	$\mu\text{m/s}$	27	$27,98 \pm 6,13^b$	$40,57 \pm 11,21^a$
Velocidad media (VAP)	$\mu\text{m/s}$	27	$44,82 \pm 7,22^b$	$58,11 \pm 11,96^a$
Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH)	μm	27	3.84 ± 0.52^a	4.03 ± 0.65^a
Frecuencia de batido de la cabeza (BCF)	Hz	27	8.2 ± 1.26^a	8.01 ± 1.47^a
Índice de linealidad (LIN)	%	27	34.74 ± 6.13^a	42.61 ± 7.90^b
Índice de rectitud (STR)	%	27	62.17 ± 7.15^a	68.88 ± 8.42^b
Índice de oscilación (WOB)	%	27	55.54 ± 4.09^a	61.45 ± 4.79^b

^{a,b} Letras diferentes dentro de una misma fila muestran diferencias significativas ($P < 0.05$).

El movimiento espermática fue definida por CASA (ISAS®, Proiser, España) se demostró que las muestras seleccionadas y capacitadas tenían mayores valores que las muestras descongeladas en los parámetros de velocidad VCL (94,63 versus 80,97 $\mu\text{m/s}$), VSL (40,57 versus 27,98 $\mu\text{m/s}$), VAP (58,11 versus 44,82 $\mu\text{m/s}$), LIN (42.61 versus 34.74 %), STR

(68.88 versus 62.17%), WOB (61.45 versus 55.54%) y todos estos parámetros diferentes estadísticamente ($p < 0.05$), lo cual puede ser indicación que los espermatozoides son los más hábiles para realizar el viaje y producir la penetración espermática.

Samardzija *et al.* (2003) reportan que las muestras de semen congelado bovino seleccionadas y capacitadas con percoll (90/45) y Bovipure ® (Nidacon, Suecia) incrementaron la proporción de motilidad progresiva en 14 y 16%, la reacción osmótica (HOS) en 16 y 13% y la proporción de vivos (SYBR-14/PI) en 26 y 28%, respectivamente. Demostrando que estos sistemas de selección mecánica permiten reducir la población de espermatozoides con problemas de movimiento espermático. Asimismo, Benon y Linet (2008) indican que este aumento significativo en algunos parámetros de movimiento ALH, VCL y VSL es debido a la hiperactivación espermática, como producto de agentes capacitantes en el medio de selección y capacitación.

Esta diferencia de incremento en los parámetros cinéticos, también ha sido observado por Oliveira *et al.* (2009) donde VCL incremento de 78.3 a 118.3 $\mu\text{m/s}$; VSL incremento de 30,3 a 59.5 $\mu\text{m/s}$, al ser seleccionado y capacitado con gradiente de percoll. Similar comportamiento tienen los espermatozoides de semen sexado, aunque la población de selectos es muy reducida (Hollinshead *et al.*, 2004).

En los últimos 20 años, las técnicas CASA han permitido pasar de lo subjetivo a lo objetivo, medir los parámetros cinéticos con un margen de exactitud muy alto y asimismo, encontraron que diversas especies tienen diferentes patrones de movimientos de movimiento medio y máximos reportados. Holt *et al.* (2007) reporta para toros la velocidad curvilínea (VSL) media es 81.4 $\mu\text{m/s}$ y VSL máxima de 179.6 $\mu\text{m/s}$, para Verracos velocidad curvilínea (VSL) media es 50.7 $\mu\text{m/s}$ y VSL máxima de 122.5 $\mu\text{m/s}$, para carneros velocidad curvilínea (VSL) media es 93.9 $\mu\text{m/s}$ y VSL máxima de 192.6 $\mu\text{m/s}$, para Gacelas velocidad curvilínea (VSL) media es 33.8 $\mu\text{m/s}$ y VSL máxima de 93.0 $\mu\text{m/s}$ y para Muca-opossum velocidad curvilínea (VSL) media es 150.9 $\mu\text{m/s}$ y VSL máxima de 167.0 $\mu\text{m/s}$.

Estas diferencias entre especies a los parámetros cinéticos, son en parte del proceso que permite una especie se reproduzca y sea fértil, sin embargo, a nivel de subespecie o raza estas diferencias no son muy marcadas, tal como muestra Mellisho *et al.* (2014) en un estudio realizado en toros fértiles *Bos taurus* y *Bos primigenius*.

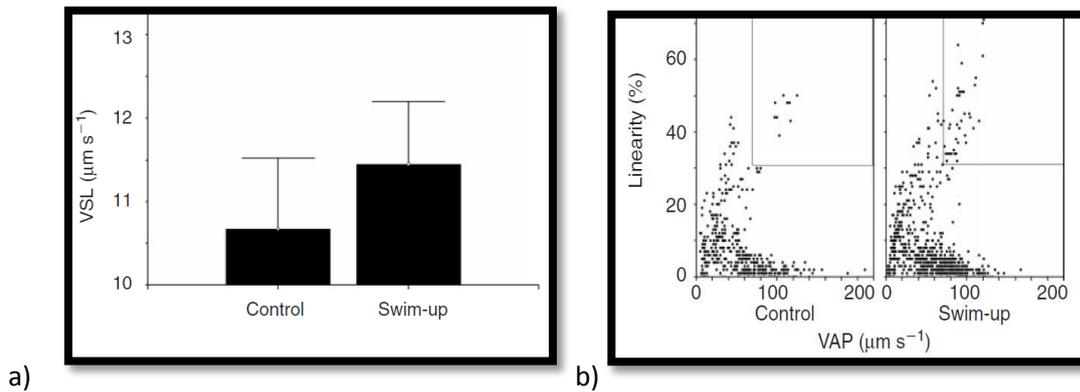


Figura 15: a) Velocidad lineal -VSL-del grupo control y tratado con swim up y b) Distribución de los espermatozoides por velocidad promedio –VAP (Holt *et al.*, 2007)

Holt *et al.* (2007) reportaron diferencias no marcadas en velocidad lineal (VSL) de espermatozoides de verraco seleccionadas y capacitadas por método Swim up versus control (figura 15a); sin embargo, observo que en la población de espermatozoides seleccionados y capacitados por swim up había un grupo representativo con diferente comportamiento y mayor velocidad promedio (VAP) (figura 15b).

4.2 Indicadores en la producción de embriones *in vitro* por toro evaluado

El mejor indicador de eficiencia en producción de embriones *in vitro* es la cantidad y calidad de blastocistos producidos al día 7 post fecundación. Esto es muy importante, debido a que existen evidencias que sugieren que el periodo de maduración, fecundación y cultivo de embriones puede afectar su potencial de desarrollo embrionario temprano y junto a la calidad del ovocito es la llave determinante para obtener los blastocistos de calidad y cantidad (Lonergan *et al.*, 2006).

La producción de embriones *in vitro* en bovinos tiene 3 pasos esenciales. En el primer paso de maduración *in vitro* aproximadamente el 90% de los ovocitos inmaduros y recuperado de los folículos (profase I) llegan a tener maduración nuclear (metafase II), de allí cerca del 80% son fecundados luego de la inseminación y desarrollan a dos células. Sin embargo, solo el 30 a 40% de los ovocitos iniciales tienen la capacidad para llegar al estado de blastocistos. Siendo la etapa más crítica en el periodo de desarrollo de 2 células a blastocisto, como el determinante en la producción *in vitro* de embriones (Rizos *et al.*, 2002). Similares resultados reporto, Fernández *et al.* (1999) reporto una tasa de fecundación de 74% con uso de semen de toros *Bos indicus* y *Bos taurus*.

Existe evidencia que los patrones de transcripción de ARNm (materno y fetal) estén alterados en especial cuando se manipula ovocitos y embriones *in vitro*, por lo que el bloqueo al desarrollo embrionario es el que más afecta en el éxito de la producción de blastocistos *in vitro* en bovinos (Lonergan *et al.*, 2006)

En la tabla 4, se muestran datos de producción de blastocistos de 4 toros en fecundación *in vitro* y no se encontraron diferencias significativas entre los toros evaluados ($P \leq 0.05$). La utilización de semen congelado de diferentes toros se demostró que este posee un papel importante en el resultado final del proceso de FIV, Siendo la fertilidad de los toros variable tanto en campo como en la producción de embriones *in vitro* (Watanabe *et al.*, 1995). En 1992 Marquant- Le Guinne *et al.*, también observaron una alta correlación entre la producción de blastocistos y la fertilidad de campo de diferentes toros.

Tabla 4: Número y porcentaje de blastocistos en relación con los ovocitos fecundados por toro.

TORO	Repet.	Velocidad media (VAP) $\mu\text{m/s}$	Nº COCS	Nº BLASTOCISTOS (día, 7)	%BLASTOCISTOS (día, 7 post fecundación)
PREDILECTO	10	45.6	570	197	34.62 \pm 8.34 a
MISTIANO	9	45.8	559	167	29.91 \pm 8.55 a
FELIPE	4	46.8	254	90	35.32 \pm 11.1 a
TALMO	4	38.6	225	58	25.71 \pm 1.36 a

^{a,b}Letras diferentes dentro de una misma columna muestran diferencias significativas ($P < 0.05$).

