



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE VETERINARIA



DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL

TESIS DOCTORAL

*Análisis cinético y morfométrico del espermatozoide
del caballo empleando el sistema Sperm Class
Analyzer*

ANTONIO BUZÓN CUEVAS

CÓRDOBA, SEPTIEMBRE DE 2013.

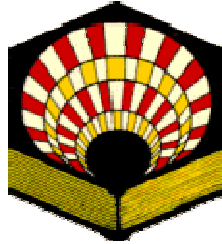
TITULO: *Análisis cinético y morfométrico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer*

AUTOR: *Antonio Buzón Cuevas*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2014
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE VETERINARIA



DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL

“Análisis cinético y morfométrico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer”

***Memoria presentado por el Licenciado
D. Antonio Buzón Cuevas para optar
al grado de Doctor en Veterinaria***

2013



UNIVERSIDAD
DE
CÓRDOBA

Departamento de Medicina y Cirugía Animal

D^a. INMACULADA RODRÍGUEZ ARTÍLES, D. MANUEL HIDALGO PRIETO y D. JESÚS M. DORADO MARTÍN, directores de la Tesis Doctoral y profesores del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba,

INFORMAN:

Que la tesis titulada *“Análisis cinético y morfométrico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer”*, de la que es autor el Licenciado en Veterinaria **D. Antonio Buzón Cuevas**, ha sido realizada en este departamento bajo nuestra dirección y asesoramiento, se considera finalizada y puede ser presentada para su exposición y defensa pública ante el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos en Córdoba a 20 de septiembre 2013.

Dra. Inmaculada Rodríguez Artiles Dr. Manuel Hidalgo Prieto Dr. Jesús M. Dorado Martín

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que, de una manera u otra, han participado en la elaboración de esta tesis, y en especial:

A mi directora, la Dra. D^a Inmaculada Rodríguez Artilles, por sus consejos y fe incondicional en este proyecto.

A mis codirectores, el Dr. D. Manuel Hidalgo Prieto y el Dr. D. Jesús M. Dorado Martín, por su paciencia, trabajo y correcciones, sin las cuales no hubiera podido terminar esta tesis.

Al Dr. D. Andrés Muñoz Serrano por su imprescindible colaboración con la estadística, que en paz descanse.

Al Dr. D. Francisco Javier Mendoza García y al Dr. D. Rafael Alejandro Pérez Écija por todos los esfuerzos que han hecho a lo largo de estos años, para que no perdiera el rumbo y pudiera finalizar esta etapa de mi vida.

A toda mi Familia, padres, hermanas, sobrinos y Amaranta por todo su apoyo, sin el cual yo no sería la persona que soy.

A Miguel y Killo *in memoriam*.

Este trabajo se ha realizado gracias al proyecto PETRI (PTR1995-0826-OP) sin cuya aportación no hubiese sido posible esta tesis.

ÍNDICE

Índice	
I. Introducción.....	23
II. Objetivos	29
III. Revisión Bibliográfica.....	33
III a. Espermiograma Clásico.....	33
III.a.1. pH.....	34
III.a.2. Volumen y Concentración espermática.....	35
III.a.3. Viabilidad espermática	37
III.a.4. Morfología espermática.....	39
III.a.5. Movimiento espermático.	43
III.b. Sistemas computarizados de análisis espermático (CASA)	46
III.b.1. Sistema computarizado de análisis del movimiento espermático ..	47
III.b.2. Sistemas computarizado de análisis de la morfología espermática	53
III.b.3. Correlación entre los Parámetros Morfométricos y Cinéticos obtenidos mediante los sistemas CASA.....	59
IV. Material y Método.....	63
IV.a. Animales.....	63
IV.b. Recogida de esperma	63
IV.d. Valoración de la calidad espermática	65
IV.d.1. Volumen, pH y Concentración del eyaculado	65
IV.d.2. Morfología espermática e integridad del acrosoma	65
IV.d.3. Movimiento espermático	66
IV.d.4. Morfometría espermática	69
IV.e. Diseño experimental.....	72
IV.e.1.1. Experimento 1. Estudio de los parámetros cinéticos del espermatozoide equino: identificación de subpoblaciones cinéticas en el eyaculado fresco procedentes de caballos de diferentes razas.	73

IV.e.1.2. Experimento 2. Estudio de los parámetros morfométricos del espermatozoide equino: identificación de subpoblaciones morfométricas en eyaculados frescos procedentes de caballos de diferentes razas.	73
IV.e.1.3. Experimento 3. Estudio de la correlación entre los parámetros morfométricos y cinéticos del espermatozoide de caballos de diferentes razas.	74
IV.f. Análisis estadístico	74
IV.f.1. Variables Cinéticas	74
IV.f.2. Variables Morfométricas	75
IV.f.3. Correlación entre las variables cinéticas y morfométricas del espermatozoide del caballo.	76
V. RESULTADOS	79
V.a. Resultados promedio del análisis de la calidad seminal realizado en eyaculados frescos de équidos.....	79
V.b. Resultados del estudio de los parámetros cinéticos del espermatozoide equino: identificación de subpoblaciones cinéticas en el eyaculado fresco procedentes de caballos de diferentes razas.....	81
V.b.1. Estudio de movilidad CASA.....	81
V.b.2. Subpoblaciones espermáticas	83
V.c. Resultados del estudio de los parámetros morfométricos del espermatozoide equino: identificación de subpoblaciones morfométricas en el eyaculado fresco procedentes de caballos de diferentes razas.....	93
V.c.1. Estudio de morfometría CASMA	93
V.c.2. Subpoblaciones morfométricas del eyaculado de caballo.....	94
V.d. Correlación entre las variables cinéticas y morfométricas del espermatozoide del caballo.	110
VI. Discusión:.....	121
VI.a. Parámetros de calidad seminal	121

VI.b. Parámetros cinéticos del espermatozoide equino: identificación de subpoblaciones cinéticas en el eyaculado fresco procedentes de caballos de diferentes razas	123
VI.b.1. Subpoblaciones cinéticas	124
VI.c. Parámetros morfométricos del espermatozoide equino: identificación de subpoblaciones morfométricas en el eyaculado fresco procedentes de caballos de razas diferentes	128
VI.c.1. Subpoblaciones morfométricas	130
VI.d. Correlación entre las variables cinéticas y morfométricas del espermatozoide del caballo	133
VII Conclusiones	139
VIII Resumen	145
IX SUMMARY	149
X. Bibliografía	153

Índice de tablas

Tabla 1. Valores medios del espermiograma clásico	45
Tabla 2. Set up del sistema utilizado para la valoración del movimiento espermático durante este estudio	67
Tabla 3. Set up del sistema casma utilizado para la valoración morfométrica de la cabeza del espermatozoide de caballo	70
Tabla 4. Parámetros espermáticos (Media \pm SEM) obtenidos tras la evaluación de la calidad seminal de 40 eyaculados de 10 sementales fértiles.	80
Tabla 5. Parámetros cinéticos (Media \pm SEM) obtenidos por el sistema Sperm Class Analyzer tras la evaluación objetiva de 40 eyaculados de 10 sementales adultos.....	82
Tabla 6. Resultado del Análisis de Componentes Principales de los parámetros cinéticos obtenidos mediante el sistema Sperm Class Analyzer.....	83
Tabla 7. Parámetros cinéticos (Media \pm SEM) que definen las 4 subpoblaciones espermáticas identificadas en el eyaculado de caballo (n = 40).	86
Tabla 8. Parámetros cinéticos (Media \pm SEM) descriptores de la Subpoblación 1 (sP 1) en las 4 razas estudiadas.	87
Tabla 9. Parámetros cinéticos (Media \pm SEM) descriptores de la Subpoblación 2 (sP 2) para las 4 razas estudiadas.....	88
Tabla 10. Parámetros cinéticos (Media \pm SEM) descriptores de la Subpoblación 3 (sP3) para las 4 razas estudiadas.....	89
Tabla 11. Parámetros cinéticos (Media \pm SEM) descriptores de la Subpoblación 4 (sP4) para las 4 razas estudiadas.....	91
Tabla 12. Relación del porcentaje de espermatozoides de cada raza según la subpoblación	92
Tabla 13. Parámetros morfométricos (Media \pm SEM) obtenidos tras la evaluación objetiva de 40 eyaculados de sementales adultos (n = 10).....	94
Tabla 14. Matriz factorial de la correlación entre las componentes principales (cpm-1 y cpm-2) y las variables morfométricas originales (longitud, anchura, área, perímetro, Elipticidad, rugosidad, elongación y regularidad).....	95

Tabla 15. Parámetros morfométricos (Media \pm SEM) que definen las 5 subpoblaciones espermáticas consideradas como normales (M-1, M-2, M-3, M-4 y M-5), identificadas en el eyaculado del caballo.	100
Tabla 16. Parámetros morfométricos (Media \pm SEM) que definen los subgrupos identificados en la Subpoblación M-6 del eyaculado del caballo.....	101
Tabla 17. Parámetros morfométricos (Media \pm SEM) descriptores de la Subpoblación M-1 (estándar).....	103
Tabla 18. Parámetros morfométricos (Media \pm SEM) descriptores de la Subpoblación M-2 (grande).....	104
Tabla 19. Parámetros morfométricos (Media \pm SEM) descriptores de la Subpoblación M-3 (pequeña).....	106
Tabla 20. Parámetros morfométricos (Media \pm SEM) descriptores de la Subpoblación M-4 (alargada).....	107
Tabla 21. Parámetros morfométricos (Media \pm SEM) descriptores de la Subpoblación M-5 (globosa).....	108
Tabla 22. Distribución de las subpoblaciones morfométricas (M-1, M-2, M-3, M-4, M-5 y M-6), identificadas en eyaculados frescos de caballo, dentro de cada raza estudiada.....	109
Tabla 23. Correlación de Pearson entre las parámetros morfométricos y cinéticos del espermatozoide de caballo.....	111
Tabla 24. Correlación de Pearson entre las variables morfométricas y cinéticas del espermatozoide de caballo de raza PRA.....	112
Tabla 25. Correlación de Pearson entre las variables morfométricas y cinéticas del espermatozoide de caballo de raza PSI.....	113
Tabla 26. Correlación de Pearson entre las variables morfométricas y cinéticas del espermatozoide de caballo de raza A-a.	114
Tabla 27. Correlación de Pearson entre las variables morfométricas y cinéticas del espermatozoide de caballo de raza PRE.....	115
Tabla 28. Modelo de regresión lineal múltiple de los componentes principales de las variables cinéticas (CPC 1, CPC 2 y CPC 3) en función a los parámetros morfométricos.....	116
Tabla 29. Modelo de regresión lineal múltiple de los componentes principales morfométricos (CPM 1 y CPM 2) en función a los parámetros cinéticos.....	117

Índice de figuras

Figura 1. Representación gráfica de los parámetros cinéticos obtenidos mediante el sistema CASA.....	69
Figura 2. Imagen de la ventana de captura del SCA.....	71
Figura 3. Parámetros morfométricos evaluados en la cabeza del espermatozoide equino	72
Figura 4. Dendograma derivado de los datos obtenidos a partir de semen fresco de caballos	84
Figura 5. Representación grafica de las distintas subpoblaciones morfométricas obtenidas a partir de semen fresco de caballos.	97

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

La fertilización es una función biológica compleja para la cual el espermatozoide, célula altamente especializada constituida por diversos compartimentos, debe estar íntegro para desarrollar su función biológica de forma correcta. El método más preciso para valorar la fertilidad potencial de una muestra de semen es la estimación del tanto por ciento de gestaciones obtenidas tras la cubrición mediante monta natural dirigida o la inseminación artificial de una hembra (fertilidad "in vivo"). Sin embargo, este método requiere desarrollar ensayos de campo que suponen un gran esfuerzo, elevando así los costes y retrasando considerablemente la obtención de la información. Por ello, habitualmente se recurre a la evaluación, en condiciones de laboratorio, de una serie de parámetros espermáticos que identifican la calidad seminal de la muestra y que están relacionados en mayor o menor medida con la fertilidad (Colenbrander et al., 2003).

Actualmente, no existe un test único de valoración de esperma que permita predecir la fertilidad potencial de una muestra de semen. Así, es necesario integrar el análisis de diferentes parámetros espermáticos que informen de la integridad y funcionalidad del espermatozoide. Según Graham (1996) las cualidades que deben tener los espermatozoides de un eyaculado fecundante son: motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactivada, integridad estructural y funcional de la membrana, integridad de las enzimas asociadas a la fecundación, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético. Sin embargo, este análisis integral es muy difícil de desarrollar, debido a la enorme complejidad inherente de la función espermática (Amann and Hammerstedt, 1993; Cueva., 1998; Graham, 1996). Esta complejidad evidencia el hecho de que el análisis clásico basado en el estudio de la motilidad, concentración, viabilidad y estado del acrosoma o las morfoanomalías no permite evaluar todas las características funcionales espermáticas, sobreestimando o subestimando así el potencial fecundante de

una muestra (Pace et al., 1981; Saacke et al., 1980). Las técnicas actuales exploran facetas concretas del proceso reproductivo y solo ofrecen una información parcial del potencial del espermatozoide, aunque al combinar varias pruebas “in vitro” se puede estudiar con mayor amplitud y precisión la viabilidad espermática (Graham 1980). Por tanto, existe un gran número de métodos de laboratorio que intentan determinar la calidad espermática y poder predecir además la fertilidad de las muestras de una forma rápida y precisa (Boixo, 1994).

Tradicionalmente, la calidad del esperma se viene evaluando a través de una serie de parámetros macro y microscópicos, integrados en una prueba de valoración “in vitro” que podemos denominar espermograma clásico. A pesar de que la correlación entre estos parámetros y la fertilidad no es definitiva, si ofrecen información válida de la calidad seminal de una muestra o de un individuo. Así, una muestra seminal de buena calidad puede no siempre ser fértil, mientras que una de baja calidad rara vez lo será (Hidalgo, 2003). Actualmente, este análisis seminal se ha mejorado mediante la introducción de nuevas técnicas objetivas de valoración. En esta línea, el estudio de la motilidad y la concentración espermática, junto a las anomalías morfológicas, pueden realizarse hoy día de forma objetiva mediante el uso de sistemas automáticos de análisis de semen (Computer-Assisted Sperm Analysis, CASA). Con este fin se han usado en distintas especies animales como el caballo (Ball and Mohammed, 1995; Davis et al., 1993a; Hidalgo et al., 2008; Palmer and Magistrini, 1992; Samper et al., 1991; Varner et al., 1991), el asno (Dorado et al., 2013; Miró et al., 2005), el toro (Muiño et al., 2009; Muiño et al., 2008a), el cerdo (Peña et al., 2005), el carnero (Dorado et al., 2010) o el perro (Dorado et al., 2011b). La implementación de estos sistemas CASA atenúa en gran medida el factor subjetivo del análisis seminal y garantiza una mejor correlación con la capacidad fecundante del espermatozoide (Jasko et al., 1992). Estos nuevos métodos valoran un gran número de variables cuantitativas que ofrecen una información muy completa y precisa de las características cinéticas y morfométricas de los espermatozoides (Gil et al., 2009). Asimismo, la información que ofrecen estas variables puede también ser agrupada mediante técnicas estadísticas multivariantes (Martínez-Pastor et al., 2011), reduciendo

así el número de variables a estudiar. En este sentido, el uso combinado de los sistemas CASA y la estadística multivariante ha permitido demostrar la existencia de diferentes subpoblaciones cinéticas y morfométricas de espermatozoides dentro de un eyaculado en diversas especies animales (Dorado et al., 2011a; Dorado et al., 2011b; Dorado et al., 2010; Estes et al., 2009; Hidalgo et al., 2008; Maroto-Morales et al., 2012; Miró et al., 2009; Muiño et al., 2008b; Ortega-Ferrusola et al., 2009; Thurston et al., 2001), modificando así la idea de que un eyaculado se comporta como una población uniforme de distribución normal. Por lo tanto, hoy en día es ampliamente aceptado por la comunidad científica la existencia de diferentes subpoblaciones en el eyaculado de muy diversas especies (Comber et al., 2004; Martínez-Pastor et al., 2008). No obstante, hasta la fecha, no existen estudios sobre la estructura poblacional, cinética y morfométrica, de los eyaculados de diversas razas equinas. Con esta Tesis Doctoral pretendemos por tanto, profundizar en el estudio de las características espermáticas de los eyaculados de caballos de distinta razas, incorporando el sistema CASA denominado Sperm Class Analyzer (SCA[®]). Asimismo, empleando el análisis estadístico multivariante, pretendemos definir la estructura poblacional cinética y morfométrica del eyaculado de las razas equinas seleccionadas, proporcionando nuevos puntos de vista que permitan determinar de forma más precisa la calidad seminal del eyaculado del caballo.

Objetivos

II. OBJETIVOS

El presente trabajo pretende valorar los parámetros cinéticos y morfométricos del espermatozoide del caballo, mediante el análisis computarizado del esperma y su posterior análisis estadístico multivariante, para identificar la presencia de subpoblaciones espermáticas en los eyaculados del caballo de las razas: Pura Raza Árabe (PRA), Pura Sangre Inglés (PSI), Anglo-Árabe (A-a) y Pura Raza Español (PRE).

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

1. Caracterizar los parámetros cinéticos del espermatozoide equino e identificar las subpoblaciones cinéticas presentes en los eyaculados de caballos de diferentes razas.
2. Caracterizar los parámetros morfométricos del espermatozoide equino, identificando las subpoblaciones morfométricas presentes en los eyaculados de caballos de las diferentes razas estudiadas.
3. Estudiar la correlación entre los parámetros cinéticos y morfométricos encontrados en los eyaculados de caballos de razas diferentes.

Revisión Bibliográfica

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

III a. Espermograma Clásico

El espermograma clásico permite realizar una primera evaluación eficaz de la calidad espermática, ayudando en la predicción del potencial de fertilidad así como en la identificación de posibles causas de infertilidad (Hidalgo, 2003). Para ello, se incluyen una serie de pruebas que evalúan diversos factores o funciones de la célula espermática. Aunque no hay un consenso sobre la eficacia de las diferentes pruebas utilizadas en andrología, en cuanto a predicción de la fertilidad del macho, el espermograma sigue siendo, sin embargo, una prueba fidedigna que permite valorar la calidad de las muestras seminales correspondientes a diferentes especies. No obstante, en ocasiones, los resultados de los parámetros espermáticos del espermograma clásico pueden no ser suficientes para determinar con exactitud la capacidad fecundante de un eyaculado (Butler and Roberts, 1975; Pace et al., 1981; Rodriguez-Martinez, 2000.; Saacke et al., 1980).

Debido a que el esperma es uno de los fluidos biológicos más variables que existen (Lewis, 2007) y a que los espermatozoides son conocidos por la capacidad de cambiar su comportamiento en respuesta a sutiles cambios ambientales, como métodos de procesado, conservación, temperatura, etc., los científicos y especialistas en reproducción animal se enfrentan a un gran reto a la hora de poder valorar la calidad seminal y comparar sus resultados con los de otros estudios o laboratorios. Esto es debido, en parte, a la ausencia de un protocolo estándar de valoración (Gravance et al., 1998b). Existe así una gran variabilidad de resultados, equiparable a la variedad de métodos empleados en la valoración espermática, que limitan el valor de los métodos de evaluación de la calidad seminal en caballos.

Entre las limitaciones descritas requiere especial mención la necesidad de un personal cualificado para el desarrollo de determinadas pruebas de

laboratorio, al haberse demostrado ampliamente la influencia del evaluador en el resultado final de las mismas (Davis and Siemers, 1995). Otro problema es la falta de consenso entre los laboratorios a la hora de interpretar los resultados (Vázquez et al., 1997) y, por tanto, si bien el espermiograma clásico aporta una información válida de la calidad seminal ésta no es suficiente como para poder permitirnos una mayor comprensión de todos los procesos que determinan la calidad espermática.

El seminograma clásico evalúa de una forma rutinaria diversos parámetros espermáticos como el pH, el volumen, la concentración, el movimiento espermático y la morfología, entre otros. Estos parámetros individualmente no presentan una correlación definitiva con la fertilidad, si bien su interpretación global nos permite una primera evaluación y control rutinario de la calidad seminal. Así, como resultado del análisis seminal, podemos calificar a la muestra como “apta” o “no apta” para su uso en inseminación artificial o en determinados programas de reproducción asistida (Hidalgo, 2003).

III.a.1. pH

Como hemos indicado anteriormente, dentro de los diferentes parámetros rutinarios a evaluar en el espermiograma clásico se encuentra la valoración del pH del eyaculado. Hasta la fecha existen numerosos estudios que hacen diferentes apreciaciones sobre el pH del eyaculado de diferentes especies animales, variando desde ligeramente ácido a ligeramente básico (Setchell et al., 1993.). Así mismo, ha sido descrito que las variaciones en estos valores de referencia pudieran ser indicativos de algún tipo de patología (Gopalkrishnan et al., 1992). El pH del eyaculado completo oscila entre un 7,2 a 7,7 en el caballo adulto fértil (Pickett et al., 1988)

III.a.2. Volumen y Concentración espermática

El volumen del eyaculado habitualmente se determina en recipientes calibrados en mililitros (ml). Los équidos, en condiciones normales y a diferencia de otras especies, presentan un gran volumen eyaculado, al estar conformado éste por dos fracciones bien diferenciadas: 1) una fracción rica en espermatozoides, formada por los espermatozoides almacenados fundamentalmente en la cola del epidídimo junto con las secreciones de las glándulas prostáticas y bulbouretrales; 2) otra fracción pobre en espermatozoides, formada principalmente por gel seminal procedente de las glándulas vesiculares. Los valores medios para el volumen total se encuentran entre 60-120 ml y para el volumen libre de gel entre 30-100 ml (Samper, 2009a; Samper, 2009b); si bien, estos valores pueden variar en función de la estacionalidad, la edad del semental, la frecuencia de recogida, así como por las diferencias entre sementales (Dorado et al., 2010; Dowsett and Knott, 1996; Dowsett and Pattie, 1987; Gamboa et al., 2010; Muiño et al., 2008b; Sieme et al., 2002; Sieme et al., 2004).

En cuanto a la concentración, al igual que el volumen, presenta una gran variabilidad y está fuertemente influida por un mayor número de variables, entre ellas, tamaño testicular, método de recogida (completa o fraccionada), edad de los sementales o la raza (Dowsett and Knott, 1996). Su valor medio habitualmente oscila entre $50-150 \times 10^6$ espermatozoides/ml, cuando se realiza la recogida del eyaculado completo con una metodología adecuada (Samper, 2009a).

En la determinación de la concentración espermática del eyaculado del caballo se pueden utilizar diversos métodos, como por ejemplo el hemocitómetro, el espectrofotómetro, los sistemas CASA, la citometría de flujo y los contadores espermáticos basados en fluorescencia [Nucleocounter[®]] (Christensen et al., 2005; Love, 2012). La técnica del hemocitómetro permite determinar el número de espermatozoides presentes en una cámara de recuento celular como la cámara de Thomas, Neubauer o Bürker-Türk. Su bajo coste hace de este método uno de los más empleados; sin embargo, puede presentar una variabilidad entre replicas causada por las diluciones previas, la

falta de homogeneidad en la distribución de la muestra en la cámara o la influencia del observador (Lu et al., 2004).

Más rápido y de fácil uso es del espectrofotómetro, el cual realiza una medición de forma indirecta, relacionando el grado de absorción o dispersión de la luz que provocan los espermatozoides de una muestra de esperma con su concentración. Sin embargo, para que este método se muestre preciso requiere una calibración previa mediante una curva determinada por recuento microscópico en cámara, debido a que la transmitancia varía de acuerdo a la concentración espermática. Además, depende también del tamaño y forma del espermatozoide o del índice de refracción, factores que son variables entre individuos (Mocé and Graham, 2008). Aunque este método funciona correctamente en muestras espermáticas puras, presenta sus limitaciones cuando la solución está contaminada con sustancias no espermáticas, hecho común en el esperma del semental, pudiendo llevar a una sobreestimación de la concentración espermática (Love, 2012).

Asimismo, pueden realizarse recuentos muy rápidos, aunque a mayor coste, mediante contadores espermáticos basados en fluorescencia o sistemas CASA. Igualmente, para que el recuento de partículas sea correcto, los equipos deben de estar correctamente calibrados. Además, estos métodos se ven influenciados por los componentes de los distintos diluyentes (Love, 2012). Una técnica en actual desarrollo es la valoración de la concentración espermática mediante citometría de flujo (Petrunkina and Harrison, 2011), la cual cuantifica el ADN previamente teñido con un fluorocromo (por ejemplo H33258) para calcular el número de células en base a que la cantidad de ADN presente en el espermatozoide (Gadea, 1996). Aunque es una técnica muy precisa, presenta el inconveniente de que los fluorocromos pueden unirse a otros componentes del eyaculado (por ejemplo células somáticas) o del diluyente, pudiendo igualmente sobreestimar la concentración espermática (Petrunkina and Harrison, 2011).

Finalmente, la evaluación del volumen y de la concentración espermática son fundamentales en la estimación del número total de espermatozoides eyaculados (volumen x concentración), parámetro empleado en la

determinación del número de dosis destinadas a inseminación artificial, y por tanto, en la evaluación del rendimiento de un eyaculado y/ o del semental.

III.a.3. Viabilidad espermática

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

La evaluación de la integridad de la membrana plasmática es una prueba fundamental dentro del espermiograma debido a la importancia que tiene esta estructura en el mantenimiento del espermatozoide vivo (Mocé and Graham, 2008). De tal manera que la valoración de la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática constituye una parte importante en la evaluación de la fertilidad del macho, debido a que la conservación del contenido genético depende fundamentalmente del buen estado de la membrana plasmática (Evenson and Wixon, 2006; Quintero-Moreno et al., 2007). Además, la integridad de la membrana espermática no solo es fundamental para el metabolismo espermático, sino que es imprescindible en varios eventos de la fecundación como la capacitación, la reacción del acrosoma o su fusión con el ovocito (Cabrera et al., 2012).

