

Evaluación de los parámetros de calidad seminal y cinemática espermática en tres razas ovinas de lana en condiciones de trópico alto colombiano

Melissa Carvajal-Serna¹ / Héctor A. Cortés-López² / Carlos Manrique-Perdomo³ / Henry A. Grajales-Lombana³

Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del eyaculado, la raza y las colectas sobre los parámetros de calidad seminal y cinemática en 3 tipos raciales ovinos de lana bajo condiciones de trópico alto colombiano. Se colectó semen de 12 machos de la raza criollo, romney marsh y hampshire de 2 a 5 años de edad, con vagina artificial, durante 4 colectas con un tiempo de abstinencia de 3 d. Se realizó el análisis de la motilidad con ayuda de un sistema computarizado de análisis seminal (CASA) en combinación con una tinción de fluorescencia Hoeschst 33259 para el estudio de la viabilidad y la morfología. Se realizó un análisis de medidas repetidas en el tiempo con el paquete estadístico SAS, empleando el método Proc Mixed. No hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en el porcentaje de motilidad total y motilidad progresiva para el primer y segundo eyaculado, pero sí hubo diferencias ($p < 0,05$) para la concentración, volumen y viabilidad; el primer eyaculado fue significativamente superior al segundo, independiente de la raza y la colecta. Las variables de cinemática espermática relacionadas con el movimiento progresivo y la velocidad (ALH, VAP, LIN) no difieren entre eyaculados, pero sí hay un efecto racial ($p > 0,05$) en el que la raza criolla es superior en estas variables, lo que podría sugerir que las células espermáticas de esta raza tienen la capacidad de recorrer mayor distancia en menor tiempo, comparado con los espermatozoides de las otras dos razas, en las condiciones del presente experimento.

Palabras clave: calidad seminal, cinemática, espermatozoide, ovino.

- 1 Zootecnista. MSc. Departamento de Ciencias para la Producción Animal, Universidad Nacional de Colombia. ✉ mcavajals@unal.edu.co
- 2 Médico veterinario. MSc. (c). Departamento de Salud Animal. Universidad Nacional de Colombia. ✉ hacorteslo@unal.edu.co
- 3 Zootecnista. MSc. Ph.D. Profesor asociado Departamento de Ciencias para la Producción Animal, Universidad Nacional de Colombia. ✉ cmanriquep@unal.edu.co; hagrajalesl@unal.edu.co

Evaluation of semen quality parameters and sperm kinematics in three wool sheep breeds in conditions of high tropics in Colombia

Abstract

This study aimed to evaluate the effect of the ejaculate, race, and sperm collections on semen quality and kinematic parameters in three wool sheep breeds in conditions of high tropics in Colombia. Semen was collected from 12 males of Creole, Romney marsh, and Hampshire sheep breeds ranging from 2 to 5 years of age, with artificial vagina, during 4 collections with a time of abstinence of 3 days. Motility analysis was performed with the help of a computer-assisted semen analysis (CASA) in combination with a fluorescent Hoechst 33259 stain for the study of viability and morphology. An analysis of measures repeated over time was performed with the SAS statistical package, using the Proc Mixed method. There were no significant differences ($p > 0.05$) in the percentage

Cómo citar este artículo: Carvajal-Serna M, Cortés-López HA, Manrique-Perdomo C, Grajales-Lombana HA. Evaluación de los parámetros de calidad seminal y cinemática espermática en tres razas ovinas de lana en condiciones de trópico alto colombiano. Rev Med Vet. 2018;(18):49-61. doi: <http://dx.doi.org/10.19052/mv.5171>

of total motility and progressive motility for the first and second ejaculates, but there were differences ($p < 0.05$) for concentration, volume, and viability; the first ejaculate was significantly superior to the second, independent of breed and collection. Sperm kinematic variables related to progressive movement and speed (ALH, VAP, LIN) do not differ between ejaculates, but there is a racial effect ($p > 0.05$), since the Creole breed is superior in all these variables, which could suggest that the sperm cells of this breed have the ability to travel greater distance in less time, compared with sperm from the other two breeds, under the conditions of the present experiment.

Keywords: seminal quality, kinematics, sperm, sheep.

Avaliação dos parâmetros de qualidade seminal e cinemática espermática em três raças ovinas de lã em condições de trópico alto colombiano

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da ejaculação, a raça e as coletas sobre os parâmetros de qualidade seminal e cinemática em 3 tipos raciais ovinos de lã sob condições de trópico alto colombiano. Foram colhidas amostras de sêmen de 12 machos da raça crioulo, romney marsh e hampshire de 2 a 5 anos de idade, com vagina artificial, durante 4 coletas com um tempo de abstinência de 3 d. Realizou-se a análise da motilidade com ajuda de um sistema computarizado de análise seminal (CASA) em combinação com uma tincão de fluorescência Hoeschst 33259 para o estudo da viabilidade e a morfologia. Realizou-se um análise de medidas repetidas no tempo com o pacote estadístico SAS, empregando o método Proc Mixed. Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) na porcentagem de motilidade total e motilidade progressiva para a primeira e segunda ejaculação, mas, sim houve diferenças ($p < 0,05$) para a concentração, volume e viabilidade; a primeira ejaculação foi significativamente superior ao segundo, independente da raça e da coleta. As variáveis de cinemática espermática relacionadas com o movimento progressivo e velocidade (ALH, VAP, LIN) não diferem entre as ejaculações, mas sim há um efeito racial ($p > 0,05$) no que a raça crioula é superior em estas variáveis, o que poderia sugerir que as células espermáticas desta raça têm a capacidade de percorrer maior distância em menor tempo, comparado com os espermatozoides das outras duas raças, nas condições desta experiência.