Los resultados de producción de blastocistos son similares (día 7 post fecundación) a los reportados por Madrid (2003), sin embargos los resultados de Presicce *et al.*, (2011) de 39.8% y Dayan (2001) 36.2% de blastocistos fue mayor numéricamente a los resultados reportados en nuestro trabajo.

Cabrera *et al.* (2009) indica que no hay diferencia de la tasa de blastocistos para los 4 toros evaluados siendo los índices de producción de blastocistos de 20 a 32%. Sin embargo, hay trabajos que muestran una tasa inferior de blastocistos de 18 a 20% (Urrego *et al.*, 2008).

Según Madrid (2003), Los toros con alta tasa de no retorno mostraron mayor división de embriones, sin embargo no hubieron diferencias estadísticas ($P \leq 0.001$) entre los toros en la producción de blastocistos y en el desarrollo de los embriones a los 7, 8 y 9 días post inseminación.

4.3. Correlación entre los parámetros de movimiento espermática

Según datos publicados de Samardzija *et al.* (2003) los espermatozoides bovinos congelados, luego del proceso de selección y capacitación con percoll (90/45) y Bovipure® (Nidacon, Suecia) incrementaron notoriamente la proporción de motilidad progresiva, integridad de membrana y proporción de vivos y había una relación positiva con la producción de 28 y 21% de blastocistos en bovinos.

Es importante conocer el grado de correlación que existe entre los parámetros de movimiento de los espermatozoides antes y después del proceso de selección y capacitación y si esta era lineal. Según la tabla 5, se observa que todos tienen baja correlación, pero positiva, siendo la velocidad curvilínea (VCL) la que tiene mayor correlación positiva y la frecuencia de batido de la cabeza (BCF) no tiene relación alguna 0.03.

Tabla 5: Correlación de los parámetros de motilidad antes versus después de la selección y capacitación espermática.

Parámetros de movimiento	n	Antes versus después Correlación de Pearson
Velocidad curvilínea (VCL)	27	0.35 (0.07)
Velocidad rectilínea (VSL)	27	0.29 (0.14)
Velocidad media (VAP)	27	0.28 (0.15)
Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH)	27	0.25 (0.21)
Frecuencia de batido de la cabeza (BCF)	27	0.03 (0.88)
Índice de linealidad (LIN)	27	0.23 (0.25)
Índice de rectitud (STR)	27	0.17 (0.39)
Índice de oscilación (WOB)	27	0.27 (0.17)

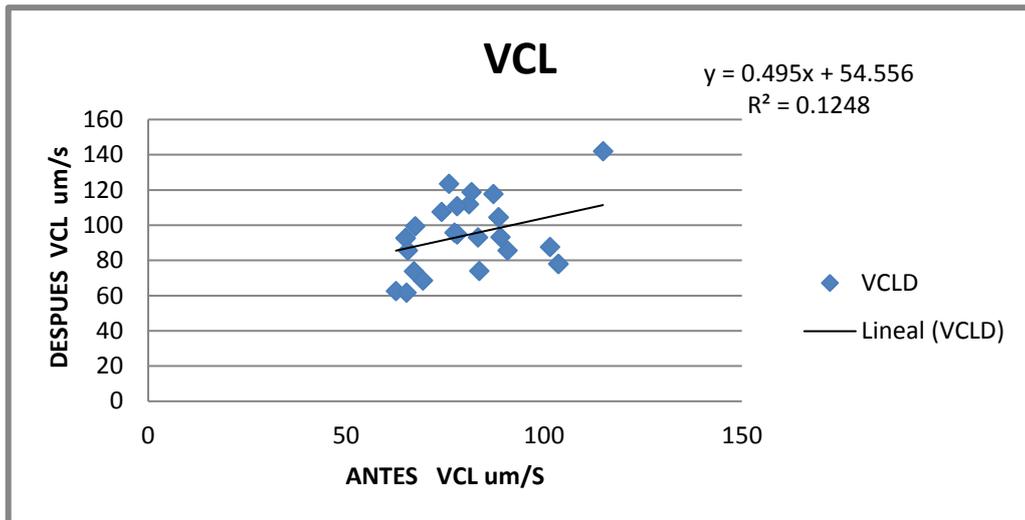


Figura 16: Correlación de parámetros de movimiento antes y después de la selección y capacitación espermática de la velocidad curvilínea (VCL).

La correlación entre dos variables X e Y es perfecta positiva con un r^2 de 12 % lo cual explica débilmente la relación entre estas variables, cuando exactamente en la medida que aumenta una de ellas aumenta la otra. Esto sucede cuando la relación entre ambas variables es funcionalmente exacta (Calzada, 1982). Como se observa en la figura 16 hay una correlación positiva no perfecta ya que los datos se encuentran dispersos unos a otros.

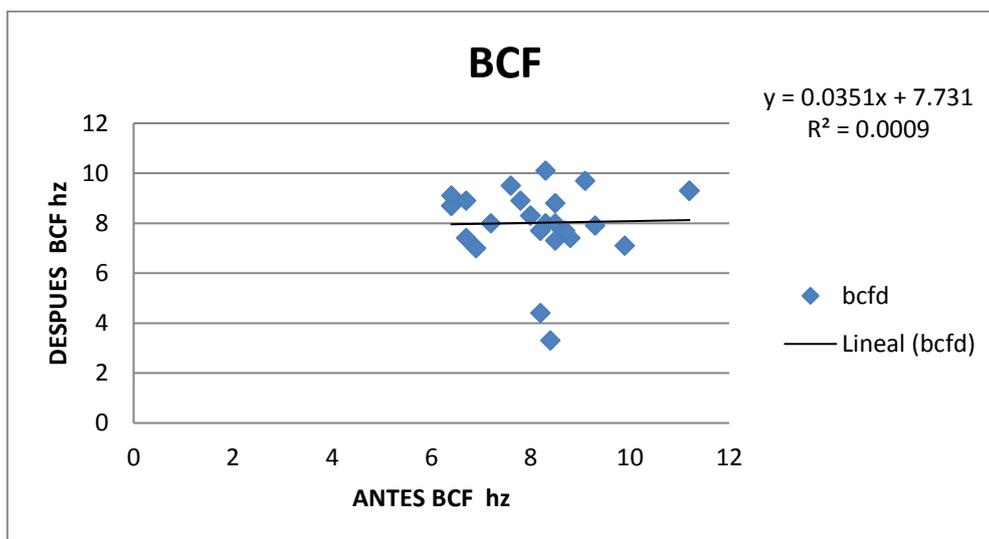


Figura 17: Correlación de parámetros de movimiento antes y después de la selección y capacitación espermática de la frecuencia de batida de la cola (BCF).

La correlación entre dos variables X e Y es baja con un r^2 de 0.09 % lo cual nos indica que no hay relación entre estas dos variables (Calzada, 1982). Como se observa en la figura 17 hay una correlación lineal no perfecta ya que los datos se encuentran muy dispersos unos a otros.

4.4. Correlación de parámetros de movimiento espermático versus tasa de tasa de blastocistos *in vitro*

Como se observa en la tabla 6, se encuentra una mayor correlación positiva para los parámetros evaluados inmediatamente a la descongelación (antes) con la tasa de producción de blastocistos en comparación con los parámetros evaluados después. Siendo la VCL, STR y VAP medidos a la descongelación de semen, medianamente correlacionable (0.47, 0.49 y 0.35, respectivamente) y una exactitud (0.01, 0.01 y 0.07 respectivamente), con la producción de blastocistos *in vitro* en bovinos. Los valores de correlación de los parámetros cinéticos medidos después de la selección y capacitación versus la tasa de blastocistos son bajos. En el caso de los parámetros de movimientos evaluados “Después” la correlación es variable siendo mayor en la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), con una correlación de 0.22 y una exactitud de 0.27; contrariamente la variable índice de rectitud (STR) muestra una correlación negativa de -0.02 y una exactitud de 0.92.

Tabla 6: Correlación de parámetros de movimiento espermático con la producción de blastocistos.