Entre los métodos descritos para la valoración de la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide se describen técnicas tintoriales como la eosina/azul de anilina, el verde/eosina, el tripán azul/giemsa o el amarillo naftol/eritrosina, las cuales se valoran bajo microscopía de campo claro (Bamba and Cran, 1988; Didion and Graves, 1986; García-Artiga et al., 1994), o microscopía de ópticas de contraste de Normarski o de contraste de fases (Pursel and Johnson, 1974). Otra técnica es la microscopia electrónica, tanto de transmisión como de barrido, que debido a su alto coste y su complejidad es poco práctica (Rodríguez-Martínez et al., 2001).

Actualmente el desarrollo de sondas fluorescentes y la utilización de la microscopia de fluorescencia o la citometría de flujo han disparado el uso de

nuevas técnicas para evaluar los daños de la membrana plasmática del espermatozoide. Un ejemplo de ello es la combinación de sondas como el diacetato de carboxifluorescencia o el SYBR-14 con el yoduro de propidio (Garner and Hafer, 1996; Maxwell, 1996). Este tipo de técnicas permiten evaluar de forma más precisa la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide (Harkema and Boyle, 1992; Magistrini et al., 1997; Pérez-Llano et al., 2003) y, en consecuencia, la viabilidad de la célula espermática (Graham et al., 1990; Johnson et al., 1996). Se han descrito también otras técnicas similares como el fluorocromo específico del ADN Hoechst 33258. Este fluorocromo penetra en aquellas células espermáticas cuya membrana está dañada, fijándose al ADN espermático e incrementando la fluorescencia de estos espermatozoides (Cross et al., 1986).

Por otra parte, las pruebas funcionales como el test de endosmosis (HOST-test) permite evaluar la integridad de la membrana plasmática, valorando su funcionalidad al comprobar la resistencia osmótica del espermatozoide en medios hipoosmóticos (Rubio-Guillén et al., 2009). La célula espermática posee la capacidad de captar o liberar agua según la osmolaridad del medio extracelular (Drevius and Eriksson, 1966; Quintero-Moreno et al., 2003), informando de la óptima funcionalidad de su membrana plasmática y de la capacidad del espermatozoide para la distribución de fluidos dentro y fuera del mismo (Pérez-Llano et al., 1998b; Vázquez et al., 1996; Vázquez et al., 1997). Este parámetro ha sido también correlacionado con la fertilidad del macho (Rubio-Guillén et al., 2009)

Respecto a la valoración de la integridad acrosómica, junto con la valoración de la integridad de la membrana espermática, ha sido uno de los parámetros seminales más estudiados debido a que juega un papel clave en la fecundación (Cabrera et al., 2012), gracias a que solo los espermatozoides que presenten un acrosoma integro podrán realizar la reacción acrosomal de manera sincronizada con la fase de penetración del oocito y, como consecuencia, fusionarse con éste para formar un embrión (Januskauskas et al., 2000).

La evaluación de la integridad acrosómica puede realizarse mediante la fijación de las células espermáticas y su posterior observación con microscopia

de contraste de fases (Söderquist et al., 1997), con extensiones teñidas bajo microscopio de campo claro (Brum et al., 2006; Varner et al., 1987; Vázquez et al., 1992) o con microscopía de interferencia y fluorescencia (Bosard et al., 2005; Johnson et al., 1996). En las preparaciones no teñidas, lo más frecuente es fijar las células en glutaraldehído (Saacke and Marshall, 1968) o con soluciones salinas formoladas (Memon and Ott, 1981), realizando la lectura bajo contraste de fases. Entre las técnicas de tinción tenemos la tinción de Giemsa (Watson, 1975), la eosina-fast green (Wells and Awa, 1970), la eosina-nigrosina (Bamba, 1988), las tinciones dobles o triples, basadas en la combinación del azul tripán con otros colorantes (Rodríguez-Gil et al., 1994; Talbot and Chacon, 1981; Vázquez et al., 1992), y las tinciones comerciales como el Spermac[®] (Oettle, 1986). La tinción triple (TST) fue desarrollada para espermatozoides humanos (Talbot and Chacon, 1981) y posteriormente se adaptó a las distintas especies animales como el toro (Didion and Graves, 1986), el caballo (Varner et al., 1987) y el macho cabrío (Kusunoki et al., 1988). Asimismo, es posible determinar de forma conjunta la integridad del acrosoma y la viabilidad de las células espermáticas mediante el empleo de tres colorantes, el tripán azul (colorante vital), el marrón Bismark (colorante post-acrosómico) y el rosa de Bengala (colorante acrosómico) (Vázquez et al., 1992) o mediante el uso de fluorocromos junto a la citometría de flujo (Kavak et al., 2003; Love et al., 2003).

A pesar de que con los años han surgido multitud de técnicas de laboratorio más precisas para la evaluación morfológica y funcionalidad del acrosoma espermático, éstas pruebas no han sustituido por completo a la evaluación morfológica clásica, sino que complementan la información aportada por ésta (Ball et al., 1997; Gamboa and Ramalho-Santos, 2005; Sousa et al., 2006).

III.a.4. Morfología espermática

La cabeza de los espermatozoides de mamíferos presenta importantes variaciones en la forma entre las diferentes especies (Lizaraso, 2009). Por

ejemplo, es ovoide y discoidal en conejo, toro y cerdo, falciforme en ratón, rata y hámster, y algo aplanado y elipsoide en el hombre. En cambio, es elíptica en el caballo (Samper, 2009c). En cuanto al tamaño, también existen considerables diferencias (Cummins and Woodall, 1985; Eddy, 2006), mientras que el espermatozoide humano presenta 5-6 μm de longitud y 2,5-3,5 μm de ancho (WHO, 1999), el del caballo tiene una longitud de 6,62 μm y una anchura de 3,26 μm (Hidalgo et al., 2005; Samper, 2009c). Aunque en general se podría aceptar que la mayoría de los mamíferos presentan una población espermática morfológicamente homogénea (Gago et al., 1999), en el hombre y el caballo es característica la variabilidad morfológica en la población espermática del eyaculado, incluso en individuos fértiles, lo que dificulta la determinación de la morfología normal de un espermatozoide.

El eyaculado de la mayoría de animales domésticos se caracteriza por presentar un bajo porcentaje de morfoanomalías, como por ejemplo el macho cabrío (5-15% de morfoanomalías) (Roca et al., 1992). En cambio, el eyaculado del caballo no presenta un porcentaje de morfoanomalías tan bajo, llegando a superar el 20% de anomalías en sementales fértiles (Love et al., 2000;), debido, al menos en parte, a la escasez de selección en función a su capacidad reproductiva a la que se ha sometido la especie equina, a diferencia de lo que ocurre en rumiantes y cerdos. De esta manera, el porcentaje de espermatozoides con morfología normal presente en un eyaculado de caballo es extremadamente variable (Tabla 1).

Posiblemente, la morfología espermática sea uno de los parámetros más importantes, junto con la motilidad, a evaluar en el eyaculado de nuestras especies domésticas. Existen numerosos trabajos de investigación que ponen de manifiesto la importancia de este parámetro, correlacionándolo con la motilidad espermática (Varner, 2008) y con la fertilidad (Dufour et al., 1984; Jasko et al., 1990; Kruger et al., 1988 ; Kumar and Rani, 1999; Levine, 1999; Menkveld et al., 1990). Concretamente, algunas morfoanomalías han sido asociadas con una fertilidad reducida, como las anomalías de la pieza intermedia y las colas dobladas o enrolladas en espiral (Varner, 2008). Asimismo, cualquier defecto morfológico debido a un proceso de maduración espermático incompleto (por ejemplo defectos en la cola o pequeñas diferencias geométricas en la cabeza) puede originar a su vez un movimiento

anormal que incapacite al espermatozoide para su progresión en el aparato genital femenino y la posterior fecundación (Dresdner and Katz, 1981).

La morfología espermática ha sido determinada mediante numerosas técnicas, aunque el método más sencillo corresponde a la fijación de una muestra espermática con soluciones de formaldehído o glutaraldehído y el posterior conteo de espermatozoides mediante microscopía de contraste de fase (Björndahl et al., 2002; Briz et al., 1995; Pinart et al., 1999; WHO, 1999). Igualmente se han usado diferentes técnicas tintoriales para hacer valoraciones bajo microscopía de campo claro. Entre los métodos de tinción más empleados se incluyen la eosina-nigrosina (Colas, 1980), el trypan azul y giemsa (Kusunoki et al., 1988), el papanicolau (Hafer, 1987) y el Spermac[®] (Oettle, 1986).

Al igual que existen diferentes métodos de procesado de la muestra, existen diferentes sistemas de evaluación y clasificación de la morfología espermática (Briz et al., 1995; Pinart et al., 1999). No obstante, comúnmente se utilizan dos tipos de clasificación o combinaciones de estas. Así, las anomalías pueden ser clasificadas en función de la estructura espermática que está alterada (Jasko et al., 1990): 1) anomalías de la cabeza, 2) de la pieza intermedia y 3) de la cola. Del mismo modo, las anomalías pueden clasificarse en función de su origen (Varner, 2008): 1) anomalías primarias, 2) secundarias y 3) terciarias. Generalmente, los defectos primarios se consideran más severos y se creen que tienen su origen durante la espermatogénesis dentro del epitelio seminífero testicular. Este tipo de alteraciones son fácilmente detectadas mediante la evaluación morfológica y aportan una información muy valiosa ya que estas anomalías se consideran que están entre moderada y altamente relacionadas con la fertilidad de los sementales (Samper, 2009e). En cuanto a los defectos secundarios, son considerados como menos graves al producirse éstos durante la migración espermática a través del epidídimo o durante su almacenamiento (Samper, 2009e). En cambio, las anomalías terciarias se producen de forma iatrogénica o como consecuencia del manejo del semen durante su procesado y/o evaluación (Samper, 2009e). A pesar de su gran utilidad, este método presenta una gran limitación debido a que de algunas alteraciones morfológicas no se conoce su origen, como ocurre con las

cabezas sueltas, lo que induce a que se produzca una mala interpretación de los resultados (Samper, 2009e).

Además de las descritas, existe otro tipo de clasificación de las anomalías del espermatozoide, propuesta por Blom (1973) y aceptada por varios autores, que clasifica los defectos espermáticos en mayores y menores. Además, sugiere que los defectos mayores, como las alteraciones en el acrosoma o los defectos nucleares, son aquellos que causan muerte embrionaria temprana o impiden que se produzca la fertilización (Saacke, 2008), mientras que los defectos menores, como las anomalías de la cola, alteran la motilidad espermática, impidiendo que el espermatozoide pueda alcanzar al ovocito (Saacke et al., 2000). Recientemente, se ha sugerido una evaluación de los defectos morfológicos más precisa, teniendo en cuenta la posibilidad de la presencia de más de una anomalía en un mismo espermatozoide (alteraciones del acrosoma, gota citoplasmática proximal, pieza intermedia engrosada, cola enrollada, etc.). Esta metodología, al valorar las diversas anomalías presentes en un espermatozoide de forma conjunta, aporta una información más precisa de la muestra evaluada (Samper, 2009e) y evita además errores en la determinación del origen de estos defectos (Varner, 2008).

La guía editada por la Sociedad Americana de Reproducción Animal (The Society for Theriogenology, 1992), recomienda la elección de aquellos sementales que presenten al menos un 75% de gestaciones tras la cubrición de 40 o más yeguas, o superior a 120 yeguas cuando se realiza inseminación artificial. Si bien no determina, sino que propone un porcentaje estándar de espermatozoides con morfología normal por eyaculado, establece la valoración positiva de los eyaculados cuando presenten al menos 1 billón de espermatozoides con morfología normal y movimiento progresivo, tras dos eyaculados recogidos y evaluados con una hora de separación (Brito, 2007; Samper, 2009e). No obstante, otros autores consideran que una muestra seminal puede ser considerada apta cuando presenta al menos un 60% de espermatozoides con morfología normal (Hurtgen, 1992) ya que una muestra que presentara menos de un 50% se esperaría que presentara un valor de fertilidad reducido (Brito, 2007).

Aunque la valoración de las morfoanomalías utilizando estos métodos han demostrado ser un importante indicador de la determinación del descenso en la fertilidad en diversas especies (Chandler et al., 1988; Sekoni and Gustafsson, 1987; Voss et al., 1981), incluyendo los équidos (Brito, 2007; Jasko et al., 1990), su subjetividad condiciona la interpretación de los resultados. Además, estos métodos subjetivos de valoración espermática presentan una gran variabilidad intra- e inter- laboratorios (Cooper et al., 1999), haciendo necesario la utilización de métodos de valoración morfológicos mas objetivos (Hidalgo et al., 2006) como los sistemas CASA, que serán abordados en un apartado posterior.

III.a.5. Movimiento espermático.

Los espermatozoides de mamíferos adquieren la capacidad de movimiento durante el transporte por el epidídimo (Yanagimachi et al., 1981). La motilidad flagelar es estimulada tras la eyaculación y se modula durante el transito del espermatozoide a través del aparato reproductor de la hembra (Davis and Siemers, 1995). Este tránsito implica cambios secuenciales importantes en los patrones de movimiento espermático, mostrando diferencias en cuanto a la longitud de la onda flagelar (movimiento asimétrico) o cambios en el desplazamiento lateral de la cabeza (Muiño, 2008), sugiriendo que el espermatozoide necesita primero sufrir una activación en la motilidad que le permita atravesar el tracto genital de la hembra y, posteriormente, una hiperactivación del movimiento para llegar al punto de fecundación y penetrar la pared del ovocito (Turner, 2003). Por todo ello, la motilidad del espermatozoide es una característica fundamental a tener en cuenta en la evaluación de la calidad seminal. Así, ha sido considerado tradicionalmente un indicador de la capacidad fecundante del eyaculado del caballo (Varner, 2008). Según algunos autores, el desarrollo de la capacidad fecundante y la movilidad del espermatozoide ocurren de forma paralela, de ahí que se haya utilizado como medida indirecta del potencial fecundante de la población espermática (Vantman et al., 1989; Vantman et al., 1994).

Para la evaluación del movimiento espermático se han descrito numerosos métodos (Björndahl et al., 2002; Bonet et al., 2000; Briz, 1994; Ludwig and Frick, 1990; WHO, 1999), desde la valoración subjetiva bajo microscopio de campo claro hasta los sistemas CASA, capaces de realizar evaluaciones objetivas tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo (Björndahl et al., 2002; Herreros, 2007; WHO, 1999). Este tipo de evaluación será abordada más ampliamente en un apartado posterior.

Es sabido que cada especie animal cuenta con un patrón propio de movimiento, en función a múltiples características del espermatozoide como el tamaño de la cabeza, longitud de la cola y frecuencia de batido, entre otros (Gomendio and Roldan, 2008). El caballo cuenta con un tipo de movimiento espermático circular o semicircular muy característico debido principalmente a la inserción abaxial de la pieza intermedia en la cabeza del espermatozoide, que en otras especies no se catalogaría como progresivo (Samper, 2009d). Al igual que ocurre con la evaluación morfológica, no existe un consenso sobre los valores normales de movimiento espermático de un semental fértil (Tabla 1), aunque la mayoría de los autores mantiene que una muestra seminal de calidad debe mostrar valores $\geq 60\%$ de espermatozoides con movimiento progresivo (Samper, 2009c).

Tabla 1. Valores medios del espermiograma clásico

Parámetros	Media±SD	Numero de Sementales	Referencia
Volumen libre de Gel (ml)	65±26	398	(Parlevliet et al., 1994)
	45±30	417	(Pickett, 1993)
	33,7±2,13	165	(Dowsett and Knott, 1996)
	51,6±31,5	8	(Long et al., 1993)
	45,3±30,9	47	(Dowsett and Pattie, 1982)
Concentración (10 ⁶ /ml)	206,1±168,5	398	(Parlevliet et al., 1994)
	335±232	417	(Pickett, 1993)
	164,13±39,35	165	(Dowsett and Knott, 1996)
	223±148	8	(Long et al., 1993)
	178±168	47	(Dowsett and Pattie, 1982)
Número total de Espermatozoides (10 ⁹)	11,29±7,13	398	(Parlevliet et al., 1994)
	11,9±9	417	(Pickett, 1993)
	6,34±1,93	165	(Dowsett and Knott, 1996)
	9,1±4,7	8	(Long et al., 1993)
	7,21±6,87	47	(Dowsett and Pattie, 1982)
Motilidad Total (%)	53±15	417	(Pickett, 1993)
	76,43	165	(Dowsett and Knott, 1996)
	72,1±16	47	(Dowsett and Pattie, 1982)
	70,3±17,4	64	(Jasko et al., 1992)
Espermatozoides Vivos (%)	65±9	398	(Parlevliet et al., 1994)
	82,56	165	(Long et al., 1993)
	78,8	47	(Jasko et al., 1992)
Motilidad Progresiva (%)	68±9	398	(Parlevliet et al., 1994)
	53,1±16,2	8	(Long et al., 1993)
	52,7±17,4	64	Jasko et al.1991
Espermatozoides con Morfología Normal (%)	66±15	398	(Parlevliet et al., 1994)
	51±15	417	(Pickett, 1993)
	67,82	165	(Dowsett and Knott, 1996)
	47,5±12,4	8	(Long et al., 1993)
	58,2	47	(Dowsett and Pattie, 1982)

Existen multitud de factores, tanto de origen extrínseco, que influyen en la calidad del movimiento y que pueden afectar al movimiento espermático de una muestra. Entre ellos, destacamos la frecuencia de recogida (Parlevliet et al., 1994; Sieme et al., 2002), el uso y el tipo de diluyentes para su evaluación (Samper, 2009c), el tiempo entre la recogida y la evaluación, la temperatura o el uso de antibióticos en los diluyentes (Blanchard et al., 2012; Dean et al., 2012), como factores extrínsecos y la raza de los animales estudiados (Dowsett and Pattie, 1982; Dowsett and Pattie, 1987; Paccamonti et al., 1999; Voss et al., 1981), las alteraciones de origen testicular (Bonet et al., 1992; Foote et al., 1992), epididimario (Wenkoff, 1975) o prostático (Leib et al., 1994), entre los de intrínsecos.

III.b. Sistemas computarizados de análisis espermático (CASA)

Con el objetivo de solventar el problema de la subjetividad y de la variabilidad de algunos de los parámetros convencionales del seminograma clásico se empezó a investigar la forma de automatizar el análisis del movimiento espermático mediante el uso de sistemas informáticos. Los primeros valores objetivos se obtuvieron con métodos directos como la cine-video-micrografía (Overstreet et al., 1979) e indirectos, espectrofotometría o velocímetro laser de doppler (Jouannet et al., 1977). Posteriormente, con el desarrollo de la tecnología de digitalización de la imagen de video, se incorporaron al mercado los sistemas semiautomáticos (Jagoe et al., 1986) y automáticos (Davis and Katz, 1989), genéricamente denominados con las siglas CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis), los cuales permiten valorar de forma rápida, precisa y fiable tanto las variables cinéticas (Krause and Viethen, 1999; Mortimer, 2000b) como las morfométricas (Hidalgo et al., 2008) del espermatozoide de humanos y animales.

En cuanto a la valoración de la morfometría espermática, es una característica espermática que puede ser utilizada en la evaluación de la calidad seminal, tanto para determinar la función del espermatozoide como la

capacidad fecundante de un eyaculado (Hidalgo et al., 2006). Las primeras técnicas morfométricas se basaron fundamentalmente en el uso de la microscopía electrónica (Dadoune et al., 1980; Serres et al., 1984). Éstas fueron seguidas de sistemas videomicrográficos de digitalización manual asistido mediante ordenador (Ball and Mohammed, 1995; Katz et al., 1986). La mejora de los equipos permitió el paso de la digitalización manual a semiautomática (Davis et al., 1992b; Perez-Sanchez et al., 1994) y, a partir de este momento, se desarrollaron múltiples equipos que permitían el análisis morfométrico objetivo (Verstegen et al., 2002). Así, surgió el CellForm-Human (CFH), un sistema semiautomático para el análisis morfométrico de espermatozoides de la especie humana (Davis et al., 1992a) y que posteriormente se aplicó a diferentes especies de animales domésticos (Gravance et al., 2009). Las metodologías de análisis que incluían la digitalización automática así como la utilización de potentes programas informáticos fueron produciéndose en años posteriores (Boersma and Braun, 1999; Garrett and Baker, 1995; Gravance and Davis, 1995; Hirai et al., 2001; Perez-Sanchez et al., 1994; Steigerwald and Krause, 1998). Este desarrollo permitió que se comercializaran diferentes sistemas para evaluar tanto la cinética como la morfometría del espermatozoide de diferentes especies, como el Sperm Class Analyzer[®] (Buendía et al., 2002; Gago et al., 1998; Hidalgo et al., 2006; Hidalgo et al., 2007; Pérez-Llano et al., 1998a; Sancho et al., 1998), el Hamilton-Thorn Motility Analyzer[®] (Boersma et al., 2001; Rijsselaere et al., 2004), el Cell-Form ASMA[®] (Gravance et al., 2009) o el Integrated Semen Analysis System[®] (Gil et al., 2009). Actualmente, estos sistemas computarizados de análisis espermático son utilizados de manera rutinaria en la mayoría de los laboratorios de investigación para la evaluación de muestras seminales de especies de mamíferos domésticos y salvajes, así como del hombre (Hidalgo et al., 2006).

III.b.1. Sistema computarizado de análisis del movimiento espermático

Los sistemas CASA reflejan una serie de medidas derivadas del análisis del desplazamiento de la cabeza del espermatozoide a través del tiempo. Los

parámetros evaluados en las muestras seminales se caracterizan por una serie de parámetros globales, los cuales dependen de la configuración del “set up” ver tabla 2 en el apartado IV.d.3 (Material y Método). Entre ellos encontramos el porcentaje de espermatozoides estáticos (EST), lentos (LEN), medios (MED), rápidos (RAP) y progresivos (PRO). Además, otros parámetros definen la cinética de cada espermatozoide como la velocidad curvilínea (VCL), la velocidad media (VAP) y la velocidad rectilínea (VSL), los índices de linealidad (LIN), rectitud (STR) y de oscilación (WOB), obtenidos de las variables anteriores, la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y la frecuencia de cruces sobre la trayectoria media (BCF). Estos parámetros cinéticos serán descritos en el apartado IV.d.3 (Material y Métodos).

III. b.1.1. Estandarización del sistema

A pesar de sus ventajas, como la objetividad mostrada por estos sistemas, algunos autores han advertido sobre el mal uso de los resultados obtenidos por los sistemas CASA (Katkov and Lulat, 2000). Por otra parte, debemos tener en cuenta que tanto el hardware como el software empleados para la identificación y determinación del desplazamiento de los espermatozoides individuales, junto con el análisis de las características del movimiento, difieren entre los sistemas comercialmente disponibles. Esto, unido al patrón de movimiento específico que presenta el espermatozoide de cada especie estudiada, hace especialmente importante la estandarización del sistema y las condiciones de trabajo, pilar fundamental en la obtención de resultados repetibles y comparables con los obtenidos por otros laboratorios (ESHRE. and group., 1998; Versteegen et al., 2002).

Entre los factores a estandarizar en el análisis CASA encontramos la concentración espermática de la muestras a analizar, al poder ésta influir en la identificación de los espermatozoides por parte del sistema y en la construcción de sus trayectorias (Iguer-ouada and Versteegen, 2001). Así, es conocida la necesidad de diluir previamente las muestras de esperma con diluyentes que no alteren las características cinéticas del espermatozoide (Farrell et al., 1998; Maxwell and Jonhson, 1999; Vantman et al., 1988). En este sentido, cabe

destacar que estudios previos han demostrado que la composición del diluyente de espermatozoides empleado y el grado de dilución pueden influir en los resultados obtenidos con los sistemas CASA (Farrell et al., 1996; Mortimer and Maxwell, 2004). Por otra parte, otros autores han demostrado la influencia de la temperatura de análisis (Davis et al., 1993b), el tipo de cámara (Verstegen et al., 2002) o el número de espermatozoides capturados en cada muestra (Jasko et al., 1990; Varner et al., 1991), entre otros factores. No menos importante en la determinación correcta del movimiento espermático es el propio sistema CASA, el cual debe procesar los datos de forma precisa. Para tal fin, estudios previos han demostrado que es imprescindible la estandarización del sistema, a través de la configuración del software mediante un “set up” específico para cada especie. Así, podemos seleccionar la frecuencia y el número de fotogramas (frames) a capturar (Mortimer, 2000b; Wilson-Leedy and Ingermann, 2007), parámetros específicos de la especie a estudiar (Hoogewijs et al., 2009; Verstegen et al., 2002). A este respecto, el uso de ajustes del análisis inadecuados podría dar lugar a cambios en el cálculo de las variables cinéticas (Davis et al., 1993b; Mortimer, 2000b; Verstegen et al., 2002), obteniéndose así resultados erróneos en aquellos parámetros cinéticos más relacionados con la fertilidad (Anel, 1999).

Finalmente, también se ha sugerido la existencia de variaciones en los resultados obtenidos en una misma muestra de semen empleando distintos sistemas CASA (Verstegen et al., 2002), debido principalmente a que cada sistema reconstruye las trayectorias espermáticas de forma distinta o utilizan métodos diferentes para la localización e identificación de los espermatozoides así como algoritmos para el cálculo de los parámetros cinéticos. Incluso se ha sugerido que un mismo parámetro podría variar entre versiones distintas del mismo sistema CASA (Mortimer, 2000b). Por todo ello, es de suma importancia tener un buen conocimiento de los principios que rigen el funcionamiento de los sistemas CASA, las características y la fiabilidad de estos sistemas, así como el significado de los parámetros cinéticos (Boyers et al., 1989; Mortimer, 2000a).

III. b.1.2. Variables cinéticas

Los sistemas CASA se caracterizan por el elevado número de variables cinemáticas que aportan por cada espermatozoide analizado. Además, algunas de ellas están muy relacionadas entre sí o son función de otras como la LIN, la STR y la WOB (Martínez-Pastor et al., 2011; Stockley et al., 1997). Debido a que gran parte de las variables transmiten información similar se hace necesario conocer el grado de implicación de cada variable cinética en el patrón de movimiento, el cual es además específico de la especie (Steinley and Brusco, 2008). Por ello, se debe realizar un estudio previo de las variables con el objeto de determinar qué grado de información muestra cada una de ellas y poder así realizar una correcta elección de aquellas que mayor información aporten.