Palavras chave: qualidade seminal, cinemática, espermatozoide, ovino.

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial es una técnica que tiene como fin potencializar el mejoramiento genético en la creciente industria ovina de Colombia. En la práctica, se realizan dos inseminaciones con semen líquido fresco o refrigerado entre 8 y 12 h de intervalo, para inseminación cervical. Existen otras metodologías de in-

seminación, como la laparoscopia, que involucra el uso de semen criopreservado, con dosis seminales de aproximadamente 50 a 200 millones de células por mililitro. Cuando el número de individuos que se van a inseminar es alto, se requiere más de una colecta, en las que los eyaculados son sometidos a altas diluciones para ser almacenados en fresco, líquidos o congelados (1,2). Se requiere que la calidad del eyaculado por procesar sea

óptima para garantizar mayor resistencia a los procesos de manipulación. Los ovinos con los mejores parámetros de calidad poseyacuación y adecuada transmisión genética de las características pueden ser usados como sementales para la creación de bancos de germoplasma, y de esta forma se garantizará la fertilidad por un número de espermatozoides con alto rango de supervivencia al procesamiento (2).

La libido de los individuos, la capacidad de recuperación entre montas y el número de hembras para servicio en un periodo corto afectan la calidad o la capacidad de las células espermáticas en los diferentes eyaculados. El tránsito en el epidídimo facilita la maduración espermática para adquirir la capacidad fertilizante, previo a un proceso de maduración final llamado *capacitación* (3). Las diferencias en el tiempo de tránsito epididimal proveen un mecanismo de variabilidad en la respuesta a diferentes cambios de temperatura, lo cual explica por qué los eyaculados de un mismo individuo son completamente heterogéneos y pueden variar en su calidad, dependiendo del tiempo de almacenamiento en el reservorio epididimal (3,4). Otros factores pueden afectar la calidad seminal (volumen, concentración, motilidad, normalidad, etc.), como la época del año, la edad, la raza y la frecuencia de montas; aquí se observa que las sucesivas eyacuaciones pueden alterar el volumen y la concentración espermática (2). Las razas estacionales que se encuentran en latitudes cercanas al Ecuador presentan un comportamiento reproductivo en el que no se define por completo una época reproductiva y no reproductiva (5). Por otro lado, la introducción de la especie ovina en Colombia se remonta a la época de la Conquista, lo que ha llevado a la reproducción de una raza denominada criolla, producto de una serie de cruces entre razas que le permiten ser altamente rústica y adaptada a las condiciones del medio.

Nel-Themaat et al. (6) observaron que el segundo eyaculado presenta mayor motilidad comparado con el primero, los cuales fueron colectados con un intervalo inferior a 10 min en ovinos nativos del golfo. Similares resulta-

dos fueron encontrados por Ollero et al. (3), quienes observaron que el segundo eyaculado presentó mayores valores de viabilidad, medido en función de integridad de la membrana, motilidad individual progresiva y menores resultados en la integridad del acrosoma. Todo lo anterior se relaciona de igual forma al periodo de abstinencia, la cual a los 3 días presentó los mayores valores para los parámetros evaluados (3). Otros autores reportan el efecto de la frecuencia de colecta sobre los parámetros de calidad seminal en rumiantes (7), pero en algunos casos no se registra el uso específico de algún eyaculado.

La motilidad es uno de los parámetros más usados en la evaluación de la calidad espermática; describe el estado energético de los espermatozoides (8). Es uno de los aspectos más importantes para que logre la fertilización la célula espermática; sin embargo, su evaluación sigue siendo muy subjetiva en los ensayos de rutina (9). En los últimos años se ha venido publicando el uso de sistemas computarizados para la evaluación de la motilidad espermática, y se ha realizado un arduo trabajo en la estandarización de las condiciones del sistema en ovinos (4,8,10-13). La evaluación de los parámetros de calidad en función de la cinemática espermática ha sido pobremente estudiada en las razas ovinas de lana, y su conocimiento permitiría encontrar patrones de adaptación a las condiciones de producción en el trópico.

La estacionalidad reproductiva en ovinos es una característica común de las razas en latitudes templadas, pero se ha observado que es menos marcada en el trópico, donde se presenta reproducción durante todo el año (14). A pesar de esto, existe limitada información sobre cómo otras razas adaptadas al trópico exhiben actividad reproductiva durante todo el año (15). El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del eyaculado y la raza en 4 periodos de colecta sobre los parámetros de calidad seminal y motilidad espermática en 3 tipos raciales ovinos de lana bajo condiciones de trópico alto colombiano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

La presente investigación se realizó en el Centro Agropecuario Marengo de la Universidad Nacional de Colombia (CAM), en las instalaciones del Centro de Investigación Desarrollo Tecnológico y Extensión Ovina (Cidteo). El CAM se encuentra ubicado en el departamento de Cundinamarca, municipio de Mosquera, vía a Facativá. Tiene una latitud norte de 4° 42' y 74° 12' de longitud oeste. La precipitación promedio es de 803,025 mm año, con una temperatura media de 13,6 °C a 2543 m s. n. m. y una humedad relativa de 81,57 %.

Unidades experimentales

El semen fue colectado de 12 machos reproductores pertenecientes a 3 razas, distribuidos de la siguiente forma: 4 criollos, 4 romney marsh y 4 hampshire, entre los 2 y los 5 años, con adecuado estado de salud (previamente evaluado, basados en un examen físico y sanitario), alimentados con una dieta que garantizó el consumo de energía diario recomendado. Se adicionaba suplementación con silo (100 g/animal/d) y concentrado (150 g/animal/d).