Parámetros de movimiento	ANTES	DESPUES
	Post descongelación Correlación de Pearson	Post selecc y capacit. Correlación de Pearson
Velocidad curvilínea (VCL)	0.47 (0.01)	0.06 (0.76)
Velocidad rectilínea (VSL)	0.07 (0.71)	0.13 (0.51)
Velocidad media (VAP)	0.35 (0.07)	0.11 (0.58)
Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH)	-0.36 (0.06)	0.22 (0.27)
Frecuencia de batido de la cabeza (BCF)	-0.34 (0.08)	0.21 (0.28)
Índice de linealidad (LIN)	-0.34 (0.08)	0.16 (0.41)
Índice de rectitud (STR)	0.49 (0.01)	-0.02 (0.92)
Índice de oscilación (WOB)	0.22 (0.26)	0.19 (0.33)

Como se ha descrito anteriormente, pocos parámetros individuales de viabilidad espermática muestran una relación significativa con la fertilidad de semen descongelado, especialmente si los porcentajes de viabilidad se encuentran dentro de límites de normalidad aceptables. Por lo tanto, pruebas funcionales *in vitro*, capaces de discernir la habilidad del semen descongelado para llevar a cabo procesos celulares específicos y complicados como la capacitación, la reacción acrosomal, la fecundación *in vitro* (FIV) y la inducción del desarrollo embrionario *in vitro* han sido diseñados para determinar su relación con la fertilidad obtenida luego de la IA (Rodríguez-Martínez , 2000).

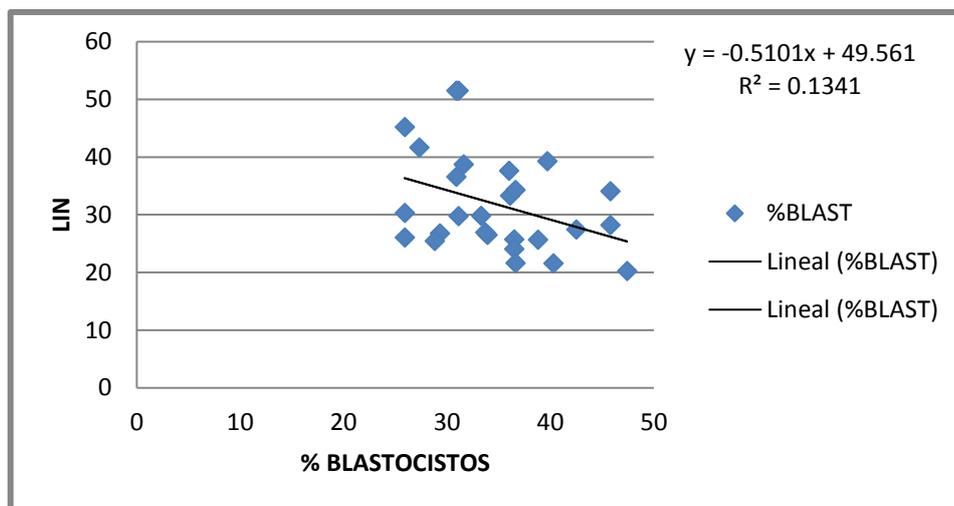


Figura 18: Correlación del Índice de linealidad (LIN) con el porcentaje de la producción de blastocistos.

El índice de linealidad (LIN) de los las muestras analizados mostraron una relación es perfecta negativa cuando exactamente en la medida que aumenta una variable, lo cual muestra que es desfavorable a la producción de embriones *in vitro*.

La correlación entre dos variables X e Y es perfecta negativa con un r^2 de 13 % lo cual explica débilmente la relación entre estas variables, cuando exactamente en la medida que aumenta una de ellas disminuye la otra. Esto sucede cuando la relación entre ambas variables es funcionalmente exacta (Calzada, 1982). Como se observa en la figura 18 hay una correlación negativa no perfecta ya que los datos se encuentran dispersos unos a otros. Probablemente debido al bajo número de repeticiones evaluadas, sin embargo hay que considerar que la tendencia puede ser la misma reforzada con un mayor r^2 a medida que aumente las repeticiones.

Algunos métodos para predecir fertilidad usan el método de penetración espermática, para lo cual miden el conteo de espermatozoides accesorios que atravesaron zona pelúcida parcialmente, indicando la capacidad de medir la capacidad fecundante del espermatozoide (Saacke *et al.*, 2000). Sin embargo, al correlacionar la fertilidad *in vitro* versus la fertilidad *in vivo* los valores reportados varían entre 0.35 a 0.59 (Zhang *et al.*, 1997 y Schneider *et al.*, 1999). Los valores reportados por nuestro trabajo son similares cuando correlacionamos parámetros de movimiento espermático con la tasa de blastocistos (día, 7 post fecundación *in vitro*).

Investigaciones muestran que las correlaciones de los análisis de semen en laboratorio con la fertilidad del toro, reveló grandes rangos de variación. Las correlaciones entre motilidad espermática y la fertilidad oscilaron desde un mínimo de 0,15 hasta un máximo de 0,83 (Kjaestad *et al.*, 1993; Januskauskas *et al.*, 2003). Incluso los análisis de muestras de semen estandarizados utilizando instrumentos de CASA han mostrado correlaciones variables entre ciertos patrones de motilidad post descongelado, tales como linealidad, y la fertilidad del campo 0.45-0.63 (Zhang *et al.*, 1998; Januskauskas *et al.*, 2001). Análisis estadísticos combinados de diferentes patrones de motilidad produjeron correlaciones más fuertes de 0.68-0.98 (Farrell *et al.*, 1998).

V. CONCLUSIONES

- ✓ Los parámetros de motilidad espermática evaluadas con el Sistema computarizado de análisis de semen (CASA) fueron superiores en muestras de semen seleccionado y capacitado comparado con semen post descongelado mostrando diferencias estadísticas en las variables velocidad curvilínea, velocidad lineal, velocidad promedio, índice de linealidad, índice de rectitud e índice de oscilación ($p < 0.05$).
- ✓ La tasa de producción de blastocistos está dentro de parámetros normales siendo el promedio 31.39% en comparación con otros laboratorios, y no se encontraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los toros evaluados.
- ✓ Los parámetros de motilidad espermática se encuentran correlacionados positivamente entre sí en el tratamiento post descongelado (Antes) y post selección y capacitación (Después) a excepción del parámetro frecuencia de batido de la cabeza (BCF).
- ✓ Para la correlación de los parámetros de motilidad espermática (ANTES) con la tasa de blastocistos se obtuvieron correlaciones positivas mayores siendo el índice de rectitud y la velocidad curvilínea los parámetros de mayor correlación.
- ✓ Al correlacionar los parámetros de movimiento espermático evaluados post selección y capacitación (DESPUES) con la tasa de blastocistos se obtuvieron correlaciones positivas mayores siendo la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza y frecuencia de batido de cabeza los parámetros de mayor correlación.

VI. RECOMENDACIONES

- ✓ Ampliar el número de muestras (Pajillas) de toros y el número de ovarios colectados, con el fin de tener un análisis estadístico más consistente.
- ✓ Realizar pruebas de fertilidad in vitro y compararlas con fertilidad in vivo utilizando el mismo toro y evaluar los factores que afectan en ambos procedimientos.
- ✓ Evaluar objetivamente las variables de motilidad comparando estas variables con toros nacionales e importados.
- ✓ Aplicar el protocolo estandarizado de fertilización in vitro descrito en este estudio con técnicas de colección de ovocitos In vivo (ovum pick up) con vacas de alto valor genético.
- ✓ Replicar el trabajo en otras especies relacionadas a la producción animal.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ADAMS, G.P; MATTERI, R.L; KASTELIC, J.P; KO, J.C.H; GINTHER, O.J. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil* 94: 177-188.

ADAMS, G.P; KOT, K; SMITH, C.A; GINTHER, O.J. 1993. Selection of a dominant follicle and supression of follicular growth in heifers. *Anim Reprod. Sci.* 30: 259 – 271.

ÁLVAREZ LLEDÓ, C. 2003. Análisis integrado de morfología y movilidad espermática humana con el uso del Sperm Class Analyzer. Tesis Doctoral, Departamento de Biología Funcional y Antropología Física, Universidad de Valencia, Valencia, 171pp

BARTH, A. 1992. The relationship between sperm abnormalities and fertility. In: *Proceedings 14th Technnical Conference on Artificial Insemination and Reproduction.* pp. 47–63.

BLANCO, A.G.S; CAMPO, P.E. 1997. Mecanismos neurohormonales del ciclo estral en la vaca. *La Habana.*

BONET, S; BRIZ, M; FRADERA, A; EGOZCUE, J. 1992, Origin, development and ultrastructure of boar spermatozoa with folded tails and with two tails. *Human Reproduction* 7: 523-528.

BRITO LFC; BARTH AD; BILODEAU-GOESEELS S; PANICH PL; KASTELIC JP. 2003. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology* 60:1539–1551

BRITO, LFC. 2007. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice* 6:249-264.

BUTLER, WJ; ROBERTS, TK. 1975. Effects of some phosphatidyl compounds on boar spermatozoa following cold shock or slow cooling. *Journal of Reproduction and Fertility* 43: 183-187.

CALZADA, B. J. 1982. Métodos estadísticos para la investigación. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima – Perú.

CABRERA, VP; PANTOJA, A. 2012, Viabilidad espermática e Integridad del acrosoma en semen congelado de toros Nacionales. *Rev. investig. vet. Perú* vol.23, p.192-200.