Una de las posibles soluciones para reducir en número de variables obtenidas con los sistemas CASA es la realización de un análisis de correlación simple entre variables o de agrupación de variables (Flores et al., 2009; Miró et al., 2005; Miró et al., 2009; Quintero-Moreno et al., 2003; Quintero-Moreno et al., 2007; Quintero-Moreno et al., 2004; Rivera et al., 2005), o el uso de métodos iterativos (Brusco and Cradit, 2001; Huang et al., 2005). Otra metodología descrita recientemente para la reducción de las variables cinéticas es el Análisis de Componentes Principales (PCA) (Dorado et al., 2010; Martínez-Pastor et al., 2008; Martínez-Pastor et al., 2005a; Martínez-Pastor et al., 2005b; Núñez-Martínez et al., 2006a), la cual ha demostrado ser una muy buena herramienta para la selección de estas variables (Al-Kandari and Jolliffe, 2005; Ramió et al., 2008), a pesar de no estar exenta de detractores (King and Jackson, 1999; Yeung and Ruzzo, 2001).

III.b.1.3. Estudio de subpoblaciones

Los eyaculados de la mayoría de los mamíferos son conocidos por presentar un grado de heterogeneidad elevado (Dorado et al., 2010), lo que significa que espermatozoides con diferentes cualidades coexisten en un mismo eyaculado (Chantler et al., 2004). Esto justifica la existencia de

diferentes subpoblaciones espermáticas en función a distintas características seminales, como parámetros bioquímicos (Meggiolaro et al., 2003), test funcionales (Holt et al., 1997; Pérez-Llano et al., 2003) o valoración morfológica (Hidalgo et al., 2008). Respecto a la identificación de subpoblaciones cinéticas, es necesario el análisis objetivo y preciso del movimiento, el cual no fue posible hasta el desarrollo de los sistemas CASA (Boyers et al., 1989). Estos sistemas permiten identificar a los espermatozoides de una manera individual por sus características cinéticas (Wilson-Leedy and Ingermann, 2007). El uso de estos sistemas junto al análisis estadístico multivariante han demostrado la existencia de subpoblaciones cinéticas en eyaculados de diferentes especies, como el titi (Holt et al., 1996), la gacela (Abaigar et al., 1997; Abaigar et al., 2001), el caballo (Quintero-Moreno et al., 2003), el asno (Álvarez et al., 2008; Dorado et al., 2013; Flores et al., 2008; Miró et al., 2005) el cerdo (Abaigar et al., 1999; Cremades et al., 2005; Quintero-Moreno et al., 2004; Rivera et al., 2005; Rivera et al., 2006), el perro (Dorado et al., 2011a; Dorado et al., 2011b; Núñez-Martínez et al., 2006a; Núñez-Martínez et al., 2006b), el conejo (Quintero-Moreno et al., 2007) y el macho cabrío (Dorado et al., 2009), empleando diferentes sistemas CASA y análisis estadísticos (Martínez-Pastor et al., 2011).

Aunque existen multitud de métodos estadísticos para la determinación de las distintas subpoblaciones espermáticas, la mayoría de ellos están basados en el método de determinación de grupos, conglomerados o clústers (Dorado et al., 2011b; Flores et al., 2008; Miró et al., 2009; Quintero-Moreno et al., 2003). Dicho método consiste en agrupación de elementos, en este caso espermatozoides, basándose en la similitud de determinadas variables. A pesar de ser un método altamente contrastado y utilizado en multitud de estudios (Dorado et al., 2013; Flores et al., 2009; Muiño et al., 2009; Quintero-Moreno et al., 2007; Rivera et al., 2005), no está libre de inconvenientes. En primero lugar, se debe decidir si se emplea la distancia euclídea u otro tipo de indicadores para realizar los grupos (como Manhattan o las distancias de Mahalanobis), ya que los resultados pueden variar (Holt and Harrison, 2002; Xu and Wunsch II, 2005). En segundo lugar, debe decidirse un determinado algoritmo de agrupamiento (método de agrupamiento), ya que en función del tipo de datos algunos métodos de agrupamiento son más adecuados que otros. Entre ellos destacamos el método no jerárquico, el jerárquico o una combinación de los

dos, también denominado método de dos pasos (Abaigar et al., 1999; Cremades et al., 2005; Dorado et al., 2010; Flores et al., 2008; Martínez-Pastor et al., 2005a; Martínez-Pastor et al., 2006; Martínez-Pastor et al., 2005b). Aunque existen algunos métodos más, cada uno de ellos presenta sus ventajas e inconvenientes (Martínez-Pastor et al., 2011). No obstante, su principal inconveniente es que el número de grupos debe ser determinado previamente por el investigador. Para minimizar los posibles errores en la determinación del número de grupos se pueden utilizar distintos métodos estadísticos que ayudarían a solventar este problema (Kerr and Churchill, 2001; Xu and Wunsch li, 2005). En cambio, algunos autores como Yeung y Ruzzo (2001) opinan que no existe un modelo bien fundamentado aún.

La presencia en el eyaculado de las distintas especies de una subpoblación o grupo de espermatozoides con unas características cinéticas determinadas está ampliamente asumido por la comunidad científica. Actualmente se piensa que se trata de un hecho fisiológico (Flores et al., 2008; Núñez-Martínez et al., 2006a) que podría estar relacionado con la capacidad fecundante de la muestra seminal (Quintero-Moreno et al., 2003). De una manera sencilla, Miró et al. (2005) interpretan que las subpoblaciones describen diferentes niveles de calidad en base a los patrones natatorios de los espermatozoides. En cambio, para Abaigar et al. (2001), estas subpoblaciones se podrían corresponder con grupos de espermatozoides originarios de diferentes partes del epidídimo. Además, apuntan que durante el almacenamiento espermático se produciría una secuencia progresiva en la estructura poblacional, de manera que algunos de los espermatozoides de una determinada población transformarían su movimiento, quedando englobados en otra subpoblación, posiblemente perdiendo su integridad metabólica y de coordinación (Abaigar et al., 2001). En esta misma línea hay algunos autores que han comenzado a sugerir que determinadas características cinéticas están relacionadas con diferentes cualidades espermáticas. Así, Martínez-Pastor et al (2005b) sugieren que las subpoblaciones compuestas por espermatozoides rápidos y lineales son los que presentan mayor calidad de movimiento, mientras que Dorado et al (2009) consideran que la subpoblación que muestra un movimiento más lento y menos lineal podría significar que presentan algún tipo de compromiso metabólico. También se ha descrito que determinadas

subpoblaciones están relacionadas con la mayor resistencia a la crioconservación (Martinez-Pastor et al., 2005b; Muiño et al., 2008b) o con la fertilidad (Quintero-Moreno et al., 2003; Quintero-Moreno et al., 2004). A pesar de todo lo expuesto, a día de hoy no se conocen los mecanismos fisiológicos por los cuales se forman las distintas subpoblaciones así como su función biológica.

Por otra parte, se ha comprobado que determinados factores influyen en la frecuencia de distribución de las distintas subpoblaciones. Entre ellos, la especie, el individuo e incluso el eyaculado de un mismo individuo son los más influyentes, como así lo demuestran multitud de estudios realizados en diferentes especies, como el cerdo (Cremades et al., 2005), el toro (Muiño et al., 2009; Muiño et al., 2008b), el asno (Dorado et al., 2013; Miró et al., 2005), el caballo (Abaigar et al., 1999), la gacela (Abaigar et al., 2001), el perro (Dorado et al., 2011b; Núñez-Martínez et al., 2006b) o el macho cabrío. Otro de los factores influyentes en la estructura subpoblacional de un eyaculado es la calidad seminal de la muestra (Dorado et al., 2009; Miró et al., 2005; Núñez-Martínez et al., 2006a; Núñez-Martínez et al., 2006b; Quintero-Moreno et al., 2003; Quintero-Moreno et al., 2007; Quintero-Moreno et al., 2004; Rivera et al., 2005; Rivera et al., 2006) o la raza (Quintero-Moreno et al., 2007).

III.b.2. Sistemas computarizado de análisis de la morfología espermática

El porcentaje de morfoanomalías presente en un eyaculado ha demostrado ser un importante indicador del descenso de la fertilidad en diversas especies animales (Chandler et al., 1988; Sekoni and Gustafsson, 1987; Voss et al., 1981). Sin embargo, el uso de los métodos subjetivos anteriormente expuestos dificulta su interpretación (Dowsett et al., 1984), lo que hace necesario la introducción de análisis objetivos y precisos que permitan reducir las diferencias intra- e inter-observadores así como conseguir resultados fiables y reproducibles entre laboratorios (Ehlers et al., 2011; Gravance et al., 1996).

Con la finalidad de mejorar la evaluación morfológica del espermatozoide se desarrollaron en la década de los 80 los primeros sistemas

semiautomáticos para el análisis por imagen de la morfología espermática (Jagoe et al., 1986; Moruzzi et al., 1988). Hubo que esperar hasta la década de los 90 para la llegada de los actuales sistemas denominados ASMA (Automatic Semen Morphology Analysis) o CASMA (Computer Automatic Semen Morphology Analysis). Esta tecnología, validada originalmente para el espermatozoide humano (Davis et al., 1992a; De Monserrat et al., 1995; Kruger et al., 1993), ha sido progresivamente adaptada a algunas especies animales como el caballo (Gravance et al., 1996; Hidalgo et al., 2008), el perro (Iguerouada and Verstegen, 2001) o el carnero (Sancho et al., 1998), entre otros.

Con esta metodología, las muestras seminales, previamente fijadas y teñidas, pueden ser analizadas individualmente para determinar las características morfométricas de la cabeza del espermatozoide en cuanto a tamaño (área, perímetro, longitud y anchura) y forma (elipticidad, elongación, regularidad y rugosidad) ver figura 3 en el apartado IV.d.4 (Material y Método). Además, proporciona datos sobre la proporción de la cabeza que pertenece al acrosoma (Álvarez Lledó, 2003). Algunos sistemas ofrecen incluso información sobre la pieza intermedia (área y anchura) y datos referentes a la inserción de la pieza intermedia en la cabeza, como son la distancia y el ángulo de la inserción (Gil et al., 2009).

De forma general, estos sistemas se componen de un microscopio que, a través de una cámara incorporada, transmite imágenes procedentes de muestras de esperma previamente teñidas, hacia una tarjeta capturadora ubicada en el ordenador. La imagen microscópica digitalizada es procesada por el software de análisis, informando de forma individualizada, de las características morfométricas de los espermatozoides capturados (Hidalgo et al., 2002). A diferencia de la variabilidad inherente al análisis subjetivo (Manet et al., 2000), esta tecnología ha permitido cuantificar de forma precisa y repetible las características morfométricas de la cabeza de los espermatozoides (Davis et al., 1992a).

III.b.2.1. Estandarización de la técnica

La eficacia de estos sistemas depende de la estandarización de una serie de variables analíticas que intervienen en el análisis (Davis and Gravance, 1993; Gago et al., 1998; Gravance et al., 1995; Hidalgo et al., 2002) y que afectan tanto a la preparación de la muestra (lavado, fijación y tinción), captura de imágenes con microscopio bajo condiciones adecuadas de iluminación y "set up" ve tabla 3 en apartado IV.d.4 (material y Método), así como al análisis de las mismas. Todo ello en función de la especie. Además de las variaciones propias debidas al proceso de valoración, se deben añadir los errores causados por el análisis de un número insuficiente de espermatozoides o a las causadas por las posibles diferencias existentes entre los distintos sistemas CASMA (Verstegen et al., 2002).

Por lo expuesto, la elección de las condiciones en las que se realiza el análisis pueden determinar cambios significativos en la morfología observada. Así, entre otras, se deben elegir adecuadamente las técnicas de tinción en función a la especie, tamaño de la muestra o los aumentos (Ball and Mohammed, 1995; Estes et al., 2006b; Hidalgo et al., 2006; Núñez-Martínez et al., 2006a; Rijsselaere et al., 2004; Saravia et al., 2007; Verstegen et al., 2002). Además, los sistemas automatizados deben discriminar entre los verdaderos espermatozoides y las células sobrepuestas o artefactos (Gravance et al., 1996; Kruger and Coetzee, 1999), para lo cual es conveniente la correcta captura de las imágenes.

Todas las modificaciones realizadas en el proceso de cuantificación morfológica influyen en los valores obtenidos y deben tenerse en cuenta a la hora de comparar los resultados (Verstegen et al., 2002). Por ejemplo, cuando los espermatozoides se tiñen, al utilizar preparaciones en seco o fijándolas el citoplasma celular se deshidrata y como resultado se produce una disminución del tamaño de la cabeza espermática (Hidalgo et al., 2006). Esto se ha descrito en muestras de semen humano y de caballo, teñidas con Papanicolaou y Feulgen respectivamente, en las que la reducción media del área de la cabeza respecto a las muestras medidas en ambiente húmedo alcanza el 30% para los espermatozoides de hombre y, si se contempla la longitud y la anchura, esta

disminución para el caballo oscila entre el 20% y el 13% respectivamente, frente a espermatozoides no fijados y no teñidos (Ball and Mohammed, 1995; Katz et al., 1986).

Otros aspectos a tener en cuenta son la osmolaridad de los diluyentes o el procesado del esperma (refrigerado o congelado), los cuales afectan también al tamaño de la cabeza de los espermatozoides (Esteso et al., 2006a; Gravance et al., 1998b). En esta línea, existen diversos estudios que demuestran la gran influencia del tipo de tinción tanto en la precisión, como en el tamaño de la medición de la cabeza espermática en la valoración de la morfometría (Hidalgo et al., 2005). Además, esta influencia varía en función de la especie estudiada (Gago et al., 1998; Gravance et al., 1998a; Hidalgo et al., 2005; Hidalgo et al., 2006; Kruger et al., 1993), del individuo y del eyaculado de un mismo individuo (Dahlbom et al., 1997; Gravance et al., 1999; Hidalgo et al., 2008; Malo et al., 2006b; Morrow and Gage, 2001). Existe un mayor consenso en la bibliografía consultada a la hora de establecer el número mínimo de espermatozoides a analizar en cada análisis morfométrico. Así, la mayoría de autores consideran suficientes analizar 100 espermatozoides por muestra (Gago et al., 1998; Gravance et al., 1998a; Hidalgo et al., 2005; Hidalgo et al., 2006; Rijsselaere et al., 2004; Sancho et al., 1998).

El uso de estos sistemas computarizados ha permitido determinar sutiles diferencias entre muestras, tanto en la especie humana (Álvarez Lledó, 2003) como en otras especies animales (Gago et al., 2000; Gravance and Davis, 1995; Pérez-Sánchez et al., 1998; Sancho et al., 1998), lo que es de suma importancia en las especies que presentan una gran homogeneidad entre los espermatozoides de un mismo eyaculado, como es el caso del ovino (Sancho et al., 1998). Por otra parte, estos hallazgos han incrementado el interés por el análisis de las características morfológicas de los espermatozoides y su posible aplicación en estudios futuros. Así, se ha sugerido que los espermatozoides más largos serían capaces de nadar más rápido y, en consecuencia, llegarían antes al ovocito que sus competidores y penetrarían el recubrimiento de esta célula más fácilmente (Montoto et al., 2011; Tourmente et al., 2009). Además, en diversas especies de mamíferos (*Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Mesocricetus auratus*, *Mus musculus* y *Oryzolagus cuniculus*) se ha encontrado una alta

correlación entre la longitud de la cabeza espermática y la velocidad del espermatozoide ($r = 0,96$; $p = 0,009$) (Gomendio and Roldan, 1993).

Otra cuestión importante es conocer qué parámetros morfométricos son los más relevantes para el estudio morfométrico de la cabeza del espermatozoide. En la bibliografía consultada los parámetros elegidos como óptimos varían entre especies. Así, en ovino (Sancho et al., 1998) y en la alpaca (Buendía et al., 2002) se recomienda la utilización del perímetro y del factor de forma (W/L), mientras que en conejos (Gravance and Russell, 1995) probablemente la relación W/L es la única capaz de discernir entre individuos. En ciervos la longitud y la anchura son los parámetros que presentan una mayor relevancia y la regularidad el que presenta menor diversidad entre individuos (Soler et al., 2005a). En cambio, no existe un consenso en cuanto a los parámetros elegidos como óptimos para discriminar entre individuos cuando se refieren a caballos. Así, Casey et al (1997) y Gravance et al (1996) utilizaron los parámetros longitud, anchura, área y perímetro de la cabeza espermática para comparar con éxito los valores morfométricos entre caballos fértiles y subfértiles. En cambio Hidalgo et al. (2005; 2006; 2008) utilizan tanto los parámetros de tamaño (longitud, anchura, área y perímetro) como los de forma (elipticidad, rugosidad, elongación y regularidad) en sus estudios. Por otra parte, Arruda et al. (2002) usan los parámetros de área y perímetro cuando comparan la morfometría de los espermatozoides de caballo en fresco y después de congelar-descongelar, determinando que estos valores son menores en los espermatozoides que han sufrido este último proceso.

III.b.2.2. Estudio de Subpoblaciones morfométricas/morfológicas

Hoy en día es ampliamente admitida la existencia de diferentes subpoblaciones morfológicas en el eyaculado de la mayoría de las especies (Esteso et al., 2009; Maroto-Morales et al., 2012; Peña et al., 2005; Rubio-Guillén et al., 2007). La caracterización de las diferentes formas espermáticas y el estudio de su relación con la fertilidad es una de las posibilidades que actualmente ofrece el análisis morfométrico. Las nuevas tecnologías de análisis por imagen permiten estudiar de forma individualizada las características

morfológicas de los espermatozoides, lo que a su vez ha permitido vislumbrar la heterogeneidad celular existente tanto entre los eyaculados de mamíferos como entre individuos (Maroto-Morales et al., 2012). Así, el análisis automático de la morfología espermática ha sido satisfactoriamente empleado para identificar y caracterizar estos grupos celulares en las diferentes especies animales (Buendía et al., 2002; Estes et al., 2009; Hidalgo et al., 2006; Peña et al., 2005; Thurston et al., 2001).

Uno de los principales problemas que presenta el estudio morfométrico, al igual que el estudio cinético, es la elevada cantidad de variables que aporta este tipo de sistemas, dificultando el entendimiento, la comprensión de los datos y disminuyendo su eficacia (Peña et al., 2005). En este sentido, diferentes trabajos científicos han combinado el uso de los sistemas CASMA con diferentes métodos estadísticos que permitan reducir el número de variables, conservando la mayor cantidad de información relevante (Estes et al., 2009; Thurston et al., 2001). Entre los métodos descritos, el análisis clúster es el método estadístico multivariante más utilizado para la identificación y caracterización de las subpoblaciones morfométricas, a partir de los resultados obtenidos con los sistemas CASMA. Así, este tipo de análisis estadístico se ha usado con éxito en varias especies como el caballo (Gravance et al., 1996; Hidalgo et al., 2006), el ciervo (Estes et al., 2009), la alpaca (Buendía et al., 2002) y el cerdo (González Villalobos et al., 2008; Rubio-Guillén et al., 2007). No obstante, el número de subpoblaciones obtenida por los diversos estudios es muy variable (Álvarez et al., 2008; Estes et al., 2009; Hidalgo et al., 2006; Hidalgo et al., 2008; Peña et al., 2005; Rubio-Guillén et al., 2007).

Uno de los puntos clave es la importancia que cobra la morfometría en el estudio de otros parámetros reproductivos como pueden ser la fertilidad y la prolificidad, o respecto a la aplicación de técnicas de conservación de gametos, como es la criopreservación espermática. Así, en los últimos años el estudio de las dimensiones del espermatozoide se ha convertido en una línea de investigación muy atractiva en las diferentes especies (Larsen et al., 2000).

III.b.3. Correlación entre los Parámetros Morfométricos y Cinéticos obtenidos mediante los sistemas CASA.

Los análisis de motilidad y morfometría del espermatozoide mediante los sistemas computarizados son técnicas que se están llevando a cabo de forma paralela en algunas especies de animales domésticos (Gil et al., 2009), aunque son más numerosos en la especie humana (Álvarez Lledó, 2003; Dott, 1975; Evans and Maxwell, 1987; Saacke, 1982; WHO, 1999). Estos análisis computarizados se han convertido en un método valioso a la hora de evaluar muestras seminales para predecir su fertilidad (Casey et al., 1997) y son de gran ayuda, no solo para llevar un control de sementales sino también como técnicas necesarias en el estudio de cualquier muestra seminal (Krause and Viethen, 1999). Así, existen trabajos que miden bien los parámetros cinéticos del espermatozoide de caballo (Quintero-Moreno et al., 2003) o sus parámetros morfométricos (Casey et al., 1997; Gravance et al., 1996; Hidalgo et al., 2005; Hidalgo et al., 2006; Hidalgo et al., 2008). Sin embargo, no se han realizado hasta la fecha ningún estudio en el que se correlacionen los valores obtenidos con ambos sistemas en muestras seminales frescas.

Aunque por ahora no existe una gran número de estudios en los cuales relacionen la morfometría con la dinámica espermática, los que hay son bastantes esperanzadores (Montoto et al., 2011; Tourmente et al., 2009). Además, en diversas especies de mamíferos (*Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Mesocricetus auratus*, *Mus musculus* y *Orystolagus cuniculus*), existe una alta correlación entre la longitud espermática y la velocidad del espermatozoide ($r = 0,96$, $p = 0,009$) como han observado Gomedio y Roldan (1993) y Malo et al. (2006b). En cambio, Herreros (2007), trabajando con cerdos, determino una correlación diferente entre el conjunto de variables morfométricas y cinéticas. Esta discrepancia de resultados nos hace pensar que la relación existente entre este tipo de variables es diferente en función de la especie, por lo que sería interesante realizar este tipo de estudios en el caballo.

Material y Métodos

IV. MATERIAL Y MÉTODO

IV.a. Animales

Todas las muestras seminales utilizadas en el presente estudio procedieron de 10 sementales adultos de fertilidad demostrada, pertenecientes a cuatro razas equinas distintas: dos Pura Raza Árabe (PRA), dos Pura Sangre Inglés (PSI), dos Anglo-Árabes (A-a) y cuatro Pura Raza Español (PRE); y cuyas edades estaban comprendidas entre los 7 y los 11 años. Ocho de los sementales fueron cedidos por el Centro de Reproducción Equina de Écija (Sevilla), propiedad de Cría Caballar, mientras el resto pertenecieron a clientes particulares del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Córdoba S.L. (HCV).

Durante el periodo de estudio, los sementales fueron alojados en boxes individuales de 3,5 m x 3,7 m, ubicados en una zona especialmente acondicionada de las instalaciones del HCV, bajo condiciones de temperatura y humedad controlada. Todos los animales recibieron una dieta equilibrada, que consistió en tres kilos de pienso repartidos en tres tomas diarias, junto con unos 7-8 kilogramos de heno de alfalfa de buena calidad y con disponibilidad de agua *ab libitum*.

IV.b. Recogida de esperma

Los sementales utilizados en el estudio fueron sometidos a 3 recogidas de esperma por semana durante 2 semanas consecutivas ver tabla en apartado V.a. (Resultados).

Las muestras de esperma fueron recogidas mediante vagina artificial cerrada (modelo Missouri, Minitüb, Tiefenbach, Alemania), empleando una yegua en celo natural o inducido mediante prostaglandinas sintéticas

(Luprostiol 7,5 mg IM, Prosolvin[®]; Intervet International B.V., Boxmeer, Holanda) como estímulo sexual positivo. Todas las extracciones de esperma se realizaron en una de las salas de exploración del HCV, de 50 m², provista de suelo antideslizante para el correcto manejo de los animales y de un potro de sujeción para la inmovilización de las yeguas durante el periodo de preparación del semental.

Para cada una de las recolectas de semen, la yegua soporte es primero introducida en el potro de sujeción y a continuación preparada para el salto en vagina mediante el encolado y posterior lavado de la zona genital, con el fin de reducir las posibilidades de contaminación del eyaculado en el momento del salto. Una vez preparada, se introduce el semental en la sala para proceder a la preparación del mismo, la cual duró aproximadamente 15 minutos. Esta consiste primero en aproximar el semental a la hembra soporte, ubicada en el potro de sujeción, y estimularlo sexualmente hasta conseguir la erección adecuada. Una vez alcanzada ésta, se procede a lavar el aparato reproductor con agua atemperada y jabón neutro para disminuir la carga bacteriana y mejorar la calidad espermática del eyaculado. Transcurridos los 15 minutos, se saca al semental de la sala de recogida y se procede a la protección e inmovilización de la yegua mediante la aplicación de un protector para el cuello y de un par de trabones traseros.

Finalmente, se adecua la vagina artificial para la correcta recogida del esperma. Esta preparación consistió en la aplicación de una funda sanitaria interna de un solo uso (Minitüb, Tiefenbach, Alemania) para garantizar la máxima higiene entre recolectas, la colocación de un filtro en línea (Minitüb, Tiefenbach, Alemania) para reducir la presencia de gel, la renovación del agua caliente de la vagina hasta conseguir una temperatura final de 42°C a 45°C y la lubricación de la misma con gel no espermicida estéril (Priority Care[®], Minitüb, Tiefenbach, Alemania).

IV.d. Valoración de la calidad espermática

Una vez recogido el eyaculado, éste fue transportado en condiciones isotermas (37°C) al laboratorio de Reproducción del Departamento de Medicina y Cirugía Animal, ubicado en la primera planta del Edificio Francisco Santisteban y próximo a la sala de recogida. Este laboratorio dispone de todo el material y equipamiento necesario para la valoración espermática.

IV.d.1. Volumen, pH y Concentración del eyaculado

El volumen eyaculado libre de gel se determinó mediante la escala milimetrada (ml) del colector de recogida. Una alícuota del eyaculado (3 ml) se utilizó para evaluar el pH, empleando para tal fin un pHmetro (HI 2211-02; Hanna Instruments Inc., Woonsocket RI, USA), según metodología descrita por Vidamen y col (2009). La concentración espermática (millones de espermatozoides/ml) fue registrada según la metodología descrita por Hidalgo (2006), empleando el fotómetro Spermacue® (Minitüb, Tiefenbach, Alemania).