Colecta del semen y evaluación

La colecta se realizó usando vagina artificial, bajo el protocolo aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, de la Universidad Nacional de Colombia (CB-074-2014). Los machos se encontraron en las mismas condiciones de colecta, con un acostumbamiento previo al inicio del trabajo de 30 días. Fueron colectados individualmente y cada eyaculado fue separado como eyaculado 1 y eyaculado 2. Se determinó el volumen espermático en un tubo aforado. Previo a la evaluación microscópica, se realizaron diluciones consecutivas con el fin de obtener una concentración final de 40×10^6 SPZ/ml, para facilitar el rango operacional del sistema computarizado, garantizando un coeficiente de variación mínimo. El medio de mantenimiento espermático llamado medio fosfato-HEPES-sucrosa fue compuesto por sa-

carosa 10 %, HEPES 1 %, sodio-fosfato monobásico 0,5 M y EGTA 100 mm (16), a una temperatura de 37 °C. Las características espermáticas microscópicas se evaluaron mediante el uso de un sistema computarizado de análisis seminal (IVOS; Hamilton Thorne Research, Beverly, MA), bajo la configuración Ovino Viadent 10X NH CM040GE, que captura 31 fotogramas por segundo, y evalúa la motilidad progresiva, la motilidad total, la concentración espermática, los parámetros de cinemática, la normalidad morfológica y la viabilidad. Una muestra de 3 μ l fue cargada en una de las cámaras Leja® de 4 cámaras, con una profundidad de 20 μ m. Para cada muestra, se evaluaron en promedio 5 campos ubicados en el retículo central de la cámara, y se contaron en promedio 340 células por muestra.

Los valores de cinemática determinados para cada espermatozoide representan la velocidad del movimiento, la amplitud de la trayectoria de la cabeza del espermatozoide y la frecuencia del cambio de dirección de la cabeza (tabla 1) (17).

La opción Viadent se implementó para determinar la viabilidad espermática mediante una tinción de bizbenzimidaz trihidrocloruro (Hoeschst 33259, 5 μ g/ml) que penetra únicamente las membranas dañadas. La opción Viadent usa luz visible (luz azul de emisión de diodo) para determinar el número de células no viables. La evaluación de la normalidad morfológica se basó en la posición de la cola y la presencia de gota citoplasmática; se clasifican como anomalías (cola enrollada: CT; cola doblada: BT; gota citoplasmática distal: DCD; gota citoplasmática proximal: PCD), con una valoración en porcentaje.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de medidas repetidas en el tiempo en el paquete estadístico SAS (9.3.1, 2016) empleando el método Proc Mixed; las variables respuesta fueron sucesivamente las características de calidad seminal (volumen, concentración, motilidad masal, motilidad total, motilidad progresiva, morfología, viabilidad) y las variables de cinemática evaluadas por el sistema compu-

Tabla 1. Parámetros de cinética espermática

Parámetro	Unidad	Definición
Velocidad curvilínea (VCL)	μm/s	Distancia recorrida por el SPZ a lo largo de su trayectoria
Velocidad rectilínea (VSL)	μm/s	Distancia recorrida por el SPZ desde el primer punto hasta el último de su trayectoria
Velocidad media (VAP)	μm/s	Distancia recorrida por el SPZ durante su trayectoria en función del tiempo
Índice de linealidad (LIN)	%	Relación porcentual entre VSL y VCL, una medida de la dirección
Índice de rectitud (STR)	%	Relación entre VSL y VAP es una medida de la densidad del movimiento
Índice de oscilación (WOB)	%	Relación porcentual de VCL y VAP mide el tambaleo del espermatozoide
Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH)	μm	Desplazamiento medio efectuado por la cabeza
Frecuencia de batido de la cola (BFC)	Hz	Frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa la lineal en función del tiempo

Fuente: Mortimer ST. CASA-Practical aspects andrology lab corner. J Andrology. 2000;21:515-24.

tarizado. Los efectos sobre el modelo fueron el eyaculado (primero y segundo), la raza (criolla, romney marsh y hampshire) y el muestreo. La estructura del análisis dependió del BIC (criterio de selección: el menor valor) y cada variable fue analizada de forma individual según dicho criterio.

RESULTADOS

Parámetros de calidad seminal

El promedio de volumen espermático, motilidad total, motilidad progresiva, concentración, viabilidad y

morfología espermática del primer y segundo eyaculado para cada una de las razas se resume en la tabla 2. El volumen y la viabilidad presentaron diferencias estadísticas; fueron mayores en todos los casos en el primer eyaculado comparado con el segundo eyaculado, independientemente de la raza. Para el caso de la concentración espermática, se observó que en el primer eyaculado fue significativamente mayor al segundo eyaculado, y a través del tiempo se presentaron cambios significativos en la concentración. No hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en el porcentaje de motilidad total y motilidad progresiva para el primer y segundo eyaculado, al igual que no se observó efecto de la raza para estas variables.

