

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”

UNIDAD SALTILLO

DIVISIÓN CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL



Determinación de sub poblaciones espermáticas por
motilidad en ovinos de pelo

Por

Luis Felipe Velasco cruz

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el
título de:

Ingeniero Agrónomo zootecnista

Buena Vista, Saltillo, Coahuila, México. Septiembre de 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"

UNIDAD SALTILLO

DIVISIÓN CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

POR:

LUIS FELIPE VELASCO CRUZ

Tesis que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador
como requisito parcial para obtener el título de:

Ingeniero Agrónomo Zootecnista

Aprobada por:



M.C. Enrique Esquivel Gutiérrez
Presidente



M.C. Laura Padilla González
Sinodal

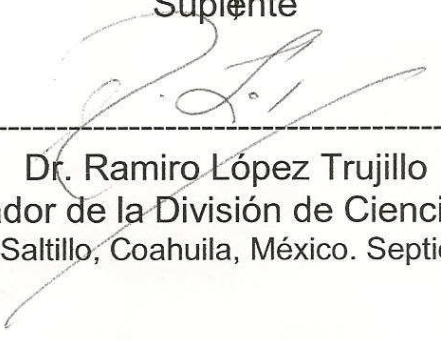


Dr. Héctor Magaña Sevilla
Sinodal





M.C. Manuel Torres Hernández
Suplente



Dr. Ramiro López Trujillo
Coordinador de la División de Ciencia Animal.
Buena Vista, Saltillo, Coahuila, México. Septiembre de 2011

DEDICATORIA

COMO UNA FLOR

Como el agua que se precipita
Mojando la tierra sedienta
Para dar vida, que ha cubierto
La tierra y que nos llena las manos

Así te siento y donde quiera que estoy
Y veo una flor veo tu rostro que es
Como una flor que se abre por las
Mañanas y sus pétalos mojados con el
Roció de las mañanas
Y le sirve de cobija a los insectos
Así mi madre me cobija

Como una flor que ha dado su semilla
Y a dado vida, así mi madre me dio vida
Que es lo único con lo que naci

VELASCO C. L. F, MAYO 2000.

Con todo mi cariño para mi madre Aurora Cruz Cabrera y a mi padre Félix Velasco Retana, por darme la vida y la oportunidad de llegar hasta donde estoy

y en general a todas las personas que estuvieron a mi lado durante mis estudios.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por la maravilla de la vida, sin la cual nada de esto se habría llevado a cabo.

A **mis Padres** por el apoyo moral que me nunca faltó, a pesar de la distancia.

A la **Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”**, por brindarme la oportunidad de formar parte de sus profesionistas.

Al mi asesor el **Dr. Héctor Magaña Sevilla** por la confianza y los conocimientos que me brindó, y sobre todo por el tiempo dedicado a esta investigación.

A la **M.C. Laura Padilla González**, por su valioso apoyo durante el desarrollo de este proyecto, también por todos los consejos que me ayudaron a comprender mejor el tema, gracias.

Al **M.C. Enrique Esquivel Gutiérrez**, por su apoyo en la realización de este proyecto, sobre todo por la confianza prestada en mi persona.

Al **M.C. Manuel Torres Hernández**, por su valiosa colaboración en mi formación como profesionista.

A la **Ing. Joyce Anaid Vela Lozada** por su gran ayuda en la elaboración de este proyecto, sobre todo por los conocimientos que depositó en mí y su gran amistad.

Al **M.C. Edgar Noé Rodríguez Cruz** por su valioso apoyo en el análisis estadístico de este proyecto gracias.

A la **Ing. María Isabel Reyes Arreozola** por su gran amistad, tolerancia, sobre todo por su gran apoyo durante mi estancia en la Universidad y por estar a mi lado cuando la necesite durante mi formación gracias Isa.

A las personas que me ayudaron en el estado de Yucatán durante mi estancia y una parte de este proyecto gracias compañeros: Alejandro, Erik, Masa, y a los doctores encargados del CeSyRo.

A las personas que me ayudaron y apoyaron en lo académico y fuera de lo académico, a mis amigos: José Gumaro, Jorge Abel Rodas, Issac Velasco, a los mis entrenadores y a mis compañeros de equipo de fut-ball americano de liga mayor y de intermedia por su valiosa colaboración en mi formación como persona.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	XI
CAPITULO I.....	1
1.1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. OBJETIVOS GENERALES.....	2
1.2.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	2
1.3. HIPÓTESIS.....	3
CAPITULO II	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. RAZAS OVINAS	4
2.1.1. SANTA CRUZ.....	4
2.1.2. BLACKBELLY	4
2.1.3. DORPER.....	5
2.1.4. PELIBUEY	5
2.1.5. KATADHIN.....	5
2.2. EL SEMEN.....	6
2.2.1. COMPOSICIÓN DEL SEMEN	6
2.2.2. ESPERMATOGÉNESIS.....	7
2.2.3. PASO DE LOS ESPERMATOZOIDES POR LAS VÍAS EXCRETORAS GENITALES	8
2.2.5. FUNCIÓN DEL PLASMA SEMINAL	9
2.3. COLECTA DE SEMEN	10
2.3.1. VAGINA ARTIFICIAL.....	11

2.4. MORFOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE	12
2.5. FISIOLOGÍA DEL MOVIMIENTO ESPERMÁTICO.....	14
2.5.1. METABOLISMO ESPERMÁTICO.....	15
2.5.2. FUNCIÓN MITOCONDRIAL	16
2.6. ANÁLISIS SEMINAL	17
2.6.1. VOLUMEN DE EYACULADO	18
2.6.2. APARIENCIA	18
2.6.3. MOTILIDAD INDIVIDUAL	18
2.6.4. MOTILIDAD MASAL	20
2.6.5. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA.....	21
2.6.6. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA MEDIANTE CASA.....	21
2.7. MÉTODO CASA	22
2.7.1. EVALUACIÓN MEDIANTE CASA.....	24
2.7.2. DEFINICIÓN DE PARÁMETROS MEDIDOS POR CASA	24
2.7.3. IMPORTANCIA DE LOS PARÁMETROS DEL CASA.	26
2.8. SUB-POBLACIONES ESPERMÁTICAS.....	27
2.8.1. IDENTIFICACIÓN DE SUB POBLACIONES A TRAVÉS DE CASA.....	28
2.9. AGRUPACIÓN DE DATOS (CLUSTERING)	29
CAPITULO III	31
3.1. LOCALIZACIÓN.....	31
3.2. MATERIALES	31
3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO	31
3.2.1.1. SEMENTALES OVINOS.....	31
3.2.1.2. HEMBRA.....	31

3.3. MATERIAL EMPLEADO EN LA COLECTA.....	32
3.3.1. REACTIVOS USADOS	33
3.4. MÉTODO.	33
3.4.1. COLECTA DE SEMEN	33
3.4.2. EVALUACIÓN DE SEMEN	34
3.4.2.1. EXAMEN MACROSCÓPICO.....	35
3.4.2.2. EXAMEN MICROSCÓPICO	36
3.4.2.2.1. MOTILIDAD MASAL	36
3.4.2.2.2. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA POR CASA	37
3.5. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	39
3.5.1. ANÁLISIS DE MOTILIDAD MASAL	39
3.5.2. ANÁLISIS DE MOTILIDAD INDIVIDUAL.	39
CAPITULO IV.....	41
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1. MOTILIDAD MASAL.	41
4.2. DETERMINACIÓN DE ÍNDICES DE MOTILIDAD	42
4.3. ESTABLECIMIENTO DE SUB POBLACIONES POR MEDIO DE UN CONGLOMERADO EN DOS FASES.....	43
4.4. SUB POBLACIÓN ESPERMÁTICA PREDOMINANTE EN CADA RAZA EVALUADA.	46
ANEXO 1	57
ANEXO 2	58
CONCLUSIONES	51
LITERATURA CITADA	52

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN ESQUEMATICA DE LA ESPERMATOGENESIS	8
FIGURA 2. SECCION ESQUEMÁTICA DE UNA VAGINA ARTIFICIAL.....	12
FIGURA 3 REPRESENTACIÓN GRAFICA DE LAS PARTES DE UN ESPERMATOZOIDE	13
FIGURA 4 . SECCION TRANSVERSAL DEL FLAJELO	14
FIGURA 5. RECONSTRUCCIÓN DE LA TRAYAECTORIA DE UN ESPERMATOZOIDE	23
FIGURA 6. PARAMETROS UTILIZADOS POR EL ANALISIS COMPUTARIZADO	25
FIGURA 7. RAZAS DE CARNEROS	32
FIGURA 8. VAGINA ARTIFICIAL DESARMADA	34
FIGURA 9. COLECTA DE SEMEN.....	34
FIGURA 10. SEMEN EN TUVO COLECTOR.....	35
FIGURA 11. MOTILIDAD Y CONSENTRACION	36
FIGURA 12. CAMPOS PARA CONSENTRACION ESPERMATICA	37
FIGURA 13. CAMPOS PARA MOTILIDAD.....	39

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1 MOVIMIENTO ESPERMATICO	36
CUADRO 2. COMPONENTES USADOS EN LA DETERMINACION DE INDICES DE MOTILIDAD.....	40
CUADRO 3. VALORES DE VARIANZA POR COMPONENTES.....	42
CUADRO 4. PARAMETROS DE MOTILIDAD CALCULADOS PARA INDICES DE MOTILIDAD	43
CUADRO 5. DISTRIBUCION DE SUBPOBLACIONES.....	44
CUADRO 6. DISTRIBUCION DE SUBPOBLACIONES POR MOTILIDAD.....	45
CUADRO 7. DISTRIBUCION DE LA POBLACION ESPERMATICA EN SUBPOBLACIONES POR RAZA	47

ÍNDICE DE GRAFICAS

GRAFICA 1 MEDIAS DE MOTILIDAD MASAL PARA RAZAS	41
GRAFICA 1. MEDIDAS DE MOTLIDAD MASAL PARA RAZAS.....	41
GRAFICA 2. COMPARACION DE LA MEDIA DE GRUPO CON LA MEDIA GLOBAL, PARA INDICE DE VELOCIDAD.....	48
GRAFICA 3. COMPARACION DE LA MEDIA DE GRUPO CON LA MEDIA GLOBAL, PARA INDICE DE MOVIMIENTO.	49

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de sub-poblaciones espermáticas en eyaculados de 20 ovinos de pelo agrupados en un diseño completamente al azar tomando a la raza como efecto fijo, para lo cual se utilizó el análisis de semen asistido por computadora (CASA) para determinar la motilidad espermática; la optimización de los datos se hizo por medio de un análisis de matriz de covarianza para lo cual se utilizó un análisis factorial. Se determinaron los índices de movimiento y velocidad espermática y por medio de un conglomerado en dos fases se agruparon los datos para determinar las sub-poblaciones. Los resultados nos muestran la presencia de 5 sub-poblaciones en el eyaculado de las 5 razas, de las cuales las razas Santa Cruz, Katadhin, BlackBelly demostraron un valor por encima de la media global de los eyaculados para lo que refiere al índice de motilidad y las razas Santa Cruz y Katadhin demostraron tener un comportamiento por arriba de la media. La raza Pelibuey a pesar de tener un comportamiento por debajo de media su comportamiento para índices de movimiento y velocidad es similar. Los valores subjetivos de la motilidad masal fueron analizados mediante una prueba de análisis de varianza. Los cuales no arrojaron una diferencia significativa entre eyaculados de las 5 razas.

Palabras clave: sub-poblaciones espermáticas, evaluación seminal, índices de motilidad.

1. CAPITULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Estudios recientes han demostrado la existencia de sub poblaciones en el eyaculado de los mamíferos, estas han sido definidas a través de los distintos patrones de movimiento (Abaigar y col., 1999; Rigau y col., 2001; Thurston y col., 2001; Holt, 1996 citado por Quintero, 2003). La presencia de estas sub-poblaciones podría sugerir la existencia de alguna relación entre cambios en la estructura sub-poblacional de una muestra de semen y su capacidad fecundante (Quintero, 2003 citado por Muiño, s/f). Estas sub poblaciones espermáticas con características específicas pueden ser analizadas por el sistemas de análisis de esperma asistido por ordenador CASA el cual proporciona toda una serie de datos relativos a la velocidad y trayectoria de cada espermatozoide que coexiste en la misma muestra de semen (Davis, 1995 citado por Quintero, 2003; Abaigar et al., 1999), lo que es una visión más real, puesto que, un eyaculado está formado por una población heterogénea de espermatozoides. El software utilizado por CASA aporta gran cantidad de variables que describen tanto motilidad como velocidad y están altamente correlacionados entre sí, lo que dificulta la selección de variables que expliquen mejor el movimiento espermático.

Hacer uso de la información obtenida es difícil debido al elevado número de las variables de los espermatozoides y la falta de información sobre el significado biológico, y por lo tanto la importancia práctica de cada variable. (Martínez y col., 2006)

En un intento por mejorar la información obtenida por CASA, una serie de investigaciones recientes han utilizado una agrupación de procedimientos para estudiar la estructura de sub poblaciones de espermatozoides dentro del eyaculado de los mamíferos. Los resultados se procesan mediante análisis estadísticos multi-variados que permiten hacer un estudio de las características de las sub poblaciones espermáticas con características específicas de motilidad. Una alternativa para el estudio de esta infinidad de datos se basa en

la agrupación de variables de cada espermatozoide de acuerdo con las características comunes entre sí. Esto permite separar objetivamente los espermatozoides dentro de una muestra en subgrupos, agrupando y explicando sus patrones cinéticos con las variables que mejor lo describen (Martínez y col., 2006; Quintero, 2001 citado por Quintero, 2003).