CABRERA, VP; YOONG, W; GAMARRA, G. 2009, Evaluacion de la fertilidad *in vitro* del semen de toros jóvenes nacionales en ovocitos provenientes de ovarios de animales beneficiados. *Rev. investig. vet. Perú* vol.20(1):.28-32.

CHANDLER, JE; PAINTER, CL; ADKISON, RW; MEMON, MA; HOYT, PG. 1988, Semen quality characteristics of dairy goats. *Journal of Dairy Science* 71, 1638-1646.

COLLIN S; SIRARD MA; DUFOUR M; BAILEY JL. 2000. Sperm calcium levels and chlortetracycline fluorescence patterns are related to the *in vivo* fertility of cryopreserved bovine semen. *J Androl*, 21:938–43.

CORREA JR; RODRIGUEZ MC; PATTERSON DJ; ZAVOS PM; 1996. Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability. *Theriogenology*, 46: 413–20.

CORREA, J; PACE, M; ZAVOS, P 1997. Relationships among frozen–thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology* 48, 721–731.

DAVIS, RO; SIEMERS, RJ. 1995, Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. *Reprod Fertil Dev* 7, 857-869.

DAYAN, A. 2001. fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação *in vitro*. Tese magistral.

DRESDNER, RD; KATZ, DF. 1981, Relationships of mammalian sperm motility and morphology to hydrodynamic aspects of cell function. *Biol Reprod.* 25, 920-930.

DRIANCOURT MA; THATCHER WW; TERQUI M; ANDRIEU D. 1991. Dynamics of ovarian follicular development in cattle during the estrous cycle, early pregnancy and in response to PMSG. *Anim. Endoc.* 8(2): 209-221.

EPPIG, J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*,(122), 829-838.

FAIR, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*, (78), 203-216.

FERNANDEZ, A; BASTIDAS P; TROCONIZ, J. 1999. Fertilización in vitro de ovocitos recolectados de vacas cebú postmortem. *Rev. Fac. Cs. Vets. UCV.* 40(2): 89-100.

FOOTE, R. 2003. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Anim Reprod Sci*;75:119–39.

GADEA J; MATA'S C; LUCAS X. 1998. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. *Anim Reprod Sci*, 54:95–108.

GADEA J; MATAS C. 2000. Sperm factors related to in vitro penetration of porcine oocytes. *Theriogenology*;54:1343–57.

GADEA, J.; SELLES, E. Y MARCO, MA. 2004. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Reprod Domest Anim* 2004;39:1–6.

GALINA, C. Y VALENCIA, J. 2006. Colección del semen bovino. *Reproduccion de Animales Domesticos*. Segunda edición. Mexico D.F.

GAGO, C; PÉREZ-SÁNCHEZ, F; YEUNG, CH; TABLADO, L; COOPER, TG; SOLER, C. 1999, Morphological characterization of ejaculated cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm. *American Journal of Primatology* 47, 105-115.

GAMBOA, S; RAMALHO-SANTOS, J. 2005, SNARE proteins and caveolin-1 in stallion spermatozoa: Possible implications for fertility. *Theriogenology* 64, 275-291.

GIGLI, I; RUSO, A; AGÜERO, A. 2006. Consideraciones sobre la dinámica ovárica em equino, bovino y camelidos sudamericanos. *InVet.* 8(1): 183-204.

GORDON I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. *Biotechnology in Agriculture Vol. II.* CAB International, UK.

GORDON I; LU H. 1990. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. *Theriogenology* 33:77-87. 1990.

GRAVANCE, CG; VISHWANATH, R; PITT, C; GARNER, DL; CASEY, PJ. 1998. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *Journal of Andrology* 19, 704-709.

GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULICK, L.J. Y WILTBANK, M.C. 1997. Sampling follicular fluid without altering follicular status in cattle: oestradiol concentrations early in a follicular wave. *J Reprod Fertil* 109 (2):181-186.

HAFEZ, E. 2000. Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición.

HAMMERSTEDT RH,;GRAHAN JK; NOLAN JP. 1990 Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl*, 11:73–88.

HASLER JF; HENDERSON WB; HURTGEN PJ; JIM ZQ; MCCAULEY AD; MOWER SA; NEELY B; SHUEY LS; STOKES JE; TRIMMER SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43: 141-152.

HASLER J. 2000. In-vitro production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. *Human Reproduction* 15, (Suppl. 5): 47-58.

HAY, MA; KING, WA; GARTLEY, CJ; LEIBO, SP; GOODROWE, KL. 1997. Canine spermatozoa — cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology* 48, 1329–1342.

HIDALGO, M; RODRIGUEZ, I; DORADO, J; SANZ, J; SOLER, C. 2005. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Veterinarni Medicina* 50, 24-32.

HILL, D. J. 1989. Growth factors and their cellular actions. *Journal of Reproduction & Fertility*, (85), 723- 734.

HIRAI, M; BOERSMA, A; HOEFLICH, A; WOLF, E; FOLL, J; AUMULLER, TR. 2001. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. *J Androl* 22:104–10.

HIRAO, K. 1975. A multiple regression analysis on six measurements of bovine semen characteristics for fertility. *Int. J. Fertil.* 20, 204–208.

HOLT WV; O'BRIENJ; ABAIGAR T. 2007. Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research *Reproduction, Fertility and Development*, 19, 709–718

HOLT, C; HOLT, W; MOORE, H; REED, H; CURNOCK, R. 1997. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J. Androl.* 18, 312–323.

JANUSKAUSKAS, A; JOHANNISSON, A; SO'DERQUIST YL; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2000. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bull. *Theriogenology* 53, 859–875.

JASKO, DJ; LEIN, DH; FOOTE, RH. 1990, Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 197, 389-394

JEYENDRAN RS; VAN DER VEN HH; PEREZ-PELAEZ M; CRABO BJ; ZANEVELD LJD. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal Reproduction Fertil.* 70:219-228.

KNOBIL, E. Y NEIL, J.D. 2003. Spermatogenesis, *Encyclopedia of reproduction*. Vol 4: 539-545. San Diego California.

KARAJDOLE, M; GETZ, I; SAMARDZIJA, M. MACESIC, N; MATKOVIĆ, M; MAKEK1, T; KARADJOLE1, G; POLETTO, M. 2010. The developmental competence of bovine immature oocytes and quality of embryos derived from slaughterhouse ovaries or live donors by ovum pick up. *Veterinarski arhiv* 80 (4), 445-454.

KARSH, F.J.; BOWEN, J.M.; CARATY, A.; EVANS, N.P. Y MOENTER, S.M. 1997. Gonadotropin releasing hormone requirements for ovulation. *Biol. Reprod.* 56: 303-309.

KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H. Y GINTHER, O.J. 1990. Supression of dominant and subordinate ovarian follicles by a proteinaceous fraction of follicular fluid in heifers. *Theriogenology.* 34: 499-509.

KJAESTAD, H; ROPSTAD, E; ANDERSEN BERG, K. 1993. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Vet. Scand.* 34, 299–303.

KUMAR, V; RANI, S. 1999, Light sensitivity of the photoperiodic response system in higher vertebrates: Wavelength and intensity effects. *Indian Journal of Experimental Biology* 37, 1053-1064.

LARSSON, B; RODRIGUEZ-MARTINEZ H. 2000. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? *Animal Reproduction Science*, 60–61:327–336.

LEWIS, SEM. 2007. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility. *Reproduction in Domestic Animals* 134, 31-40.

LOHUIS MM. 1995. Potential benefits of bovine embryo manipulation technologies to genetic improvement programmes. *Theriogenology* 43: 51-60.

LONERGAN P; FAIR T; CORCORAN D; EVANS ACO. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 65:137–152

LOVE, C; VARNER, D; THOMPSON, J. 2000, Intra- and inter-stallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility. *J Reprod Fertil Suppl* (56), 93-100.

MAXWELL, WMC.1996, Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction, Fertility and Development* 8, 1165-1178.

MELLISHO E; ANCCO E; QUISPE C; DIPAZ D; SENEDA M. 2014. Comparação das características cinéticas do sêmen de touros *Bos taurus* E *Bos primigenius* no Peru. XXVIII Reunião Anual SBTE, 14 a 17 de agosto de 2014. Pg. 175. SBTE12. Abstract.

MOCÉ, E; GRAHAM, JK. 2008, In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science* 105, 104-118.

MORTIMER, ST. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update* 3, 403-439.

MONGET, P.; BESNARD, N.; HUET, C.; PISSELET, C. Y MONNIAUX, D. 1996. Insulin-like growth factor-binding proteins and ovarian folliculogenesis. *Horm Res* 45(3-5):211-217.

MOROTTI F., B.V. SANCHES, J.H.F. PONTES, A.C. BASSO, E.R. SIQUEIRA, L.A. LISBOA, M.M. SENEDA. 2014. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale

IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. *Theriogenology* 81: 696–701

MUÑOZ, R; RIVERA, MM; RIGAU, T; RODRIGUEZ-GIL, JE; PEÑA, AI. 2008. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *Animal Reproduction Science* 109, 50-64.