IV.d.2. Morfología espermática e integridad del acrosoma

La morfología espermática y la integridad del acrosoma fueron evaluados conjuntamente mediante la tinción Spermac® (Minitüb, Tiefenbach, Alemania). Una alícuota de 7 µl de cada eyaculado es extendida en un portaobjetos y una vez secada al aire durante 30 minutos, teñida, según el protocolo descrito previamente en caballos por Hidalgo y col (2006; 2008). A continuación, las preparaciones son individualmente identificadas y montadas de forma permanente mediante un cubreobjetos de 24 x 60 y medio de montaje para microscopía Eukitt® (Kindler and Co; Friburgo, Alemania). Finalmente, las preparaciones son almacenadas hasta su posterior valoración.

Cada muestra fue valorada mediante observación visual, empleando un microscopio óptico de campo claro (BH2-Sc, Olympus, Tokio, Japón) provisto de objetivo de 100x. Un total de 200 espermatozoides fueron contados por preparación para determinar el porcentaje (%) de morfoanomalías y de espermatozoides con el acrosoma íntegro. Las morfoanomalías se clasificaron en anomalías de la cabeza, del flagelo y gota citoplasmáticas, según la clasificación de Saacke (1972). Por su parte, el estado del acrosoma se clasificó como íntegro (borde apical definido, marcado por una semiluna oscura) o dañado (con bordes irregulares y no definidos o con ausencia de acrosomas), según la clasificación de Oettle (1986).

IV.d.3. Movimiento espermático

El movimiento se valoró de forma objetiva empleando el equipo de análisis de imagen Sperm Class Analyzer[®] (SCA, Microptic S.L, Barcelona, España). Este equipo consta de un microscopio (Olympus BH-2; Tokio, Japón) equipado con un objetivo de 10x y conectado a una videocámara (Sony CCD - IRIS SSC-M370; Sony Corporation, Tokio, Japón) que transmite las imágenes microscópicas hasta una tarjeta capturadora de video (Meteor II; Matrox Electronic Systems Ltd; Quebec, Canadá), ubicada en el interior de un PC (Procesador Pentium IV, Intel Inside, Filipinas), para posteriormente ser procesadas por el software del módulo de movimiento del SCA.

Antes de cada valoración se ajustaron los parámetros de iluminación y contraste con el fin de optimizar las capturas de las células espermáticas, según metodología de Dorado et al. (2010). En cada análisis, se diluyó una alícuota de 200 μ l de esperma puro en un diluyente a base de leche desnatada y glucosa (EquiPro[®], Minitübe, Tiefenbach, Alemania), atemperado a 37°C, hasta obtener una concentración de 50 millones de espermatozoides/ml. Tras un periodo de incubación de 5 minutos en estufa (modelo 205, Pselecta, Barcelona, España) a 37°C, se depositó 10 μ l de la dilución en una cámara de recuento celular Makler (Sefi-Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel), atemperada a 37°C. A continuación, al menos cuatro campos microscópicos

fueron capturados aleatoriamente en una misma muestra con el fin de obtener un mínimo de 200 espermatozoides analizados por muestra .

TABLA 2. SET UP DEL SISTEMA UTILIZADO PARA LA VALORACIÓN DEL MOVIMIENTO ESPERMÁTICO DURANTE ESTE ESTUDIO

Parámetros	
Frames/segundo: imágenes capturadas por segundo.	25
Cámara de captura de imágenes	Makler
Escala (1 pixel equivale a 0,836232 micras)	10X
Área de partícula	<15 y >75 micras ²
	Lento <10
Límite VCL (µm/seg): para ser considerado como	Medio >10 <45
	Rápido >45<90
STR mínimo (%) : valor utilizado para definir los espermatozoides considerados progresivos	75
LIN mínima (%) : valor utilizado para definir los espermatozoides considerados con movimiento circular	<50

Set up recomendado por el fabricante

Una vez realizadas las capturas, las trayectorias espermáticas fueron corregidas mediante la función “playback”. Los parámetros cinéticos calculados por el SCA, a partir de las imágenes capturadas en cada célula espermática, han sido previamente descritos por diferentes autores (Álvarez Lledó, 2003; Mortimer, 1997):

Movimiento total (MT, %): porcentaje de espermatozoides que presentan una Velocidad curvilínea VCL > 10 µm/s.

Movimiento progresivo (MP, %): porcentaje de espermatozoides que presentan movimiento con un índice de rectitud (STR) ≥ 75% dentro de la muestra.

Estáticos (%): El porcentaje de espermatozoides que presentan una Velocidad curvilínea (VCL) $< 10 \mu\text{m/s}$.

Velocidad curvilínea (**VCL**, $\mu\text{m/s}$): se obtiene a partir de la unión de los puntos donde se localiza el centroide de la cabeza del espermatozoide en cada frame durante el tiempo de adquisición de la imagen. Nos aporta información sobre la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo.

Velocidad rectilínea (**VSL**, $\mu\text{m/s}$): se obtiene a partir de la unión entre el primer y el último punto durante el tiempo de adquisición de la imagen. Indica la distancia recorrida por el espermatozoide entre estos dos puntos de su trayectoria en función el tiempo.

Velocidad de la trayectoria media (**VAP**, $\mu\text{m/s}$): se obtiene por extrapolación de los puntos que determinan la VCL. Nos muestra la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media en función del tiempo.

Índice de Linealidad (**LIN**, %): Relación porcentual entre VSL y VCL ($\text{VSL} / \text{VCL} \times 100$). Indica la rectitud de la trayectoria curvilínea.

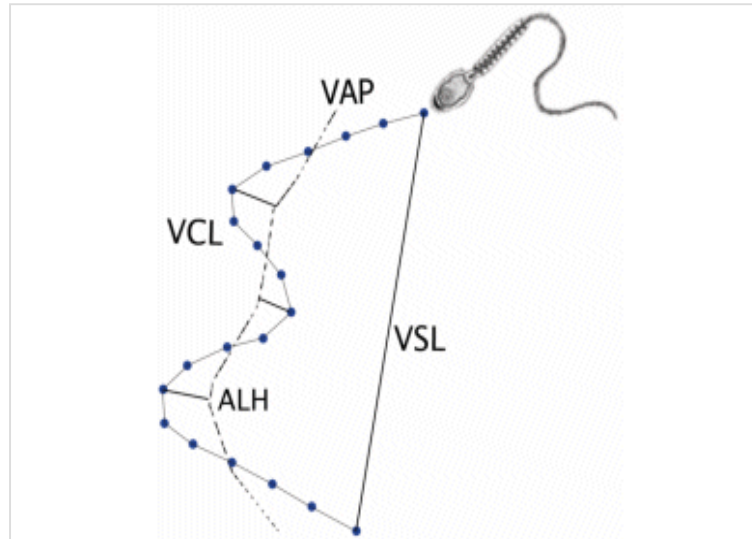
Índice de Rectitud (**STR**, %): Relación porcentual entre VSL y VAP ($\text{VSL} / \text{VAP} \times 100$). Indica la rectitud de la trayectoria media.

Índice de Oscilación (**WOB**, %): Relación porcentual entre VAP y VCL ($\text{VAP} / \text{VCL} \times 100$). Es una medida de la oscilación de la trayectoria curvilínea respecto de la trayectoria media.

Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (**ALH**, $\mu\text{m/s}$): Mide el máximo desplazamiento efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea, de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.

Frecuencia de cruces (**BCF**, Hz): Frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa la línea media en función del tiempo.

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS OBTENIDOS MEDIANTE EL SISTEMA CASA.



VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad rectilínea; VAP: Velocidad de la trayectoria media; ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza. (Imagen adaptada de MICROPTIC SL, Automatic Diagnostic Systems)

Todos los datos obtenidos con el sistema CASA usado en el presente estudio fueron almacenados en una única hoja de cálculo Excel[®] (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) para su posterior análisis estadístico.

IV.d.4. Morfometría espermática

La evaluación morfométrica se realizó siguiendo la metodología previamente descrita por este grupo de investigación para el análisis morfométrico del espermatozoide del caballo (Hidalgo et al., 2005). Para ello, una alícuota de 200 μ l de la dilución realizada para la determinación del movimiento se vuelve a diluir con 200 μ l de la solución Dubelcco's Buffer difosfato (DPBS, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) en un tubo eppendorf y centrifugada (IEC Micromax, mod. 230, International Equipment Company,

USA) durante 10 minutos a 600g. Tras eliminar el sobrenadante, se resuspende el sedimento con 200 µl de DPBS. A continuación, una gota de esta dilución es extendida en un portaobjetos que tras secarse al aire, se tiñe por inmersión durante 40 minutos en Hematoxilina de Harris (Panreac Química S.A., Barcelona, España). Finalmente, las preparaciones teñidas son identificadas individualmente y montadas con Eukitt[®], quedando así la muestra preparada para posterior su valoración.

TABLA 3. SET UP DEL SISTEMA CASMA UTILIZADO PARA LA VALORACIÓN MORFOMÉTRICA DE LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE DE CABALLO

Parámetros

Número de espermatozoides	100-200
Tamaño de cuadro	100x100 pixeles
Blanco y negro	
Escala (1pixel = 0,082 micras)	100X
Detección	Semiautomática
Especie	Equina
Tinción	Hematoxilina de Harris
Área de partícula(µm²)	2< y >80

Para el análisis morfométrico, se empleó el mismo hardware, aunque esta vez se utilizó el software de morfometría del analizador de semen SCA, descrito en el apartado IV. d. 3. En cada preparación se capturaron al azar un mínimo de 100 espermatozoides, evitando únicamente aquellos espermatozoides superpuestos o rodeados de partículas. Para la captura de los espermatozoides, el software de análisis morfométrico proporciona un cuadro de 100 x 100 megapíxeles en el que se encuadra la cabeza y la primera

porción de la pieza intermedia de cada uno de los espermatozoides presentes en la muestra (Figura 2A). Una vez capturados, el software elabora una máscara que se ajusta a la imagen microscópica original de cada espermatozoide, diferenciando la cabeza y la pieza intermedia (Figura 2B). Finalmente, se procede a revisar todas las capturas eliminándose aquellas imágenes que presentaron errores en la delimitación de las células espermáticas.

FIGURA 2. IMAGEN DE LA VENTANA DE CAPTURA DEL SCA

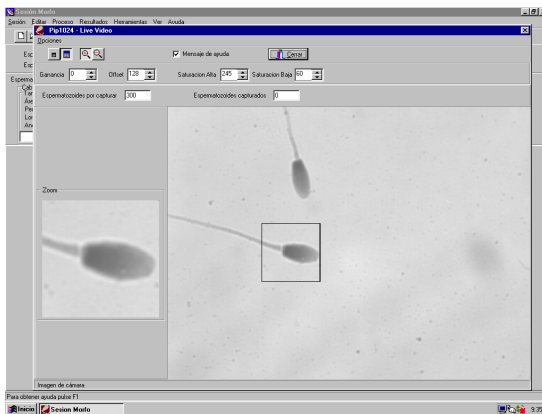


Figura 2A

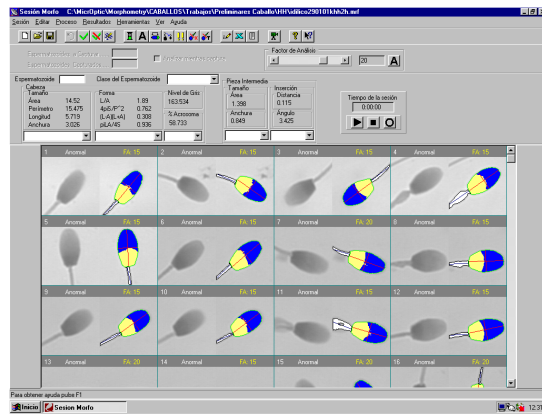
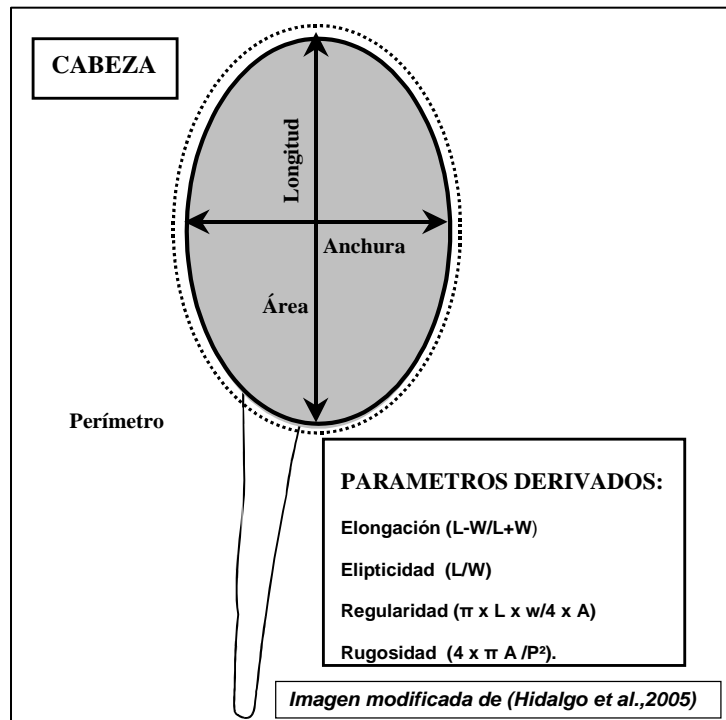


Figura2B

Sobre las imágenes digitalizadas, el programa realiza los cálculos y proporciona cuatro parámetros de tamaño de la cabeza: Longitud (L), Anchura (W), Perímetro (P) y Área (A), además de cuatro parámetros de forma: Elongación ($L-W/L+W$), Elipticidad (L/W), Regularidad ($\pi \times L \times w/4 \times A$) y rugosidad ($4 \times \pi \times A / P^2$).

FIGURA 3. PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS EVALUADOS EN LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE EQUINO



De igual modo, todos los datos morfológicos obtenidos fueron almacenados en una única hoja de cálculo Excel[®] para su posterior análisis estadístico.

IV.e. Diseño experimental

El presente trabajo pretende valorar los parámetros cinéticos y morfológicos del espermatozoide del caballo, mediante el análisis computarizado del espermatozoide y su posterior análisis estadístico multivariante para identificar la presencia de subpoblaciones espermáticas en los eyaculados del caballo de razas distintas. Para alcanzar tal fin se diseñaron tres experiencias que se correspondieron con cada uno de los tres objetivos planteados en el presente estudio.

IV.e.1.1. Experimento 1. Estudio de los parámetros cinéticos del espermatozoide equino: identificación de subpoblaciones cinéticas en el eyaculado fresco procedentes de caballos de diferentes razas.

Con el fin de responder al primer objetivo de este estudio, que consistió en la caracterización de los parámetros cinéticos del espermatozoide equino y la identificación de las distintas subpoblaciones cinéticas presentes en eyaculados de caballos de diferentes razas, se utilizaron 18.536 espermatozoides de un total de 40 muestras, procedentes de los 10 caballos (4 eyaculados por semental) del estudio. Las ocho variables cinéticas (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH y BCF) obtenidas por el sistema CASA fueron tratadas estadísticamente para identificar las subpoblaciones cinéticas y las diferencias existentes entre razas.

IV.e.1.2. Experimento 2. Estudio de los parámetros morfométricos del espermatozoide equino: identificación de subpoblaciones morfométricas en eyaculados frescos procedentes de caballos de diferentes razas.

Este experimento pretendió caracterizar los parámetros morfométricos del espermatozoide equino e identificar subpoblaciones morfométricas en eyaculados de caballos de diferentes razas (Objetivo 2). Para tal fin se utilizaron 7.312 espermatozoides de un total de 40 muestras, procedentes de los 10 caballos del estudio (4 eyaculados por semental). Cada espermatozoide proporciona ocho variables morfométricas de la cabeza del espermatozoide: **Longitud** (*Long-c*), **Anchura** (*Anch-c*), **Área** (*Área-c*), **Perímetro** (*Peri-c*), **Elipticidad** (*Elip*), **Rugosidad** (*Rug*), **Elongación** (*Elong*) y **Regularidad** (*Regu*), a partir de las cuales identificar las subpoblaciones morfométricas y las diferencias entre las razas eqinas estudiadas.

IV.e.1.3. Experimento 3. Estudio de la correlación entre los parámetros morfométricos y cinéticos del espermatozoide de caballos de diferentes razas.

Para cumplir con el objetivo 3, que consistió en el estudio de la correlación entre los parámetros cinéticos y morfométricos del espermatozoide de caballos de diferentes razas, se emplearon los datos obtenidos en los Experimentos 1 y 2, los cuales fueron organizados en una única base de datos Excel[®] para su posterior análisis estadístico, que se describe en el apartado (IV. f. Análisis estadístico).

IV.f. Análisis estadístico

IV.f.1. Variables Cinéticas

El conjunto de variables expuestas en el (Experimento 1) fueron sometidas a un análisis estadístico discriminante según la metodología descrita previamente por Martínez-Pastor et al. (2005b).

En primer lugar, mediante el procedimiento **PRINCOMP**, realizamos un Análisis de Componentes Principales (PCA) con el objetivo de reducir el número de variables, manteniendo la mayor cantidad de información de las variables originales. De entre las componentes principales obtenidas se eligieron aquellas que mostraban un valor Euclidiano (valor de la varianza extraída de cada una de las componentes principales) superior a uno (criterio de Kaiser).

En segundo lugar, se realizó un análisis clúster no jerárquico (método **FASTCLUS**) de las componentes principales obtenidas. Este procedimiento efectúa un análisis de los grupos (clúster), basándose en la distancia de una o más variables cuantitativas, usando para ello la distancia Euclidiana (Modelo K-means) para calcular el centro del clúster. Esto nos permite determinar el número de grupos iniciales para su posterior análisis jerárquico, facilitando la

detección y posterior eliminación de datos anómalos (outliers) y simplificando además el siguiente análisis.

Seguidamente se realizó un análisis jerárquico de los grupos obtenidos en el paso anterior, usando el método **AVERAGE**, para agrupar a los distintos grupos (método de conexión de medias) y determinar el número de grupos, según la evolución de los estadísticos pseudo- t^2 , pseudo- F y criterio cúbico del clúster (CCC). Los resultados del análisis jerárquico se ilustraron mediante un Dendograma (Figura 4).

Finalmente, una vez obtenidos los grupos, se utilizó un modelo lineal general (**PROC GLM**) para realizar el análisis de varianza (ANOVA) de los datos, seguido de un test múltiple a posteriori de Duncan para comparar aquellos resultados significativamente diferentes ($P < 0,05$). Además se realizó un test de Chi-cuadrado (**método FREQ**) para el estudio de la distribución de las observaciones.

IV.f.2. Variables Morfométricas

Para tal fin, se realizó en primer lugar un Análisis Factorial (procedimiento **FACTOR**) para encontrar grupos homogéneos a partir de un conjunto de variables altamente correlacionadas. Posteriormente se realizó un análisis de componentes principales (procedimiento **PRINCOMP**) con el fin de reducir el número de variables. Seguidamente, se realizó una matriz de covarianzas (**opción COV**) de los datos obtenidos y una estandarización de las componentes principales (**opción STD**). Finalmente, para comprobar las clasificaciones obtenidas mediante este método estadístico, se utilizó el Análisis Multivariante de la Varianza. Tras obtener los diferentes grupos, se utilizó un Modelo Lineal General (**PROC GLM**) para realizar el análisis de varianza de los datos, seguido de un test Múltiple de Duncan a posteriori para comparar aquellos resultados significativamente diferentes ($P < 0,05$). Además, se empleó el test de Chi-cuadrado (**método FREQ**) para el estudio de la distribución de las observaciones.

IV.f.3. Correlación entre las variables cinéticas y morfométricas del espermatozoide del caballo.

El conjunto de variables expuestas en los apartados IV.e.1.1 y IV.e.1.2 fue sometido a un análisis estadístico según la metodología descrita previamente por Gil et al. (2009).

En primer lugar, con el objeto de poder trabajar con variables normales obtuvimos los valores medios de cada variable cinética por eyaculado ($n = 40$). Seguidamente, se utilizó el **test de Kolmogorov-Smirnov** para comprobar la distribución normal de las variables en estudio. Finalmente, empleamos el **test de Pearson** para determinar la existencia de correlaciones entre las variables cinéticas y morfométricas. De la misma manera, se repitió el análisis de correlación dentro de la raza.

Además, se realizó el **test de Regresión Lineal Múltiple** con el fin de determinar cómo influyen las variables morfométricas sobre las componentes principales cinéticas (CPC1, CPC2 y CPC3). Asimismo, se utilizó el mismo test para determinar la influencia de las variables cinéticas sobre las componentes principales morfométricas (CPM1 y CPM2). Por último, usamos el test de **Regresión Logística Multinomial** para determinar si existe relación entre las variables morfométricas y/o cinéticas en función de las razas de las cuales proceden las muestras estudiadas.

Todos los análisis fueron realizados mediante el paquete estadístico SAS v.9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Los resultados se expresaron en media \pm error estándar de la media (SEM).

Resultados

V. RESULTADOS

V.a. Resultados promedio del análisis de la calidad seminal realizado en eyaculados frescos de équidos.

La Tabla 4 muestra los valores medios de los parámetros espermáticos evaluados en los caballos de las razas Pura Sangre Inglés (PSI), Anglo-Árabe (A-a), Pura Raza Árabe (PRA) y Pura Raza Español (PRE), utilizados para este estudio.

Según nuestros resultados, observamos diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las razas estudiadas para varios de los parámetros seminales evaluados. Así, el volumen eyaculado de los caballos PRA fue significativamente ($P < 0,05$) menor (45,88 ml) que el presentado por los caballos de otra raza. Del mismo modo, el número total de espermatozoides presentes en el eyaculado fue significativamente ($P < 0,05$) mayor en caballos de raza A-a ($16,58 \times 10^9$ espermatozoides/ml); si bien, no encontramos diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las razas estudiadas para la concentración. En el presente estudio, bajo nuestras condiciones de análisis, no observamos diferencias significativas ($P > 0,05$) entre razas para los parámetros pH y movimiento total (MT). Sin embargo, los caballos de raza PRA presentaron valores significativamente ($P < 0,05$) mayores (82,59%) de movimiento progresivo (MP), comparados con las razas PSI y A-a (72,3% y 70,24%, respectivamente).

TABLA 4. PARÁMETROS ESPERMÁTICOS (MEDIA ± SEM) OBTENIDOS TRAS LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL DE 40 EYACULADOS DE 10 SEMENTALES FÉRTILES.

Parámetros	Raza				Total
	PRA	PSI	A-a	PRE	
Volumen (ml)	45,88±9,38 ^b	65,00±10,40 ^a	79,75±5,20 ^a	69,00±3,24 ^a	65,74±3,52
Concentración (x10 ⁶ spz/ml)	255,87±50,17 ^a	175,5±20,53 ^a	211,25±22,62 ^a	162,81±24,66 ^a	193,65±15,82
Espermatozoides totales (x10 ⁹ spz/ml)	8,46±0,97 ^b	10,67±1,03 ^b	16,58±1,97 ^a	11,54±1,87 ^{ab}	11,79±0,99
Movimiento total (%)	95,86±1,91 ^a	93,37±2,20 ^a	91,88±2,27 ^a	93,50±1,73 ^a	93,67±0,99
Movimiento progresivo (%)	82,59±2,77 ^a	72,34±3,28 ^b	70,24±2,82 ^b	76,97±2,26 ^{ab}	75,96±1,49
Morfología normal (%)	84,23±2,45 ^a	60,93±4,35 ^c	66,97±1,19 ^{bc}	75,74±2,14 ^{ab}	72,61±2,14
Morfoanomalías (%)	16,51±2,59 ^b	39,07±4,35 ^a	33,02±1,19 ^a	28,02±3,11 ^{ab}	29,60±2,50
Anomalías de la cabeza (%)	8,45±3,11 ^a	9,67±1,50 ^a	5,77±2,04 ^a	9,25±3,27 ^a	8,69±1,35
Anomalías de la cola (%)	2,82±0,85 ^b	1,87±0,51 ^b	3,52±0,81 ^b	6,42±0,87 ^a	3,96±0,59
Anomalías de la pieza intermedia (%)	5,22±1,25 ^b	25,84±4,67 ^a	24,31±4,03 ^a	12,34±2,07 ^b	16,76±2,45
Espermatozoides íntegros (%)	68,20±9,81 ^a	52,27±6,48 ^a	47,25±14,72 ^a	48,75±4,70 ^a	54,34±4,08
Espermatozoides activados (%)	24,71±4,10 ^b	41,69±16,09 ^{ab}	50,93±16,09 ^a	42,67±6,69 ^{ab}	39,24±3,72
Espermatozoides desnudos (%)	17,55±13,37 ^a	7,07±2,14 ^a	7,42±4,82 ^a	8,58±2,24 ^a	8,90±1,88
pH	7,52±0,03 ^a	7,68±0,04 ^a	7,57±0,04 ^a	7,58±0,03 ^a	7,59±0,03

PRA= Pura Raza Árabe; **PSI=** Pura Sangre Ingles; **A-a=** Anglo-Árabe; **PRE=** Pura Raza Español; **SEM=** error estándar de la media.

Diferentes letras (a-d) para la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre razas (P<0,05).

En cuanto a los resultados de morfología espermática, son las razas PSI y A-a las que mostraron mayores porcentajes (39,07% y 33,02%, respectivamente) de espermatozoides morfológicamente anormales ($P < 0,05$), frente al 28,02% y al 16,51% registrados en el PRE y el PRA, respectivamente. El estudio detallado de las morfoanomalías mostró un incremento significativo ($P < 0,05$) del porcentaje de espermatozoides con pieza intermedia anormal en las razas PSI (25,84%) y A-a (24,31%), mientras que el porcentaje de espermatozoides con colas anormales fue mayor en los caballos de raza PRE (6,42%), no observándose diferencias significativas ($P > 0,05$) entre razas para la morfología de la cabeza. En relación a la integridad del acrosoma, únicamente observamos diferencias significativas ($P < 0,05$) entre razas para el porcentaje de espermatozoides activados, cuyos porcentajes fueron menores en caballos de raza PRA (24,71%).