Recientemente, un nuevo procedimiento, de agrupación simple ha sido incorporado a las últimas versiones del software SPSS. El Two-Step es un grupo de algoritmos de análisis escalable diseñado para manejar datos muy grandes, al igual que los generados con CASA. El procedimiento revela las agrupaciones naturales (o grupos) dentro de un conjunto de datos que de otro modo no serían evidentes (Martínez y col. 2006).

1.2. OBJETIVOS GENERALES

Determinar motilidad masal espermática en ovinos de pelo, y la determinación de motilidad individual mediante CASA (Análisis de Semen Asistido por Computadora).

1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar si existe una diferencia significativa en los datos obtenidos de motilidad masal, usando un análisis de varianza.

Determinación de índices de velocidad y movimiento espermático, mediante una reducción de datos para el estudio de sub-poblaciones espermáticas entre razas.

Determinar la presencia de sub-poblaciones espermáticas en eyaculados diluidos de cinco razas diferentes de ovinos de pelo en el trópico a partir de los datos proporcionados por CASA.

Determinar la raza con mejores valores de motilidad, de acuerdo con los resultados proporcionados por el programa SPSS 15.0 para widows.

1.3. HIPÓTESIS

Una muestra de semen está constituida por espermatozoides con distintos patrones de movimiento.

La evaluación de semen mediante motilidad masal no refleja el comportamiento de una muestra de semen.

2. CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. RAZAS OVINAS

2.1.1. Santa Cruz

Origen. Proviene de los ovinos de pelo de África occidental, que se introdujeron en el Caribe aproximadamente en el 1500, se le considera nativa de las islas vírgenes de Santa Cruz.

Ovinos de color blanco, fácilmente adaptables a distintos climas, en climas fríos, hay presencia de vellón, que se pierde en primavera. Su pelaje de medula hueca les permite tolerar la humedad, las altas temperaturas, y bajas temperaturas. Las hembras llegan a pesar 68 kg, los machos de 90 a 91 kg, el peso del cordero al nacimiento es de 3.5 kg aproximadamente (Burke, 2005).

Es una raza precoz y de larga vida productiva, no presenta estacionalidad reproductiva, llegando a alcanzar tres partos en dos años. Su tasa de pariciones es de 195 a 200% (Christiansen, 1994; Burke, 2005).

2.1.2. Blackbelly.

Originaria de la isla de Barbados en América Central. Se caracteriza por su buena prolificidad, poliestricidad anual y precocidad reproductiva. Sin embargo carece de aptitud lechera y conformación cárnica. Los carneros presentan un peso vivo entre 50-55 kg y las ovejas entre 40 a 45 kg. Las ovejas son multíparas presentando un 20% de partos simples, 40% de partos dobles y 30% de partos triples. A pesar de su gran difusión, se desconocen todavía aspectos básicos de su comportamiento productivo y reproductivo. Mucha de la información existente data de hace 20 años y existen evidencias de que algunos parámetros en estas razas han cambiado dada la dinámica que se da

en el tiempo en las poblaciones por los procesos de selección, adaptación o cruzamientos. La fertilidad entre varios años oscila de 68% a 88%, promediando 80.8%,(Amador., et al 2009).

2.1.3. Dorper

De origen sudafricano se desarrollo en 1930, a partir de las razas Dorset Horn y Blackhead Persian, no se le considera un como un verdadero ovino de pelo. La raza Dorper fue desarrollada para soportar los ambientes más severos, de climas y temperaturas extremas en las condiciones áridas de Sudáfrica, lográndose obtener un excelente animal.

Ovino de color blanco con cabeza negra, presencia de lana que se pierde en primavera/verano, lo que le da un grado de adaptabilidad. Peso adulto de las hembras en un rango de 77 a 91 kg y de los machos de 100 a 115 kg.

Raza precoz con un promedio de pariciones de 150% con un promedio de peso al nacimiento de 4.3 kg (Bactawar, 2003).

2.1.4. Pelibuey

Origen la costa de África occidental. La entrada de la pubertad depende principalmente del peso y la edad, sin influir las épocas de nacimiento. Esta agrupación incluye ovejas de tamaño, color y desempeño similares. Los colores más frecuentes “beige”, blanco y “beige”, y rojo cereza. Los machos alcanzan pesos adultos de 50 kg. Y las hembras de 38 kg, raza prolífica y rustica (Atto, s/f).

Porcentaje de fertilidad es de 90%, siendo mayor en temporada de lluvias. Su prolificidad entre 1.3 y 1.4 lo cual es menor que otras razas, no presenta una estacionalidad muy marcada con un intervalo entre partos de 242 días.

2.1.5. Katadhin

Se origino a partir de cruces de razas de lana, principalmente sulffolk, Wiltshire horn y ovinos de pelo de las islas vírgenes, desarrollada después de 20 años de

selección, puede presentar diferentes colores, presenta vellón en climas fríos que pierde entrando la primavera. Con un peso en las hembras de 55 a 75 kg y en machos de 80 a 113 kg. (Bactawar, 2003).

Presentando un 125 a 200 % de partos, con un promedio en peso del cordero al nacimiento de 3.5 kg (Bactawar, 2003).

2.2. EL SEMEN

El semen es la secreción masculina que contiene a los espermatozoides o células reproductoras, y secreciones de las glándulas accesorias. Contiene espermatozoides, proporciones diversas de líquidos y secreciones que revisten el tracto reproductor masculino y (Salisbury, y Vandemark, 1964) que normalmente es eyaculado en el aparato reproductor femenino durante la copula. El cual ha tenido un intenso estudio debido a su importancia en la inseminación artificial y en los problemas de esterilidad. (White 1958; citado por Hafez, 1978).

2.2.1. Composición del semen

El semen se compone de dos partes: una parte espermática y la parte del plasma seminal.

Plasma seminal. Constituido por las secreciones de las glándulas bulbo uretrales, la próstata, las vesículas seminales, el epidídimo y los conductos deferentes, siendo un vehículo isotónico, nutritivo y protector al permanecer tamponado, tendiendo hacia un PH normalmente neutro 5.9 - 7.3. Contiene también agentes antimicrobianos como la seminalplasma e inmunoglobulinas, y una gran variedad de hormonas como andrógenos, estrógenos, FSH, LH, gonadotropina coriónica, hormona del crecimiento, insulina, glucagon, prolactina, relaxina, destacando entre ellas las prostaglandinas(Angulo, 2003).

La parte espermática está compuesta de las células espermáticas (Hafez, 1978). Los espermatozoides se producen en los tubos seminíferos, a partir de las espermatogonias del epitelio germinativo, cuyas células están situadas en la parte exterior de dichos tubos. El proceso de formación de los espermatozoides recibe el nombre de espermatogénesis.

2.2.2. Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso largo y dirigido en el que las células madre diploides de la base de los tubos seminíferos (espermatogonias) se dividen por mitosis para mantener su número de cromosomas y de forma cíclica formar progenie que sufrirá progresivas divisiones meióticas, hasta diferenciarse en espermáticas haploides, que se liberan como espermatozoides. La espermatogénesis se divide en tres procesos principales: espermatocitogénesis, meiosis y espermiogénesis. La espermatocitogénesis cumple con dos funciones importantes: 1) divisiones mitóticas de las espermatogonias tipo A, que producen otras espermatogonias que no entran en el ciclo productivo de espermatozoides y que por tanto, mantienen la población, de células indiferenciadas. Estas divisiones de las células madre son las responsables de la capacidad de los machos de producir espermatozoides de forma continua durante toda su vida adulta. 2) las espermatogonias tipo A se transforman en espermatogonias tipo B, que se dividen por mitosis para producir espermatocitos primarios. Estos experimentan en dos ocasiones un proceso de meiosis para dar lugar a los espermatozoides. En la primera división meiótica, los cromosomas homólogos se reparten entre las dos células resultantes, creando así una condición haploide (Cunningham, 2008).

La espermatogénesis en carneros se divide en cuatro fases, probablemente sea similar en otras especies, los espermatozoides en desarrollo van emigrando paulatinamente de la membrana basal hacia el lumen de los tubos seminíferos como se considera en la (figura 1). Sin embargo, durante este lapso,

permanecen en contacto con el citoplasma de las células de Sertoli, o células sustentadoras, que probablemente los nutren (Hafez, 1978).

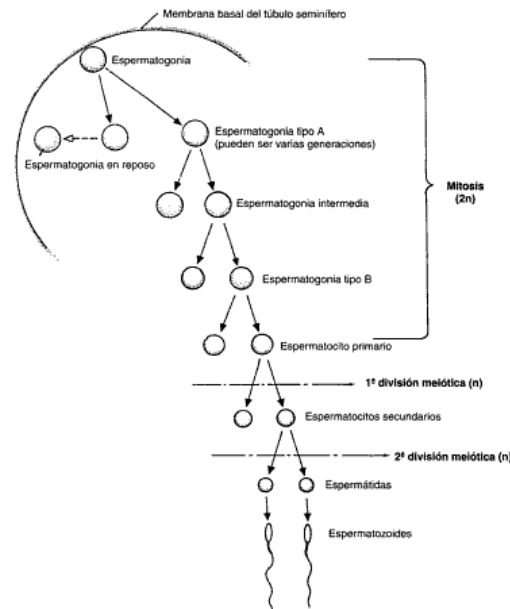


Figura 1 representación esquemática de la espermatogénesis

2.2.3. Paso de los espermatozoides por las vías excretoras genitales.

Edwards, (1940) citado por Salisbury y Vandemark, (1964) calculo el paso de los espermatozoides en la cabeza y cola del epidídimo, en conductos deferentes y en la ampolla que se necesitan de 4 a 7 días para el tránsito de aquellos por el epidídimo, en conejos, desde el testículo al epidídimo, mediante una ligadura epididimal. Solamente se precisan de 5-6 días para el tránsito de los zoospermos por el epidídimo en el carnero sometido a eyaculaciones frecuentes, y unos 11 días en carneros sin eyaculaciones frecuentes o bien reposo genital.

El epidídimo. Aun cuando su importancia es el almacenamiento de espermias algunos autores lo consideran como una parte de un sistema que ejerce funciones específicas y especializadas, encaminadas a la producción de espermatozoides completamente maduros y aptos para la fertilización.

Motilidad en el epidídimo, en un estudio práctico realizado en cuatro toros, cinco carneros y cuatro cobayos presentaron débiles movimientos vibratorios, de la cola, insuficientes para determinar el movimiento de todo espermatozoide. No se poseen datos sobre la duración de la vida fértil de los espermatozoides en el epidídimo escrotal aislado de grandes especies domesticas. Estudios demuestran que los espermatozoides de carneros obtenidos del cuerpo epididimal viven más tiempo que aquellos colectados de la cabeza o la cola del epidídimo. (Salisbury y Vandemark, 1964)

2.2.4. Composición química del semen.

Composición química del semen (mg/100cm ³)	
Constituyente o propiedad	Carnero
pH	6.9 (5.9-7.3)
Agua, g/100cm ³	85
Sodio	100
Potasio	70
Calcio	9
Magnesio	3
Cloro	86
Fructosa	250
Sorbitol	72 (26-120)
Acido cítrico	140 (110-260)
Inositol	12 (7-4)
Glicerifosforilcolina (GPC)	1650 (1100-2100)
Ergotioneína	0
Proteína g/100cm ³	5.8
Plasmalógeno	380

(Hafez, 1978)

2.2.5. Función del plasma seminal

La función principal del plasma seminal es transportar los espermatozoides al aparato reproductor femenino, ya que en la mayoría de las especies esta constituye un medio amortiguador en el que se encuentran compuestos que proporcionan energía en forma directa a los espermatozoides como: sorbitol, fructosa, etc. (White, 1958; Citado por Hafez, 1978).

2.3. COLECTA DE SEMEN

Para la colecta del semen se puede realizar con diversas metodologías, siendo las más empleadas en pequeños rumiantes: electro eyaculación y vagina artificial (Graham, 1978; citado por Cortes s/f; Pérez 1986). El electro eyaculador consiste en un electrodo bipolar que se inserta de 15 a 20 cm dentro del recto y a través del cual se realizan descargas eléctricas de 2 a 3 voltios, 100 a 150 μ A con una duración de 4 a 5 segundos (Angulo, 2003). Presenta una serie de inconvenientes tales como la contaminación por orina, menor resistencia de estos al choque térmico y al proceso de crio preservación, así como producir lesiones degenerativas, en los sistemas nervioso y muscular esquelético por las contracciones tan bruscas que ocasiona, por lo que (Garde) 1992 recomienda el uso de este en sementales de alto valor genético que por alguna causa no respondan a la vagina artificial (Duran, 1980; citado por López-Brea 1992). Proporciona mayor volumen de semen que la vagina artificial pero la concentración de espermatozoides es inferior. (Cabodevila S/F). También se puede hacer mención de los colectores vaginales, así como condones de ubicación intra-vaginal, en donde los primeros a pesar de los resultados satisfactorios que mostraron, existieron problemas como la ruptura de los mismos en el interior de la vagina, pérdida de material seminal, así como la contaminación de muestras (Pérez y Pérez 1985 citado por López-Brea 1992). El procedimiento primitivo de la colecta de esperma de la misma vagina se usa raramente, ya que dicho el semen resulta contaminado por las secreciones genitales. La colecta de semen mediante masaje de ampollas deferenciales y

de las glándulas accesorias, por vía rectal, ha caído en desuso ya que el semen colectado de esta manera frecuentemente es contaminado con orina y gran cantidad de bacterias (salisbury, y Vandemark, 1964). Lo que resulta de gran importancia no solo para la obtención de eyaculados de buena calidad, sino también para el adecuado uso de sementales (Pérez 1958 citado por López-Brea 1992).