O'MEARA, CM; HANRAHAN JP; DONOVAN A; FAIR S; RIZOS D; WADE M; BOLAND MP; EVANS ACO; LONERGAN P. 2005. Relationship between in vitro fertilization of ewe oocytes and the fertility of ewes following cervical artificial insemination with frozen-thawed ram semen. *Theriogenology* 64: 1797–1808

ORTEGA-FERRUSOLA, C; MACÍAS-GARCÍA, B; SUÁREZ-RAMA, V; GALLARDO-BOLAÑOS, JM; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L; TAPIA, JA; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H; PEÑA FJ. 2009. Identification of sperm subpopulations in stallion ejaculates: changes after cryopreservation and comparison with traditional statistics. *Reprod Domest Anim.* 44(3):419-23.

PALMA, G. Y BREM, G. 2001., *Biología de la reproducción*, cap. 1, 1-19. Buenos Aires, Argentina: Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

PALMER, E; BEZARD, J; MAGISTRINI, M; DUCHAMP, G. 1991. *In vitro* in the horse. A retrospective study. *J. Reprod. Fertil.* 44, 375–384.

PENNY CD; LOWMAN BG; SCOTT NA; SCOTT PR; VOELKEL S; DAVIES DAR, 1995. Management aspects of induced twinning in beef suckler cows using in vitro fertilised embryos. *Veterinary Record* 136: 506-510.

PEREZ, L; VALCARCEL, A; DE LAS HERAS, M; BALDASSARRE, H. 1997. Comparative study of four techniques for evaluation of sperm quality in ovine and bovine frozen–thawed samples. *Reprod. Domest. Anim.* 32, 157–160.

PÉREZ-LLANO, B; YENES-GARCÍA, P; GARCÍA-CASADO, P. 2003, Four subpopulations of boar spermatozoa defined according to their response to the short

hypoosmotic swelling test and acrosome status during incubation at 37°C. *Theriogenology* 60, 1401-1407.

PINART, E; SANCHO, S; BRIZ, MD; BONET, S; GARCÍA, N. 1999. Characterization of the semen quality of postpuberal boars with spontaneous unilateral abdominal cryptorchidism on the right side. *Animal Reproduction Science* 55, 269-278.

PRESICCE GA; JIANG S; SINKIN M; YANG X. 1993. Oocyte quality and embryo development in prepubertal calves. *Biology of Reproduction*, 52: 127.

PURSEL, VG; JOHNSON, LA. 1974, Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology* 1, 63-68

QUINTERO-MORENO, A; MIRO, J; TERESA RIGAU, A; RODRÍGUEZ-GIL, JE. 2003, Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 59, 1973-1990.

RAJAKOSKI, E. 1960. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal ciclical and left – right variations. *Acta. Endocrinol.* 34, 1- 60.

RIVERA, C. 1993. Regulacion neuroendocrina de la función ovárica. En: *Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción*. Ed. Hemisferio Sur. Argentina.

RIZOS D; LONERGAN P; WARD F; DUFFY P; BOLAND MP. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev*; 61:234–48.

ROCA, J; MARTINEZ, E; VAZQUEZ, JM; COY, P. 1992, Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area. *Animal Reproduction Science* 29, 255-262.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., 2000., Evaluación del semen congelado: métodos tradicionales y de actualidad. Ithaca, New York, International Veterinary Information Service.

SAACKE RG; DALTON J; NADIR S; NEBEL RL; BAME J. 2000. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. Anim Reprod Sci 60–61, 663–677.

SAMPER, JC. 2009. Equine Breeding Management and Artificial Insemination, 2nd, ed., 137pp

SAVIO, J.D; KEENAN, L.; BONALD, M.P. Y ROCHE, J.F. 1988. Patterns of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers. J. Reprod. Fery. 83, 663 – 671.

SCHNEIDER CS; ELLINGTON JE; WRIGHT RW. 1999: Relationship between bull field fertility and in vitro embryo production using sperm preparation methods with and without somatic cell co-culture. Theriogenology 51, 1085–1098.

SHAMSUDDIN, M; LARSSON, B. 1993. *In vitro* development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors. Reprod. Domest. Anim. Vol nr 28, 77–84.

SHI, D; LU, K.; GORDON, I. 1990. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development *in vitro*. Theriogenology 33, 324.

SUNDERLAND, S.J.; GROWE, M.A.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F E IRELAND, J.J. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrus cycle of heifers. J. Reprod. Fert. 101: 547-555.

TARDIF, S; LAFOREST, J; CORMIER, N; BAILEY, J. 1999. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. Theriogenology;52:447–59.

TARTAGLIONE CM; RITTA MN. 2004 Prognostic value of spermatological parameters as predictors of n vitro fertility of frozen-thawed bull semen. Theriogenology. 62:1245-1252

TURNER, RM. 2003. Tales from the Tail: What Do We Really Know about Sperm Motility? *Journal of Andrology* 24, 790-803.

UWLAND, J. 1984. Correlation between the number of inseminated spermatozoa and results of fertilization in dairy cattle. Verband tussen het aantal geïnsemineerde zaadcellen en de bevruchtingsresultaten bij melkvee. 109, 405-412.

VARNER, DD. 2008. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* 70, 448-462.

VERSTEGEN, J; IGUER-OUADA, M; ONELIN, K. 2002. Computer-assisted semen analysers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*; 57:149–79.

WATANABE, MR. 2001. Aspiração *in vivo* de oócitos em fêmeas nelore de diferentes idades reprodutivas mediante punção transvaginal guiada por ultra-som. Teses magistral.

WHITFIELD, C; PARKINSON, T. 1995. Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by *in vitro* induction of acrosome reactions with calcium ionophore A23187. *Theriogenology* 44, 413–422.

WHO 1999. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm Cervical Mucus Internation, Press, C.U., ed.

XU, X; POMMIER, S; ARBOV, T; HUTCHINGS, B; SOTTO, W; FOXCROFT, GR. 1998. *In vitro* maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. *J Anim Sci*;76:3079–89.

YANAGIMACHI, R; OKADA, A; TUNG, KSK. 1981, Sperm autoantigens and fertilization: II. Effects of anti-guinea pig sperm autoantibodies on sperm-ovum interactions. *Biology of Reproduction* 24, 512-518.

YANG X. 2003 Advanced transgenesis and cloning: Genetic Manipulation in Animals. Electronic Workshop Presentation: *Paper No. 22* Chemistry and Life Sciences Office (CLSO).

ZHANG BR; LARSSON B; LUNDEHEIM N; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H.1997:
Relation between embryo development in vitro and 56- day non-return rates of frozen-
thawed semen from dairy AI bulls. *Theriogenology* 48, 221–231

ZHANG, B; LARSSON, B; LUNDEHEIM, N; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 1998.
Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-
thawed semen from dairy AI bulls. *Int. J. Androl.* 21, 207–216.

ZOU CX; YANG ZM. 2000. Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen
during in vitro storage under different temperatures. *Theriogenology*;53:1477–88.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: Datos de parámetros de cinética espermática con la producción de blastocistos
(ANTES)

MUESTRA	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF	%BLAST
1	83,6	27,8	44,8	33,3	62,1	53,6	4,1	9,9	29,78
2	67,1	21,2	36,1	31,6	58,7	53,8	3,4	6,9	38,7
3	88,5	40,6	53,4	45,8	76	60,4	3,9	11,2	34,09
4	88,5	40,6	53,4	45,8	76	60,4	3,9	11,2	28,2
5	101,5	40,3	58,7	39,7	68,6	57,9	4,3	8,8	39,24
6	62,6	29,7	43,3	47,4	68,5	69,2	2,6	8,4	20,24
7	89	32	49,6	36	64,6	55,8	4,3	8,5	37,61
8	81	25	42,8	30,9	58,4	52,9	4,1	7,2	36,58
9	90,8	30,8	49,2	33,9	62,5	54,2	4	8,3	26,47
10	78	20,2	39,7	25,9	50,9	50,8	3,8	6,4	30,3
11	78	20,2	39,7	25,9	50,9	50,8	3,8	6,4	45,2
12	103,6	32,3	55,1	31,1	58,5	53,2	4,7	8,2	51,5
13	103,6	32,3	55,1	31,1	58,5	53,2	4,7	8,2	29,73
14	65	23,7	35,5	36,5	66,9	54,5	3,6	8	25,7
15	65	23,7	35,5	36,5	66,9	54,5	3,6	8	24,07
16	67,5	28,7	42	42,5	68,2	62,3	2,9	9,3	27,42
17	69,4	26,9	41,4	38,8	64,9	59,7	3,2	8,5	25,64
18	87,2	29,3	47,7	33,7	61,5	54,7	4	9,1	26,92
19	76	22,3	39,5	29,3	56,4	51,9	3,9	6,7	26,78
20	65,6	23,7	37,5	36,1	63,2	57,1	3,1	8,5	33,3
21	77,4	31,2	43,5	40,3	71,7	56,2	3,7	8,7	21,56
22	114,9	31,4	59,3	27,3	52,9	51,6	4,9	6,7	41,67
23	83,3	25,7	45,3	30,9	56,8	54,4	4	7,6	51,51
24	78	20,2	39,7	25,9	50,9	50,8	3,8	6,4	26,02
25	81,7	29,9	46	36,6	65	56,3	4	8,3	21,62
26	74,1	27,1	41,2	36,6	65,8	55,6	3,9	7,8	34,28
27	65,3	18,8	35,2	28,8	53,5	53,9	3,5	8,2	25,42
PROMEDIO	80,97	27,99	44,82	34,75	62,18	55,54	3,84	8,20	31,84
DS	13,69	6,13	7,22	6,13	7,15	4,09	0,52	1,26	

ANEXO 02: Datos de parámetros de cinética espermática con la producción de blastocistos (DESPUES).