Tabla 2. Parámetros de calidad seminal de dos eyaculados consecutivos en machos criollo, romney marsh y hampshire. Los valores se presentan en medias, EEM y valor de p para el efecto raza y eyaculado

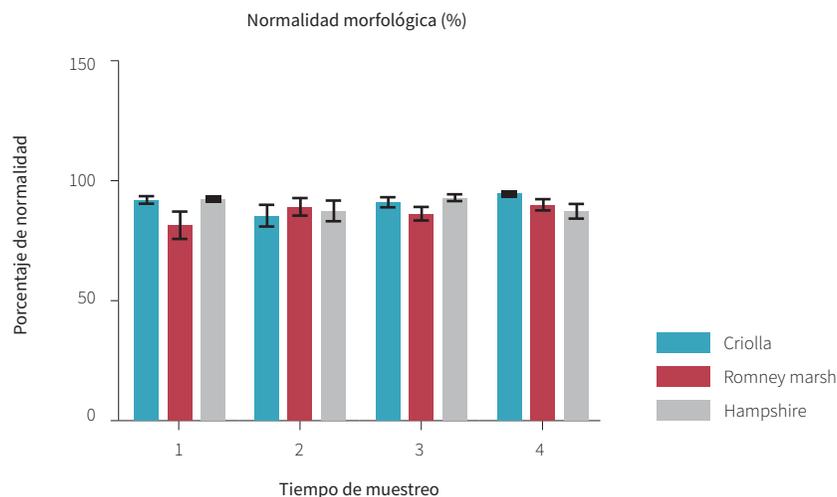
Efecto	Volumen	M. total	M. prog	Concentración	Viabilidad	Morfología
Criollo	0,9375	76,96	64,26	4388,76	90,39	90,81
Romney marsh	1,0844	75,38	59,91	4586,34	88,26	86,67
Hampshire	1,3426	76,56	62,55	4023,19	90,02	89,74
Valor-p	0,1356	0,9319	0,5458	0,6847	1,24	0,4199
EEM	0,1293	1,678	2,71	453,2	0,4592	2,12
Eyaculado 1	1,2458 ^a	76,96	60,69	5185,3 ^a	90,97 ^a	91,004
Eyaculado 2	0,9972 ^b	75,38	63,79	3480,76 ^b	88,14 ^b	87,14
Valor-p	0,0006	0,4363	0,1497	0,0005	0,0406	0,1466
EEM	0,07848	1,3702	1,85	307,57	0,925	1,755

a y b = diferencias significativas dentro de columnas.

En el caso de la normalidad morfológica espermática (figura 1), se observó que la interacción *raza-tiempo* fue significativa ($p = 0,0086$); se encontró que la raza criolla es superior en la mayoría de los muestreos. En el segundo eyaculado hubo una disminución de la normalidad morfológica en general de las tres razas, probablemente relacionado con una disminución en la libido

de los animales, ya que los muestreos generaron presión sobre estos al tener periodos de abstinencia cortos. En su totalidad, la normalidad morfológica de los eyaculados evaluados para las tres razas estuvo dentro de los estándares esperados para ser clasificados como eyaculados satisfactorios; este valor fue $>70\%$, como lo reporta Kasimanickam et al. (1).

Figura 1. Promedio y EEM de la morfología espermática en relación con la raza y el tiempo de colecta



*El efecto del tiempo y la raza presentó una interacción significativa ($p = 0,0086$). La raza criolla presentó mayores valores en el tiempo 1 y el 4. Entre el tiempo 2 y el 4 se observó una recuperación de los valores de morfología para la raza criolla con respecto a las demás razas.

Cinemática espermática

La definición de cinemática es la variación geométrica en el tiempo de los aspectos del movimiento (18). Los parámetros de ALH, LIN, STR y VAP no presentaron diferencias entre el primer y segundo eyaculado, pero se observó un efecto significativo ($p < 0,05$) de la raza y el tiempo para estas variables (figura 2).

La amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) es una variable medida en función de la distancia total que recorre la cabeza durante determinada trayectoria. Un valor muy alto se relaciona con trayectorias

irregulares como las que se observan en eyaculados con espermatozoides hiperactivos, superando un valor de $7 \mu\text{m}$ (17). El promedio de ALH para todas las muestras analizadas fue de $4,90 \mu\text{m}$. Se considera que el valor límite para espermatozoides hiperactivo en ovinos ha sido previamente establecido con un $\text{ALH} > 7 \mu\text{m}$ y una linealidad $< 45\%$ (19). Este hecho no hace referencia a un movimiento hiperactivo, pero sí a un movimiento más amplio que permitiría tener un recorrido mayor en la trayectoria de la célula. Los parámetros VSL y WOB presentan un efecto significativo para raza, eyaculado y tiempo. En general, VSL y WOB presentan mayores valores en el eyaculado 2. Se resume en la tabla 3.

Figura 2. Promedio y EEM para las variables cinemáticas de ALH, LIN, STR y VAP en relación con el tiempo y la raza