2.3.1. Vagina artificial

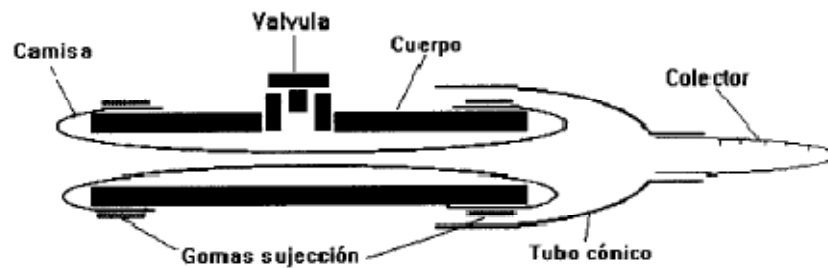
En 1914 el profesor italiano Amantea ideó la primera vagina artificial para obtener el semen de un perro con el llamado coito ficticio (Amantea, 1914 citado por Fernández 2001). Posteriormente fue adaptada por Ivanov del Instituto de Moscú en 1931 para ganado ovino (Moreno, 2001).

La vagina artificial es el método de colecta más difundido para la mayoría de los mamíferos como se menciona anteriormente, (Moreno, 2001; Garde, 1992; Hafez, 1978)

La vagina artificial intenta replicar, en lo más posible las condiciones de la vagina natural de una hembra (Garde, 1992 citado por Cortes s/f). La vagina artificial utilizada para pequeños rumiantes consta de:

- 1) *Cuerpo rígido* (de metal o caucho), que incluye una válvula de doble espita a través de la cual se añade agua y aire;
- 2) *Camisa interna*, de pared delgada que forma una cámara al doblarse hacia el exterior;
- 3) *Tubo cónico* o intermediario, que sirve de unión entre el cuerpo rígido y el tubo colector;
- 4) *Tubo colector*, situado al final del tubo cónico y generalmente de 10 ml de capacidad, graduado en 0,1 ml;

5) *Manta*, encargada de mantener la temperatura y proteger el semen frente a la luz. Como se muestra en la figura 2.



**Figura 2 sección esquemática de una vagina artificial usada para ovinos y caprinos
(Cortes s/f)**

2.4. MORFOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE

La morfología del espermatozoide es considerada como un reflejo del estado fisiológico del aparato reproductor (Saacke, 1983 citado por Garde, 1992). Los valores de morfo-anomalías aceptables, entre un eyaculado y otro va a cambiar de acuerdo con la especie, los valores aceptables para carneros se hallan comprendidos entre 15 y 20%, a pesar de esto no presentan una clara correlación con la fertilidad (Hafez, 1989). Estas se clasifican atendiendo a distintos criterios:

- a) Dependiendo de sí se originan en el testículo (anomalías mayores) o a lo largo del tránsito por epidídimo o tras la eyaculación (anomalías menores) (Bloom, 1977; Barth y Oko, 1989).
- b) Si están asociadas a infertilidad o no (primarias o secundarias, respectivamente) (Milovanov, 1938; Bloom, 1977).
- c) de la región espermática implicada (anomalías de la cabeza, de la pieza intermedia o de la pieza principal). Cualquier anomalía, primaria o secundaria, si afecta a un número elevado de espermatozoides, puede llegar a comprometer la fertilidad del semen.

Los espermatozoides de los mamíferos están constituido de 2 partes, la cabeza y la cola que a su vez se divide en tres partes que son: segmento medio, segmento principal, y segmento caudal o terminal (Hafez; et al, 2000)

Cabeza. Es un núcleo aplanado en donde encontramos la cromatina muy compacta.

Acrosoma. El extremo anterior del núcleo está cubierto por el acrosoma, un delgado saco membranoso de doble capa ubicado sobre el núcleo, se establece durante las últimas etapas de formación del espermatozoide es de gran importancia debido a que es la que se fusiona con el ovulo durante la fecundación.

Cola. Está formada por los segmentos medio, principal y caudal. (Hafez; et al, 2000) figura 3.

El flagelo se puede considerar que se compondrá de cuatro regiones: la pieza de conexión, la pieza intermedia, la pieza principal y la pieza terminal o al final (Fawcett; 1965 citado por Sharon Mortimer, 1997). La parte intermedia y la parte principal de la cola pueden presentar defectos, como: colas en espiral, colas rotas o dobladas. La Cabeza separada de la cola formas de decapitación, no se consideran espermatozoides ya que estos se definen por tener una cabeza y cola (Nieschlan et al., 2009).

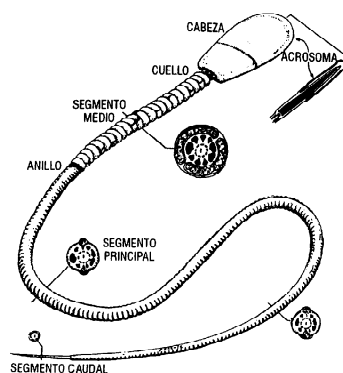


Figura 3. Representación grafica de las partes de un espermatozoide (Hafez et al 2000)

La parte principal de la cola está formada por un axonema, con una estructura radial de partes de micro túbulos dispuestos alrededor de este axonema. De igual forma la parte intermedia como la parte principal contiene una serie de elementos semirrígidos, vaina fibrosa, columnas longitudinales cuya función es la de otorgar direccionalidad y estabilidad al movimiento flagelar (Fawcett, 1965 citado por Mortimer, 1997) (figura 4)

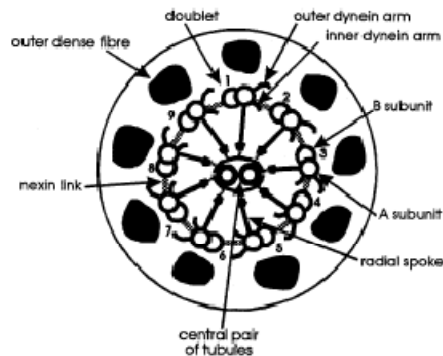


Figura 4 sección transversal del flagelo de un espermatozoide de mamífero (Sharon Mortimer 1997).

En las preparaciones líquidas, los espermatozoides humanos contienen citoplasma en una porción llamada gota citoplasmática, como se encuentra, también en otras especies, que puede extenderse desde el cuello hasta el final de la pieza intermedia. La presencia de gota citoplasmática que se puede observar en la mayoría de los espermatozoides móviles en preparaciones de muestras de semen, en diluyentes comerciales y en preparaciones de moco cervical (Fetic et al., 2006), demuestra que su presencia no refleja una célula disfuncional.

2.5. FISIOLÓGÍA DEL MOVIMIENTO ESPERMÁTICO

Se sabe que el movimiento se produce como resultado del deslizamiento de los componentes del axonema, sin embargo, el mecanismo exacto aún no se ha estudiado por completo. La energía para el movimiento flagelar se deriva de la dineína-ATPasa, que cataliza la hidrólisis del ATP de los microtúbulos, que son

las unidades de deslizamiento. El ATP se regenera por la descomposición de la glucosa o fructosa a lactato por la glucólisis, y por la oxidación mitocondrial de substratos a través del ciclo del ácido cítrico (Ford y Rees, 1990; citado por Mortimer, 1997).

La hipótesis de deslizamiento de los filamentos para el movimiento flagelar postula que la flexión se produce como resultado de las fuerzas de cizallamiento activo, llevado a cabo en los ápices de los dobletes en los microtúbulos, que conducen a un movimiento de deslizamiento generado, a través de los brazos de dineína. Se cree que la unión de ATP a los brazos de dineína, y su posterior hidrólisis ocasiona un cambio de ciclo en el ángulo de los brazos de dineína, que es coordinada con la realización de la separación y adhesión en sucesivos puntos de unión a lo largo de los microtúbulos adyacentes. Esta unión y separación resulta en un ciclo de movimiento de deslizamiento causado por cambiar la unión de los brazos de dineína de un microtúbulo a otro cercano. Estos movimientos hacen que se genere un movimiento de flexión (Gibbons, 1974; citado por Mortimer, 2006). Cuando el ritmo de deslizamiento se pierde por cualquier razón, este se puede reanudar a diferente ritmo (Eshel et al., 1992; citado por Mortimer, 2006).

La parte intermedia contiene las mitocondrias estructuradas en una vaina mitocondrial, cuya función es generar la energía necesaria para el mantenimiento del movimiento del axonema (Gagnon, 1995; citado por Quintero, 2003).

Lo que genera que la cola presente un patrón de movimiento rotacional y elíptico, el que se transmite a la cabeza del espermatozoide a través del cuello. Este movimiento rotacional es el que otorga en última instancia progresividad al movimiento espermático (Mortimer, 2000; citado por Quintero, 2003), esto explica que dentro de los parámetros de motilidad originados por el CASA, de los más importantes estén relacionados con el desplazamiento de la cabeza (Mortimer, 2000).

2.5.1. Metabolismo espermático

Las reacciones productoras de energía que tienen lugar en el semen (Mann, 1964; White, 1958; citados por Hafez, 1978), están limitadas a los espermatozoides. Ya que el semen azoospermico está desprovisto de actividad metabólica. En el semen hay por lo menos cuatro sustancias que los espermatozoides pueden utilizar directa o indirectamente, como fuente de energía para el sostenimiento de la movilidad. Estas sustancias son: fructosa, sorbitol, GPC y el plasmogeno (Hafez, 1978).

Los espermatozoides, carecen de muchos de los orgánulos que participan en los procesos metabólicos. Pero a pesar de ser células muy simples en cuanto a su actividad metabólica, poseen las enzimas necesarias para realizar las reacciones bioquímicas que constituyen la glucolisis. Además, experimentan procesos metabólicos como el ciclo del ácido tricarboxílico, la oxidación de ácidos grasos y el transporte de electrones (Hammerstedt y col., 1988; citado por Muiño, s/f). Para mantener tasas adecuadas de generación de ATP el espermatozoide dispone de dos mecanismos:

Glucolisis anaerobia: en ausencia de oxígeno los espermatozoides degradan ciertos compuestos que son capaces de atravesar la membrana, como son glucosa, fructosa o manosa, a ácido láctico y ATP (Rodríguez-Gil, 2006; citado por Muiño s/f; White, 1958; citado por Hafez, 1978).

Respiración: en presencia de O_2 , los espermatozoides pueden utilizar una variedad de sustratos para generar la energía. La actividad respiratoria permite emplear el lactato o el piruvato resultantes de la glucolisis, produciendo CO_2 y H_2O como productos de desecho (Rodríguez-Gil, 2006; citado por Muiño, s/f; White, 1958; citado por Hafez, 1978).

2.5.2. Función mitocondrial

Las mitocondrias representan la central energética del espermatozoide, y suministran energía, en forma de ATP, a los brazos de dineína de cada doblete de microtúbulos. Los brazos de dineína, que realmente son moléculas ATP-asa, degradan el ATP liberando la energía que permite el movimiento del flagelo. Cada doblete presenta dos brazos de dineína dirigidos hacia el doblete adyacente, que al ser estimulados por el ATP actúan como “ganchos” y se desplazan a lo largo del doblete adyacente. El resultado es el deslizamiento de un doblete sobre otro. Los radios de unión entre cada doblete y el par central se resisten al deslizamiento, originando la curvatura del flagelo (Muiño, s/f).

2.6. ANÁLISIS SEMINAL

Tiene por objeto valorar la calidad de un eyaculado, para poder determinar la funcionalidad del macho como reproductor. En la actualidad se han desarrollado varios métodos de evaluación de semen para valorar la vitalidad del mismo y su capacidad fecundante (Maxwell y Evans, 1990 citado por Cortés, s/f).

La Sociedad de Teriogenología, que reúne a especialistas en reproducción animal de todo el mundo, recomienda un sistema de evaluación de fertilidad que se basa en la circunferencia escrotal (40%), morfología espermática (40%) y motilidad espermática (20%). Esto se debe a que estos tres criterios se relacionan significativamente con las tasas de preñez (Duchens, 2010).

El método definitivo para la valoración de un semental es el nacimiento de un nuevo individuo, sin embargo su costo es elevado y su periodo de prueba prologado. Por lo tanto no es frecuentemente utilizado, tratando de desarrollar nuevos métodos de laboratorio que correlacionen con la fertilidad (Cortés, s/f).

Significado de la calidad seminal.

Las determinaciones de volumen de eyaculado, del número de espermatozoides y de la proporción de células que presentan una motilidad

vigorosa es una cuestión de trabajo rutinario en centros de reproducción. La información de estos análisis no solo suministra información para diluciones de semen y su distribución en el hato, sino que aporta continuamente una serie de datos referentes a la capacidad de cada semental, en cuanto a su producción de esperma. El volumen y la concentración espermática de un eyaculado proporcionan información para calcular un nivel óptimo de dilución con la que los espermatozoides mantengan un cierto número con una adecuada motilidad. El grado de motilidad sirve de medida de vigor innato de los espermatozoides, y si bien es cierto que el inmediato objetivo de la preparación del semen consiste en inhibir su motilidad hasta un cierto nivel compatible con la crio preservación, en condiciones también óptimas, la capacidad fecundante, se admite que en cuanto más intensa sea la motilidad inicial, más fácilmente se recupera la motilidad después de su inhibición (Salisbury y Vandemark, 1964).

2.6.1. Volumen de eyaculado

El volumen va a depender de diferentes factores entre ellos están el método de colecta, teniendo un mayor volumen cuando se usa electro-eyaculador en comparación con la vagina artificial. La edad del carnero, la época de colecta, la frecuencia de colecta y la habilidad del técnico cuando se usa vagina artificial. El volumen de eyaculado de un macho adulto es de 0.5 ml a 2 ml y en animales jóvenes de 0.5 ml a 0.7 ml. (Hafez, 2000).