V.b. Resultados del estudio de los parámetros cinéticos del espermatozoide equino: identificación de subpoblaciones cinéticas en el eyaculado fresco procedentes de caballos de diferentes razas

V.b.1. Estudio de movilidad CASA

Un total de 18.536 espermatozoides fueron analizados con el sistema SCA (5.010 procedentes de los sementales de raza PRA, 4.438 de los de raza PSI, 3.152 de los caballos A-a y 5.936 de los PRE), el cual nos proporcionó ocho variables cinéticas (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH y BCF).

La Tabla 5 muestra los valores medios (\pm SEM) de los parámetros cinéticos obtenidos por el sistema CASA usado en nuestro estudio en los 40 eyaculados estudiados. De forma similar a los parámetros de calidad seminal, diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$) fueron observadas entre las razas estudiadas para todas las variables cinéticas evaluadas. En este sentido, los sementales de la raza PRA presentaron valores significativamente ($P < 0,001$) superiores para las tres velocidades espermáticas (VCL, VSL y VAP) y para los parámetros de calidad del movimiento (LIN y STR), mientras que los

caballos de raza PSI presentaron valores de ALH y BCF significativamente ($P<0,001$) superiores al resto de razas. Los espermatozoides de caballos de raza A-a mostraron valores significativamente ($P<0,001$) inferiores para los parámetros VSL, VAP, LIN y STR, mientras que los caballos PRE presentaron valores significativamente ($P<0,001$) menores para los parámetros VCL y ALH y un valor significativamente ($P<0,001$) superior de la variable WOB.

TABLA 5. PARÁMETROS CINÉTICOS (MEDIA \pm SEM) OBTENIDOS POR EL SISTEMA SPERM CLASS ANALYZER TRAS LA EVALUACIÓN OBJETIVA DE 40 EYACULADOS DE 10 SEMENTALES ADULTOS.

Parámetros cinéticos	Promedio	Raza			
		PRA	PSI	A-a	PRE
N	18536	5010	4438	3152	5936
(%)	100	27,03	23,94	17,00	32,02
VCL ($\mu\text{m/s}$)	109,73 \pm 0,30	117,99 \pm 0,56 ^a	112,28 \pm 0,66 ^b	105,15 \pm 0,77 ^c	103,02 \pm 0,47 ^d
VSL ($\mu\text{m/s}$)	62,97 \pm 0,24	73,83 \pm 0,47 ^a	63,31 \pm 0,49 ^b	50,10 \pm 0,55 ^d	60,95 \pm 0,39 ^c
VAP ($\mu\text{m/s}$)	84,90 \pm 0,24	94,08 \pm 0,44 ^a	81,28 \pm 0,50 ^c	76,47 \pm 0,59 ^d	84,83 \pm 0,41 ^b
LIN (%)	56,80 \pm 0,17	62,29 \pm 0,33 ^a	54,67 \pm 0,32 ^c	47,93 \pm 0,42 ^d	59,18 \pm 0,31 ^b
STR (%)	72,04 \pm 0,16	75,90 \pm 0,29 ^a	74,12 \pm 0,30 ^b	64,15 \pm 0,41 ^d	71,82 \pm 0,31 ^c
WOB (%)	76,59 \pm 0,11	79,72 \pm 0,21 ^b	71,61 \pm 0,23 ^c	71,97 \pm 0,27 ^c	80,72 \pm 0,18 ^a
ALH (μm)	3,37 \pm 0,01	3,30 \pm 0,02 ^c	3,79 \pm 0,03 ^a	3,52 \pm 0,03 ^b	2,99 \pm 0,02 ^d
BCF (Hz)	6,98 \pm 0,03	6,76 \pm 0,05 ^c	7,38 \pm 0,05 ^a	6,44 \pm 0,06 ^d	7,18 \pm 0,05 ^b

PRA= Pura Raza Árabe; **PSI=** Pura Sangre Ingles; **A-a=** Anglo-Árabe; **PRE=** Pura Raza Español; **VCL=** velocidad curvilínea; **VSL=** velocidad rectilínea; **VAP=** velocidad de la trayectoria media, **LIN=** linealidad; **STR=**, rectitud; **WOB=** índice de oscilación; **ALH=** amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza; **BCF=** frecuencia de batido; **SEM=** error estándar de la media.

Diferentes letras (a-d) para la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre razas ($P<0,05$).

V.b.2. Subpoblaciones espermáticas

El PCA redujo el total de variables cinéticas originales a tres componentes principales cinéticos (CPC-1, CPC-2 y CPC-3), los cuales explicaron aproximadamente el 87% de la varianza acumulada (Tabla 6). CPC-1 estuvo relacionado con la linealidad y la progresividad del movimiento espermático y explicó el 41% de la varianza total, CPC-2 estuvo relacionado con el vigor del movimiento espermático y explicó el 31% de la varianza total, mientras que CPC-3 se relacionó con la actividad flagelar y explicó el 15% de la varianza total (Tabla 6).

TABLA 6. RESULTADO DEL ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS OBTENIDOS MEDIANTE EL SISTEMA SPERM CLASS ANALYZER.

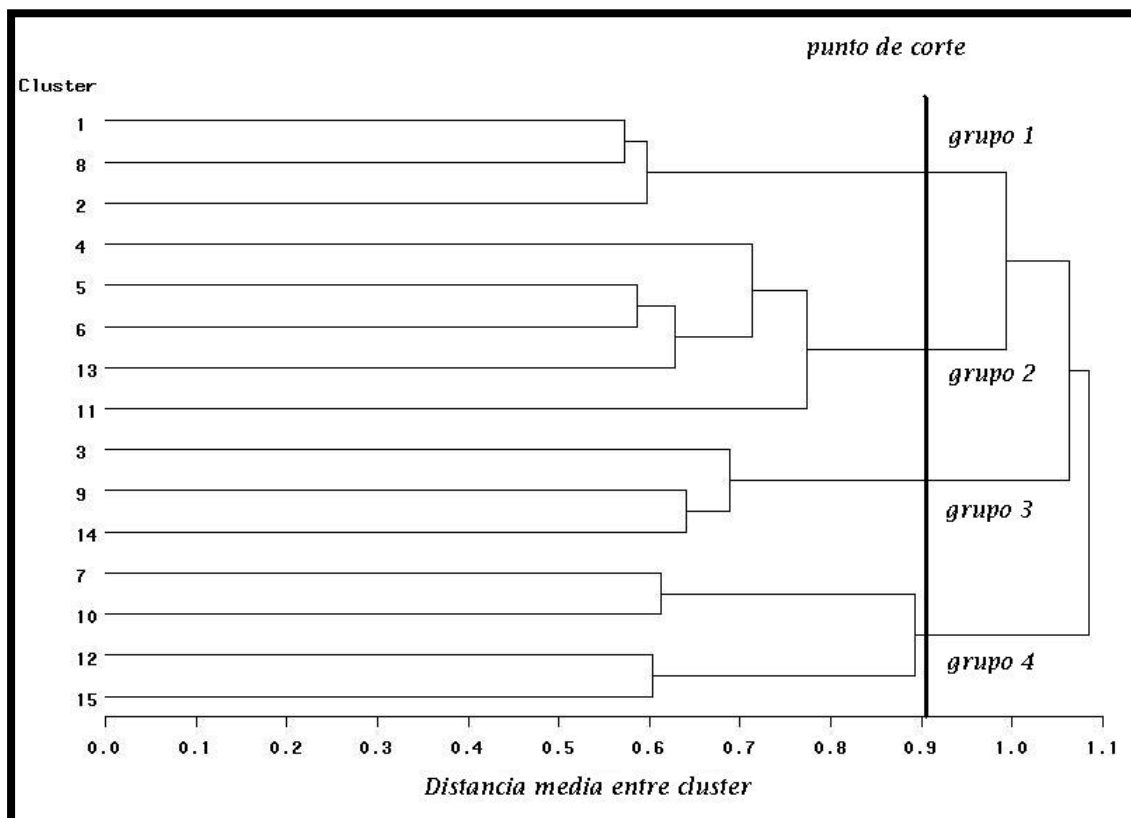
	CPC 1	CPC 2	CPC 3
Distancia Euclidiana	3,31	2,50	1,23
Varianza*	0,41	0,31	0,15
Eigenvectors [†]			
VCL	0,28	0,95	-0,09
VSL	0,93	0,28	0,09
VAP	0,61	0,67	-0,38
LIN	0,91	-0,36	0,15
STR	0,76	-0,27	0,48
WOB	0,70	-0,30	-0,52
ALH	-0,25	0,87	0,26
BCF	0,15	0,17	0,68

*Varianza explicada en función a los componentes principales. [†]Los eigenvectores son medidas de asociación entre los parámetros originales y los resultados de los componentes principales.

PRA= Pura Raza Árabe; **PSI**= Pura Sangre Ingles; **A-a**= Anglo-Árabe; **PRE**= Pura Raza Español; **VCL**=velocidad curvilínea; **VSL**= velocidad rectilínea; **VAP**= velocidad de la trayectoria media, **LIN**= linealidad; **STR**= rectitud; **WOB**= índice de oscilación; **ALH**= amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza; **BCF**= frecuencia de batido; **CPC**= Componente Principal Cinético.

Los tres componentes principales cinéticos (CPC-1, CPC-2 y CPC-3) fueron sometidos a un análisis clúster no jerárquico, y los 15 grupos o clúster resultantes se agruparon en cuatro grupos después de aplicar el procedimiento jerárquico y del estudio de los estadísticos pseudo- t^2 , pseudo- F y criterio cúbico del clúster (CCC). Los cuatro grupos surgen si la línea de corte se sitúa en cualquier lugar entre aproximadamente 0,91 y 0,98 a lo largo del eje horizontal del Dendograma (Figura 4).

FIGURA 4. DENDOGRAMA DERIVADO DE LOS DATOS OBTENIDOS A PARTIR DE SEMEN FRESCO DE CABALLOS



Los números de la izquierda representan el total de conglomerados (clúster) formados a partir de los datos individuales de los espermatozoides. A la derecha, se encuentra el valor del punto de corte que determina el número final de grupos utilizados en el estudio

El **Grupo 1 (Subpoblación 1)**, integrado por los clúster 1, 2 y 8, consta de 2.206 espermatozoides (12% del total de la población), el **Grupo 2 (Subpoblación 2)**, integrado por los clúster 4, 5, 6, 11 y 13, consta de 5.231 espermatozoides (28% del total de la población), el **Grupo 3 (Subpoblación 3)**, integrado por los clúster 3, 9 y 14, consta de 4.047 espermatozoides (22% del total de la población) y el **Grupo 4 (Subpoblación 4)**, integrado por los clúster 7, 10, 12 y 15, consta de 7.052 espermatozoides (38% del total de la población).

Tras la aplicación del procedimiento FASTCLUS sobre los datos individuales de los 18.536 espermatozoides, identificamos la presencia de cuatro subpoblaciones espermáticas en el eyaculado de los caballos empleados en el presente estudio. Las características cinéticas de las subpoblaciones identificadas se muestran en la Tabla 7 y se definen a continuación:

Subpoblación 1 (sP 1): la menor de las subpoblaciones (11,90%) incluyó espermatozoides moderadamente activos (valor elevado de VCL), pero poco progresivos (valor bajo de VSL, LIN y STR) y elevado de (VAP y WOB) Asimismo, el valor de BCF fue significativamente ($P < 0,001$) menor, comparados con los obtenidos en el resto de poblaciones.

Subpoblación 2 (sP 2): incluyó espermatozoides lentos (valores reducidos de VCL y VAP), cuyas trayectorias fueron no progresivas (valores mínimos de LIN, STR y WOB). Además son espermatozoides que recorren distancias cortas (valor mínimo de VSL). El total de espermatozoides móviles incluido en esta subpoblación fue 28,22%.

Subpoblación 3 (sP 3): estuvo formada por espermatozoides cinéticamente muy activos (valores máximos de VCL y VSL), progresivos (valores elevados de LIN y STR) y con una gran actividad flagelar (valor máximo de BCF), Además, los valores medios de ALH fueron estadísticamente ($P < 0,001$) superiores al resto de subpoblaciones (Tabla 7). El total de espermatozoides móviles incluido en esta subpoblación fue 21,83%.

Subpoblación 4 (sP 4): incluyó espermatozoides cuyo movimiento se define como lento (valor mínimo de VCL) y progresivo (valores de LIN, STR y

WOB máximos junto a una ALH mínima). El total de espermatozoides móviles incluido en esta subpoblación fue 38,04%.

TABLA 7. PARÁMETROS CINÉTICOS (MEDIA ± SEM) QUE DEFINEN LAS 4 SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS IDENTIFICADAS EN EL EYACULADO DE CABALLO (N = 40).

Parámetros cinéticos	Subpoblaciones espermáticas (sP)			
	1	2	3	4
N	2206	5231	4047	7052
(%)	11,90	28,22	21,83	38,04
VCL (µm/s)	121,45±0,32 ^b	103,42±0,51 ^c	145,63±0,45 ^a	97,66±0,33 ^d
VSL (µm/s)	59,26±0,54 ^c	35,40±0,25 ^d	86,23±0,36 ^a	81,96±0,32 ^b
VAP (µm/s)	106,92±0,30 ^a	72,29±0,64 ^d	103,09±0,36 ^b	88,75±0,32 ^c
LIN (%)	48,04±0,40 ^c	35,31±0,21 ^d	59,83±0,20 ^b	82,91±0,13 ^a
STR (%)	54,48±0,44 ^c	52,87±0,29 ^d	83,90±0,19 ^b	91,70±0,09 ^a
WOB (%)	88,16±0,13 ^b	68,39±0,20 ^d	71,13±0,15 ^c	90,22±0,01 ^a
ALH (µm)	3,01±0,02 ^c	3,81±1,29 ^b	5,11±1,30 ^a	2,22±0,08 ^d
BCF (Hz)	5,88±0,05 ^d	7,27±0,04 ^c	9,94±0,05 ^a	7,89±0,03 ^b

VCL=velocidad curvilínea; **VSL**= velocidad rectilínea; **VAP**= velocidad de la trayectoria media, **LIN**= linealidad; **STR**=, rectitud; **WOB**= índice de oscilación; **ALH**= amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza; **BCF**= frecuencia de batido; **SEM**= error estándar de la media.

Diferentes letras (a-d) para la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre razas (P<0,05).

V.b.2.1. Influencia de la raza en las variables cinéticas que caracterizan las subpoblaciones espermáticas definidas.

En la Tabla 8 se muestran los valores medios de las variables cinéticas que definen la Subpoblación sP 1 (espermatozoides moderadamente activos pero no progresivos) en cada una de las razas estudiadas.

TABLA 8. PARÁMETROS CINÉTICOS (MEDIA ± SEM) DESCRIPTORES DE LA SUBPOBLACIÓN 1 (SP 1) EN LAS 4 RAZAS ESTUDIADAS.

Parámetros cinéticos	Razas			
	PRA	PSI	A-a	PRE
n	691	258	355	902
(%)	31,32 ^b	11,70 ^d	16,10 ^c	40,88 ^a
VCL (µm/s)	123,91±0,51 ^a	121,80±0,98 ^b	115,01±0,71 ^c	122,00±0,51 ^{ab}
VSL (µm/s)	65,34±0,87 ^a	63,15±1,45 ^a	44,86±1,35 ^c	59,16±0,83 ^b
VAP (µm/s)	108,94±0,47 ^a	105,09±0,81 ^b	99,77±0,62 ^c	108,72±0,51 ^a
LIN (%)	52,27±0,6 ^a	51,24±1,04 ^a	38,16±1,05 ^c	47,75±0,61 ^b
STR (%)	59,35±0,72 ^a	59,45±1,23 ^a	43,89±1,20 ^c	53,49±0,67 ^b
WOB (%)	88,06±0,21 ^b	86,60±0,40 ^c	86,96±0,33 ^c	89,13±0,19 ^a
ALH (µm)	3,01±0,07 ^{cb}	3,23±0,05 ^a	3,11±0,04 ^b	2,91±0,03 ^c
BCF (Hz)	6,47±0,08 ^a	6,25±0,14 ^a	5,46±0,11 ^b	5,48±0,07 ^b

PRA= Pura Raza Árabe; **PSI**= Pura Sangre Ingles; **A-a**= Anglo-Árabe; **PRE**= Pura Raza Español; **VCL**=velocidad curvilínea; **VSL**= velocidad rectilínea; **VAP**= velocidad de la trayectoria media, **LIN**= linealidad; **STR**=, rectitud; **WOB**= índice de oscilación; **ALH**= amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza; **BCF**= frecuencia de batido; **SEM**= error estándar de la media.

Diferentes letras (a-d) para la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre razas (P<0,05).

Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) fueron observadas entre las diferentes razas para todas las variables cinéticas de la Subpoblación SP 1. Todas las razas mostraron valores medios similar para todas las variables cinéticas de esta Subpoblación 1. Sin embargo, la raza A-a mostro valores medios de las variables de velocidad (VCL, VSL y VAP) y de calidad (LIN, STR y WOB) significativamente menores al resto de razas ($P < 0,01$). En cuanto a la proporción de espermatozoides que cada raza aportó a esta subpoblación, observamos diferencias raciales significativas ($P < 0,05$), siendo el PRE el que contribuyó con un mayor número de espermatozoides (40,9%), mientras que la raza PSI aportó el menor número de espermatozoides (11,7%).

TABLA 9. PARÁMETROS CINÉTICOS (MEDIA \pm SEM) DESCRIPTORES DE LA SUBPOBLACIÓN 2 (SP 2) PARA LAS 4 RAZAS ESTUDIADAS

Parámetros cinéticos	Razas			
	PRA	PSI	A-a	PRE
n	1084	1305	1357	1485
(%)	20,72 ^d	24,95 ^c	25,94 ^b	28,39 ^a
VCL($\mu\text{m}/\text{sec}$)	107,30 \pm 1,14 ^a	97,87 \pm 0,96 ^b	100,51 \pm 1,08 ^b	108,12 \pm 0,89 ^a
VSL($\mu\text{m}/\text{sec}$)	38,75 \pm 0,55 ^a	35,26 \pm 0,50 ^b	29,92 \pm 0,44 ^c	38,11 \pm 0,47 ^a
VAP($\mu\text{m}/\text{sec}$)	75,70 \pm 0,93 ^b	63,66 \pm 0,80 ^d	66,72 \pm 0,86 ^c	82,48 \pm 0,85 ^a
LIN (%)	36,92 \pm 0,43 ^a	36,55 \pm 0,40 ^a	30,98 \pm 0,37 ^b	37,00 \pm 0,42 ^a
STR (%)	53,86 \pm 0,58 ^b	57,94 \pm 0,54 ^a	49,19 \pm 0,57 ^d	51,06 \pm 0,58 ^c
WOB (%)	69,64 \pm 0,40 ^b	63,99 \pm 0,42 ^c	64,98 \pm 0,36 ^c	74,46 \pm 0,34 ^a
ALH (μm)	3,82 \pm 0,04 ^b	3,77 \pm 0,03 ^b	4,02 \pm 0,04 ^a	3,65 \pm 0,03 ^c
BCF (Hz)	7,36 \pm 0,09 ^a	7,58 \pm 0,08 ^a	7,09 \pm 0,08 ^b	7,10 \pm 0,08 ^b

PRA= Pura Raza Árabe; **PSI**= Pura Sangre Ingles; **A-a**= Anglo-Árabe; **PRE**= Pura Raza Español; **VCL**=velocidad curvilínea; **VSL**= velocidad rectilínea; **VAP**= velocidad de la trayectoria media, **LIN**= linealidad; **STR**=, rectitud; **WOB**= índice de oscilación; **ALH**= amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza; **BCF**= frecuencia de batido; **SEM**= error estándar de la media.

Diferentes letras (a-d) para la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre razas ($P < 0,05$).

En relación al estudio de los valores cinéticos medios de la Subpoblación 2 (espermatozoides lentos pero no progresivos), según las razas en estudio (Tabla 9), se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para todas las variables evaluadas. Así, los caballos de raza A-a aportaron los espermatozoides más lentos y menos progresivo, como indican los valores mínimos de VSL, LIN y STR junto a valores máximos de ALH. Por otra parte, los sementales de raza PSI aportaron el menor número de espermatozoides a esta subpoblación (20,72%; $P < 0,01$).

TABLA 10. PARÁMETROS CINÉTICOS (MEDIA \pm SEM) DESCRIPTORES DE LA SUBPOBLACIÓN 3 (SP3) PARA LAS 4 RAZAS ESTUDIADAS

Parámetros cinéticos	Razas			
	PRA	PSI	A-a	PRE
n	988	1556	487	1016
(%)	24,41 ^c	38,45 ^a	12,03 ^d	25,10 ^b
VCL ($\mu\text{m/s}$)	155,68 \pm 0,84 ^a	152,08 \pm 0,59 ^b	145,36 \pm 1,40 ^c	126,09 \pm 0,86 ^d
VSL ($\mu\text{m/s}$)	91,42 \pm 0,74 ^a	90,62 \pm 0,54 ^a	81,21 \pm 1,09 ^b	76,88 \pm 0,63 ^c
VAP ($\mu\text{m/s}$)	110,84 \pm 0,69 ^a	106,87 \pm 0,47 ^b	98,62 \pm 1,15 ^c	91,90 \pm 0,74 ^d
LIN (%)	59,35 \pm 0,44 ^b	60,02 \pm 0,32 ^b	56,60 \pm 0,60 ^c	61,53 \pm 0,35 ^a
STR (%)	82,50 \pm 0,39 ^b	84,70 \pm 0,30 ^a	82,95 \pm 0,58 ^b	84,49 \pm 0,35 ^a
WOB (%)	71,66 \pm 0,34 ^b	70,65 \pm 0,24 ^c	68,12 \pm 0,49 ^d	72,78 \pm 0,26 ^a
ALH (μm)	5,31 \pm 0,04 ^a	5,42 \pm 0,03 ^a	5,15 \pm 0,06 ^b	4,45 \pm 0,04 ^c
BCF (Hz)	8,80 \pm 0,11 ^c	9,81 \pm 0,78 ^b	9,68 \pm 0,16 ^b	11,37 \pm 0,11 ^a

PRA= Pura Raza Árabe; **PSI**= Pura Sangre Ingles; **A-a**= Anglo-Árabe; **PRE**= Pura Raza Español; **VCL**=velocidad curvilínea; **VSL**= velocidad rectilínea; **VAP**= velocidad de la trayectoria media, **LIN**= linealidad; **STR**=, rectitud; **WOB**= índice de oscilación; **ALH**= amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza; **BCF**= frecuencia de batido; **SEM**= error estándar de la media.

Diferentes letras (a-d) para la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre razas ($P < 0,05$).

Los valores cinéticos medios de la Subpoblación 3 (espermatozoides muy activos y progresivos) se presentan en la Tabla 10. Diferencias raciales fueron observadas ($P < 0,05$) para todas las variables cinéticas evaluadas. Así, se observó que el PRA mostro los valores máximos de VCL, VSL y VAP, mientras que los espermatozoides que presentan una mayor progresividad (valores máximos de LIN y STR) pertenecieron a la raza PRE. Diferencia significativas fueron observadas en la distribución de los espermatozoides entre razas para esta subpoblación, destacando la raza PSI con un 38,45%; $P < 0,01$.

La Subpoblación 4 (espermatozoides poco activos pero progresivos) mostro diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre las razas estudiadas, para todas las variables cinéticas evaluadas (Tabla 11). Así, los caballos de raza A-a presentaron los espermatozoides menos activos, valores mínimos de mínimos de VCL, VSL, VAP, ALH y BCF, mientras que los espermatozoides del PRA mostraron los espermatozoides más veloces y progresivos (valores máximos de VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB). La distribución de los espermatozoides en estas subpoblación mostro diferencias significativas ($P < 0,01$) entre razas, siendo el PSI y A-a los que mostraron unos valores mínimos (18,7% y 13,51%, respectivamente), mientras que la raza que apporto un mayor número de espermatozoides fue el PRE (35,92%).

TABLA 11. PARÁMETROS CINÉTICOS (MEDIA ± SEM) DESCRIPTORES DE LA SUBPOBLACIÓN 4 (SP4) PARA LAS 4 RAZAS ESTUDIADAS

Parámetros cinéticos	Razas			
	PRA	PSI	A-a	PRE
n	2247	1319	953	2533
(%)	31,86 ^b	18,70 ^c	13,51 ^c	35,92 ^a
VCL (µm/s)	106,77±0,53 ^a	95,95±0,79 ^b	84,95±0,90 ^c	95,26±0,52 ^b
VSL (µm/s)	92,36±0,54 ^a	77,33±0,76 ^c	70,53±0,87 ^d	79,44±0,49 ^b
VAP (µm/s)	99,05±0,54 ^a	84,16±0,75 ^c	76,60±0,88 ^d	86,59±0,51 ^b
LIN (%)	85,66±0,22 ^a	79,32±0,32 ^d	81,77±0,40 ^c	82,77±0,21 ^b
STR (%)	92,77±0,15 ^a	90,85±0,23 ^b	91,15±0,27 ^b	91,41±0,15 ^b
WOB (%)	92,16±0,15 ^a	87,13±0,23 ^d	89,46±0,29 ^c	90,39±0,15 ^b
ALH (µm)	2,13±0,02 ^c	2,52±0,02 ^a	2,03±0,03 ^d	2,21±0,02 ^b
BCF (Hz)	7,90±0,05 ^b	8,10±0,07 ^a	7,57±0,09 ^c	7,91±0,05 ^b

PRA= Pura Raza Árabe; **PSI=** Pura Sangre Ingles; **A-a=** Anglo-Árabe; **PRE=** Pura Raza Español; **VCL=** velocidad curvilínea; **VSL=** velocidad rectilínea; **VAP=** velocidad de la trayectoria media, **LIN=** linealidad; **STR=**, rectitud; **WOB=** índice de oscilación; **ALH=** amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza; **BCF=** frecuencia de batido; **SEM=** error estándar de la media.

Diferentes letras (a-d) para la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre razas (P<0,05).