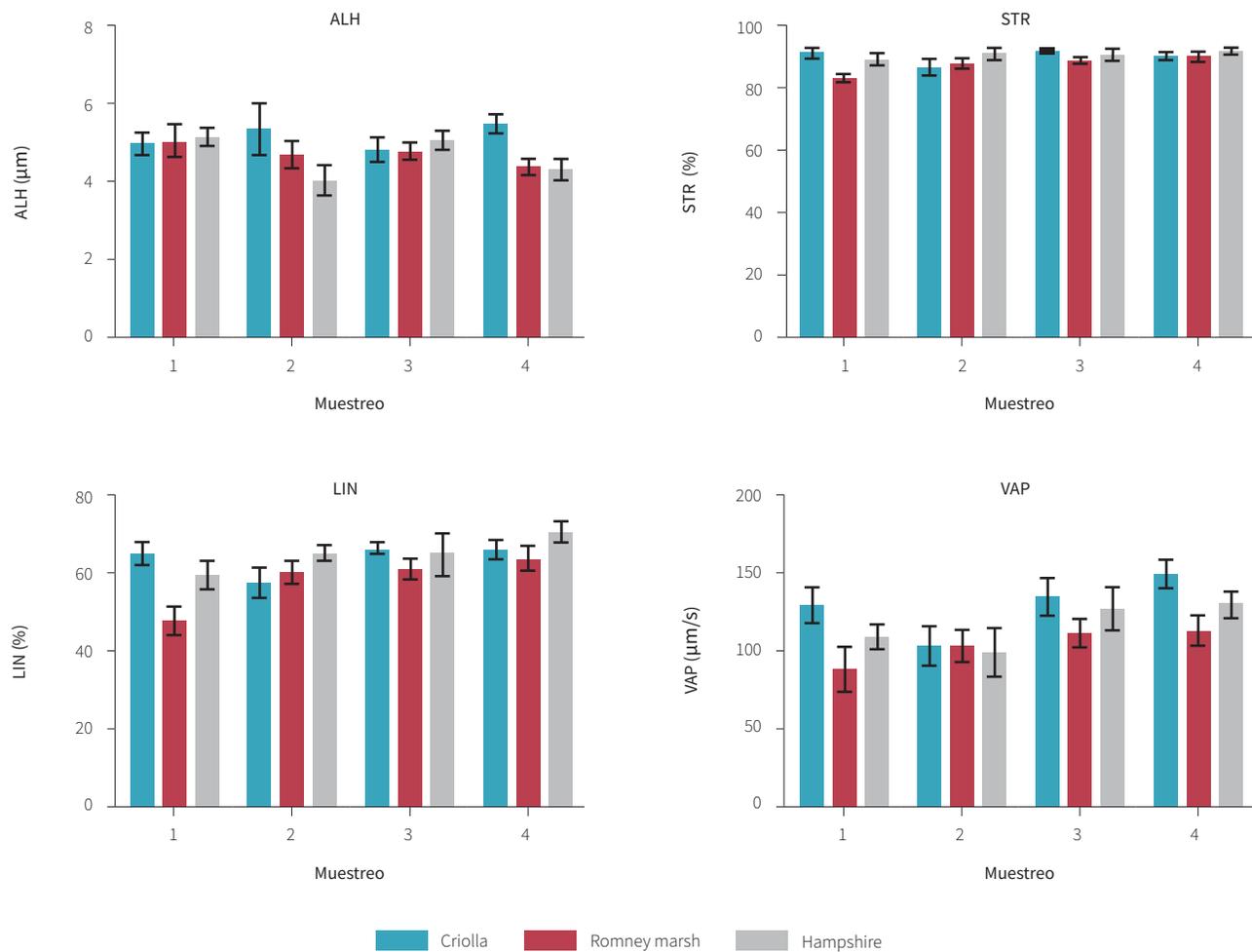


Tabla 3. Promedio y EEM para las variables de cinemática VSL y WOB en machos ovinos

		VSL $\mu\text{m/s}$		WOB %	
		Eyaculado 1	Eyaculado 2	Eyaculado 1	Eyaculado 2
Tiempo 1	Criollo	115,12 \pm 26,18	74,06 \pm 36,15	65,75 \pm 5,24	74,06 \pm 3,63
	Romney marsh	67,03 \pm 31,06	80,43 \pm 36,35	54,45 \pm 9,59	58,64 \pm 12,21
	Hampshire	83,62 \pm 12,05	113,67 \pm 11,44	83,62 \pm 3,88	70,59 \pm 4,90
Tiempo 2	Criollo	71,21 \pm 18,45	110,97 \pm 33,35	59,46 \pm 6,12	70,82 \pm 33,36
	Romney marsh	82,12 \pm 7,16	100,54 \pm 29,17	65,64 \pm 3,90	68,51 \pm 7,77
	Hampshire	94,04 \pm 25,94		70,575 \pm 4,52	
Tiempo 3	Criollo	134,01 \pm 32,43	117,94 \pm 30,82	72,13 \pm 2,47	71,30 \pm 4,12
	Romney marsh	82,11 \pm 11,92	118,19 \pm 10,31	64,23 \pm 5,33	71,46 \pm 4,60
	Hampshire	104,93 \pm 35,88	134,39 \pm 18,86	66,40 \pm 10,17	76,64 \pm 5,75
Tiempo 4	Criollo	122,65 \pm 25,40	150,0 \pm 13,33	67,68 \pm 1,72	76,79 \pm 2,89
	Romney marsh	82,66 \pm 16,54	122,61 \pm 16,69	65,12 \pm 4,38	75,57 \pm 3,49
	Hampshire	112,17 \pm 4,67	147 \pm 42,89	75,99 \pm 5,70	75,33 \pm 4,88
Eyaculado (valor de p)		0,0002		0,001	
Raza (valor de p)		0,0324		0,0065	
Tiempo (valor de p)		0,001		0,0001	

La variable BFC hace referencia al número de veces que la cabeza del espermatozoide cruza de dirección y está relacionado con el movimiento en ondas del flagelo (17). En las condiciones del presente experimento no se observó efecto significativo del tiempo, eyaculado o raza, ni se presentaron interacciones entre estos factores, al igual que en los valores de la variable VCL.

DISCUSIÓN

La estimación de los parámetros de calidad comúnmente usados en las evaluaciones de rutina ha sido blanco de controversia por su pobre relación con la habilidad fertilizante del eyaculado (3). Sin embargo, la integración de un sistema objetivo de evaluación, junto con la implementación de tinciones fluorescentes que determinan la integridad de la membrana, puede ser un criterio más relevante para determinar el potencial fértil de un eyaculado (8,17). La valoración de los parámetros de cinemática es el reflejo de la capacidad del espermatozoide para migrar a través del tracto genital femenino

e interactuar con el oocito en la fertilización (20); una característica que a futuro puede representar una herramienta sistemática útil para la predicción de la calidad seminal de un eyaculado, ya sea para su implementación en inseminación artificial en fresco, o procesos de criopreservación, y que en la actualidad sirve para clasificar los eyaculados en porcentajes de subpoblaciones que tienen alta relación con la fertilidad (4,21).