2.6.2. Apariencia

El color del semen ovino tiene coloraciones lechosas o crema pálido. Una coloración rosada indica presencia de sangre, quizá por una lesión en el pene, mientras que una coloración grisácea o parda nos sugiere una posible infección en el tracto reproductivo. La coloración amarillenta indica la presencia de orina en el eyaculado (Hafez et al., 2000). La coloración también puede estar directamente relacionada con el consumo de carotenos en la alimentación.

2.6.3. Motilidad individual

La movilidad individual es una de las pruebas que con mayor frecuencia se utilizan para evaluar la calidad seminal y en algunas especies parece estar correlacionada con la capacidad fecundante del espermatozoide (Maxwell y Evans, 1990; citado por Cortes, s/f).

Entre los diversos métodos para mediciones objetivas de la motilidad de los espermatozoides, el seguimiento de las imágenes de vídeo de espermatozoides individuales por CASA proporciona datos objetivos sobre la velocidad. (Hafez et al., 2000)

La movilidad espermática se valora rutinariamente de manera subjetiva mediante un microscopio óptico (10 x ó 20x) sobre una gota de semen diluido en una solución isosmótica, determinando el porcentaje de espermatozoides móviles y su calidad de movimiento (Hafez., et al 2000; Maxwell y Evans, 1990; citado por Cortes, s/f). Los actuales sistemas de análisis de imagen asistidos por ordenador ó sistemas CASA (Computer-Assisted- Sperm-Analysis) son capaces de determinar, de manera objetiva, toda una serie de parámetros de velocidad y angularidad (O'Connor et al., 1981; Jasko et al., 1988; Tuli et al., 1992; Theau-Clement et al., 1996, citados por Cortes, s/f), que colaboran en el establecimiento de un grado de calidad de movimiento. Además de determinar la proporción de espermatozoides móviles, estos sistemas permiten la medición de parámetros cinemáticos, tales como la velocidad de los espermatozoides, la linealidad, y la amplitud de los desplazamientos laterales de la cabeza (Mortimer, 1997).

La motilidad espermática se examina en una muestra fresca ésta se realiza a temperatura ambiente (entre 20 y 24°C) preferentemente a 37° C y se expresa como el porcentaje de células que presentan las siguientes clases de movilidad: (Hermann, 2010).

- PR: motilidad progresiva (movimiento, tanto lineales como en los arcos grandes.

•NP: motilidad no progresiva (movimiento sobre el terreno, movimiento flagelar en círculos pequeños).

•IM: inmovilidad (sin movimiento).

Subdivisión de los espermatozoides progresivamente móviles en rápido y lento a menudo es tratado, pero es difícil para los técnicos evaluar con precisión las velocidades (Cooper y Yeung, 2006; citado por Hermann, 2010). En donde para la medición de las velocidades espermáticas se requiere de una temperatura de 37° C y los sistemas de CASA.

2.6.4. Motilidad masal

Debido a la alta concentración espermática que tienen los rumiantes es posible determinar la motilidad masal (Maxwell y Evans, 1990). Se coloca una gota de semen sin diluir en un portaobjetos atemperado y se observa al microscopio con objetivo 10X. Se observa el movimiento en masa que presentan los espermatozoides y se valora en una escala del 1 al 5 de acuerdo a la presencia de movimiento. (Carbonero D. 1954; Maxwell y Evans, 1990; citados por Cortes, s/f) Bajo el siguiente criterio de motilidad masal:

Valores de Motilidad Masal

- 0 No hay movimiento
- 1 Hay movimiento sin olas
- 2 Olas escasas o lentas
- 3 Olas abundantes y de rápido movimiento
- 4 Olas y remolinos
- 5 “Tempestad”

(Evans y Maxwel, 1990; citado por Cortes, s/f)

2.6.5. Concentración espermática

El número de espermatozoides en el eyaculado puede reflejar la producción de espermatozoides en el testículo, la permeabilidad del sistema ductal y las reservas de esperma del epidídimo. Además que la concentración de espermatozoides refleja el grado de dilución de la glándula accesoria y de esperma emitido desde el epidídimo a través de la uretra en el momento de la eyaculación, no proporciona ninguna información biológicamente relevante acerca de los testículos o las glándulas accesorias.

Se mide con el fin de calcular el número total de espermatozoides en la eyaculación, que se obtiene multiplicando la concentración de espermatozoides por el volumen de semen.

La concentración espermática se determina en una cámara de conteo, preferiblemente una cámara Neubaver. Esta cámara tiene una profundidad de 100 micras. El número de espermatozoides obtenidos en un eyaculado depende no sólo del tiempo de abstinencia, sino también en el volumen testicular. La concentración normal de los carneros varía de 3.5×10^9 a 6×10^9 espermatozoides por mililitro. (Hafez et al., 2000). Recientemente se usa la citometría de flujo de ADN para permitir la determinación precisa de los espermatozoides se basa en su grado de tinción de ADN. Dado que este método permite que varios miles de células sean contadas en muy poco tiempo, puede tener una alta precisión eso es posible gracias a que los errores estadísticos de conteo se reducen al mínimo (Klom, 1999 y Eustache et al., 2001).

2.6.6. Concentración espermática mediante casa

Los sistemas CASA permiten determinar la concentración espermática de la muestra. Sin embargo, Verstegen y col., (2002) citado por Muiño, (s/f) demostraron, utilizando muestras de semen de distintas especies, se tienden a sobreestimar la concentración de espermatozoides de la muestra, debido a las

colisiones espermáticas, el mismo espermatozoide puede ser contabilizado varias veces. Cuanto mayor es la tasa de dilución los problemas de sobreestimación de la concentración tienden a disminuir (Muiño, s/f).

Se reconoce que los sistemas CASA proporcionan datos fiables solo en un rango óptimo de concentración espermática, dado que en presencia de pocos espermatozoides el análisis es logísticamente impracticable mientras que, en presencia de demasiados surgen errores en la estimación de la concentración y de los movimientos, debido al cruzamiento de trayectorias de los espermatozoides (Irvine, 1995). Las muestras de semen fresco deben ser diluidas antes del análisis computarizado a fin de reducir la concentración de espermatozoides y así, permitir el análisis de las trayectorias individuales; de modo que el diluyente utilizado para reducir la concentración debe estar libre de partículas de tamaño semejante al tamaño de la cabeza del espermatozoide, para evitar su clasificación como espermatozoide inmóvil (Malmgren, 1997, citado por Martins, 2005).

2.7. MÉTODO CASA

La determinación objetiva de la motilidad de una muestra no siempre es posible basándose en un examen visual, por la subjetividad inherente y a la reducida cantidad de la muestra. En consecuencia, evaluar una muestra de semen con base en este parámetro podrá resultar en una baja correlación con la fertilidad in vivo. Los sistemas de análisis de imagen computarizados, CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), han sido desarrollados inicialmente para su uso en el análisis de la motilidad del semen humano (Johnson y col., 1996; citado por Martins, 2005). Estos sistemas posibilitan un análisis de la motilidad automático, rápido y objetivo (Anzar y col., 1991; Malmgren, 1997; citados por Martins, 2005), basado en la evaluación de los espermatozoides individualmente, proporcionando un cálculo preciso de los distintos parámetros seminales (Verstegen y col., 2002; citado por Martins, 2005).

El análisis asistido por ordenador CASA se presentó por primera vez a mediados del decenio de 1980, se pensó que desplazarían el laboratorio de andrología, desafortunadamente estas máquinas de primera generación no proporcionaron resultados muy precisos para analizar semen (Mortimer y Mortimer, 1988, 1998; citado por Mortimer 1997).

Es a la fecha donde el sistema CASA ha tenido un papel importante en los laboratorios de andrología clínica e investigación. En la actualidad se considera una herramienta clínica muy poderosa. De hecho, su inclusión en estudios de toxicología reproductiva indica su relevancia (Slott et al., 1993; citado por Mortimer 1997).

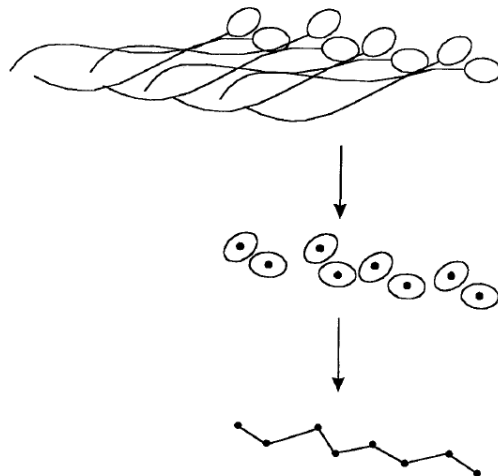


Figura 5 Reconstrucción de la trayectoria de un espermatozoide.

Los sistemas de análisis de la motilidad espermática se basan en la utilización de un microscopio de contraste de fases (contraste negativo), a partir del cual y por medio de una cámara de video se obtiene la imagen. Estas se digitalizan, identificando a las células espermáticas que contiene la primera imagen, después se procede al seguimiento de las células en imágenes sucesivas como se muestra en la figura 5 y al establecimiento de las trayectorias, estas trayectorias a continuación, son aplicados varios algoritmos para analizar la motilidad espermática (Amann, 1989; Krause, 1995; citado por Martins, 2005). Básicamente existen 2 tipos principales de sistemas CASA, uno que captura

una secuencia de 20 imágenes en aproximadamente 0,8 segundos y analiza los movimientos del espermatozoide retrospectivamente y otro que opera en tiempo real en periodos de tiempo prolongados (Holt, 1996; citado por Mortimer, 1997).

2.7.1. Evaluación mediante casa.

El método (CASA) permite contar el número de células espermáticas, de acuerdo al tamaño de estas, por medio de la captura de una imagen que es tomada con un microscopio de contraste de fases, esta imagen es digitalizada. En general para identificar la imagen de la cabeza como un espermatozoide debe de contar con los parámetros de altura y anchura del espermatozoide (Mortimer, 1997). El conteo de la cabeza de los espermatozoides ha visto obstaculizado por la presencia de partículas que no son espermas, incluyendo todas las células en el semen reconocido por el programa como espermatozoides. Lo que se plantea para superar esto es:

Aceptar sólo formas de la cabeza ovalada, con base en las medidas del eje mayor y menor y su relación.

Proporcionar la detección de algoritmo que analiza las proyecciones a lo largo del eje de la cabeza del espermatozoide. Sin embargo, para determinar las concentraciones de esperma con precisión, especialmente para las muestras con pocos espermatozoides, aún no se ha establecido y está obstaculizado por las cámaras de baja profundidad en la que fluye el semen la cámara hace una distribución desigual de espermatozoides (Douglas-Hamilton et al., 2005).

2.7.2. Definición de parámetros medidos por casa

Parámetros que definen la velocidad se utilizan comúnmente para la descripción del movimiento del centroide del esperma humano. Estos son la velocidad curvilínea (VCL), la velocidad en línea recta (VSL) y la velocidad media de la ruta (VAP) (Boyers et al., 1989; citado por Mortimer, 1997). Cada

una de estas velocidades describe un aspecto diferente de la progresión de los espermatozoides (Mortimer, 1997):

La VCL. Velocidad curvilínea es la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria curvilínea, y se calcula mediante la suma de las distancias a lo largo de la trayectoria.

El VSL. Es la distancia en línea recta entre el primer y el último punto de la trayectoria y da la ganancia de espacio neto en el período de observación. Este es el más bajo de los 3 valores de velocidad para cualquier espermatozoide.

El VAP. La velocidad media indica la longitud de la trayectoria general de los espermatozoides.

Esto es conceptualmente el valor de velocidad más difícil de entender porque podría parecer que debería ser similar a la VSL. En los casos en que la trayectoria de la cabeza del espermatozoide es muy regular y lineal, con un movimiento lateral muy poco, entonces el VAP es casi la misma que la VSL. Sin embargo, con trayectorias irregulares, como los que no son lineales, o cuando hay un alto grado de la desviación lateral de la cabeza de la dirección del movimiento, entonces la VAP puede ser mucho más alta que la VSL. (Mortimer, 1997), (figura 6).

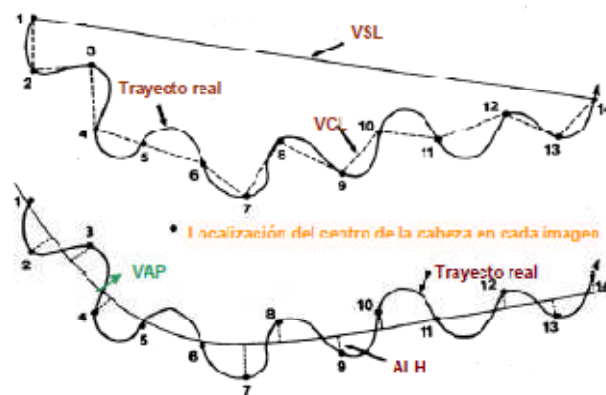


Figura. 6 Parámetros utilizados en el análisis computarizado por motilidad (Budworth y col. 1988; citado por Martins, 2005).

Para describir la trayectoria se han desarrollado más de tres valores de relación de velocidad. Estos son linealidad (LIN), una comparación de las trayectorias en línea recta y curvilínea, la rectitud (STR), una comparación de las trayectorias en línea recta y media, y movimiento lateral (WOB) una comparación de los trayectos curvilíneos y media (Boyers et al., 1989 citado por Mortimer, 1997).