MUESTRA	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF	%BLAST
1	74,1	20,9	39,9	28,3	52,5	53,8	3,3	7,1	29,78
2	73,8	35	47,6	47,4	73,6	64,5	3,6	7	38,7
3	104,6	57,5	72,2	55	79,6	69	4,1	9,3	34,09
4	104,6	57,5	72,2	55	79,6	69	4,1	9,3	28,2
5	87,7	43,1	57,5	49,2	75,1	65,5	4,4	7,4	39,24
6	62,6	19,5	37	31,1	52,6	59,1	3,3	3,3	20,24
7	93,2	56,2	69,4	60,3	81	74,4	3,4	8,8	37,61
8	112	42,6	65,1	38	65,3	58,2	4,9	8	36,58
9	85,7	37,4	52,3	43,6	71,6	60,9	3,7	8	26,47
10	95	42,6	57,2	44,9	74,5	60,3	4,2	8,7	30,3
11	95	42,6	57,2	44,9	74,5	60,3	4,2	8,7	45,2
12	78,1	29,1	45,4	37,3	64,2	58,1	3,2	7,7	51,5
13	78,1	29,1	45,4	37,3	64,2	58,1	3,2	7,7	29,73
14	92,7	42,6	60,2	45,9	70,7	64,9	3,7	8,3	25,7
15	92,7	42,6	60,2	45,9	70,7	64,9	3,7	8,3	24,07
16	99,5	34,3	58,5	34,5	58,5	58,9	4,3	7,9	27,42
17	68,6	28,4	42,1	41,4	67,4	61,4	3,6	7,3	25,64
18	117,8	53,8	74,8	45,7	72	63,5	4,6	9,7	26,92
19	123,6	47,1	67,4	38,1	69,9	54,6	5,1	8,9	26,78
20	85,7	37,4	52,3	43,6	71,6	60,9	3,7	8	33,3
21	95,8	35,1	55,1	36,6	63,6	57,6	4,3	7,7	21,56
22	142	44,1	78,2	31	56,4	55,1	5,7	7,4	41,67
23	93,1	46,4	60,6	49,9	76,6	65,1	3,6	9,5	51,51
24	110,9	46,3	63,6	41,8	72,9	57,3	4,6	9,1	26,02
25	118,8	55,5	71,3	46,7	77,9	60	4,8	10,1	21,62
26	107,6	49,6	70	46,1	70,8	65,1	4,3	8,9	34,28
27	61,8	19,1	36,4	31	52,6	58,8	3,1	4,4	25,42
PROMEDIO	94,63	40,57	58,11	42,61	68,89	61,46	4,03	8,02	31,84
DS	19,18	11,21	11,96	7,90	8,42	4,79	0,65	1,47	

ANEXO 03: Producción de blastocistos por toro

TORO	REP	NºCOC'S	Nº BLAST	% BLAST
1	1	47	14	29,78
	2	44	15	34,09
	3	39	11	28,2
	4	109	41	37,61
	5	41	15	36,58
	6	33	10	30,3
	7	73	33	45,2
	8	78	21	26,92
	9	33	17	51,51
	10	73	19	26,02
2	1	62	24	38,7
	2	79	32	39,24
	3	84	17	20,24
	4	68	18	26,47
	5	51	11	21,56
	6	84	35	41,67
	7	37	8	21,62
	8	35	12	34,28
	9	59	15	25,42
3	1	64	33	51,5
	2	74	22	29,73
	3	56	15	26,78
	4	60	20	33,3
4	1	70	18	25,7
	2	54	13	24,07
	3	62	17	27,42
	4	39	10	25,64

ANEXO 04: Analisis de varianza para la comparación de parámetros de cinética espermática antes y después de la capacitación espermática.

VCL

Analisis de varianza VCL							
FV	GL	SC	CM	FC	FT	p>F	Sig
Tratamiento	1	2520,13	2520,13	13,63	4,22	0,001	*
Bloque	26	9629,51	370,36	2	4,22	0,04	n.s
Error exp (B*T)	26	4807,28	184,89				
Total	53	16956,92					

R² 0.71

Duncan Grouping	Mean	N	tto
A	94.633	27	D
B	80.970	27	A

VAP

Analisis de varianza VAP							
FV	GL	SC	CM	FC	FT	p>F	Sig
Tratamiento	1	2385,35	2385,35	32,42	4,22	<.0001	**
Bloque	26	3163,04	121,65	1,65	4,22	0,103	n.s
Error exp (B*T)	26	1912,99	73,57				
Total	53	7461,39					

R² 0.74

Duncan Grouping	Mean	N	tto
A	58.115	27	D
B	44.822	27	A

VSL

Análisis de varianza VSL							
FV	GL	SC	CM	FC	FT	p>F	Sig
Tratamiento	1	2138,22	2138,22	34,67	4,22	<.0001	**
Bloque	26	2643,88	101,68	1,65	4,22	0,1	n.s
Error exp (B*T)	26	1603,28	61,66				
Total	53	6385,39					

R² 0.74

Duncan Grouping	Mean	N	tto
A	40.570	27	D
B	27.985	27	A

WOB

Análisis de varianza WOB							
FV	GL	SC	CM	FC	FT	p>F	Sig
Tratamiento	1	471,7	471,7	32,48	4,22	<.0001	**
Bloque	26	655,2	25,2	1,74	4,22	0,08	n.s
Error exp (B*T)	26	377,5	14,52				
Total	53	1504,46					

R² 0.74

Duncan Grouping	Mean	N	tto
A	61.450	27	D
B	55.545	27	A

STR

Análisis de varianza STR							
FV	GL	SC	CM	FC	FT	p>F	Sig
Tratamiento	1	607,35	607,35	11,98	4,22	0,0019	*
Bloque	26	1853,38	71,28	1,41	4,22	0,19	n.s
Error exp (B*T)	26	1318,55	50,71				
Total	53	3779,29					

R² 0.65

Duncan Grouping	Mean	N	tto
A	68.85	27	D
B	62.18	27	A

LIN

Análisis de varianza LIN							
FV	GL	SC	CM	FC	FT	p>F	Sig
Tratamiento	1	834,65	834,65	21,4	4,22	<.0001	**
Bloque	26	1584,99	60,96	1,56	4,22	0,13	n.s
Error exp (B*T)	26	1013,94	38,99				
Total	53	3433,58					

R² 0.70

Duncan Grouping	Mean	N	tto
A	42.61	27	D
B	34.75	27	A

BCF

Análisis de varianza BCF							
FV	GL	SC	CM	FC	FT	p>F	Sig
Tratamiento	1	0,44	0,44	0,25	4,22	0,62	n.s
Bloque	26	50,08	1,92	1,06	4,22	0,44	n.s
Error exp (B*T)	26	47,18	1,81				
Total	53	97,7					

R² 0.52

Duncan Grouping	Mean	N	tto
A	8.2	27	A
A	8.01	27	D

ALH

Análisis de varianza ALH							
FV	GL	SC	CM	FC	FT	p>F	Sig
Tratamiento	1	0,462	0,462	1,75	4,22	0,197	n.s
Bloque	26	11,28	0,433	1,64	4,22	0,106	n.s
Error exp (B*T)	26	6,877	0,264				
Total	53	18,62					

R² 0.63

Duncan Grouping	Mean	N	tto
A	4.02	27	D
A	3.84	27	A

ANEXO 05: Correlación de los parámetros de cinética antes con la producción de blastocistos.