Finalmente, el estudio de la distribución de las subpoblaciones cinéticas identificadas en cada raza (Tabla 12) mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas (P<0,001) para todas las razas estudiadas. Nuestros resultados mostraron que todas las razas presentaron una menor proporción de espermatozoides pertenecientes a la Subpoblación 1 (moderadamente activos pero poco progresivos), con valores que oscilaron entre el 5,81% del PSI y el 15,20% del PRE. En cambio, la subpoblación

mayoritaria en el PRA (44,85%) y del PRE (42,67%) fue la sP 4 (espermatozoides poco activos pero muy progresivos), mientras que para en los sementales de raza PSI fue la sP-3 (espermatozoides muy activos y progresivos, 35,06%) y la sP 2 (espermatozoides lentos y no progresivos, 43,05%) para el A-a.

TABLA 12. RELACIÓN DEL PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDEOS DE CADA RAZA SEGÚN LA SUBPOBLACIÓN

Raza	Subpoblación			
	1	2	3	4
PRA	13,79 ^d	21,64 ^b	19,72 ^c	44,85 ^a
PSI	5,81 ^c	29,41 ^b	35,06 ^a	29,72 ^b
A-a	11,26 ^d	43,05 ^a	15,45 ^c	30,24 ^b
PRE	15,20 ^d	25,01 ^b	17,12 ^c	42,67 ^a

PRA= Pura Raza Árabe; **PSI**= Pura Sangre Inglés; **A-a**= Anglo-Árabe; **PRE**= Pura Raza Español;

Diferentes letras (a-d) en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre razas (P<0,05, test Chi-cuadrado).

V.c. Resultados del estudio de los parámetros morfométricos del espermatozoide equino: identificación de subpoblaciones morfométricas en el eyaculado fresco procedentes de caballos de diferentes razas

V.c.1. Estudio de morfometría CASMA

Un total de 7.312 espermatozoides fueron analizados objetivamente con el módulo de morfometría del sistema SCA (1.671 procedían de los sementales de raza PRA, 1.645 de los PSI, 1.550 de los A-a y 2.446 de los PRE, el cual nos proporciono cuatro variables de tamaño de la cabeza del espermatozoide: **Longitud** (*Long-c*), **Anchura** (*Anch-c*), **Área** (*Área-c*), **Perímetro** (*Peri-c*); y cuatro variables de forma: **Elípticidad** (*Elip*), **Rugosidad** (*Rug*), **Elongación** (*Elong*) y **Regularidad** (*Regu*).

La Tabla 13 muestra los parámetros morfométricos obtenidos por el sistema SCA para el espermatozoide de caballo. Nuestros resultados indicaron la existencia de diferencias significativas ($P < 0,001$) entre las diferentes razas para todos los parámetros morfométricos evaluados. Así, los sementales de raza PRA mostraron valores significativamente ($P < 0,001$) superiores para las variables *Anch-c* (2,90 μm), *Área-c* (14,05 μm^2), *Regu* (0,94) y *Rug* (0,75); sin embargo, presentaron valores significativamente ($P < 0,001$) menores para los parámetros *Elip* (2,00) y *Elong* (0,33).

Por su parte, los sementales de raza PSI mostraron valores significativamente ($P < 0,001$) superiores para las variables *Elip* (2,26) y *Elong* (0,38), pero significativamente ($P < 0,001$) menores para las variables *Anch-c* (2,62 μm), *Área-c* (13,23 μm^2), *Regu* (0,92) y *Rug* (0,70), respecto al resto de razas. En cambio, la raza A-a mostró valores significativamente ($P < 0,001$) superiores de las variables *Long-c* (5,99 μm) y *Peri-c* (15,42 μm). Por último, los sementales de raza PRE mostraron valores intermedios para todas las variables morfométricas (Tabla 13).

TABLA 13. PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS (MEDIA ± SEM) OBTENIDOS TRAS LA EVALUACIÓN OBJETIVA DE 40 EYACULADOS DE SEMENTALES ADULTOS (N = 10).

Parámetros morfométricos	Promedio	Razas			
		PRA	PSI	A-a	PRE
n	7312	1671	1645	1550	2446
(%)	100	22,85	22,49	21,19	33,45
Long-c (µm)	5,90±0,01	5,80±0,01 ^c	5,92±0,01 ^b	5,99±0,01 ^a	5,90±0,01 ^b
Anch-c (µm)	2,76±0,00	2,90±0,00 ^a	2,62±0,00 ^d	2,68±0,00 ^c	2,81±0,01 ^b
Area-c (µm ²)	13,71±0,02	14,05±0,03 ^a	13,23±0,03 ^d	13,51±0,02 ^c	13,93±0,02 ^b
Peri-c (µm)	15,33±0,02	15,26±0,02 ^c	15,28±0,02 ^c	15,42±0,02 ^a	15,35±0,01 ^b
Elip	2,15±0,00	2,00±0,00 ^d	2,26±0,00 ^a	2,24±0,00 ^b	2,11±0,00 ^c
Elong	0,36±0,00	0,33±0,00 ^d	0,38±0,00 ^a	0,38±0,00 ^b	0,35±0,00 ^c
Regu	0,93±0,00	0,94±0,02 ^a	0,92±0,02 ^d	0,93±0,02 ^c	0,93±0,02 ^b
Rug	0,73±0,00	0,75±0,00 ^a	0,70±0,00 ^d	0,71±0,00 ^c	0,73±0,00 ^b

PRA= Pura Raza Árabe; **PSI=** Pura Sangre Ingles; **A-a=** Anglo-Árabe; **PRE=** Pura Raza Español; **Long-c=** Longitud de la cabeza; **Anch-c=** Anchura de la cabeza; **Área-c=** Área de la cabeza; **Peri-c=** Perímetro de la cabeza; **Elip=** Elipticidad de la cabeza; **Rug=** Rugosidad de la cabeza; **Elong=** Elongación de la cabeza; **Regu=** Regularidad de la cabeza; SEM= error estándar de la media.

Diferentes letras (a-d) en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre razas (P<0,05).

V.c.2. Subpoblaciones morfométricas del eyaculado de caballo

Tras el análisis de componentes principales los parámetros morfométricos originales fueron reducidos a dos componentes principales morfométricas (CPM-1 y CPM-2), las cuales explicaron el 98% de la varianza total (Tabla 14). La CPM-1, relacionada con los parámetros Anch-c y Área-c, explicó el 55% de la varianza total. Esta componente aportó información sobre el tamaño del espermatozoide, mientras que la CPM-2, relacionada con los

parámetros Elip, Rug y Elong, mostró información de la forma de la cabeza del espermatozoide. Esta segunda componente principal explicó el 43% de la varianza total.

TABLA 14. MATRIZ FACTORIAL DE LA CORRELACIÓN ENTRE LAS COMPONENTES PRINCIPALES (CPM-1 Y CPM-2) Y LAS VARIABLES MORFOMÉTRICAS ORIGINALES (LONGITUD, ANCHURA, ÁREA, PERÍMETRO, ELIPTICIDAD, RUGOSIDAD, ELONGACIÓN Y REGULARIDAD).

Parámetros morfométricos	Componentes principales	
	CPM 1	CPM 2
Longitud	0,5940	0,7976
Anchura	0,9800	- 0,1762
Área	0,9357	0,3476
Perímetro	0,7714	0,6281
Elipticidad	- 0,4872	0,8666
Rugosidad	0,4872	0,8666
Elongación	- 0,4345	0,8913
Regularidad	0,4621	- 0,0315
Explicación	0,5462	0,4331
Acumulada	0,5642	0,9793

CPM-1: Componente Principal Morfométrica 1, **CPM-2:** Componente Principal Morfométrica 2.

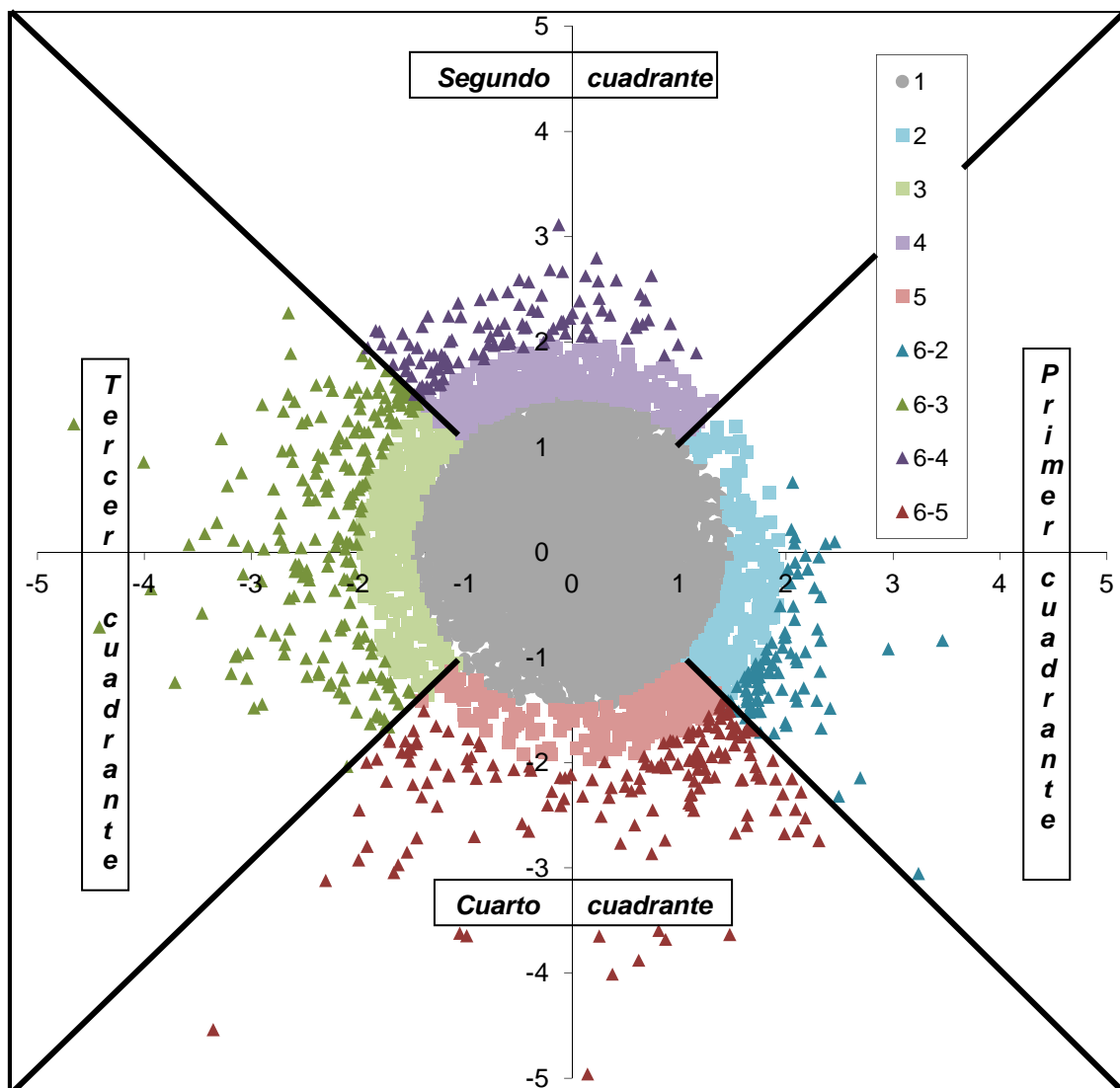
En la Figura 5 se representa gráficamente las componentes principales estandarizadas para el total de la población espermática. La representación gráfica de CPM-1 (estándar) en el eje horizontal y CPM-2 (estándar) en el vertical nos permitió clasificar las células analizadas en subpoblaciones

mediante el uso de la distancia existente al centro de coordenadas de ambas variables. Así, las subpoblaciones se identificaron en función del valor de la desviación típica de ambas componentes. Cuando el valor de la desviación típica de ambas componentes CPM-1 (estándar) y CPM-2 (estándar) fue inferior a $\pm 1,5$ los espermatozoides se clasificaron dentro de la **Subpoblación M-1**, con un nivel de confianza de 86%. Cuando el valor de la desviación típica de alguna de sus componentes principales fue superior a $\pm 1,5$ e inferior a $\pm 2,0$, entonces las subpoblaciones se clasificaron según el cuadrante al que pertenecían (Figura 5). Estos cuadrantes fueron elegidos por una cuestión geométrica, teniendo en cuenta la distancia euclídea con respecto a los ejes X e Y:

- Primer cuadrante: formado entre los grados $> 315^0$ y $< 45^0$ respecto al eje X e Y.
- Segundo cuadrante: formado entre los grados $> 45^0$ y $< 135^0$ respecto al eje X e Y
- Tercer cuadrante: formado entre los grados $> 135^0$ y $< 225^0$ respecto al eje X e Y
- Cuarto cuadrante: formado entre los grados $> 225^0$ y $< 315^0$ respecto al eje X e Y

Así, según este principio, se determinaron 4 subpoblaciones más: **Subpoblación M-2**, **Subpoblación M-3**, **Subpoblación M-4** y **Subpoblación M-5**, con un nivel de confianza de entre el 86% y el 95%. Finalmente, aquellos espermatozoides que mostraron un valor de la desviación típica de alguna o ambas componentes principales superior a ± 2 , se incluyeron en la **Subpoblación M-6** (con un nivel de confianza superior al 95%). Además, según el cuadrante en el que se ubicaron, pudimos diferenciar 4 subgrupos dentro de esta subpoblación: **Subgrupo 6-2** (Primer cuadrante), **Subgrupo 6-3** (Segundo cuadrante), **Subgrupo 6-4** (Tercer cuadrante) y **Subgrupo 6-5** (Cuarto cuadrante). Una vez formada las distintas subpoblaciones se realizó un análisis multivariante de la varianza, mostrando que la clasificación realizada en este estudio fue altamente significativa ($P < 0,001$).

FIGURA 5. REPRESENTACIÓN GRAFICA DE LAS DISTINTAS SUBPOBLACIONES MORFOMÉTRICAS OBTENIDAS A PARTIR DE SEMEN FRESCO DE CABALLOS.



Eje X = valor de la desviación típica CPM 1-estándar, Eje Y = valor la desviación típica de CPM 2-estándar.

Diferentes números (1-6) representan distintas subpoblaciones.

La **Subpoblación M-1**, representada mediante círculos grises en la Figura 5, ocupa la zona central de la grafica debido a que el valor de ambas variables (desviación típica de CMP-1 y CMP-2 estandarizadas) es $< \pm 1,5$. Incluye aquellos espermatozoides con un tamaño y forma intermedia (**estándar**), siendo además la subpoblación más abundante con 5.730 espermatozoides (78,36% del total de la población).

La **Subpoblación M-2**, representada mediante cuadrados de color azul en la Figura 5, engloba aquellos espermatozoides que se distribuyeron dentro del primer cuadrante. Incluye a un total de 245 espermatozoides (3,35% del total de la población), los cuales mostraron un valor de CPM-1 (estándar) $> 1,5$ y < 2 y un valor de CPM-2 (estándar) $< \pm 2$. Estos espermatozoides se definen como espermatozoides con tamaño **grande** y forma normal.

La **Subpoblación M-3**, representada mediante cuadrados de color verde en la Figura 5, ocupó el tercer cuadrante. Incluyó un total de 266 espermatozoides (3,64% del total de la población) y se caracterizó por tener un valor de CPM-1 (estándar) > -2 y $< -1,5$ y un valor de CPM-2 (estándar) $< \pm 2$. Se define, por tanto, como espermatozoides de **pequeño** tamaño y forma normal.

La **Subpoblación M-4**, representada mediante cuadrados de color morado en la Figura 5, ocupó el segundo cuadrante. Integrada por 276 espermatozoides (3,77% del total de la población), se caracterizó por presentar valores de CPM-2 (estándar) $> 1,5$ y < 2 y de CPM-1 (estándar) $< \pm 2$. Así, se definió como espermatozoides de tamaño normal y forma **alargada**.

La **Subpoblación M-5**, representada mediante cuadrados de color rojo en la Figura 5, ocupó el cuarto cuadrante. Integrada por 213 espermatozoides (2,91% del total de la población), se caracterizó por presentar valores de CPM-2 (estándar) > -2 y $< -1,5$ y de CPM-1 (estándar) $< \pm 2$. Los espermatozoides englobados en esta subpoblación se definen como espermatozoides de tamaño normal y forma **globosa**.

La **Subpoblación M-6**, representada mediante triángulos de distintos colores según el cuadrante al que pertenezcan, incluyó espermatozoides con alguna de las componentes estandarizadas (CPM-1 o CPM-2) con valores superiores a ± 2 . Por lo tanto, se consideró que está integrada por espermatozoides con tamaño o forma que se salen de los límites de la varianza donde se incluyen los espermatozoides considerados como normales. La componen un total de 582 espermatozoides (7,96% del total de la población). Dentro de esta subpoblación se pudo diferenciar cuatro grupos:

El **Subgrupo 6-2** representado mediante triángulos de color azul en la Figura 5, incluye aquellos espermatozoides que se distribuyen dentro del primer cuadrante (88 espermatozoides, 1,20% del total de la población). Destaca por poseer un valor positivo muy elevado de CPM-1 (estándar) y un valor positivo o negativo de medio a elevado de CPM-2 (estándar). Se trata de espermatozoides con tamaño excesivamente **grande** y forma más o menos normal.

El **Subgrupo 6-3**, representado mediante triángulos de color verde en la Figura 5, ocupa el tercer cuadrante. Integrado por 210 espermatozoides (2,87% del total de la población), se caracteriza por presentar un valor negativo muy alto de CPM-1 (estándar) y un valor positivo o negativo de medio a elevado de CPM-2 (estándar). Se compone, por tanto, de espermatozoides con un tamaño excesivamente **pequeño** y forma más o menos normal.

El **Subgrupo 6-4**, representado mediante triángulos de color morado en la Figura 5, ocupó el segundo cuadrante. Integrado por 108 espermatozoides (1,48% del total de la población), se caracterizó por poseer un valor positivo o negativo de medio a elevado de CPM-1 (estándar) y un valor positivo muy elevado de CPM-2 (estándar), por lo que definieron como espermatozoides de tamaño más o menos normal y forma excesivamente **alargada**.

Finalmente, el **Subgrupo 6-5**, representado mediante triángulos de color rojo en la Figura 5, ocupó el cuarto cuadrante. Está integrado por 176 espermatozoides (2,41% del total de la población) y se caracteriza por tener un valor positivo o negativo de medio a alto de CPM-1 (estándar) y un valor negativo muy elevado de CPM-2 (estándar), por lo que estamos ante espermatozoides de tamaño más o menos normal y forma excesivamente **globosa**.

Los parámetros morfométricos descriptores de las cinco subpoblaciones consideradas como normales (M-1, M-2, M-3, M-4 y M-5) mostraron diferencias significativas ($P < 0,001$) para todas las variables morfométricas estudiadas (Tabla 15). La **Subpoblación M-1** (estándar) mostró valores intermedios para todas las variables estudiadas. En cambio, la **Subpoblación M-2** (grande) presentó valores significativamente ($P < 0,05$) mayores para las variables de tamaño (Anch-c, Área-c y Peri-c) y la variable de forma Regu, mientras que la

Subpoblación M-3 (pequeña) mostró valores significativamente ($P<0,05$) menores para las variables de tamaño (Anch-c, Área-c y Peri-c) y la de forma Regu. En cuanto a la **Subpoblación M-4** (alargada), ésta presentó valores significativamente ($P<0,05$) superiores para las variables de tamaño Long-c, Peri-c y para las variables de forma Elip y Elong, junto a valores mínimos ($P<0,05$) de Rug. Al contrario, la **Subpoblación M-5** (globosa) mostró valores significativamente ($P<0,05$) menores para las variables de forma Elip y Elong.

TABLA 15. PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS (MEDIA \pm SEM) QUE DEFINEN LAS 5 SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS CONSIDERADAS COMO NORMALES (M-1, M-2, M-3, M-4 Y M-5), IDENTIFICADAS EN EL EYACULADO DEL CABALLO.

Parámetros morfométricos	Subpoblaciones				
	M-1 (Estándar)	M-2 (Grande)	M-3 (Pequeña)	M-4 (Alargada)	M-5 (Globosa)
n	5730	245	266	276	213
(%)	78,36	3,35	3,64	3,77	2,91
Long-c (μm)	5,93 \pm 0,00 ^c	6,15 \pm 0,02 ^b	5,49 \pm 0,02 ^d	6,51 \pm 0,01 ^a	5,45 \pm 0,02 ^d
Anch-c (μm)	2,77 \pm 0,00 ^c	3,21 \pm 0,01 ^a	2,36 \pm 0,00 ^e	2,62 \pm 0,01 ^d	2,95 \pm 0,01 ^b
Área-c (μm^2)	13,83 \pm 0,02 ^c	16,18 \pm 0,05 ^a	11,07 \pm 0,03 ^e	14,40 \pm 0,08 ^b	13,46 \pm 0,09 ^d
Peri-c (μm)	15,41 \pm 0,01 ^b	16,28 \pm 0,04 ^a	14,05 \pm 0,04 ^d	16,36 \pm 0,04 ^a	14,67 \pm 0,05 ^c
Elip	2,14 \pm 0,00 ^c	1,92 \pm 0,01 ^d	2,33 \pm 0,01 ^b	2,48 \pm 0,01 ^a	1,85 \pm 0,00 ^e
Elong	0,36 \pm 0,00 ^c	0,31 \pm 0,00 ^d	0,40 \pm 0,00 ^b	0,43 \pm 0,00 ^a	0,30 \pm 0,00 ^e
Regu	0,93 \pm 0,00 ^c	0,96 \pm 0,00 ^a	0,92 \pm 0,00 ^e	0,93 \pm 0,00 ^d	0,94 \pm 0,00 ^b
Rug	0,73 \pm 0,00 ^c	0,77 \pm 0,00 ^b	0,70 \pm 0,00 ^d	0,67 \pm 0,00 ^e	0,78 \pm 0,00 ^a

Long-c= Longitud de la cabeza; **Anch-c**= Anchura de la cabeza; **Área-c**= Área de la cabeza. **Peri-c**= Perímetro de la cabeza; **Elip**= Elipticidad de la cabeza; **Rug**= Rugosidad de la cabeza; **Elong**= Elongación de la cabeza; **Regu**= Regularidad de la cabeza; **SEM** = error estándar de la media.

Diferentes letras (a-d) en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre razas ($P<0,05$).

La Tabla 16 muestra los valores medios (\pm SEM) de las variables morfométricas descriptoras de los subgrupos integrados en la **Subpoblación M-6** (no considerados normales).

TABLA 16. PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS (MEDIA \pm SEM) QUE DEFINEN LOS SUBGRUPOS IDENTIFICADOS EN LA SUBPOBLACIÓN M-6 DEL EYACULADO DEL CABALLO.

Parámetros morfométricos	Subgrupos subpoblación M-6			
	M-6.2 E-Grande	M-6.3 E-Pequeña	M-6.4 E-Alargada	M-6.5 E-Globosa
n	88	210	108	176
(%)	1,20	2,87	1,48	2,41
Long-c (μm)	6,09 \pm 0,03 ^b	5,20 \pm 0,06 ^c	6,62 \pm 0,03 ^a	5,09 \pm 0,05 ^d
Anch-c (μm)	3,39 \pm 0,01 ^a	2,15 \pm 0,02 ^d	2,48 \pm 0,02 ^c	2,95 \pm 0,03 ^b
Area-c (μm^2)	16,81 \pm 0,11 ^a	9,77 \pm 0,13 ^d	13,89 \pm 0,15 ^b	12,70 \pm 0,21 ^c
Peri-c (μm)	16,38 \pm 0,06 ^a	13,22 \pm 0,13 ^c	16,47 \pm 0,09 ^a	13,98 \pm 0,13 ^b
Elip	1,80 \pm 0,01 ^c	2,42 \pm 0,02 ^b	2,67 \pm 0,01 ^a	1,73 \pm 0,01 ^d
Elong	0,28 \pm 0,00 ^c	0,41 \pm 0,00 ^b	0,45 \pm 0,00 ^a	0,26 \pm 0,00 ^d
Regu	0,96 \pm 0,00 ^a	0,91 \pm 0,00 ^d	0,93 \pm 0,00 ^c	0,94 \pm 0,00 ^b
Rug	0,79 \pm 0,00 ^b	0,70 \pm 0,00 ^c	0,64 \pm 0,00 ^d	0,80 \pm 0,00 ^a

Long-c= Longitud de la cabeza; **Anch-c=** Anchura de la cabeza; **Área-c=** Área de la cabeza; **Peri-c=** Perímetro de la cabeza; **Elip=** Elipse de la cabeza; **Rug=** Rugosidad de la cabeza; **Elong=** Elongación de la cabeza; **Regu=** Regularidad de la cabeza; **SEM=** error estándar de la media; **E-Grande=** excesivamente Grande; **E-Pequeña=** excesivamente pequeña; **E-Alargada=** excesivamente Alargada; **E-Globosa=** excesivamente Globosa

Diferentes letras (a-d) en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre razas ($P < 0,05$).

Diferencias significativas ($P < 0,001$) fueron igualmente observadas entre los subgrupos descritos para todas las variables morfométricas estudiadas. El **Subgrupo M-6.2** (excesivamente grande) presentó valores significativamente ($P < 0,05$) mayores para las variables de tamaño (Anch-c, Área-c y Peri-c) y la variable de forma Regu, mientras que el **Subgrupo M-6.3** (excesivamente pequeño) mostró valores significativamente ($P < 0,05$) menores para las variables de tamaño (Anch-c, Área-c y Peri-c) y la de forma Regu. El **Subgrupo M-6.4** (excesivamente alargado) presentó valores significativamente ($P < 0,05$) superiores para las variables de tamaño Long-c, Peri-c y las de forma Elip y Elong, junto a valores mínimos ($P < 0,05$) de Rug. Al contrario, el **Subgrupo M-6.5** (excesivamente globoso) mostró valores significativamente ($P < 0,05$) menores para las variables Long-c, Elip y Elong, además de un valor significativamente ($P < 0,05$) superior de Rug.