LIN (Índice de Linealidad): es la relación porcentual entre la Velocidad Rectilínea y la Velocidad Curvilínea. LIN: $(VSL / VCL) \times 100$

STR (Índice de Rectitud): es la relación porcentual entre la Velocidad Rectilínea y la Velocidad Lineal. STR: $(VSL / VAP) \times 100$

WOB (Índice de Oscilación): es la relación porcentual entre la Velocidad Lineal y la Velocidad Rectilínea. WOB: $(VAP / VCL) \times 100$

Parámetros de angularidad y oscilación de la cabeza:

(ALH) La amplitud de desplazamiento de la cabeza es la anchura del movimiento lateral de la cabeza del espermatozoide. Se calcula como el ancho total de la trayectoria de la cabeza (en lugar de la mitad de la anchura, que es el valor de la amplitud utilizada en física y matemáticas) y se expresa en micrómetros (David et al., 1981; citado por Mortimer, 1997).

(FBC) La frecuencia del golpe de cruz. FBC se expresa en hertz y se calcula contando el número de veces que la trayectoria curvilínea cruza el camino promedio por segundo. Fue desarrollado para dar una indicación de la frecuencia de batido del flagelo, ya que cada vértice es el resultado de un cambio en el latido flagelar, y cada vez que la trayectoria curvilínea cruza en el camino medio es el resultado de un latido flagelar nuevo, suponiendo que el espermatozoide gira con inicio en cada latido (Serres et al., 1984; citado por Mortimer, 1997).

2.7.3. Importancia de los parámetros de casa.

El desarrollo de análisis de espermatozoides asistido por ordenador (CASA) ha permitido obtener grandes cantidades de información objetiva de las características de cinemática y morfometría de una muestra de semen (Núñez-Martínez y col., 2006), además el CASA proporciona toda una serie de datos objetivos de las células móviles presentes en la muestra y el tipo de movimiento (Amann, 1989; Anzar et al., 1991) además permite identificar la existencia de sub poblaciones con distintos patrones de movimiento.

La tecnología de CASA se ha utilizado en estudios sobre la motilidad del espermatozoides de muchas especies como: En las ratas, VSL está positivamente correlacionada con la fertilización in vitro (Moore y Akhondi, 1996; citato por Mortimer, 2000), y en los verracos, VSL se correlaciona con el número de lechones por camada (Holt et al., 1997; citato por Mortimer, 2000). En los seres humanos, estudios demuestran la variación en VSL de los hombres con sub-fertilidad y fértiles (Liu et al, 1991; Leidl et al., 1993; Wainer et al, 1996). En el espermatozoides de gallo se encontró que tiene un mayor VSL, también muestra una tendencia a seguir un camino más recto (Froman y Feltmann, 2000; citato por Mortimer, 2000). En semen fresco de verracos (Vizcarra y Ford, 2006; citato por Mortimer, 2000) y pavos (King et al., 2000; citato por Mortimer, 2000) mostraron una correlación significativa entre la movilidad de los espermatozoides y las mediciones de (BCF, VAP, VCL, y VSL). Esto indica que los espermatozoides de mayor movilidad avanzan más rápido que el espermatozoides de baja movilidad, como se indica por BCF, VSL, y la velocidad de LIN (King et al., 2000; citato por Mortimer, 2000).

2.8. SUB-POBLACIONES ESPERMÁTICAS

Recientemente se ha determinado, que asumir una distribución normal del movimiento entre los eyaculados, no lleva a una evaluación eficiente, de los efectos de diferentes factores sobre la motilidad (Núñez, 2006) lo que indica que una manera de evaluar a los eyaculados es considerando que están formados por diferentes poblaciones según su motilidad, o sub poblaciones

espermáticas. En un intento por mejorar la información obtenida por CASA, una serie de obras recientes han utilizado agrupación de procedimientos para investigar la estructura de sub población de espermatozoides dentro de la eyaculación de mamíferos (Abaigar et al, 1999; Chantler et al, 2004; Martínez-Pastor et al, 2005). Estos autores ocuparon modelos estadísticos sofisticados y software específicos, que ayudaron a obtener nueva información acerca de las características biológicas de los eyaculados en mamíferos. Recientemente un nuevo procedimiento de agrupación simple, se ha incorporado a las últimas versiones del software SPSS. El llamado Two-step es un grupo de algoritmos escalables de análisis diseñado para manejar datos muy grandes lo que establece, al igual que los generados con CASA

Estudios recientes han demostrado la existencia de sub-poblaciones espermáticas dentro de los eyaculados de los mamíferos, las que se definen por los patrones de movimiento espermático. (Holt, 1996; Aabagair et al., 1999 y 2001; Turston et al., 2001). La existencia de estas sugiere alguna relación con la capacidad fecundante de una muestra de semen. En el estudio del eyaculado de cerdo, donde las sub-poblaciones fueron clasificadas de acuerdo a su motilidad o morfometría se formaron tres grupos o sub poblaciones (Aabagair et al., 1999; Turston et al., 2001). En cuanto estudio de sub-poblaciones en ovinos es poca la información existente a pesar de su gran producción comercial a nivel mundial. Por otro lado la existencia de sub-poblaciones con distintos patrones de motilidad no se puede apreciar en los análisis seminales clásicos. (Quintero M, A. A. 2003).

2.8.1. Identificación de sub poblaciones a través de casa

El estudio de las sub-poblaciones espermáticas con sus características específicas de motilidad son parámetros analizados mediante el sistema de análisis asistido por computadora de la motilidad (CASA), esta tecnología nos permite hacer mediciones rápidas y precisas de los espermatozoides en tiempo real. Proporcionando la descripción del movimiento de cada espermatozoide.

Varias sub-poblaciones de espermatozoides puede ser determinada por CASA en diferentes especies.

En cerdos (Abaigar et al, 1999; Thurston et al, 2001) describe el comportamiento de tres sub poblaciones espermáticas 2 con un movimiento progresivo y una tercera con bajo movimiento. En la gacela se encontraron 4 sub-poblaciones en semen descongelado, con diferentes valores en los parámetros determinados por CASA (Abaigar et al., 1999), en perros revelaron la presencia de seis sub-poblaciones, caracterizadas por diferentes índices de velocidad e índices de movimiento (Nuñez et al., 2006), en semen fresco de caballo demostró la presencia de 4 sub-poblaciones con distintos valores en los parámetros de movimiento generados por CASA (Quintero-Moreno et al., 2003), y en hámster dorado (Holt, 1996 citado por Mortimer, 2000). (Harrison, 1996; citado por Mortimer, 2000) también informó de las sub-poblaciones de espermatozoides cuando se utiliza la citometría de flujo. Esta prueba es importante porque en la evaluación de móviles esperma, los procedimientos pueden ser desarrollados para sub-poblaciones separadas. Por ejemplo, en cerdos, 3 sub-poblaciones de espermatozoides se observaron con poca variación entre los machos y un importante variación en las mediciones de la motilidad de cada sub-población (Quintero-Moreno et al, 2004; citado por Mortimer, 2007). Las diferencias en las sub-poblaciones podría dar ventajas a la fertilidad seleccionando semen con sub poblaciones de mejor comportamiento (Mortimer, 2000).

2.9. AGRUPACIÓN DE DATOS (CLUSTERING)

El análisis de cluster en la investigación es utilizado para la segmentación de datos y comprensión del comportamiento.

El análisis Cluster es un conjunto de técnicas utilizadas para clasificar los objetos o casos en grupos homogéneos llamados *conglomerados (clusters)* con respecto a algún criterio de selección predeterminado. Los objetos dentro de cada grupo (conglomerado), son similares entre sí (alta homogeneidad interna)

y diferentes a los objetos de los otros conglomerados o clusters (alta heterogeneidad externa). Es decir, que si la clasificación hecha es óptima, los objetos dentro de cada cluster estarán cercanos unos de otros y los cluster diferentes estarán muy apartados. Por ello, es también conocido como análisis de clasificación o taxonomía numérica. (Johnson y Wichern, 1982)

Interpretación y perfil de los grupos

Comprende el análisis de los *centroides de grupo* (valores medios de los objetos que contiene el grupo en cada una de las variables).

Los centroides permiten dar un nombre a cada grupo. El objetivo de esta etapa es, esencialmente, examinar la variación de los clusters para asignar etiquetas que describan de un modo veraz su naturaleza. Resulta útil elaborar el perfil de los grupos en términos de las variables utilizadas para el conglomerado, como los datos demográficos, los psicográficos, uso del producto, uso de los medios u otras variables (Johnson y Wichern, 1982).

CAPITULO III MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. LOCALIZACIÓN.

El experimento se realizó durante el periodo diciembre del 2010 – abril del 2011 en las instalaciones del Centro de Selección y Reproducción Ovina (CeSyRO), perteneciente al Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, ubicado en el km 16.3 antigua Carretera Mérida-Motul, Conkal, Yucatán, el cual queda comprendido entre los paralelos 21° 02' y 21° 08' latitud norte y los meridianos 89° 29' y 89° 35' longitud oeste; posee una altura promedio de 8 msnm. Predomina el clima cálido sub húmedo con lluvias regulares en verano (mayo - julio). Tiene una temperatura media anual de 26.6°C y precipitación pluvial media anual de 469 milímetros. Humedad relativa promedio anual: marzo 66% - diciembre 89%.(INEGI, 2007)

3.2.MATERIALES

3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.2.1.1. Sementales ovinos

Se trabajó con 20 sementales ovinos de 5 razas diferentes, Blackbelly, Dorper, Katadhin, Pelibuey y Santa Cruz agrupados en un diseño completamente al azar donde raza es el efecto fijo. Las condiciones de los sementales fueron: edad 39 ± 18 meses, peso 62.9 ± 26 kg, condición corporal 3.1 ± 1 y diámetro testicular 32.6 ± 13 cm.

3.2.1.2. Hembra

Preparación de oveja maniquí

Se asignó una oveja maniquí de la raza Blackbelly la cual se indujo al celo con ECP (estradiol) aplicada intramuscular en dosis de 1.5 ml diarios durante 3 días pre-colecta



Figura 7. Razas de Carneros utilizadas en la colecta de semen: Blackbelly, Dorper, Katadhin, Santa Cruz, Pelibuey (CESYRO) Instituto Tecnológico de Conkal

3.3. MATERIAL EMPLEADO EN LA COLECTA

- Tubos colectores de cristal graduados en 0,1 ml
- Baño María (ajustada a + 37° C)
- Funda protectora para vagina artificial.
- Manga de sujeción de la hembra
- Tubos cónicos intermediarios entre vagina artificial y tubo colector
- Vagina artificial de ovino tipo francesa
- Cámara Makler
- micro pipeta 0.5 – 10 μ l
- Microscopio óptico y de contraste de fases

- Cámara Neubauer

3.3.1. Reactivos usados

- Glutaraldehído al 0.2%
- Triladyl
- Agua destilada
- Yema de huevo

3.4. MÉTODO.

Los sementales se colocaron en la manga de manejo para su evaluación individual. La edad de cada semental se obtuvo a partir de los registros que se llevan a cabo en el CeSyRO. El pesaje se realizó en una báscula para ganado y se hizo de forma manual. La condición corporal se determinó a través de la palpación de la zona lumbar con una escala de cinco puntos, técnica descrita por Jefferies (1961), adicionando la palpación alrededor de la cola como otra medida de condición corporal (Teixeira *et al.*, 1989). El diámetro testicular se midió con una cinta métrica decimal, que se colocó en la parte más ancha del escroto y en forma circular. Así mismo se revisaron los animales con la finalidad de detectar enfermedades y a su vez se desparasitaron con Ivermectina (0.5 ml por cada 25 kg). También, se realizó recorte de pezuñas, esquila y corte de pelo del prepucio.

3.4.1. Colecta de semen

Se utilizó la técnica de la vagina artificial (VA) descrita por Sorensen (1991). Diariamente se colectó semen, de cada grupo obteniendo una muestra por animal (20 muestras) una colecta por grupo por día. Los sementales se encontraban agrupado por raza quedando 5 grupos (n=4).

La VA era de tipo francesa de 40 a 50 cm de largo y de 7 a 10 cm de diámetro, esta consiste en un tubo rígido provisto de válvula con tapa, funda interna elástica, cono de látex sujeto a un extremo de la VA y tubo colector de semen graduado. Además de una funda de cuero en la que se coloca la VA armada, con agua a 50°C y a temperatura, con la finalidad de proteger la muestra de semen de los rayos UV y mantener la temperatura.



Figura 8 Vagina artificial usada en la colecta de semen, desarmada.

El proceso de la colecta de semen se realizó sujetando la oveja maniquí, colocando la cabeza dentro de la prensa y dejando los cuartos traseros expuestos. El operador se colocaba a la derecha de la hembra sujetando la VA con la mano derecha. Con la otra mano se desvía el pene dirigiéndolo a la abertura de la VA teniendo solo contacto con el prepucio, como se puede apreciar en la figura 9.

3.4.2. EVALUACIÓN DE SEMEN

Una vez realizada la colecta, el tubo colector se colocó en baño maría a 37°C, evitando los cambios de temperatura que puedan afectar la calidad seminal. Para la evaluación seminal, esta se dividió en dos partes: examen macroscópico y examen microscópico.



Figura 9. Colecta de semen. CESYRO Instituto tecnológico de Conkal



Figura 10. Semen en tubo Colector

3.4.2.1. Examen macroscópico

Consistió principalmente en analizar las características más visibles del semen, como se muestra en la figura 10.

- Volumen: Este se determinó a partir del contenido total del eyaculado por macho, la lectura se tomaba directamente del tubo colector.
- Color: Dependía principalmente de la concentración espermática (CE) y el color variaba desde blanco cremoso hasta blanco transparente.

3.4.2.2. Examen microscópico

Consistió en analizar principalmente la Motilidad Masal (MM) e Individual (MI) y Concentración Espermática (CE), (figura 11).