	Pearson Correlation Coefficients, N = 27 Prob > r under H0: Rho=0						Pearson Correlation Coefficients, N = 27 Prob > r under H0: Rho=0					
	blas	vc1	vs1	vap	rap	med	lent	lin	str	wob	alh	bcf
blas	1.00000	0.47519 0.0122	0.07522 0.7092	0.35173 0.0720	0.45062 0.0183	-0.14869 0.4592	-0.43678 0.0227	-0.36618 0.0603	-0.34049 0.0822	-0.34144 0.0813	0.49101 0.0093	-0.22428 0.2607
vc1	0.47519 0.0122	1.00000	0.60572 0.0008	0.91844 <.0001	0.56889 0.0020	-0.58260 0.0014	-0.42206 0.0283	-0.19071 0.3407	-0.10782 0.5924	-0.28497 0.1497	0.89304 <.0001	0.09139 0.6503
vs1	0.07522 0.7092	0.60572 0.0008	1.00000	0.84630 <.0001	-0.01757 0.9307	-0.69681 <.0001	-0.09880 0.6239	0.65456 0.0002	0.69938 <.0001	0.47937 0.0114	0.34992 0.0736	0.73316 <.0001
vap	0.35173 0.0720	0.91844 <.0001	0.84630 <.0001	1.00000	0.41728 0.0303	-0.62652 0.0005	-0.36672 0.0599	0.19182 0.3378	0.22076 0.2685	0.11139 0.5802	0.68779 <.0001	0.37666 0.0528
rap	0.45062 0.0183	0.56889 0.0020	-0.01757 0.9307	0.41728 0.0303	1.00000	-0.12912 0.5210	-0.76192 <.0001	-0.49772 0.0082	-0.56578 0.0021	-0.33485 0.0878	0.45697 0.0166	-0.49783 0.0082
med	-0.14869 0.4592	-0.58260 0.0014	-0.69681 <.0001	-0.62652 0.0005	-0.12912 0.5210	1.00000	0.11433 0.5701	-0.29883 0.1300	-0.46215 0.0152	-0.00041 0.9984	-0.50994 0.0066	-0.34193 0.0809
lent	-0.43678 0.0227	-0.42206 0.0283	-0.09880 0.6239	-0.36672 0.0599	-0.76192 <.0001	0.11433 0.5701	1.00000	0.24235 0.2232	0.30249 0.1251	0.13242 0.5103	-0.30522 0.1216	0.35075 0.0728
lin	-0.36618 0.0603	-0.19071 0.3407	0.65456 0.0002	0.19182 0.3378	-0.49772 0.0082	-0.29883 0.1300	0.24235 0.2232	1.00000	0.95228 <.0001	0.90687 <.0001	-0.43092 0.0248	0.78427 <.0001
str	-0.34049 0.0822	-0.10782 0.5924	0.69938 <.0001	0.22076 0.2685	-0.56578 0.0021	-0.46215 0.0152	0.30249 0.1251	0.95228 <.0001	1.00000	0.73703 <.0001	-0.26541 0.1809	0.82104 <.0001
wob	-0.34144 0.0813	-0.28497 0.1497	0.47937 0.0114	0.11139 0.5802	-0.33485 0.0878	-0.00041 0.9984	0.13242 0.5103	0.90687 <.0001	0.73703 <.0001	1.00000	-0.59396 0.0011	0.60877 0.0008
alh	0.49101 0.0093	0.89304 <.0001	0.34992 0.0736	0.68779 <.0001	0.45697 0.0166	-0.50994 0.0066	-0.30522 0.1216	-0.43092 0.0248	-0.26541 0.1809	-0.59396 0.0011	1.00000	-0.09042 0.6538
bcf	-0.22428 0.2607	0.09139 0.6503	0.73316 <.0001	0.37666 0.0528	-0.49783 0.0082	-0.34193 0.0809	0.35075 0.0728	0.78427 <.0001	0.82104 <.0001	0.60877 0.0008	-0.09042 0.6538	1.00000

ANEXO 06: Correlación de los parámetros de cinética después con la producción de blastocistos.

	Pearson Correlation Coefficients, N = 27 Prob > r under H0: Rho=0							Pearson Correlation Coefficients, N = 27 Prob > r under H0: Rho=0				
	blas	vcl	vs1	vap	rap	ned	lent	lin	str	wob	alh	bcf
blas	1.00000	0.06089 0.7629	0.13374 0.5060	0.10981 0.5856	0.05247 0.7949	-0.22780 0.2531	-0.09040 0.6539	0.21656 0.2779	0.21338 0.2852	0.16390 0.4140	-0.01827 0.9279	0.19255 0.3359
vcl	0.06089 0.7629	1.00000	0.74516 <.0001	0.91680 <.0001	0.81305 <.0001	-0.74530 <.0001	-0.50282 0.0075	0.17332 0.3873	0.30425 0.1228	-0.04956 0.8061	0.90920 <.0001	0.65464 0.0002
vs1	0.13374 0.5060	0.74516 <.0001	1.00000	0.92871 <.0001	0.48945 0.0096	-0.79800 <.0001	-0.41826 0.0299	0.77647 <.0001	0.81717 <.0001	0.57085 0.0019	0.55233 0.0028	0.83533 <.0001
vap	0.10981 0.5856	0.91680 <.0001	0.92871 <.0001	1.00000	0.71175 <.0001	-0.79299 <.0001	-0.46596 0.0143	0.51758 0.0057	0.56157 0.0023	0.34969 0.0738	0.74960 <.0001	0.75185 <.0001
rap	0.05247 0.7949	0.81305 <.0001	0.48945 0.0096	0.71175 <.0001	1.00000	-0.45409 0.0173	-0.48302 0.0107	-0.06836 0.7347	-0.01269 0.9499	-0.15491 0.4404	0.70403 <.0001	0.41057 0.0334
ned	-0.22780 0.2531	-0.74530 <.0001	-0.79800 <.0001	-0.79299 <.0001	-0.45409 0.0173	1.00000	0.53877 0.0037	-0.54398 0.0034	-0.67915 <.0001	-0.27856 0.1594	-0.70300 <.0001	-0.67689 0.0001
lent	-0.09040 0.6539	-0.50282 0.0075	-0.41826 0.0299	-0.46596 0.0143	-0.48302 0.0107	0.53877 0.0037	1.00000	-0.16151 0.4209	-0.27716 0.1616	0.01104 0.9564	-0.33257 0.0901	-0.50009 0.0079
lin	0.21656 0.2779	0.17332 0.3873	0.77647 <.0001	0.51758 0.0057	-0.06836 0.7347	-0.54398 0.0034	-0.16151 0.4209	1.00000	0.94207 <.0001	0.89770 <.0001	-0.01403 0.9446	0.62507 0.0005
str	0.21338 0.2852	0.30425 0.1228	0.81717 <.0001	0.56157 0.0023	-0.01269 0.9499	-0.67915 <.0001	-0.27716 0.1616	0.94207 <.0001	1.00000	0.70132 <.0001	0.15109 0.4519	0.76275 <.0001
wob	0.16390 0.4140	-0.04956 0.8061	0.57085 0.0019	0.34969 0.0738	-0.15491 0.4404	-0.27856 0.1594	0.01104 0.9564	0.89770 <.0001	0.70132 <.0001	1.00000	-0.23704 0.2339	0.31836 0.1056
alh	-0.01827 0.9279	0.90920 <.0001	0.55233 0.0028	0.74960 <.0001	0.70403 <.0001	-0.70300 <.0001	-0.33257 0.0901	-0.01403 0.9446	0.15109 0.4519	-0.23704 0.2339	1.00000	0.43560 0.0231
bcf	0.19255 0.3359	0.65464 0.0002	0.83533 <.0001	0.75185 <.0001	0.41057 0.0334	-0.67689 0.0001	-0.50009 0.0079	0.62507 0.0005	0.76275 <.0001	0.31836 0.1056	0.43560 0.0231	1.00000

ANEXO 07: Archivos CASA Computer Assisted Sperm Analysis (ANTES).

ESTUDIO CITOMORFOLÓGICO DEL SEMEN
Integrated Sperm Analysis System

Laboratorio de Análisis Projectes i Serveis R+D S.L.