V.c.2.1. Influencia de la raza en las variables morfométricas que caracterizan las subpoblaciones espermáticas

Los valores medios (\pm SEM) de la Subpoblación M-1 para cada raza son mostrados en la Tabla 17. Diferencias raciales ($P < 0,05$) fueron observadas para todas las variables morfométricas de la Subpoblación M-1. Así, los caballos de raza **PRA** presentaron en sus eyaculados aquellos espermatozoides con cabezas más globosas (valores superiores de Anch-c y Área-c junto a valores reducidos de Long-c, Peri-c, Elip y Elong), justo lo contrario a los espermatozoides pertenecientes a la raza **A-a**, quienes mostraron las cabezas más alargadas (valores elevados de Long-c y Peri-c junto a valores reducidos de Anch-c y Área-c). En cambio, los espermatozoides pertenecientes a la raza **PSI** tuvieron cabezas más estrechas y elongadas (valores mínimos de Anch-c y máximos de Elip y Elong) en comparación al resto de razas. En cambio, el **PRE** presentó cabezas de tamaño grande (valores máximos de Área-c y Peri-c y elevados de long-c y Anch-c) con forma poco elípticas (valor bajo de Elip y Elong), aunque bastante regulares (valor

elevado de Regu y Rug). Diferencias significativas ($P < 0,05$) fueron encontradas para la distribución de los espermatozoides dentro de esta subpoblación, según la raza. Así, las proporciones oscilaron entre el 22,1% de la raza A-a y el 30% del PRE.

TABLA 17. PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS (MEDIA \pm SEM) DESCRIPTORES DE LA SUBPOBLACIÓN M-1 (ESTÁNDAR).

Parámetros morfométricos	Raza			
	PRA	PSI	A-a	PRE
n	1438	1304	1267	1721
(%)	25,09 ^b	22,76 ^c	22,11 ^c	30,03 ^a
Long-c (μm)	5,83 \pm 0,01 ^c	5,95 \pm 0,01 ^b	5,99 \pm 0,01 ^a	5,96 \pm 0,01 ^b
Anch-c (μm)	2,88 \pm 0,00 ^a	2,67 \pm 0,00 ^d	2,73 \pm 0,00 ^c	2,80 \pm 0,00 ^b
Area-c (μm)	14,02 \pm 0,03 ^a	13,48 \pm 0,03 ^c	13,72 \pm 0,03 ^b	14,01 \pm 0,03 ^a
Peri-c (μm)	15,29 \pm 0,01 ^c	15,39 \pm 0,02 ^b	15,48 \pm 0,02 ^a	15,47 \pm 0,02 ^a
Elip	2,03 \pm 0,00 ^d	2,23 \pm 0,00 ^a	2,20 \pm 0,00 ^b	2,14 \pm 0,00 ^c
Elong	0,34 \pm 0,00 ^d	0,38 \pm 0,00 ^a	0,37 \pm 0,00 ^b	0,36 \pm 0,00 ^c
Regu	0,94 \pm 0,00 ^a	0,93 \pm 0,00 ^c	0,94 \pm 0,00 ^b	0,94 \pm 0,00 ^b
Rug	0,75 \pm 0,00 ^a	0,71 \pm 0,00 ^d	0,72 \pm 0,00 ^c	0,73 \pm 0,00 ^b

PRA= Pura Raza Árabe; **PSI**= Pura Sangre Ingles; **A-a**= Anglo-Árabe; **PRE**= Pura Raza Español; **Long-c**= Longitud de la cabeza; **Anch-c**= Anchura de la cabeza; **Área-c**= Área de la cabeza; **Peri-c**= Perímetro de la cabeza; **Elip**= Elipticidad de la cabeza; **Rug**= Rugosidad de la cabeza; **Elong**= Elongación de la cabeza; **Regu**= Regularidad de la cabeza; **SEM**= error estándar de la media.

Diferentes letras (a-d) en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre razas ($P < 0,05$).

En cuanto a los resultados obtenidos para las variables morfométricas descriptoras de la Subpoblación M-2 (grande), se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para todas las variables morfométricas evaluadas.

TABLA 18. PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS (MEDIA \pm SEM) DESCRIPTORES DE LA SUBPOBLACIÓN M-2 (GRANDE).

Parámetros morfométricos	Raza			
	PRA	PSI	A-a	PRE
n	67	12	6	160
(%)	27,35 ^b	4,89 ^c	2,44 ^c	65,30 ^a
Long-c (μm)	6,07 \pm 0,03 ^b	6,49 \pm 0,01 ^a	6,30 \pm 0,15 ^{ab}	6,16 \pm 0,02 ^b
Anch-c (μm)	3,20 \pm 0,01 ^a	3,12 \pm 0,03 ^b	3,12 \pm 0,05 ^b	3,22 \pm 0,00 ^a
Area-c (μm)	16,07 \pm 0,01 ^b	16,87 \pm 0,13 ^a	16,32 \pm 0,28 ^{ab}	16,17 \pm 0,07 ^b
Peri-c (μm)	16,20 \pm 0,07 ^c	17,02 \pm 0,13 ^a	16,64 \pm 0,26 ^{ab}	16,25 \pm 0,05 ^{bc}
Elip	1,90 \pm 0,01 ^b	2,08 \pm 0,05 ^a	2,02 \pm 0,07 ^a	1,91 \pm 0,01 ^b
Elong	0,31 \pm 0,00 ^b	0,35 \pm 0,01 ^a	0,34 \pm 0,01 ^a	0,31 \pm 0,00 ^b
Regu	0,95 \pm 0,00 ^{ab}	0,94 \pm 0,00 ^b	0,94 \pm 0,01 ^b	0,96 \pm 0,00 ^a
Rug	0,77 \pm 0,00 ^a	0,73 \pm 0,01 ^b	0,74 \pm 0,01 ^b	0,77 \pm 0,00 ^a

PRA= Pura Raza Árabe; **PSI**= Pura Sangre Ingles; **A-a**= Anglo-Árabe; **PRE**= Pura Raza Español; **Long-c**= Longitud de la cabeza; **Anch-c**= Anchura de la cabeza; **Área-c**= Área de la cabeza; **Peri-c**= Perímetro de la cabeza; **Elip**= Elipse de la cabeza; **Rug**= Rugosidad de la cabeza; **Elong**= Elongación de la cabeza; **Regu**= Regularidad de la cabeza; **SEM**= error estándar de la media.

Diferentes letras (a-d) en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre razas ($P < 0,05$).

La Tabla 18 muestra los valores medios (\pm SEM) de esta subpoblación. Las razas PRA y PRE mostraron los espermatozoides con cabezas más

anchas y más regulares (valor máximo de Anch-c, Regu y Rug), aunque menos elíptico (valores bajos de Elip y Elong) ($P < 0,01$). En cambio, las razas PSI y A-a mostraron los espermatozoides de mayor tamaño, como indica los valores máximos de Long-c, Área-c y Peri-c, con forma más alargada (valor máximo de Elip y Elong). Al igual que en la subpoblación anterior se observaron diferencias significativas para la distribución de los espermatozoides para todas las razas estudiadas ($P < 0,05$). En esta ocasión las proporciones oscilaron entre el 2,4% del A-a y el 65,3% del PRE.

Las variables descriptoras de la Subpoblación M-3 (pequeña) se muestran en la Tabla 19. De manera similar a las subpoblaciones anteriores, se observaron diferencias raciales significativas ($P < 0,05$) para todas las variables morfométricas evaluadas. Así, destacamos que los espermatozoides pertenecientes a la raza PRA presentan un tamaño de cabeza menor (valores mínimos de Long-c y Área-c) y una forma menos elíptica y elongada (valor mínimo de Elip y Elong) que el resto de razas. En cambio, los espermatozoides pertenecientes a las razas PSI y A-a presentan un tamaño y forma muy similares entre ellos, con valores elevados de las variables de tamaño (Long-c, Área-c y Peri-c) y de forma (Elip y Elong). En cuanto a los espermatozoides de la raza PRE, éstos presentaron valores intermedios para todas las variables, salvo para las variables Anch-c, Regu y Rug que fueron elevados. La distribución de los espermatozoides de las distintas razas equinas para esta subpoblación mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$), aportando una menor proporción de espermatozoides la raza PRA (3,76%), mientras que la raza PSI aportó un 37,21%.

TABLA 19. PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS (MEDIA \pm SEM) DESCRIPTORES DE LA SUBPOBLACIÓN M-3 (PEQUEÑA).

Parámetros morfométricos	Raza			
	PRA	PSI	A-a	PRE
n	10	99	62	95
(%)	3,76 ^d	37,21 ^a	23,30 ^c	35,71 ^b
Long-c (μ m)	5,22 \pm 0,09 ^c	5,54 \pm 0,02 ^a	5,66 \pm 0,03 ^a	5,37 \pm 0,03 ^b
Anch-c (μ m)	2,42 \pm 0,03 ^a	2,34 \pm 0,00 ^b	2,34 \pm 0,01 ^b	2,39 \pm 0,01 ^a
Area-c (μ m)	10,74 \pm 0,08 ^c	11,15 \pm 0,05 ^{ab}	11,33 \pm 0,07 ^a	10,87 \pm 0,05 ^{bc}
Peri-c (μ m)	13,54 \pm 0,12 ^b	14,17 \pm 0,05 ^a	14,40 \pm 0,07 ^a	13,75 \pm 0,06 ^b
Elip	2,16 \pm 0,06 ^c	2,37 \pm 0,02 ^a	2,41 \pm 0,02 ^a	2,25 \pm 0,02 ^b
Elong	0,36 \pm 0,01 ^c	0,40 \pm 0,00 ^a	0,41 \pm 0,00 ^a	0,38 \pm 0,00 ^b
Regu	0,92 \pm 0,01 ^{ab}	0,91 \pm 0,00 ^b	0,92 \pm 0,00 ^{ab}	0,93 \pm 0,00 ^a
Rug	0,74 \pm 0,01 ^a	0,70 \pm 0,00 ^b	0,69 \pm 0,00 ^b	0,72 \pm 0,00 ^a

PRA= Pura Raza Árabe; **PSI**= Pura Sangre Ingles; **A-a**= Anglo-Árabe; **PRE**= Pura Raza Español; **Long-c**= Longitud de la cabeza; **Anch-c**= Anchura de la cabeza; **Área-c**= Área de la cabeza; **Peri-c**= Perímetro de la cabeza; **Elip**= Elipse de la cabeza; **Rug**= Rugosidad de la cabeza; **Elong**=Elongación de la cabeza; **Regu**= Regularidad de la cabeza; **SEM**= error estándar de la media.

Diferentes letras (a-d) en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre razas ($P < 0,05$).

Como en las subpoblaciones anteriores, las variables morfométricas descriptoras de la Subpoblación M-4 (alargadas) mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) para la mayoría de las variables morfométricas evaluadas para esta subpoblación. La Tabla 20 muestra los valores medios (\pm SEM) de las diferentes variables morfométricas, según la raza estudiada. Los valores de estas variables fueron bastante homogéneos entre las diferentes razas; no obstante, podemos destacar que los espermatozoides procedentes de la raza A-a presentaron las cabezas más reducidas (valores mínimos de Anch-c, Área-c y Peri-c), mientras que los espermatozoides de los sementales

de raza PRA presentaron valores mínimos de Elipticidad y Elongación. A diferencia de las subpoblaciones anteriores, tres de las cuatro razas (PSI, A-a y PRE) mostraron una distribución muy similar, con un valor en torno al 30%, en cambio el PRA mostro un valor muy reducido (1,45%).

TABLA 20. PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS (MEDIA ± SEM) DESCRIPTORES DE LA SUBPOBLACIÓN M-4 (ALARGADA).

Parámetros morfométricos	Raza			
	PRA	PSI	A-a	PRE
n	4	92	87	93
(%)	1,45 ^b	33,33 ^a	31,52 ^a	33,69 ^a
Long-c (µm)	6,59±0,14 ^a	6,46±0,03 ^a	6,47±0,02 ^a	6,60±0,02 ^a
Anch-c (µm)	2,72±0,08 ^a	2,59±0,02 ^{ab}	2,58±0,02 ^b	2,69±0,02 ^{ab}
Area-c (µm)	15,13±0,54 ^a	14,20±0,14 ^{ab}	14,02±0,12 ^b	14,93±0,15 ^{ab}
Peri-c (µm)	16,77±0,27 ^a	16,29±0,07 ^{ab}	16,22±0,06 ^b	16,54±0,07 ^{ab}
Elip	2,41±0,03 ^b	2,50±0,01 ^a	2,51±0,01 ^a	2,46±0,01 ^{ab}
Elong	0,41±0,00 ^b	0,43±0,00 ^a	0,43±0,00 ^a	0,42±0,00 ^{ab}
Regu	0,93±0,01 ^a	0,93±0,00 ^a	0,94±0,00 ^a	0,93±0,00 ^a
Rug	0,67±0,00 ^{ab}	0,67±0,00 ^b	0,66±0,00 ^b	0,68±0,00 ^a

PRA= Pura Raza Árabe; **PSI**= Pura Sangre Ingles; **A-a**= Anglo-Árabe; **PRE**= Pura Raza Español; **Long-c**= Longitud de la cabeza; **Anch-c**= Anchura de la cabeza; **Área-c**= Área de la cabeza; **Peri-c**= Perímetro de la cabeza; **Elip**= Elipse de la cabeza; **Rug**= Rugosidad de la cabeza; **Elong**= Elongación de la cabeza; **Regu**= Regularidad de la cabeza; **SEM**= error estándar de la media.

Diferentes letras (a-d) en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre razas (P<0,05).

La Tabla 21 muestra los valores medios (\pm SEM) de las variables morfométricas descriptoras de la Subpoblación M-5 (globosa), según la raza estudiada.

TABLA 21. PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS (MEDIA \pm SEM) DESCRIPTORES DE LA SUBPOBLACIÓN M-5 (GLOBOSA).

Parámetros morfométricos	Raza			
	PRA	PSI	A-a	PRE
n	95	7	18	93
(%)	44,60 ^a	3,29 ^d	8,45 ^c	43,66 ^b
Long-c (μ m)	5,46 \pm 0,02 ^a	5,17 \pm 0,05 ^b	5,35 \pm 0,05 ^a	5,48 \pm 0,03 ^a
Anch-c (μ m)	2,97 \pm 0,02 ^a	2,74 \pm 0,07 ^b	2,91 \pm 0,04 ^a	2,97 \pm 0,02 ^a
Area-c (μ m)	13,55 \pm 0,12 ^a	11,87 \pm 0,30 ^b	12,99 \pm 0,27 ^a	13,58 \pm 0,15 ^a
Peri-c (μ m)	14,71 \pm 0,06 ^a	13,91 \pm 0,16 ^b	14,44 \pm 0,14 ^a	14,72 \pm 0,08 ^a
Elip	1,84 \pm 0,00 ^b	1,88 \pm 0,03 ^a	1,84 \pm 0,01 ^b	1,85 \pm 0,01 ^b
Elong	0,29 \pm 0,00 ^b	0,31 \pm 0,00 ^a	0,30 \pm 0,00 ^b	0,30 \pm 0,00 ^b
Regu	0,94 \pm 0,00 ^a	0,94 \pm 0,01 ^a	0,94 \pm 0,00 ^a	0,94 \pm 0,00 ^a
Rug	0,78 \pm 0,00 ^a	0,77 \pm 0,00 ^b	0,78 \pm 0,00 ^a	0,78 \pm 0,00 ^a

PRA= Pura Raza Árabe; **PSI**= Pura Sangre Ingles; **A-a**= Anglo-Árabe; **PRE**= Pura Raza Español; **Long-c**= Longitud de la cabeza; **Anch-c**= Anchura de la cabeza; **Área-c**= Área de la cabeza; **Peri-c**= Perímetro de la cabeza; **Elip**= Elipse de la cabeza; **Rug**= Rugosidad de la cabeza; **Elong**= Elongación de la cabeza; **Regu**= Regularidad de la cabeza; **SEM**= error estándar de la media.

Diferentes letras (a-d) en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre razas ($P < 0,05$).

No existieron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre razas para los parámetros morfológicos evaluados, excepto para los espermatozoides de los

sementales de raza PSI, los cuales mostraron un menor tamaño (valores mínimos de Long-c, Anch-c, Área-c y Peri-c) y formas más elongadas y elípticas, en comparación con el resto de razas. En cambio, observamos diferencias significativas ($P>0,05$) para la distribución de los espermatozoides para las diferentes razas, destacando que la mayor proporción de espermatozoides fue aportada por la raza PRA (44,60%), mientras que la menor aportación fue la del PSI (3,29%).

TABLA 22. DISTRIBUCIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES MORFOMÉTRICAS (M-1, M-2, M-3, M-4, M-5 Y M-6), IDENTIFICADAS EN EYACULADOS FRESCOS DE CABALLO, DENTRO DE CADA RAZA ESTUDIADA

Raza	Subpoblación					
	M-1 (Estandar)	M-2 (Grande)	M-3 (Pequeña)	M-4 (Alargada)	M-5 (Globosa)	M-6 (no-normales)
PRA	86,1 ^a	4,0 ^c	0,6 ^d	0,2 ^d	5,7 ^b	3,4 ^c
PSI	79,3 ^a	0,7 ^d	5,9 ^c	5,6 ^c	0,4 ^d	8,1 ^b
A-a	81,7 ^a	0,4 ^d	4,0 ^c	5,6 ^b	1,2 ^d	7,1 ^b
PRE	70,4 ^a	6,5 ^c	4,0 ^d	3,8 ^d	3,8 ^d	11,5 ^b

PRA= Pura Raza Árabe, **PSI=** Pura Sangre Ingles, **A-a=** Anglo-Árabe, **PRE=** Pura Raza Español. Diferentes letras (a-d) para la misma fila, indican diferencias estadísticamente significativas entre subpoblaciones dentro de cada raza ($P<0,05$; test Chi- cuadrado).

La Tabla 22 muestra la distribución de las subpoblaciones morfométricas identificadas en eyaculados frescos de caballo para cada una de las razas estudiadas.

Diferencias significativas ($P<0,05$) fueron observadas para la distribución de las diferentes subpoblaciones morfométricas en las diferentes razas estudiadas (Tabla 22). Para todas las razas, la subpoblación más abundante fue la subpoblación M-1 (estándar), cuyo valor osciló entre el 86,1% para el

PRA y el 70,4% para el PRE, siendo la subpoblación M-6 (no normales) la segunda más abundante en tres de las cuatro razas, y cuyo valor osciló entre el 3,4% del PRA y el 11,5% del PRE. Las subpoblaciones menos representativas fueron la M-3 (pequeña) y la M-4 (alargada), con un 0,6% y 0,2% para el PRA respectivamente, la M-2 (grande) ,con un 0,7% y 0,4% para el PSI y el A-a respectivamente, y la M-5 (globosa) con un y 0,4%, 1,2% para estas mismas dos razas. Por otra parte, los sementales de la raza PRE mostraron una mayor uniformidad entre la distribución de las subpoblaciones, no observándose diferencias significativas ($P > 0,05$) para las subpoblaciones M-3 (pequeñas), M-4 (alargada) y M-5 (globosas).

V.d. Correlación entre las variables cinéticas y morfométricas del espermatozoide del caballo.

Del total de muestras analizadas ($n = 40$), se agruparon las variables morfométricas y cinéticas para su posterior estudio estadístico para cuantificar la correlación entre ellas.

La Tabla 23 muestra las correlaciones estimadas entre los parámetros cinéticos y morfométricos obtenidos por el sistema SCA usado en nuestro estudio. VCL mostró una correlación positiva con Long-c ($r = 0,484$; $P < 0,01$), Área-c ($r = 0,472$; $P < 0,01$) y Peri-c ($r = 0,537$; $P < 0,001$). Asimismo, ALH mostró una correlación positiva con Long-c ($r = 0,67$; $P < 0,05$), Área-c ($r = 0,430$; $P < 0,01$) y Peri-c ($r = 0,517$; $P < 0,001$). Por el contrario, LIN mostro una correlación negativa con Long-c y Peri-c ($r = -0,552$; $P < 0,001$ y $r = -0,552$ $P < 0,001$, respectivamente). De forma similar, STR mostró una correlación negativa con las variables Long-c y Peri-c ($r = -0,473$; $P < 0,01$, y $r = -0,424$; $P < 0,01$, respectivamente), mientras que WOB lo hizo con Long-c ($r = -0,379$; $P < 0,05$), Área-c ($r = -0,338$; $P < 0,01$) y Peri-c ($r = -0,416$; $P < 0,01$).

TABLA 23. CORRELACIÓN DE PEARSON ENTRE LAS PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS Y CINÉTICOS DEL ESPERMATOZOIDE DE CABALLO.

Parámetros	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
Long-c	0,484	0,098	0,274	-0,552	-0,473	-0,379	0,67	0,042
	0,002**	(NS)	(NS)	0,001***	0,002**	0,016*	0,002**	(NS)
Anch-c	0,302	0,147	0,214	-0,182	-0,118	-0,177	0,246	0,253
	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)
Área-c	0,472	0,082	0,289	-0,400	-0,299	-0,338	0,430	0,240
	0,002**	NS	NS	0,010**	(NS)	0,033*	0,006**	(NS)
Peri-c	0,534	-0,011	0,301	-0,533	-0,424	-0,416	0,517	0,151
	0,001***	(NS)	(NS)	0,000***	0,006**	0,008**	0,001**	(NS)
Elong	0,117	0,114	0,061	-0,007	0,048	-0,067	0,151	-0,005
	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)
Elip	-0,022	-0,195	-0,058	-0,131	-0,140	-0,048	0,026	-0,198
	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)
Reg	0,153	-0,054	0,166	-0,189	-0,226	-0,028	0,082	0,050
	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)
Rug	-0,027	0,213	0,047	0,195	0,186	0,109	-0,098	0,185
	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)

VCL= velocidad curvilínea; **VSL**= velocidad rectilínea; **VAP**= velocidad de la trayectoria media, **LIN**= linealidad; **STR**= rectitud; **WOB**= índice de oscilación; **ALH**= amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza; **BCF**= frecuencia de batido; **Long-c**= Longitud de la cabeza; **Anch-c**= Anchura de la cabeza; **Área-c**= Área de la cabeza; **Peri-c**= Perímetro de la cabeza; **Elong**= Elongación de la cabeza; **Elip**= Elipticidad de la cabeza; **Regu**= Regularidad de la cabeza; **Rug**= Rugosidad de la cabeza.

*Diferencias significativas si *= $P < 0.05$, **= $P < 0,01$, ***= $P < 0.001$; (NS): no significativo.*

TABLA 24. CORRELACIÓN DE PEARSON ENTRE LAS VARIABLES MORFOMÉTRICAS Y CINÉTICAS DEL ESPERMATOZOIDE DE CABALLO DE RAZA PRA.

Parámetros	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
Long-c	-0,153	-0,571	-0,503	-0,442	-0,094	-0,601	0,368	0,722
	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	0,043*
Anch-c	-0,657	-0,317	-0,568	0,287	0,657	-0,042	-0,402	0,723
	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	0,043*
Área-c	-0,530	-0,438	-0,588	0,044	0,425	0,0242	-0,156	0,810
	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	0,015*
Peri-c	-0,363	-0,488	-0,540	-0,161	0,196	-0,384	0,069	0,790
	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	0,02*
Elong	0,676	-0,045	0,307	-0,676	-0,860	-0,399	0,758	-0,345
	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	0,006**	(NS)	0,029*	(NS)
Elip	0,670	-0,058	0,295	-0,685	-0,863	-0,410	0,763	-0,334
	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	0,006**	(NS)	0,028*	(NS)
Reg	-0,372	-0,608	-0,683	-0,275	0,242	-0,600	0,167	0,652
	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)
Rug	-0,539	0,286	-0,062	0,793	0,811	-0,609	-0,834	-0,019
	(NS)	(NS)	(NS)	0,019*	0,015*	(NS)	0,01**	(NS)

VCL= velocidad curvilínea; **VSL**= velocidad rectilínea; **VAP**= velocidad de la trayectoria media, **LIN**= linealidad; **STR**= rectitud; **WOB**= índice de oscilación; **ALH**= amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza; **BCF**= frecuencia de batido; **Long-c**= Longitud de la cabeza; **Anch-c**= Anchura de la cabeza; **Área-c**= Área de la cabeza; **Peri-c**= Perímetro de la cabeza; **Elong**= Elongación de la cabeza; **Elip**= Elipticidad de la cabeza; **Regu**= Regularidad de la cabeza; **Rug**= Rugosidad de la cabeza.

*Diferencias significativas si *= $P < 0,05$, **= $P < 0,01$, ***= $P < 0,001$; (NS): no significativo.*

En cuanto al estudio de la existencia de correlación entre los parámetros cinéticos y morfométricos para el PRA (Tabla 24), nuestros resultados mostraron una correlación entre la variable cinética LIN y la morfométrica Rug ($r = 0,793$; $P < 0,05$), mientras que STR mostró una correlación negativa con Elong y Elip ($r = -0,860$; $P < 0,01$, $r = -0,863$; $P < 0,01$, respectivamente) y positiva con Rug ($r = 0,811$; $P < 0,05$). Por el contrario, ALH mostró una correlación

positiva con Elong y Elip ($r = 0,758$; $P < 0,05$, y $r = 0,763$; $P < 0,05$, respectivamente) y negativa con Rug ($r = -0,834$; $P < 0,01$). En cambio, BCF mostró una correlación positiva ($P < 0,05$) con todas las variables morfométricas de tamaño Long-c ($r = 0,722$), Anch-c ($r = 0,723$), Área-c ($r = 0,810$) y Peri-c ($r = 0,790$).