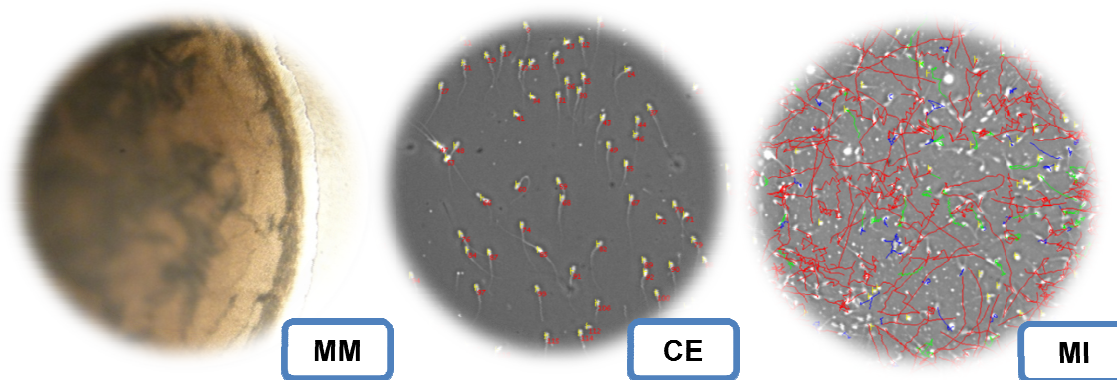


Figura 11. Motilidad masal (MM), concentración espermática (CE), motilidad individual (MI).

3.4.2.2.1. Motilidad masal

- Motilidad Masal: se colocó una gota de semen sin diluir en un portaobjetos atemperado a 37°C y se observó en microscopio con objetivo 10x – 2PH. El movimiento en masa que presentaron los espermatozoides se valoraron del 1 al 5 (Carbonero . 1954; Maxwell y Evans, 1990) como se muestra en el Cuadro 1

Cuadro 1: Movimiento espermático

MOTILIDAD MASAL		
1	+	No hay movimiento
2	++	Hay movimiento sin olas
3	+++	Olas escasas o lentas
4	++++	Olas abundantes y de rápido movimiento
5	+++++	Olas y remolinos “Tempestad”

3.4.2.2.2. Concentración espermática por casa

- **Concentración Espermática:** se llevó a cabo usando la Cámara Neubauer, con una dilución 1:1000. En un microtubo de 1.5 ml se colocó 1ml de Glutaraldehido al 0.2% (Lee *et al.*, 1987) y se agregó 1 μ l de semen puro. Posteriormente se agitó y se tomó 10 μ l con micropipeta 0.5 – 10 μ l colocando la muestra en Cámara Neubauer, llenando ésta por capilaridad. Una vez cargada la Cámara Neubauer se coloca en cámara de humedad durante 5 minutos aproximadamente con la finalidad de que los espermatozoides se fijen en el fondo de la Cámara Neubauer. Transcurridos los 5 minutos la Cámara Neubauer se colocó en microscopio con objetivo 10x – 2PH y se observó.

El análisis de la CE se realizó automáticamente con **Ánàlisis de Semen Asistido por Computadora (CASA)**, por lo que la lectura se logra conectando el microscopio de contraste de fases a la computadora. Por medio del programa **Sistema Integrado de Análisis de Semen (ISAS)** se capturaron 4 campos al azar por muestra de semen, (figura 12).

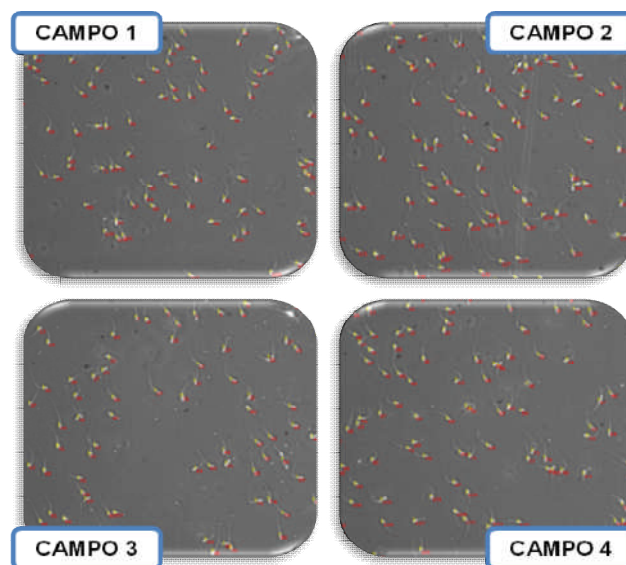


Figura. 12 Campos obtenidos determinar concentración espermática

Para lograr un buen conteo con el sistema ISAS, es necesario determinar los parámetros de tamaño del espermatozoide según la especie animal, así como tipo de Cámara para conteo y características del microscopio. Una vez determinados dichos parámetros se realiza la captura de los campos; si el proceso para el conteo espermático se realizó correctamente, entonces en cada campo se presentarán alrededor de 200 a 300 células espermáticas bien distribuidas, logrando un conteo preciso. ISAS identifica la cabeza de cada espermatozoide enumerándolo y señalando su conteo con indicador amarillo.

Este proceso se llevó a cabo antes de la Motilidad Individual con la finalidad de diluir el semen de acuerdo a la Concentración Espermática de cada muestra.

3.4.2.2.3. Motilidad individual mediante casa

- Motilidad Individual: se realizó con Cámara Makler con dilución 1:40. El medio de conservación de semen usado es base TRIS y se preparó siguiendo las recomendaciones del fabricante (250 g de Triladyl + 750 g de agua destilada + 250 g de yema de huevo fresco) teniendo una dilución 1:3:1. Realizado el diluyente, este se centrifugo durante 10 minutos y se separó el sobrenadante de las partículas y suciedad que se encontraba en el fondo del tubo cónico de 15 ml. El sobrenadante se colocó en otro tubo cónico de 15 ml limpio y se llevó a baño maría a temperar a 37°C para su manejo.

En microtubo de 0.5 ml se colocó 200 µl de diluyente y 5 µl de semen puro, se mezcló gentilmente y con micropipeta de 0.5 µl – 10 µl, se tomó una pequeña muestra colocándola en la Cámara Makler para su lectura en microscopio con objetivo 10x – 2PH. La evaluación se realizó con ISAS capturando 4 campos al azar por muestra de semen (figura 13).

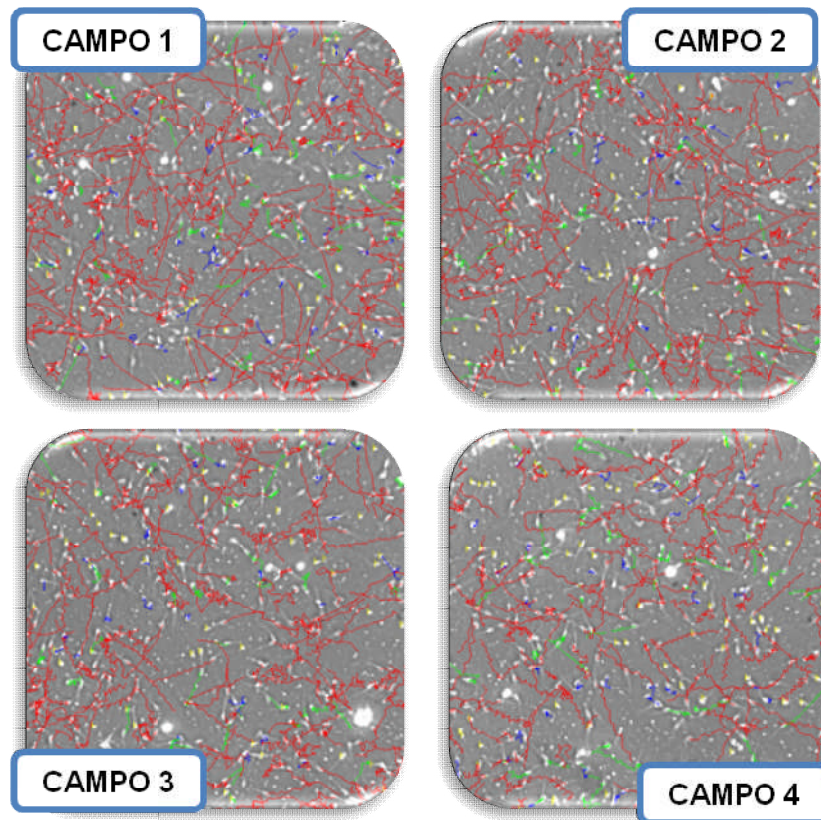


Figura 13. Campos obtenidos para determina motilidad individual.

3.5. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.

3.5.1. Análisis de motilidad masal.

Se uso un diseño experimental completamente al azar, donde el factor fijo fue la raza, con cuatro repeticiones, para los valores subjetivos tomados de las lecturas de motilidad masal que fueron analizados mediante un análisis de varianza de un factor.

3.5.2. Análisis de motilidad individual.

Reducción de datos

Se llevó a cabo mediante un análisis factorial. Para los datos arrojados por CASA, para motilidad individual, determina los parámetros de cada

espermatozoide, se analizaron con el paquete estadístico SPSS 15.0 en una reducción de datos con un análisis factorial utilizando una rotación Varimax, donde el Índice de linealidad (LIN), Índice de rectitud (STR), Velocidad Curvilínea (VCL) distancia que el espermatozoide ha viajado en promedio (VAP), Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), fueron los parámetros a medir en este primer paso.

De estos parámetros generaron 2 componentes, índice de movimiento y de velocidad. De esta forma se obtuvieron dos componentes, el 1 indica el Índice de Movimiento para el que se agrupó el Índice de linealidad (LIN), Índice de rectitud (STR). Para el componente 2, Índice de Velocidad, se agrupó la (VCL) Velocidad Curvilínea (VAP) distancia que el espermatozoide ha viajado en promedio, Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), (Cuadro 2). Usando las siguientes relaciones:

$$IM = LIN(0.97) + STR(0.916)$$

$$IV = VCL(0.953) + VAP(0.858) + ALH(0.941)$$

Cuadro 2. Componentes usados en la determinación de índices de motilidad

	Componente extraídos	
	1	2
VCL	.281	.953
VSL	.698	.576
VAP	.453	.858
LIN	.970	.171
STR	.916	.265
WOB	.790	.404
ALH	.209	.941
BCF	.585	.511

CONGLOMERADOS EN DOS FASES

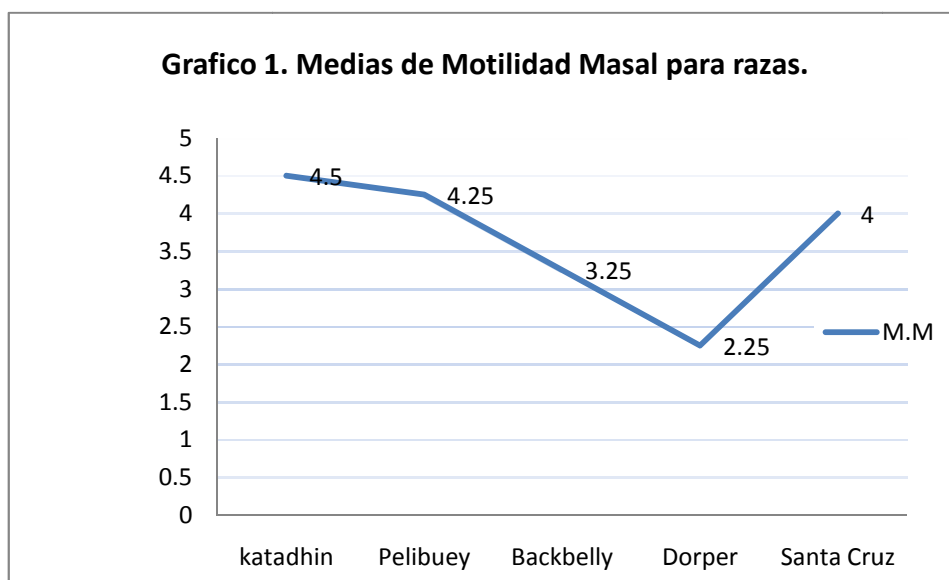
Los índices generados en el primer paso índice de velocidad, índice de movimiento, serán ahora parte de las variables continuas, mientras que la raza será ahora una variable categórica, ambas variables se analizan nuevamente con SPSS 15.0 para la clasificación de conglomerados en dos fases.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Motilidad masal.

La determinación de la motilidad espermática es de gran importancia en la evaluación seminal, ya que se ha demostrado que esta correlacionada con la fertilidad, si se considera a un eyaculado como una mezcla homogénea de acuerdo a su movimiento en masa, en el presente trabajo se determino la motilidad masal de 20 muestras de semen, se graficaron las medias de acuerdo a la raza, (Grafica 1) observándose que raza Katahdin es la que tiene un mejor comportamiento, con un promedio de 4.5, en segundo lugar la raza Pelibuey, con un promedio de 4.25 en tercer lugar la raza Santa cruz con un promedio de 4, en cuarto lugar tenemos la Blackbelly, con un promedio de 3.25, quedando en último lugar la Dorper con el promedio más bajo que fue de 2.25. Del análisis de varianza (ver anexo I) realizado a estos valores subjetivos de motilidad, no demostró que existiera una diferencia significativa entre los eyaculados de las diferentes razas.



Sin embargo hay una tendencia a ser superiores para la motilidad masal en las razas: Katadhin, Santa Cruz, Pelibuey, Backbelly versus la raza Dorper, esto puede ser debido a que se evaluó a esta raza, fuera de la temporada reproductiva y esta raza presenta estacionalidad reproductiva, la raza Santacruz tiene su origen en el Caribe, por lo que estas pruebas se realizaron dentro de su hábitat. En cuanto a la Katadhin, la raza Santacruz, interviene en la formación de esta raza, por lo que explota su vigor híbrido. La raza Pelibuey y BlackBelly comparte su origen en África y su hábitat en trópico y su comportamiento no se ve muy deprimido.