DATOS DE IDENTIFICACIÓN

Nombre: felipe Análisis: 15/03/2014 03:13:45 p.m.
 Doctor: Referencia: antes
 Observaciones:

DATOS FÍSICO-QUÍMICOS

Muestra: Fecha y hora: 15/03/2014 03:13:45 p.m.
 Abstinencia: 0 días
 Obtención:

Volumen: 2,0 ml (≥ 2 mL) Dilución: 1:0
 Licuefacción: Aglutinaciones:
 Aspecto: Color:
 Viscosidad: Olor:
 pH: 0,0 (≥ 7.2) Temperatura: 0,0 °C

CONCENTRACIÓN Y ANÁLISIS DE MOVILIDAD

	Total	Porcentaje (%)	CONCENTRACIÓN	
			millones por ml	en eyaculado Total
ESPERMATOZOIDES				
Estáticos	361	14,7%	19,9	39,8
Móviles no progresivos	1896	77,1%	104,6	209,2
Móviles progresivos	201	8,2%	11,1	22,2
Total	2458	100,0%	135,6	271,2
			(≥ 20 mill/ml)	(≥ 40 mill/total)

	Total	Porcentaje (%)	CONCENTRACIÓN	
			millones por ml	en eyaculado Total
POR VELOCIDAD				
Rápidos	1381	56,2%	76,2	152,4
Medios	506	20,6%	27,9	55,8
Lentos	210	8,5%	11,6	23,2
Estáticos	361	14,7%	19,9	39,8

	Total	Porcentaje (%)	CONCENTRACIÓN		
			millones por ml	en eyaculado Total	
SEGÚN LA O.M.S					
Progresivo rápido (tipo a)	1381	56,2%	76,2	152,4	a ≥ 25%
Progresivo lento (tipo b)	0	0,0%	0,0	0,0	a+b ≥ 50%
No progresivo (tipo c)	716	29,1%	39,5	79,0	
Inmóvil (tipo d)	361	14,7%	19,9	39,8	

	Total	Estáticos	Lentos	Medios	Rápidos	Unidades
Área de las cabezas	16,6	17,8	17,8	17,4	15,7	µm²
Células Redondas	0,0	mill/ml	(< 5 mill/ml)			
Recorridos Circulares	1916	77,9%				

VALORES MEDIOS DE LOS PARÁMETROS DE VELOCIDAD

	Total	Lentos	Medios	Rápidos	Unidades	
Velocidad Curvilínea	VCL	101,6	36,4	59,1	127,5	µm/s
Velocidad Rectilínea	VSL	28,5	9,9	15,9	36,0	µm/s
Velocidad Promedio	VAP	52,2	19,1	30,5	65,3	µm/s
Índice de Linealidad	LIN	28,0	27,2	27,0	28,2	%
Índice de Rectitud	STR	54,6	51,9	52,3	55,1	%
Índice de Oscilación	WOB	51,3	52,4	51,6	51,3	%

VALORES MEDIOS DE OTROS PARÁMETROS

	Total	Progr. Medios	Progr. Rápidos	Unidades	
Amplitud Media del desplazamiento lateral de la cabeza	ALH	4,8	2,9	5,2	µm
Frecuencia de Batida	BCF	8,6	5,7	9,2	Hz

	Total	Porcentaje (%)	CONCENTRACIÓN	
			millones por ml	en eyaculado Total
Tipo a				
ALH > 2.5µm				
STR > 85%	82	3,3%	4,5	9,0

Gráficos de distribuciones según el tipo de espermatozoides

Según progresividad

Tipo	Porcentaje
Estáticos	8%
Móviles no progresivos	77%
Móviles progresivos	15%

Según velocidad

Tipo	Porcentaje
Rápidos	56%
Medios	21%
Lentos	8%
Estáticos	15%

Según la O.M.S

Tipo	Porcentaje
Progresivo rápido (tipo a)	56%
No progresivo (tipo c)	29%
Progresivo lento (tipo b)	0%
Inmóvil (tipo d)	15%

Gráficos de distribuciones según el tipo de velocidades

Velocidades

Categoría	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)
Total	101,6	28,5	52,2
Lentos	36,4	9,9	19,1
Medios	59,1	15,9	30,5
Rápidos	127,5	36,0	65,3

Índices

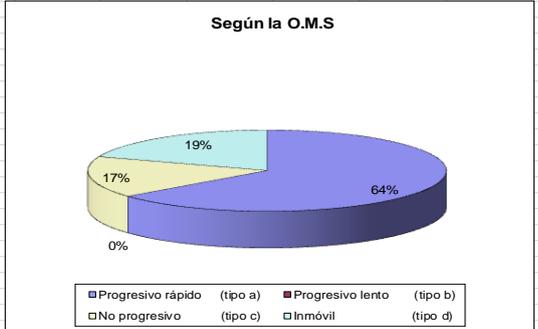
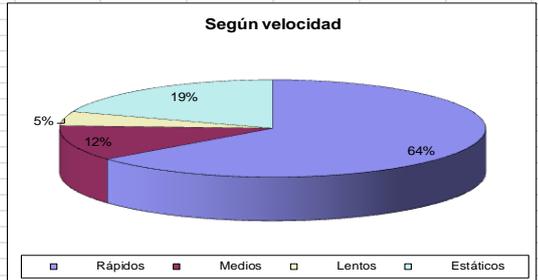
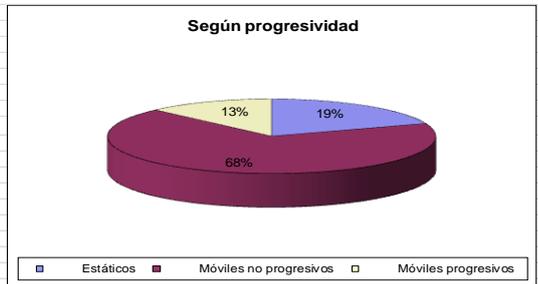
Categoría	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)
Total	28,0	54,6	51,3
Lentos	27,2	51,9	52,4
Medios	27,0	52,3	51,6
Rápidos	28,2	55,1	51,3

71

ANEXO 08: Archivos CASA Computer Assisted Sperm Analysis (DESPUES).

ESTUDIO CITOMORFOLÓGICO DEL SEMEN Integrated Sperm Analysis System						
Laboratorio de Análisis Projectes i Serveis R+D S.L.						
DATOS DE IDENTIFICACIÓN						
Nombre	felipe		Análisis	15/03/2014 03:51:43 p.		
Doctor			Referencia	despues		
Observaciones						
DATOS FÍSICO-QUÍMICOS						
Muestra:	Fecha y hora	15/03/2014 03:51:43 p.m				
	Abstinencia	0 días				
	Obtención					
Volumen	2,0 ml	(≥ 2 mL)	Dilución	1: 0		
Licuefacción			Agglutinaciones			
Aspecto			Color			
Viscosidad			Olor			
pH	0,0	(≥ 7.2)	Temperatura	0,0 °C		
CONCENTRACIÓN Y ANÁLISIS DE MOVILIDAD						
ESPERMATOZOIDES	Total	Porcentaje (%)	CONCENTRACIÓN			
			millones por ml	en eyaculado	Total	
Estáticos	307	19,4%	16,9		33,9	
Móviles no progresivos	1075	68,0%	59,3		118,6	
Móviles progresivos	198	12,5%	10,9		21,8	
	1580	100,0%	87,2		174,3	
			(≥ 20 mill/ml)		(≥ 40 mill/total)	
POR VELOCIDAD	Total	Porcentaje (%)	CONCENTRACIÓN			
			millones por ml	en eyaculado	Total	
Rápidos	1013	64,1%	55,9		111,8	
Medios	185	11,7%	10,2		20,4	
Lentos	75	4,7%	4,1		8,3	
Estáticos	307	19,4%	16,9		33,9	
SEGÚN LA O.M.S	Total	Porcentaje (%)	CONCENTRACIÓN			
			millones por ml	en eyaculado	Total	
Progresivo rápido (tipo a)	1013	64,1%	55,9		111,8	
Progresivo lento (tipo b)	0	0,0%	0,0		0,0	
No progresivo (tipo c)	260	16,5%	14,3		28,7	
Inmóvil (tipo d)	307	19,4%	16,9		33,9	
					a ≥ 25% a+b ≥ 50%	
Área de las cabezas	Total	Estáticos	Lentos	Medios	Rápidos	Unidades
	15,1	16,9	15,1	15,7	14,5	µm²
Células Redondas	Total	Estáticos	(< 5 mill/mL)			Unidades
	0,0	0,0				mill/mL
Recorridos Circulares	1030	65,2%				
VALORES MEDIOS DE LOS PARÁMETROS DE VELOCIDAD						
		Total	Lentos	Medios	Rápidos	Unidades
Velocidad Curvilínea	VCL	120,1	37,3	60,9	137,0	µm/s
Velocidad Rectilínea	VSL	41,0	10,9	19,4	47,2	µm/s
Velocidad Promedio	VAP	69,0	19,6	33,6	79,1	µm/s
Índice de Linealidad	LIN	34,2	29,1	31,8	34,4	%
Índice de Rectitud	STR	59,5	55,3	57,7	59,7	%
Índice de Oscilación	WOB	57,4	52,7	55,2	57,7	%
VALORES MEDIOS DE OTROS PARÁMETROS						
		Total	Progr. Medios	Progr. Rápidos	Unidades	
Amplitud Media del desplazamiento lateral de la cabeza	ALH	4,6	2,7	4,8	µm	
Frecuencia de Batida	BCF	9,1	5,7	9,5	Hz	
Tipo a	Total	Porcentaje (%)	CONCENTRACIÓN			
			millones por ml	en eyaculado	Total	
ALH > 2.5µm						
STR > 85%	82	5,2%	4,5		9,0	

Gráficos de distribuciones según el tipo de espermatozoides



Gráficos de distribuciones según el tipo de velocidades