Este estudio compara el primer y segundo eyaculado de tres razas ovinas de lana, en condiciones de trópico alto colombiano con relación al volumen, motilidad total, motilidad progresiva, concentración, viabilidad y morfología, en 4 periodos de colecta con un intervalo de abstinencia de 3 días. Se observó en función de la motilidad progresiva y la motilidad total que no hubo cambios significativos entre eyaculados, a pesar de ser mayores los valores de motilidad en el primer eyaculado. Lo anterior contradice los resultados publicados por Abadjieva et al. (20), que observaron la existencia de una clara tendencia a presentar mayores valores en el segundo eyaculado para motilidad total ($p < 0,05$), teniendo en cuenta la

estacionalidad reproductiva en machos de la raza bulgarian milk. Similares resultados observaron Ollero et al. (3), que evaluaron la diferencia entre el primer, segundo y tercer eyaculado en estación reproductiva de machos de la raza rasa aragonesa, en los que es superior la motilidad en el segundo eyaculado comparado con los demás. Los efectos de tener una adecuada motilidad se observan en procesos de criopreservación del semen, al presentar mayor motilidad posdescongelación (6). Es probable que el comportamiento de la motilidad se relacione con un sistema de adaptación a las condiciones del medio en el que las tres razas evaluadas (criollo, romney marsh y hampshire) se encuentran, ya que no se ha reportado estacionalidad reproductiva en las condiciones de trópico bajo, en las cuales se realizó el estudio. A su vez, las condiciones climáticas del experimento fueron óptimas en cuanto a la disponibilidad de alimento.

La viabilidad evaluada como integridad de membrana fue significativamente mayor en el primer eyaculado comparado con el segundo, independientemente de la raza o el periodo de colecta. Este resultado difiere con lo observado por el estudio de Ollero et al. (3), probablemente debido a las diferencias experimentales, ya que en dicho estudio fue en condiciones de estacionalidad reproductiva en el hemisferio norte. Lo anterior refleja que el primer eyaculado es probablemente mejor en función de la viabilidad.

Tradicionalmente, la concentración espermática y el volumen seminal se consideran parámetros de importancia para la mayoría de los estudios de inseminación artificial (22,23). La concentración y el volumen disminuyeron de forma significativa entre el primer y segundo eyaculado, resultado similar a lo reportado por otros autores en ovinos (2,3,6). Este fenómeno se considera como un proceso fisiológico normal, resultado de la eyaculación consecutiva, en relación con la función del reservorio espermático, con posible efecto racial como lo describen Stellflug y Berardinelli (24). Por otro lado, la concentración tiene una connotación negativa sobre la normalidad morfológica en dosis seminales (23). Lo anterior se explica por una disminución en la capacidad endógena del plasma seminal para eliminar la produc-

ción de radicales libres alrededor de cada espermatozoide eyaculado, lo que afecta la funcionalidad de las células, y esta varía entre cada eyaculado (25).

El conocimiento de los parámetros de cinemática espermática para las razas que se encuentran en condiciones de trópico es indispensable para identificar los diferentes elementos que pueden explicar su adaptabilidad al medio. Los parámetros cinemáticos van a cambiar dependiendo del medio en el que se encuentren las células espermáticas, como observaron Mortimer y Maxwell (26) al comparar los parámetros cinemáticos en plasma seminal, medio PBS (búfer fosfato salino) y ASP (plasma seminal artificial). Por lo tanto, las diferencias en la disponibilidad de plasma seminal en un eyaculado entre razas posiblemente afectan las variables de movimiento celular *in vivo*. El medio de evaluación seminal de este estudio era un medio enriquecido para el mantenimiento de las células espermáticas que busca no afectar su fisiología (16). Adicionalmente, durante el proceso de evaluación se garantizaron las mismas condiciones de evaluación y se implementaron los elementos recomendados por el fabricante (Hamilton-Thorne) para la evaluación espermática.

Los valores de cinemática observados en el presente estudio difieren completamente de los valores reportados por Abadjieva et al. (20), que para la raza bulgarian milk (raza sintética) fueron inferiores; pero en el caso de las razas puras evaluadas por Kasimanickam et al. (27), los valores estuvieron más acordes con los obtenidos en este estudio. Con respecto a los estudios realizados en la raza rasa aragonesa, se observa que los parámetros de cinemática del presente estudio son mayores para las diferentes velocidades comparadas con lo hallado por Palacín et al. (8), quienes a su vez reportan valores inferiores de motilidad progresiva (49%), que es un reflejo de la velocidad y linealidad con la que avanzan los espermatozoides a través de un medio.

Los valores de la velocidad (VCL, VSL y VAP) son medidos en unidades de distancia ($\mu\text{m/s}$). El VSL es siempre el valor de velocidad más bajo para cualquier espermatozoide y generalmente los valores son muy similares al

VAP. En el caso en el que la cabeza presenta un movimiento lineal y regular, con muy poco movimiento lateral, el VAP es similar al VSL. En casos contrarios en los que hay mucho movimiento lateral, el VAP puede ser mucho más grande, disminuyendo el valor de STR del movimiento (17). En este estudio se observó que la raza criolla presentó mayores valores para VSL y VAP comparado con la raza romney marsh, lo que podría sugerir la capacidad de las células para recorrer mayor distancia en menor tiempo.