4.2. Determinación de índices de motilidad.

Para definir los índices de motilidad, de los parámetros obtenidos mediante casa, se analizaron los parámetros, velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL), velocidad media (VAP), índice de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR), índice de oscilación (WOB), amplitud de desplazamiento de la cabeza (ALH), frecuencia de golpe de cruz (FBC), que analizaron con el paquete estadístico SPSS. 15.0 para una reducción de datos por medio de un análisis factorial, el cual arrojó 8 componentes, de estos componentes, los que representan una mayor varianza se agruparon en el componente 1 y 2 (cuadro 3) agrupando un 86.6% de la varianza total.

Cuadro 3. Valores de Varianza por componentes

Componente	Auto valores iniciales		
	Total	% varianza	% acumulado
1	5.758	71.972	71.972
2	1.191	14.891	86.863
3	.456	5.702	92.565
4	.350	4.369	96.934
5	.199	2.486	99.420
6	.022	.274	99.693
7	.017	.216	99.910
8	.007	.090	100.000

Estos componentes que fueron representados por el componente 1 y 2 agruparon los valores más representativos para movimiento y velocidad cuadro 4, de esta forma en el componente 1 los valores más altos para los parámetros arrojados por CASA se encontró el índice de linealidad (LIN), y el índice de rectitud (STR), por lo que se le considerara como índice de movimiento, ya que como se menciona anteriormente estos parámetros se usan para describir la trayectoria del esperma. En el componente número dos se encuentra representado por la velocidad curvilínea (VCL), velocidad media (VAP), la amplitud del desplazamiento de la cabeza (ALH), que como se hace mención con anterioridad son los parámetros que determinan la velocidad del espermatozoide.

Cuadro 4. Parámetros de motilidad calculados para los índices de velocidad y movimiento.

parámetros	Componente	
	1	2
VCL	.281	.953
VSL	.698	.576
VAP	.453	.858
LIN	.970	.171
STR	.916	.265
WOB	.790	.404
ALH	.209	.941
BCF	.585	.511

Por lo tanto estos parámetros fueron los se ocuparan para todos los espermatozoides observados y su posterior agrupación en sub poblaciones.

4.3. Establecimiento de sub poblaciones por medio de un conglomerado en dos fases.

Este análisis arrojó la presencia de 5 sub poblaciones espermáticas en el eyaculado de estas razas ovinas, de donde de las 26026 observaciones la que

quedo representada por un mayor tamaño fue la sub población 5, con una observación de 9502 espermatozoides que representan el 36.5 % cuadro 5. Esta sub población en cuanto a los índices de velocidad se posiciona en segundo lugar con una media de .7238, la cual está por arriba de la media global de os espermatozoides, que es de .6394. En cuanto a su índice de movimiento la media para esta sub población es de 116.8932 ver cuadro 6, la que también está por arriba de la media global para los índices de movimiento que es de 104.5017, por lo tanto se puede decir que la presencia de esta sub población es deseable ya que esta agrupando un alto porcentaje de espermatozoides con buenos parámetros de motilidad espermática, como se por menciona Moore y Akhondy, (1996) donde el valor de VSL está altamente correlacionado con la fertilidad in vitro de las ratas.

Cuadro 5. Distribución de los espermatozoides por sub población

Sub población	N	% del total
1	2973	11.4
2	6586	25.3
3	1605	6.2
4	5360	20.6
5	9502	36.5
Combinados	26026	100
Total	26026	100

La segunda población en tamaño estuvo representada por la sub población número 2 con una observación de 6586 espermatozoides representando un 25.3 % de la población total, esta población de acuerdo a su índice de velocidad se coloco en cuarto lugar ya que obtuvo una media de .6169 que está por debajo de la media global que es de .6394, se puede notar que apenas está por debajo de dicha media. Para el índice de movimiento ocupó también ocupó el cuarto lugar, con una media de 97.9401 comparando con la media global de

104.5017, se considera que su comportamiento está por debajo de esta media ver cuadro 5 y 6.

La tercera sub población en cuanto a número de observaciones representa el 20.6% del total de las observaciones con 5360 espermatozoides observados, para índice de velocidad presenta una media de .6219, media que apenas está por debajo de la media global, esta sub población ocupa el tercer lugar en cuanto al número de espermatozoides agrupados dentro de ella, en cuanto a su índice de movimiento la encontramos con una media de 112.7201 la que se encuentra por arriba de la media global del grupo que es de 104.5017, esta sub población debería de considerarse ya que presenta un buen parámetro para índice de movimiento y su índice de velocidad se encontró apenas por debajo de la media, cabe resaltar que la el índice de velocidad representa la distancia que el espermatozoide a recorrido y que esta sub población se encuentra por debajo de la media para este índice ver cuadro 5 y 6.

Cuadro 6 Distribución de sub poblaciones de acuerdo a sus índices de motilidad

Sub poblaciones	Índice de velocidad		Índice de movimiento	
	Media	Desv. típica	Media	Desv. típica
1	.3897	.49350	43.00977	59.92979
2	.6169	.45202	97.9401	77.33213
3	.7523	.36149	144.3610	55.85882
4	.6219	.42562	112.7201	76.94334
5	.7238	.43412	116.8932	70.05336
Global	.6394	.45207	104.5017	75.73547

La cuarta sub población en cuanto a número de observaciones con 2973 espermatozoides cubre el 11.4% del total, esta sub población presenta una media para índice de velocidad de .3897 que se encuentra por debajo del comportamiento global que tiene una media de .6394 y en cuanto a su índice de movimiento presenta una media de 43.0977 contra una media global de 104.5017

se puede ver claramente que presento los parámetros más bajos para velocidad y movimiento, además de ser una población con un bajo número de espermatozoides.

La quinta sub población en cuanto a tamaño de observaciones con 1605 espermatozoides observados, con un 6.2% de la población total de espermatozoides observados, de acuerdo con los índices de velocidad tiene una media de .7523 la que es superior a la media global de .6394, lo que coloca a esta sub población en el primer lugar en cuanto al índice de velocidad. En cuanto al índice de movimiento presenta una media de 144.3610 que comparada con la media global de 104.5017, se coloca por arriba de ella, lo que es de gran interés ya que en esta sub población se agruparon los espermatozoides con mejores índices tanto de velocidad como de movimiento, algo que se debe de tomar en cuenta es que en efecto tiene el mejor comportamiento, pero también es la sub población con menos espermatozoides observados, lo que se debe tomar en cuenta por la correlación que existe entre los parámetros tomados en cuenta para determinar los índices de motilidad y la capacidad fecundante de la muestra, (ver anexo II).

4.4. Sub población espermática predominante en cada raza evaluada.

Dorper. Se menciono anteriormente que la sub población 1 ocupo el cuarto lugar en cuanto a espermatozoides observados ahora de acuerdo al cuadro 7 se observo que el 100% de los espermatozoides representan a la raza Dorper, es preciso decir que esta raza fue formada a partir de las razas Dorset Horn y Blackhead Persian, no se le considera un verdadero ovino de pelo (Bactawar, 2003) presenta estacionalidad lo cual puede explicar dicho comportamiento ya que esta evaluación se realizo fuera de la temporada reproductiva (Hafez, 1978). Por lo tanto su índice de velocidad estuvo por debajo de la media global al igual que su índice de movimiento como se puede observar en la grafica 2 y 3.

Pelibuey. La sub población 2 que ya se mencionó antes que ocupa el segundo lugar en cuanto a tamaño, es representativa de la raza Pelibuey ya que el 100 % (cuadro 7) de los espermatozoides pertenecientes a esta sub población se agruparon dentro de esta.

Cuadro 7. Distribuciones de la población espermática en sub-poblaciones o conglomerados por Raza.

		Black Belly	Dorper	Katadhin	Pelibuey	Santa Cruz
		%	%	%	%	%
Sub-población	1	0	100	0	0	0
	2	0	0	0	100	0
	3	0	0	0	0	100
	4	100	0	0	0	0
	5	0	0	100	0	0
Comb.		100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

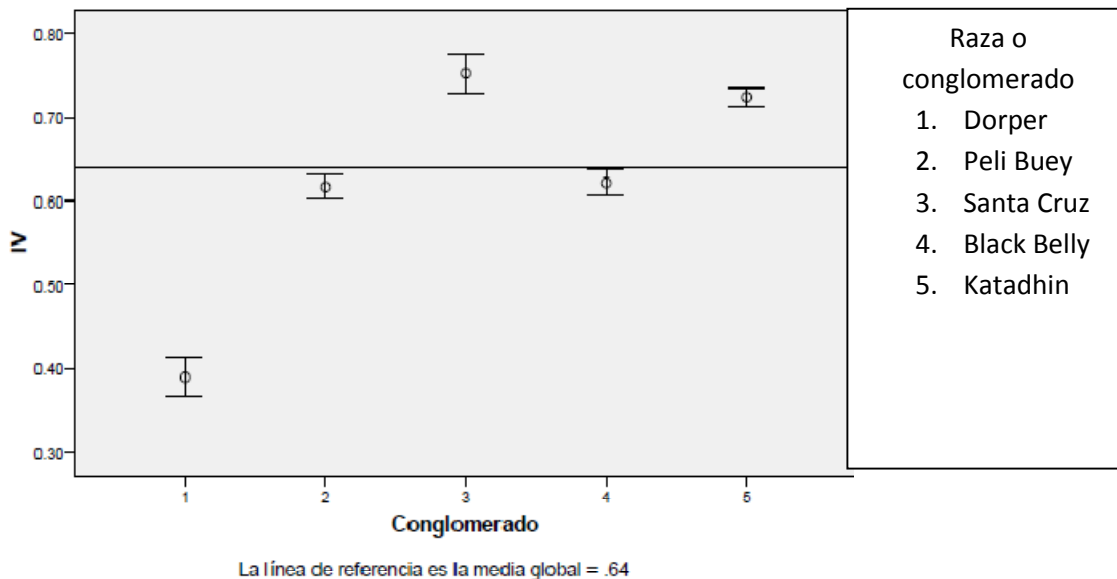
Se puede decir que esta raza no presentó parámetros reproductivos muy elevados como la raza Santa Cruz o Katadhin, pero las medias de sus índices no se alejaron mucho de la media global ver gráficas 1 y 2

Santa Cruz. En la sub población 3 agrupé los valores representados por la raza Santa Cruz, (Cuadro 7) esta raza presentó los mejores parámetros tanto para índice de velocidad como índice de movimiento (Gráficas 2 y 3), sin embargo tiene una población muy pequeña, aun así quedó por encima de la media global de las razas, esto se debe a que dicha raza tiene su origen en climas tropicales, lo cual le permite mayor adaptabilidad a estas condiciones ambientales, por lo tanto se encuentran dentro de sus condiciones óptimas de desarrollo, además de ser la raza con mejores parámetros reproductivos (Christiansen; 1994; Burke, 2005).

Blackbelly. La sub población 4 que ocupó el tercer lugar en cuanto a observación de espermatozoides estuvo representada por la raza Blackbelly con un índice de velocidad por debajo de la media global, pero con un índice de

movimiento que es mayor a la media global, en la grafica 3 se puede apreciar que el rango en donde se encuentran los espermatozoides observados para índice de velocidad es muy cercano a la media global. Como se menciona antes el origen de esta raza puede influir en el comportamiento, ya que a esta se le considera como una raza muy rustica con un elevado número de partos múltiples, (Amador., et al 2009).

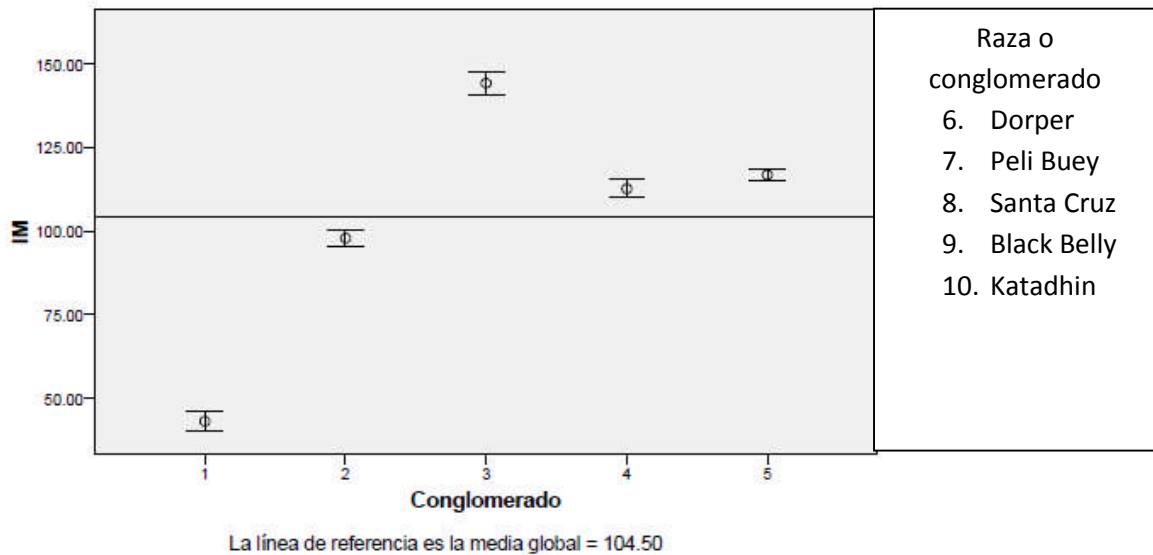
Grafica 2. Comparación de la media de grupo con la media global para índice de velocidad



Katadhin. La sub población cinco representada por la raza Katadin ocupa el segundo lugar para los índices de movimiento y velocidad cuadro 6, quedando arriba de la media global (Grafica 2 y 3), además que es la que presento un mayor número de espermatozoides observados, se puede considerar que esta raza es la mejor en cuanto a los parámetros de evaluación espermática ya que presenta los mejores índices de motilidad y además un gran número de espermatozoides con estas características, esto debido a la cercanía que tiene con la raza Santa Cruz que es una raza criolla del Caribe (Bactawar, 2003).