Por otro lado, se ha reportado la importancia de variables como la viabilidad y la velocidad curvilínea (VCL) como predictores de la fertilidad en ovinos (21), relacionado con las tres subpoblaciones espermáticas descritas para esta especie, según el patrón de cinemática que presentan (lenta, no lineal; rápida, lineal; rápida, no lineal) (28). También se ha comprobado que los espermatozoides de ovinos con alta fertilidad presentan mayores valores de viabilidad, VCL y VSL que los de ovinos de baja fertilidad (29). Lo anterior está asociado a la necesidad de las células espermáticas de penetrar la mucosa viscosa del oviducto para lograr la fertilización. La presencia de espermatozoides con motilidad vigorosa (VCL) y viabilidad pueden incrementar la probabilidad de un mayor número de espermatozoides para fertilizar (4).

El eyaculado mamífero es muy heterogéneo y contiene subpoblaciones espermáticas con importantes diferencias en sus características cinemáticas (30), o en procesos como apoptóticos, capacitados y reaccionados (acrosoma), procesos que involucran cambios en la membrana plasmática (28). Tales condiciones pueden explicar la presencia de diferentes patrones de motilidad (cinemática) que caracterizan a las subpoblaciones espermáticas, y cambios en la proporción de estas poblaciones pueden afectar el éxito en el proceso de fertilización como se ha descrito en ovinos (4), en venado rojo ibérico (31), humano (32), entre otras especies. Desde hace dos décadas el estudio de las subpoblaciones ha tenido relación con la fertilidad (33).

Los sistemas de análisis computarizado (CASA) permiten la diferenciación de espermatozoides individuales

de acuerdo con sus características de motilidad, y son uno de los métodos más confiables para el estudio de subpoblaciones espermáticas (30). La evaluación cinemática permite a cada espermatozoide por individual ser asignado dentro de una subpoblación específica de acuerdo con las trayectorias obtenidas para el análisis de cada muestra (30), pero no existe una prueba incluida en los análisis de calidad que complemente dicha información. Para poder llegar a estas pruebas, es importante conocer la fisiología de las células y el efecto de la raza y el ambiente sobre las características del eyaculado. De hecho, las subpoblaciones pueden actuar como marcadores de una buena o mala calidad del eyaculado (34,35).

CONCLUSIONES

En el presente estudio se observan diferencias entre el primer y segundo eyaculado para las variables de volumen, concentración y viabilidad independientemente de la raza evaluada. Para el caso de la normalidad morfológica, el segundo eyaculado presenta mejores porcentajes de células normales con respecto al primer eyaculado, lo que representa un efecto significativo de la raza, en el que la raza criolla es superior en normalidad morfológica. En cuanto a la cinemática, las variables de VSL y WOB fueron superiores en el segundo eyaculado, además de tener un efecto significativo de raza. Por otro lado, las variables relacionadas a la velocidad y progresividad en la motilidad de las células (ALH, VAP, STR, LIN) no presentaron diferencias entre eyaculados, pero sí se observó que la raza criolla presenta valores mayores de forma significativa, lo que posiblemente indicaría que los espermatozoides de la raza criolla tienen la capacidad de recorrer mayores distancias en menor tiempo, comparados con los de otras razas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la subvención de la Universidad Nacional de Colombia, en el proyecto "Programa estratégico para el mejoramiento genético y reproducti-

vo y determinación de las características y calidad de la canal y la carne en sistemas de producción ovina en cinco regiones de Colombia” (Ref. Proyecto: 110157635854, financiado por Colciencias en la convocatoria Col576 Del 2012).

REFERENCIAS

1. Kasimanickam R, Pelzer KD, Kasimanickam V, Swecker WS, Thatcher CD. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. *Theriogenology*. 2006;65(7):1407-21. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.056>
2. Yotov S, Fasulkov I, Vassilev N. Effect of ejaculation frequency on spermatozoa survival in diluted semen from Pleven Blackhead rams. *Turkish J Vet Anim Sci*. 2011;35(2):117-22.
3. Ollero M, Muiño-Blanco T, López-Pérez MJ, Cebrián-Pérez JA. Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *Int J Androl*. 1996;19(5):287-92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1996.tb00477.x>
4. Yániz JL, Palacín I, Vicente-Fiel S, Sánchez-Nadal JA, Santolaria P. Sperm population structure in high and low field fertility rams. *Anim Reprod Sci*. 2015;156:128-34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.03.012>
5. Souza CEA, Rego JPA, Lobo CH, Oliveira JTA, Nogueira FCS, Domont GB, et al. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. *J Proteomics [internet]*. 2012;75(14):4436-56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.05.039>
6. Nel-Themaat L, Harding GD, Chandler JE, Chenevert JF, Damiani P, Fernandez JM, et al. Quality and freezing qualities of first and second ejaculates collected from endangered Gulf Coast Native rams. *Anim Reprod Sci*. 2006;95(3-4):251-61. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.09.014>
7. Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. *Small Rumin Res*. 2002;44(2):153-8.
8. Palacín I, Vicente-Fiel S, Santolaria P, Yániz JL. Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram. *Small Rumin Res*. 2013;112(1-3):128-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.12.014>
9. Contri A, Valorz C, Faustini M, Wegher L, Carluccio A. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*. 2010;74(3):424-35. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.025>
10. Bravo JA, Montanero J, Calero R, Roy TJ. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams. *Anim Reprod Sci*. 2011;129(1-2):22-9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.10.005>
11. Yániz JL, Mateos JA, Santolaria P. Zwitterionic buffers preserve ram semen quality more efficiently than TRIS during storage at 15 °C. *Small Rumin Res*. 2011;95(1):54-60. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.08.006>
12. Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Tamayo-Canul J, Anel L, de Paz P, Martínez-Pastor F. Post-thawing quality and incubation resilience of cryopreserved ram spermatozoa are affected by antioxidant supplementation and choice of extender. *Theriogenology*. 2015;83(4):520-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.018>
13. Álvarez M, Tamayo-Canul J, Martínez-Rodríguez C, López-Urueña E, Gomes-Alves S, Anel L, et al. Specificity of the extender used for freezing ram sperm depends of the spermatozoa source (ejaculate, electroejaculate or epididymis). *Anim Reprod Sci*. 2012;132(3-4):145-54. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.05.006>
14. Galina MA, Morales R, Silva E, López B. Reproductive performance of Pelibuey and Blackbelly sheep under tropical management systems in Mexico. *Small Rumin Res*. 1996;22(1):31-7. [https://doi.org/10.1016/0921-4488\(95\)00878-0](https://doi.org/10.1016/0921-4488(95)00878-0)
15. Balaro MFA, Brandão FZ, Peneiras AB, Oba E, da Fonseca JF, Almosny NR, da Cruz Cardoso E. Reproductive performance, metabolic and hormonal profiles

- of Santa Inês ewes in winter and summer under tropical conditions. *Trop Anim Health Prod.* 2015;47(3):627-31. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0757-z>
16. Mendoza N, Casao A, Del Valle I, Serrano E, Nicolau S, Asumpção ME, et al. Quality characteristics and fertilizing ability of ram sperm subpopulations separated by partition in an aqueous two-phase system. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012;880(1):74-81. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.11.019>
 17. Mortimer ST. CASA-Practical aspects andrology lab corner. *J Andrology.* 2000;21:515-24.
 18. Drobnis EZ, Yudin AI, Cherr GN, Katz DF. Kinematics of hamster sperm during penetration of the cumulus cell matrix. *Gamete Res.* 1988;21(4):367-83.
 19. Colás C, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. Caffeine induces ram sperm hyperactivation independent of cAMP-dependent protein kinase. *Int J Androl.* 2010;33(1): e187-97. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.00991.x>
 20. Abadjieva D, Chervenkov M, Stefanov R, Metodiev N, Kistanova E, Kacheva D, et al. Effect of breeding season on the kinematic parameters and morphology of ram sperm from synthetic population Bulgarian milk sheep breed. *Bulg J Agric Sci.* 2014;20(4):967-72.
 21. Santolaria P, Vicente-Fiel S, Palacín I, Fantova E, Blasco ME, Silvestre MA, Yániz JL. Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. *Anim Reprod Sci.* 2015;163:82-8. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.10.001>
 22. Avdatek F, Gundogan M, Yeni D. Functional test in semen quality determination. *J Anim Vet Adv.* 2010;9(5):867-71.
 23. Gundogan M, Yeni D, Avdatek F, Fidan AF. Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Anim Reprod Sci.* 2010;122(3-4):200-7. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.012>
 24. Stellflug JN, Berardinelli JG. Ram mating behavior after long-term selection for reproductive rate in Rambouillet ewes. *J Anim Sci.* 2002;80(10):2588-93.
 25. Kommisrud E, Paulenz H, Sehested E, Grevle IS. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Vet Scand.* 2002;43(1):49-55. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-43-49>
 26. Mortimer ST, Maxwell WM. Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction.* 2004;127(2):285-91. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00075>
 27. Kasimanickam R, Kasimanickam V, Pelzer KD, Dascano JJ. Effect of breed and sperm concentration on the changes in structural, functional and motility parameters of ram-lamb spermatozoa during storage at 4 °C. *Anim Reprod Sci.* 2007;101(1-2):60-73. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.09.001>
 28. Gonzalez-Arto M, Hamilton TRDS, Gallego M, Gaspar-Torrubia E, Aguilar D, Serrano-Blesa E, et al. Evidence of melatonin synthesis in the ram reproductive tract. *Andrology.* 2016;4(1):163-71. <https://doi.org/10.1111/andr.12117>
 29. Vicente-Fiel S, Palacín I, Santolaria P, Fantova E, Quintín-Casorrán FJ, Sevilla-Mur E, Yániz JL. In vitro assessment of sperm quality from rams of high and low field fertility. *Anim Reprod Sci.* 2014;146(1-2):15-20. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.02.005>
 30. Luna C, Yeste M, Rivera Del Alamo MM, Domingo J, Casao A, Rodriguez-Gil JE, et al. Effect of seminal plasma proteins on the motile sperm subpopulations in ram ejaculates. *Reprod Fertil Dev.* 2015. <https://doi.org/10.1071/RD15231>
 31. Ramón M, Soler AJ, Ortiz JA, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Roldan ER, Garde JJ. Sperm population structure and male fertility: an intraspecific study of sperm design and velocity in red deer. *Biol Reprod.* 2013;89(5):110. <https://doi.org/10.1095/biol-reprod.113.112110>
 32. Buffone MG, Doncel GF, Marín Briggiler CI, Vazquez-Levin MH, Calamera JC. Human sperm subpopulations: relationship between functional quality and protein tyrosine phosphorylation. *Hum Reprod.* 2004;19(1):139-46. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh040>

33. Del Valle I, Gómez-Durán A, Holt WV, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Soy lecithin interferes with mitochondrial function in frozen-thawed ram spermatozoa. *J Androl.* 2012;33(4):717-25. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.014944>
34. Pérez-Pé R, Martí JJ, Sevilla E, Fernández-Sánchez M, Fantova E, Altarriba J, et al. Prediction of fertility by centrifugal countercurrent distribution (CCCD) analysis: correlation between viability and heterogeneity of ram semen and field fertility. *Reproduction.* 2002;123(6):869-75. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230869>
35. Druart X, Gatti JL, Huet S, Dacheux JL, Humblot P. Hypotonic resistance of boar spermatozoa: sperm subpopulations and relationship with epididymal maturation and fertility. *Reproduction.* 2009;137(2):205-13. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0225>