Como se menciono antes el análisis de varianza realizado a los valores de motilidad masal, con los valores subjetivos en donde no se encontró diferencia significativa al .95, en los eyaculados de las 5 razas de ovinos evaluadas.

Grafica 3. Comparación de la media de grupo con la media global para índice de movimiento



Sin embargo al ser evaluados los datos obtenidos por medio de CASA, se encontró la distribución de 5 sub poblaciones que representaron a cada raza, cada una con patrones de movimiento distinto, lo que se representa en forma índice de fertilidad de cada raza, ya que estudios realizados en ratas, por Moore y Akhondi, (1996) demostraron que VSL está positivamente correlacionada con la fertilización in vitro y en los verracos, Holt et al., (1997) encontraron que el VSL se correlaciona con el número de lechones por camada. En los seres humanos, estudios demuestran la variación en VSL de los hombres con fertilidad y subfertilidad (Liu et al, 1991; Leidl et al., 1993; Wainer et al, 1996). En semen fresco de verracos (Vizcarra y Ford, 2006) y pavos (King et al., 2000) mostraron una correlación significativa entre la movilidad de los espermatozoides y las mediciones de (BCF, VAP, VCL, y VSL). Esto indica que los espermatozoides de mayor movilidad avanzan más rápido que el esperma de baja movilidad, como se indica por BCF, VSL, y la velocidad de LIN

(King et al., 2000; citado por Mortimer, 2000). Para las razas manejadas encuentra que los resultados obtenidos coinciden con los parámetros reproductivos y se considera que los parámetros estudiados tienen una correlación con la fertilidad. Así mismo está acorde a los parámetros reproductivos de cada una de ellas, siendo la Santa cruz la que presenta mejores parámetros reproductivos dichos parámetros que comparte en cierta proporción con la Katadhin, esto puede ser debido a que en la formación de esta raza interviene la raza Santa Cruz (Bactawar, 2003).

5. CONCLUSIONES

- Motilidad masal. La evaluación seminal mediante motilidad masal demuestra que existe movimiento en la muestra, pero no es una medida real ya que depende directamente del observador, además se asume que todos los espermatozoides tienen el mismo comportamiento
- Motilidad individual. Para el estudio de una motilidad individual es necesario establecer el índice de velocidad y el índice de movimiento, ya que dentro de estos índices se agruparan los parámetros de mayor importancia, tanto de movimiento como para velocidad, además de ser imprescindibles en la determinación de calidad seminal.
- Los espermatozoides observados establecen las sub-poblaciones espermáticas presentes en el eyaculado de ovinos de pelo, y van a describir su comportamiento, además estas sub poblaciones son diferentes en cuanto a tamaño para este caso en particular la sub población más grande fue representada por la raza Katadhin y la sub población más pequeña por la raza Santa cruz
- La raza presente en la sub población de mejores índices fue la Santa cruz, a pesar de ser un número muy pequeño de observaciones, es decir presento buena calidad, pero para tener una información completa se deberían de tomar en cuenta otros aspectos como la concentración, un ejemplo de ello es la raza Katadhin que se coloca en el segundo lugar en cuanto a los índices de motilidad, pero es la que presento una mayor cantidad de espermatozoides observados.

6. LITERATURA CITADA

- Abagair T; Holt W. V; Harrison P. A. R; y del Barrio G. 1999 Sperm Subpopulations in Boar (*Sus scrofa*) and Gazelle (*Gazella dama mhorr*) Semen as Revealed by Pattern Analysis of Computer-Assisted Motility Assessments *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 60, 32–41
- Amador, Z. H.; Cortés, M. X.; Pérez, R. M. y De Lucas, T. J. Parámetros Productivos y Reproductivos en Ovinos de la Raza Blackbelly Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Amantea, G.: 1914. Ricerche sulla secrezione spermática: La raccolta dello sperma nel cane. *Rendiconti della R. Accademia Nazionale dei Lincei*, vol. XXIII, primer semestre, fasc. 5, pp. 68-76.
- Ana Celeste Andrade Martins de Carvalho Bessa. Influencia en la Calidad Espermática de la Adición de Distintas Concentraciones de Crioprotectores para la Conservación del Semen Canino. Memoria para optar al grado de Doctor. 2005 Universidad Complutense de Madrid Facultad de Veterinaria Departamento de Medicina y Cirugía Animal
- Angulo Mejorada R. B; Mejía Villanueva O. Memorias del curso teórico – práctico “inseminación artificial en ovinos” 23 al 26 de abril de 2003 Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, A.C.
- Atto Mendives José A. Importancia de los ovinos tropicales introducidos al país: características productivas y reproductivas XX Reunión ALPA, XXX Reunión APPA-Cusco-Perú.
- Bactawar, Basil. Characteristics and General Production Parameters of Hair Sheep Breeds. 2003 British Columbia Ministry of Agriculture, food & fisheries
- Bloom, E., 1977. Sperm morphology with reference to bull infertility. First All-India Symp. Anim. Reprod. pp: 61-81.

- Burke .J.M. Lamb Production of Dorper, Katahdin, and St. Croix Bred in Summer, Winter, or Spring in the Southeastern United States. Sheep & Goat Reseach Journal vol. 20 2005.
- Cabodevila, J.; Catalano, R.; Mihura, H. y Callejas, S.EVALUACIÓN DE SEMEN FRESCO Facultad de Ciencias Veterinarias Programa de Educación Continua Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires
- Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. J Andros 26:115–122
- Carbonero Bravo, D.: 1944. Fecundación artificial. Recientes avances en veterinaria. Tomo 3o. *Biblioteca de Biología Aplicada*. Madrid, p. 131.
- CARBONERO D. (1954) “Técnicas de laboratorio”. Ministerio de Agricultura. Dirección General de Ganadería: 9-12
- Cooper TG, Yeung CH (2006) Computer-aided evaluation of assessment of “grade a” spermatozoa by experienced technicians. Fertil Steril 85:220–224
- Cortes G. S Efecto de la conservación sobre la fisiología Espermática del Semen Caprino memoria presentada para el grado de Doctora en ciencias Biológicas Universidad de Complutense de Madrid Facultad de Ciencias Biologicas.
- Cunningham G, James, DVM, PhD Fisiologia Veterinaria 2008 segunda edición ed. ELSEVIER
- Curot, E.: 1922. *Fécondation et stérilité dans les espèces domestiques*. 2a Ed.
- David G, Serres C, Jouannet P. Kinematics of human spermatozoa. *Gamete Res*. 1981;4:83–95.
- Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Custer CE, Vermicide JP, Alehouse GC (2005)
- Duchens, M.. Examen de fertilidad para selección en toros de carne **TecnoVet**, Norteamérica, 530 09 2010. Consultado el ago 4, 2011, de <http://www.revistas.uchile.cl/index.php/RT/article/viewArticle/5234/5114>
- Fernández-Caparrós M. L. Á. 2001 Aportación a la Historia de la Inseminación Artificial Ganadera en España. Su Significado en el Desarrollo Pecuario y la Repercusión Económica en el Período 1931-1971 Memoria de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid Facultad de Veterinaria

- Fetid S, Young CH, Sonntag B, Nieschlag E, Cooper TG (2006) Relationship of cytoplasmic droplets to motility, migration in mucus, and volume regulation of human spermatozoa. *J Androl* 27:294–301
- G. W. salisbury, N. L. Vandemark. *Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de bóvidos ed acribia Zaragoza España 1964*
- Gagnon C. 1995. Regulation of sperm motility al the axonemal level. *Reprod fertile dev*; 7: 847-855
- Hacker-Klom UN, Gòhde W, Nieschlag E, Behre HM (1999) DNA flow cytometry of human semen. *Hum Reprod* 14: 2506–2512
- Ivanov, E.: 1926. La fecundación artificial como método zotécnico. *Rev. de Hig. y San. Pecuarias*, n.o 23, p. 102.
- J. Weston and C.Watkins: Multi-class support vector machines. Technical report, Royal Holloway University of London (1998)
- Jeffers. B. C. 1961. Body condition scoring and its use in management. *Tasmanian Jouranal of Agriculture*.
- Johnson, R. y Wichern, Dean, “Applied Multivariate Statistical Análisis” Prentice-Hall International, Inc, 1982..
- Krause W. 1995. The significance of computer-assisted semen analiysis (CASA) for diagnostics in andrology and fertility prognosis. *Hum –reprod*; 10:00 60-66
- Martínez N. I; Moran M. J; Peña F. J. 2006 Two-Step Cluster Procedure After Principal Component Analysis Identifies Sperm Subpopulations in Canine Ejaculates and Its Relation to Cryoresistance. *Journal of Andrology*, Vol. 27, No. 4,
- Maxwell W .M. C. y Evans G. (1990) “Inseminación Artificial de ovejas y cabras”. Ed. Acribia S.A. (Madrid). Cap. 34:19-32
- Meseguer M, Garrido N, Martínez-Conejero JA, Simón C, Pellicer A, Remohí J (2004) Relationship between standard semen parameters, calcium, cholesterol contents, and mitochondrial activity in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile males. *J Assist Reprod Genet* 21:445–451
- Michael L. Christiansen and Erik R. Lambing performance of St. Croix hair sheep in a High rainfall Cleveland, University of agriculture, Hilo, Hawaii 1994.
- Milovanov, V.K., 1938. The artificial insemination of farm animals. *Seljhozgiz, Mowcow*.

- Moreno Fernández L.A. 2001 Aportación a la historia de la inseminación artificial ganadera en España. Su significado en el desarrollo pecuario y la repercusión económica en el período 1931-1971 Universidad Complutense de Madrid. Memoria doctorado.
- Mortimer D, Kossakowski J, Mortimer ST, Fussell S. Prediction of fertilizing ability by sperm kinematics. *J Assist Reprod Genet.* 1997;14: 525.
- Mortimer D, Mortimer ST. Influence of system parameter settings on human sperm motility analysis using Cell Soft. *Hum Reprod.* 1988;3: 621–625..
- Mortimer D, Mortimer ST. Value and reliability of CASA systems. In: Ombelet W, Bosmans E, Vandeput H, Vereecken A, Renier M, Hoomans E, eds. *Modern ART in the 2000s*. London: Parthenon Publishing Group Limited; 1998:73–89.
- Nieschlan E, Behre H. M, Nieschlan S. *Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction 3rd*, completely Revised and Updated Edition. Springer 2009
- O' Connor M. T. Amann R. P. & Saacke R. G. (1981) "Comparisons of computer evaluations of spermatozoal motility with standar laboratory test and their use for predicting fertility". *J. Anim. Sci.* 53 (5): 1368-1376
- Pomerol J .M. y Arrondo J.L. (1994) "Practica andrológica". Ed. Científicas 'Técnicas. S.A.:20 198
- Quintero M. A. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo, y conejo. Tesis doctoral 2003 Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de veterinaria
- Serres C, Feneux D, Jouannet P, David G. Influence of the flagellar wave development and propagation on the human sperm movement in seminal plasma. *Gamete Res.* 1984;9:183–195.
- Slott VL, Jeffay SC, Dyer CJ, Barbee RR, Perreault SD. Sperm motion predicts fertility in male hamsters treated with α -chlorohydrin. *J Androl.* 1997;18:708–716.
- Slott VL, Jeffay SC, Suarez JD, Barbee RR, Perreault SD. Synchronous assessment of sperm motility and fertilizing ability in the hamster following treatment with α -chlorohydrin. *J Androl.* 1995;16:523–535.

- Slott VL, Suarez JD, Poss PM, Linder RE, Strader LF, Perreault SD. Optimization of the Hamilton-Thorn computerized sperm motility analysis system for use with rat spermatozoa in toxicological studies. *Fundam Appl Toxicol*. 1993;21:298–307.
- Sorensen, a.M.Jr. 1991. Reproducción animal, principios y prácticas. Mc Graw-Hill, México.
- Summer G. Goodson, Zhaojun Zhang, James K. Tsuruta, Wei Wang, and Deborah O'Brien. Classification of Mouse Sperm Motility Patterns Using an Automated Multiclass Support Vector Machines Model. 2011 The Society for the Study of Reproduction.
- Teixeria. A. F., Doney. J.M. and Gunn. R. G. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *Journal of Agricultural science*.
- Tibisay Vilanova Lourdes F; Pedro Pablo Ballarales B., MV, Dr La evaluación andrológica: justificación y métodos *Manual de Ganadería Doble Propósito. 2005 Universidad Centroccidental*
- Vapnik, N.V.: The Nature of Statistical Learning Theory. Springer-Verlag, Berlin. (2000) 1ed: 1998
- Yeung CH, Beiglböck-Karau L, Tüttelmann F, Nieschlag E (2007). The presence of germ cells in the semen of azoospermic, cryptozoospermic and severe oligozoospermic patients: stringent flow cytometric analysis and correlations with hormonal status. *Clin Endocrinal* 67:767–775
- Zhang, T., R. Ramakrishnon, y M. Livny. 1996. BIRCH: An efficient data clustering method for very large databases. In: Proceedings of the ACM SIGMOD Conference on Management of Data. Montreal (Canada): ACM.

ANEXO 1

Cuadro 5. ANÁLISIS DE VARIANZA DATOS SUBJETIVOS DE MOTILIDAD MASAL.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
TRATAMIENTOS	13.300	4	3.325	2.891	.059
ERROR	17.250	15	1.150		
TOTAL	30.550	19			

ANEXO 2

Grafica 3. Representación de las sub poblaciones en la población total.