TABLA 25. CORRELACIÓN DE PEARSON ENTRE LAS VARIABLES MORFOMÉTRICAS Y CINÉTICAS DEL ESPERMATOZOIDE DE CABALLO DE RAZA PSI

Parámetros	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
Long-c	0,590	0,093	0,158	-0,706	-0,439	-0,686	0,680	0,511
	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)
Anch-c	0,565	0,077	0,133	-0,681	-0,402	-0,672	0,697	0,393
	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)
Área-c	0,545	0,033	0,096	-0,719	-0,438	-0,705	0,669	0,480
	(NS)	(NS)	(NS)	0,044*	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)
Peri-c	0,587	0,100	0,166	-0,686	-0,436	-0,662	0,685	0,452
	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)
Elong	0,118	0,399	0,275	0,429	0,631	0,283	0,009	-0,178
	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)
Elip	-0,117	0,081	0,087	0,236	0,063	0,276	-0,318	0,161
	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)
Reg	0,781	0,595	0,590	-0,255	-0,044	-0,286	0,756	0,050
	0,022*	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	0,03*	(NS)
Rug	-0,193	-0,576	-0,545	-0,526	-0,286	-0,564	0,077	0,342
	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)

VCL= velocidad curvilínea; **VSL**= velocidad rectilínea; **VAP**= velocidad de la trayectoria media, **LIN**= linealidad; **STR**= rectitud; **WOB**= índice de oscilación; **ALH**= amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza; **BCF**= frecuencia de batido; **Long-c**= Longitud de la cabeza; **Anch-c**= Anchura de la cabeza; **Área-c**= Área de la cabeza; **Peri-c**= Perímetro de la cabeza; **Elong**= Elongación de la cabeza; **Elip**= Elipticidad de la cabeza; **Regu**= Regularidad de la cabeza; **Rug**= Rugosidad de la cabeza.

Diferencias significativas si *= $P < 0,05$, **= $P < 0,01$, ***= $P < 0,001$; (NS): no significativo.

La Tabla 25 representa la correlación existente entre las variables cinéticas y morfométricas del caballo PSI. Así, VCL y ALH mostraron una correlación positiva con Regu ($r = 0,781$; $P < 0,05$, y $r = 0,756$; $P < 0,05$, respectivamente), mientras que LIN mostró una correlación negativa con Área-c ($r = 0,719$; $P < 0,05$).

TABLA 26. CORRELACIÓN DE PEARSON ENTRE LAS VARIABLES MORFOMÉTRICAS Y CINÉTICAS DEL ESPERMATOZOIDE DE CABALLO DE RAZA A-A.

Parámetros	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
Long-c	-0,451 (NS)	0,261 (NS)	-0,293 (NS)	0,322 (NS)	0,329 (NS)	0,256 (NS)	-0,398 (NS)	0,022 (NS)
Anch-c	0,893 0,003**	-0,752 0,013*	0,614 (NS)	-0,895 0,003**	-0,948 0,000***	-0,626 (NS)	0,833 0,01**	-0,742 0,035*
Área-c	0,766 0,027*	-0,682 (NS)	0,540 (NS)	-0,815 0,014*	-0,869 0,005**	-0,554 (NS)	0,719 0,045*	-0,791 0,019*
Peri-c	0,156 (NS)	-0,191 (NS)	0,200 (NS)	-0,251 (NS)	-0,306 (NS)	-0,094 (NS)	0,126 (NS)	-0,536 (NS)
Elong	-0,896 0,003**	0,712 0,047*	-0,619 (NS)	0,855 0,007**	0,904 0,002**	0,602 (NS)	-0,825 0,012*	0,641 (NS)
Elip	-0,900 0,002**	0,722 0,043*	-0,622 (NS)	0,865 0,006**	0,915 0,001***	0,608 (NS)	-0,830 0,011**	0,656 (NS)
Reg	0,742 0,035*	-0,736 0,037*	0,509 (NS)	-0,837 0,009**	-0,894 0,003**	-0,571 (NS)	0,714 0,047*	-0,703 (NS)
Rug	0,918 0,001***	-0,766 0,027*	0,568 (NS)	-0,896 0,003**	-0,921 0,001***	-0,678 (NS)	0,879 0,004**	-0,614 (NS)

VCL= velocidad curvilínea; **VSL**= velocidad rectilínea; **VAP**= velocidad de la trayectoria media, **LIN**= linealidad; **STR**= rectitud; **WOB**= índice de oscilación; **ALH**= amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza; **BCF**= frecuencia de batido; **Long-c**= Longitud de la cabeza; **Anch-c**= Anchura de la cabeza; **Área-c**= Área de la cabeza; **Peri-c**= Perímetro de la cabeza; **Elong**= Elongación de la cabeza; **Elip**= Elipticidad de la cabeza; **Regu**= Regularidad de la cabeza; **Rug**= Rugosidad de la cabeza.

Diferencias significativas si *= $P < 0,05$, **= $P < 0,01$, ***= $P < 0,001$; (NS): no significativo.

Las variables cinéticas y morfométricas estudiadas en el A-a mostraron una alta correlación entre ellas (Tabla 26), destacando en este caso la falta de correlación ($P>0.05$) entre las variables morfométricas Long-c y Peri-c y las diferentes variables cinéticas. De forma similar, las variables cinéticas VAP y WOB no fueron correlacionadas con ninguna de las variables morfométricas.

TABLA 27. CORRELACIÓN DE PEARSON ENTRE LAS VARIABLES MORFOMÉTRICAS Y CINÉTICAS DEL ESPERMATOZOIDE DE CABALLO DE RAZA PRE.

Parámetros	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
Long-c	0,894 0,001***	0,180 (NS)	0,706 0,002**	-0,827 0,001***	-0,735 0,001***	-0,434 (NS)	0,774 0,001***	-0,060 (NS)
Anch-c	0,348 (NS)	0,112 (NS)	0,061 (NS)	-0,357 (NS)	-0,062 (NS)	-0,661 0,005**	0,650 0,006**	0,529 0,035*
Área-c	0,659 0,005**	0,200 (NS)	0,370 (NS)	-0,613 0,012*	-0,365 (NS)	-0,659 0,005**	0,812 0,001***	0,350 (NS)
Peri-c	0,827 0,001***	0,209 (NS)	0,583 0,018**	-0,760 0,001***	-0,592 0,016*	-0,558 0,025*	0,828 0,001***	0,131 (NS)
Elong	0,272 (NS)	0,004 (NS)	0,453 (NS)	-0,216 (NS)	-0,474 0,064*	0,412 (NS)	-0,152 (NS)	-0,628 0,01**
Elip	0,299 (NS)	0,002 (NS)	0,472 (NS)	-0,245 (NS)	-0,499 0,049**	0,394 (NS)	-0,126 (NS)	-0,629 0,01**
Reg	0,297 (NS)	-0,164 (NS)	0,115 (NS)	-0,425 (NS)	-0,249 (NS)	-0,452 (NS)	0,468 (NS)	0,239 (NS)
Rug	-0,389 (NS)	-0,003 (NS)	-0,543 0,03*	0,336 (NS)	0,582 0,018*	-0,351 (NS)	0,048 (NS)	0,637 0,01**

VCL= velocidad curvilínea; **VSL**= velocidad rectilínea; **VAP**= velocidad de la trayectoria media, **LIN**= linealidad; **STR**= rectitud; **WOB**= índice de oscilación; **ALH**= amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza; **BCF**= frecuencia de batido; **Long-c**= Longitud de la cabeza; **Anch-c**= Anchura de la cabeza; **Área-c**= Área de la cabeza; **Peri-c**= Perímetro de la cabeza; **Elong**= Elongación de la cabeza; **Elip**= Elipticidad de la cabeza; **Regu**= Regularidad de la cabeza; **Rug**= Rugosidad de la cabeza.

Diferencias significativas si *= $P<0.05$, **= $P<0,01$, ***= $P<0.001$; (NS): no significativo.

Al igual que lo observado en el caballo de raza A-a, los espermatozoides pertenecientes a la raza PRE mostraron una elevada correlación ($P < 0.05$) entre todas las variables morfométricas y cinéticas, salvo para la variables VSL y Reg (Tabla 27).

Con el fin de determinar si alguna variable morfométrica es predictora o infiere sobre los valores de las componentes principales de movimiento (CPC 1, CPC 2 y CPC 3) realizamos un **test de Regresión Lineal Múltiple** (Tabla 28). Este test mostró la existencia de dos modelos de regresión: 1) el Modelo 1, en el cual el parámetro morfométrico longitud de la cabeza infirió sobre la CPC 1 con un coeficiente de variación (R^2 ajustada) de 1,7%, y 2) un Modelo 2, en el que el parámetro morfométrico Perímetro de la cabeza infirió sobre la CPC 2 (R^2 ajustada = 33,9%), no existiendo ningún modelo para el CPC 3.

TABLA 28. MODELO DE REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES DE LAS VARIABLES CINÉTICAS (CPC 1, CPC 2 Y CPC 3) EN FUNCIÓN A LOS PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS

<i>Modelos</i>	<i>Y</i>	<i>X</i>	<i>m</i>	<i>β</i>
1	CPC 1	Longitud Cabeza	-1,255	-0,361
		Constante	7,464	
		R^2 Ajustada=0,017		
		$P < 0,002$		
2	CPC 2	Perímetro cabeza	0,973	0,597
		Constante	-15,094	
		R^2 ajustada=0,339		
		$P < 0,001$		
NO MODELO	CPC 3			

m: coeficiente no estandarizado; β : coeficiente estandarizado.

Por otra parte, el **test de Regresión Lineal Múltiple** realizado sobre los Componentes Principales Morfométricos (CPM 1 y CPM 2), mostró la existencia de un solo modelo predictivo de la CPM 2 (Tabla 29), en el que el

parámetro cinético Linealidad posee un coeficiente de variación (R^2 ajustada) del 9,2 %.

TABLA 29. MODELO DE REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES MORFOMÉTRICOS (CPM 1 Y CPM 2) EN FUNCIÓN A LOS PARÁMETROS CINÉTICOS.

<i>Modelos</i>	<i>Y</i>	<i>X</i>	<i>m</i>	<i>β</i>
<i>NO MODELO</i>	<i>CPM 1</i>			
<i>2</i>	<i>CPM 2</i>	<i>linealidad</i>	<i>-1,568</i>	<i>-0,340</i>
		<i>Constante</i>	<i>0,995</i>	
		<i>R² ajustada=0,092</i>		
		<i>P<0,032</i>		

m: coeficiente no estandarizado, β: coeficiente estandarizado.

Por último, realizamos un test de **Regresión Logística Multinomial** para determinar qué variables morfométricas y/o cinéticas son predictoras o infieren sobre las razas equinas en estudio, de las cuales proceden las muestras estudiadas, no obteniéndose ningún modelo predictivo para la variable raza (datos no mostrados).

Discusión

VI. DISCUSIÓN:

VI.a. Parámetros de calidad seminal

Los parámetros de calidad seminal analizados durante el presente estudio fueron acordes a los establecidos por diversos autores en diferentes razas de caballos (Dowsett and Pattie, 1982; Phetudomsinsuk et al., 2008; Pickett, 1993; Samper, 2009e) .

Para el volumen eyaculado libre de gel, obtuvimos valores superiores a los publicados previamente por otros investigadores (Dowsett and Pattie, 1982; Dowsett and Knott, 1996; Long et al., 1993; Phetudomsinsuk et al., 2008; Pickett, 1993; Quintero-Moreno et al., 2003), hecho que pudiera venir motivado por las diferencias existentes para este parámetro entre razas, la edad de los animales, etc. La integridad acrosómica de las muestras analizadas en nuestro estudio fue inferior a los resultados publicados en trabajos previos (Gamboa et al., 2010; Hoogewijs et al., 2010), posiblemente debido a la diferencia en la técnica utilizada para dicha valoración (Garner and Johnson, 1995).

En cuanto a la morfología espermática, nuestros resultados mostraron un valores medios muy similares a los obtenidos por Dowsett et al. (1984), ligeramente inferiores a los registrados por Hoogewijs et al (2010) y muy superiores a los obtenidos por otros autores (Hurtgen, 1992; Janett et al., 2003; Phetudomsinsuk et al., 2008) en caballos fértiles. Estas diferencias pueden estar influidas por el método de recogida (Dowsett et al., 1984), el tipo de tinción empleado (Hidalgo et al., 2005; Hidalgo et al., 2006; Hoogewijs et al., 2010), el intervalo de recogida (Sieme et al., 2004), la duración del periodo de excitación previo a la recogida (Sieme et al., 2002), así como la edad de los sementales (Dowsett and Knott, 1996).

Otro de los factores que puede afectar a los parámetros de calidad seminal es la raza; aunque no hemos observado diferencias significativas respecto a la integridad del acrosoma ni al valor del pH. En cambio, y en consonancia con los resultados obtenidos por Dowsett y Knott (1996), si observamos una influencia de la raza para algunos de las variables analizadas, entre ellas, el volumen del eyaculado. Así, el Pura Raza Árabe (PRA) mostró un volumen significativamente menor al resto de sementales. Paccamonti et al.

(1999) demostraron que los sementales de menor alzada (< 96,5 cm a la cruz), presentan un volumen de eyaculado menor que aquellos sementales que tienen una alzada superior. Diversos autores (Love et al., 1991; Paccamonti et al., 1999; Pickett, 1993) defienden que estas variaciones pudieran deberse también a diferencias en el tamaño testicular. En este sentido, se ha comprobado que los caballos con menor envergadura corporal presentan un tamaño testicular menor (Paccamonti et al., 1999; Pickett, 1993; Pickett et al., 1987). No obstante, y aunque el tamaño testicular no fue valorado en el presente estudio, pensamos que es posible que la raza haya influido en este sentido ya que los sementales árabes presentaban la menor alzada (datos no mostrados).

En cuanto a la concentración espermática, nuestros datos coinciden con los obtenidos por Phetudomsinsuk (2008), no mostrando diferencias significativas entre la distintas razas estudiadas. Sin embargo, difieren de los publicados por Dowsett y Knott (1996) y Pickett (1993). Estas diferencias podrían deberse a que estos estudios fueron realizados con équidos de razas de muy diferente alzada y envergadura (ponis o Holsteiner), mientras que en nuestro caso la población seleccionada fue más homogénea entre sí, tanto en tamaño como en línea genealógica.

En cuanto al movimiento total (MT), la raza no parece ser una variable que influya en los valores medios de MT, al no observarse diferencias significativas. Por otra parte, los valores registrados para esta variable fueron muy superiores a los obtenidos por otros autores en estudios previos (Dowsett and Knott, 1996; Hoogewijs et al., 2010; Jasko et al., 1992; Long et al., 1993; Parlevliet et al., 1994; Quintero-Moreno et al., 2003; Sieme et al., 2003; Warnke et al., 2003), pudiéndose deber estas diferencias a distintos factores como el procesado de la muestra, la frecuencia de recogida (Parlevliet et al., 1994; Sieme et al., 2002), el uso y tipo de diluyentes antes de la evaluación (Aurich et al., 2007; Samper, 2009c), el tiempo entre la recogida y la evaluación, la temperatura o la presencia de antibióticos en los diluyentes (Blanchard et al., 2012; Dean et al., 2012; Schäfer-Somi and Aurich, 2007). Además, algunos de estos trabajos realizaron una valoración subjetiva, la cual aporta valores diferentes a los obtenidos mediante la valoración objetiva (Álvarez Lledó, 2003;

Rijsselaere et al., 2005; Tuli et al., 1992). Finalmente, factores fisiológicos propios del semental, como la edad de los animales estudiados (Dowsett and Pattie, 1982; Dowsett and Pattie, 1987; Paccamonti et al., 1999; Voss et al., 1981) o el individuo (Dorado et al., 2013; Dorado et al., 2010; Dorado et al., 2011c), podrían haber inducido esta diversidad de resultados.

Por otro lado, nuestros resultados mostraron que existieron diferencias significativas entre razas para el movimiento progresivo (MP), de tal modo que los sementales PRA presentaron valores de MP más altos que el resto de razas, mientras que el PSI y el A-a tuvieron los valores más bajos. Si bien en la bibliografía consultada no hemos encontrado ningún estudio que haya obtenido resultados similares, tales diferencias inter-raciales han sido demostradas en otras especies (Hoflack et al., 2007; Quintero-Moreno et al., 2007).

En consonancia con estudios previos (Dowsett and Knott, 1996; Pickett, 1993), también encontramos diferencias significativas entre las distintas razas en cuanto a la morfología espermática, observándose los mayores porcentajes de espermatozoides morfológicamente normales en los caballo PRA y PRE.

VI.b. Parámetros cinéticos del espermatozoide equino: identificación de subpoblaciones cinéticas en el eyaculado fresco procedentes de caballos de diferentes razas

Los valores medios de los parámetros cinéticos obtenidos en nuestro estudio se encuentran en consonancia con los aportados por Quintero-Moreno et al. (2003) en el caballo; si bien, difieren ligeramente de los aportados por otros autores (Khlifaoui et al., 2005; Ortega-Ferrusola et al., 2009; Rigby et al., 2001; Trimeche et al., 1999; Waite et al., 2008; Warnke et al., 2003). Estas diferencias podrían deberse al uso de diferentes sistemas CASA, lo cual, a pesar de la precisión de estos sistemas en la medición de los parámetros cinéticos del espermatozoide, implica que una misma trayectoria espermática muestre valores cinéticos diferentes en función del sistema CASA utilizado (Mortimer, 2000b) al utilizar cada uno de éstos algoritmos diferentes para reconstruir las trayectorias. Además, el “set up” empleado por el técnico

durante el análisis, que es también distinto para los diferentes sistemas CASA, influye en el cálculo de las trayectorias (Hoogewijs et al., 2009; Hoogewijs et al., 2010; Mortimer, 2000b), como también lo hacen otros factores como el número y frecuencia de las imágenes tomadas para determinar una trayectoria (Davis and Katz, 1992; Dorado et al., 2011c; Mortimer, 2000b) o el procesado de las muestras (Verstegen et al., 2002) el diluyente empleado (Iguer-ouada and Verstegen, 2001; Rijsselaere et al., 2003), la concentración de la misma (Davis and Katz, 1992; Dorado et al., 2011c; Varner, 2008) o el tipo de cámara utilizada (Contri et al., 2010; Davis and Katz, 1992; Verstegen et al., 2002). En este sentido, una alta concentración podría alterar el movimiento al producirse colisiones entre los espermatozoides (Bartoov et al., 1991; Rijsselaere et al., 2003), dificultando así la reconstrucción de las trayectorias por los sistemas CASA (Verstegen et al., 2002). Como se ha expuesto con anterioridad, todos estos factores dificultan la comparación de los resultados entre estudios y laboratorios (Davis and Katz, 1992; Dorado et al., 2011c; Rijsselaere et al., 2003; Verstegen et al., 2002).

En esta misma línea, se ha sugerido la existencia de diferencias individuales significativas en las variables de movimiento influidas en especies como el caballo (Gamboa et al., 2010; Quintero-Moreno et al., 2003), el asno (Dorado et al., 2013; Miró et al., 2005), el macho cabrío (Dorado et al., 2010), el perro (Dorado et al., 2011b) o el toro (Muiño et al., 2009). Nuestros resultados confirman que existen diferencias entre razas para las variables cinéticas estudiadas, siendo estas las primeras que se publican en este sentido. Los escasos estudios encontrados en la bibliografía consultada se realizaron en el toro (Hoflack et al., 2007; Muiño et al., 2009) y el carnero (Maroto-Morales et al., 2012).

VI.b.1. Subpoblaciones cinéticas

Recientemente, la identificación de subpoblaciones caracterizadas por valores precisos de movimiento, obtenidos mediante sistemas CASA, en el eyaculado de mamíferos se ha convertido en un tema de sumo interés para la evaluación espermática (Martínez-Pastor et al., 2011). Aunque no existe

consenso acerca del papel fisiológico que desempeñan las diferentes subpoblaciones dentro de un eyaculado, está ampliamente aceptado la existencia de las mismas en el eyaculado de mamíferos (Abaigar et al., 1999; Dorado et al., 2013; Dorado et al., 2011b; Dorado et al., 2010; Holt et al., 1996; Miró et al., 2005; Quintero-Moreno et al., 2003; Quintero-Moreno et al., 2007).

El uso combinado de los sistema CASA y el análisis estadístico multivariante ha sido utilizado previamente con éxito en la identificación de subpoblaciones cinéticas en diferentes especies animales (Abaigar et al., 2001; Abaigar et al., 1999; Dorado et al., 2011a; Dorado et al., 2011b; Dorado et al., 2010; Estes et al., 2009; Martínez-Pastor et al., 2005b; Martínez-Pastor et al., 2011; Muiño et al., 2009; Muiño et al., 2008b; Núñez-Martínez et al., 2006a; Quintero-Moreno et al., 2007; Quintero-Moreno et al., 2004), incluido el caballo (Ortega-Ferrusola et al., 2009; Quintero-Moreno et al., 2003) y el asno (Dorado et al., 2013; Flores et al., 2008; Miró et al., 2005). Siguiendo esta metodología, nuestros resultados revelaron la presencia de 4 subpoblaciones espermáticas en los eyaculados estudiados, las cuales fueron definidas por la combinación de las 8 variables cinéticas que aporta el sistema CASA usado en nuestro estudio. En la mayoría de estudios previos se han identificado entre 3 ó 4 subpoblaciones cinéticas en eyaculados de diferentes especies domésticas (Dorado et al., 2013; Dorado et al., 2011b; Dorado et al., 2010), incluido el caballo (Macías García et al., 2009; Quintero-Moreno et al., 2003). en la bibliografía consultada se describe la presencia de 6 subpoblaciones en el eyaculado del caballo (Ortega-Ferrusola et al., 2009), aunque no todas las subpoblaciones definidas estuvieron presentadas en los eyaculados de los sementales estudiados. Como hemos expuesto anteriormente, es difícil comparar diferentes estudios ya que los valores cinéticos y, por ende, esta agrupación en subpoblaciones, depende del sistema CASA empleado y del análisis estadístico y del numero de variables utilizadas, (Bravo et al., 2011; Dorado et al., 2013; Dorado et al., 2011b; Holt et al., 1996; Martínez-Pastor et al., 2011; Quintero-Moreno et al., 2007).

Una primera interpretación de nuestros resultados nos hace pensar que las subpoblaciones cinéticas identificadas representan espermatozoides en diferentes estados fisiológicos, al menos según su patrón de movimiento, como

ha sido previamente propuesto por Dorado et al. (2013; 2011a; 2011b; 2010). Así, tanto la Subpoblación 1 (sP1), que incluyó espermatozoides lentos y poco progresivos, como la Subpoblación 2 (sP2), formada por espermatozoides lentos y no progresivos, podrían tratarse de un subgrupo de espermatozoides comprometidos metabólicamente que pronto perderán esa capacidad de movimiento (Abaigar et al., 1999; Dorado et al., 2013; Dorado et al., 2011b; Dorado et al., 2010; Miró et al., 2005). La Subpoblación 3 (sP3), espermatozoides rápidos y progresivos, podrían representar la población más adecuada para realizar la fecundación, al ser la motilidad espermática importante en el transporte del espermatozoide a través del aparato reproductor femenino y en la penetración de la zona pelúcida (Olds-Clarke, 1996). En esta misma línea, Gaddum-Rosse (1981) demostró que solo aquellos espermatozoides con motilidad progresiva eran capaces de penetrar la unión utero-tubárica en ratas y, más recientemente, varios autores han sugerido que aquellos eyaculados que posean una mayor proporción de este tipo de subpoblación (rápida y progresiva) podrían presentar una mayor resistencia al proceso de crioconservación (Dorado et al., 2013; Muiño et al., 2008b) o una mayor capacidad fertilizante, como ha sido sugerido previamente en el cerdo (Cremades et al., 2005), el toro (Muiño et al., 2009) y el macho cabrío (Dorado et al., 2010). La Subpoblación 4 (sP4), formada por espermatozoides lentos pero progresivos, podría considerarse como un estado de evolución de la Subpoblación 3, la cual ha perdido parte de su vigor de movimiento aunque mantiene trayectorias rectas (Dorado et al., 2013; Quintero-Moreno et al., 2003).

Nuestros resultados revelaron que los espermatozoides se distribuyeron de forma homogénea entre las diferentes subpoblaciones identificadas, lo que difiere de lo publicado por otros autores (Macías García et al., 2009; Ortega-Ferrusola et al., 2009; Quintero-Moreno et al., 2003). Estas diferencias pudieran deberse a los donantes usados (edad, raza, variaciones individuales, etc.) (Dorado et al., 2013; Dorado et al., 2010; Gamboa et al., 2010; Muiño et al., 2009; Quintero-Moreno et al., 2003; Quintero-Moreno et al., 2007) o al procesado de las muestras (Hoogewijs et al., 2009; Hoogewijs et al., 2010; Mortimer, 2000b). Si coincidimos con el resto de autores (Macías García et al.,

2009; Ortega-Ferrusola et al., 2009; Quintero-Moreno et al., 2003) en observar que la subpoblación mas abundante en el caballo es la formada por los espermatozoides definidos como lentos pero progresivos, lo que sugiere que este tipo de movimiento determina las características cinéticas generales de una muestra seminal, sin olvidar que el resto de subpoblaciones aportarían sutiles diferencias a las cualidades del eyaculado. Por todo ello creemos que es de suma importancia enfocar la evaluación seminal desde el punto de vista de la identificación y distribución de las subpoblaciones espermáticas.

VI.b.1.1. Influencia de la raza en las variables cinéticas que caracterizan las subpoblaciones espermáticas definidas

De acuerdo a la bibliografía consultada, este es el primer estudio comparativo de subpoblaciones cinéticas en distintas razas de caballo. Nuestros resultados mostraron la existencia de cuatro subpoblaciones en todas las razas estudiadas; no obstante, la distribución de los espermatozoides dentro de cada una de ellas varió entre las mismas. En este sentido, destacamos la supremacía de la subpoblación 4 (espermatozoides poco activos pero muy progresivos) en las razas PRA (44,85%) y PRE (42,67%) , de la sP3 (espermatozoides muy activos y progresivo) en el PSI (35,06%) y de la sP2 (espermatozoides lentos y no progresivos) en el A-a (43,05%).

Estas diferencias raciales han sido previamente descritas por otros autores en estudios previos realizados en otras especies (Hoflack et al., 2007; Quintero-Moreno et al., 2007), sugiriendo que estas diferencias podrían deberse a las variaciones genéticas propias de cada raza (Hoflack et al., 2007). Este hecho podría ser además mucho más evidente en el caballo al tratarse una especie con una escasa selección reproductiva. No obstante, se hace necesario la realización de futuros estudios en los que se incrementen el número de animales y las razas que confirmen nuestros resultados. En este sentido, somos conscientes de que no podemos excluir el efecto que el donante de esperma tiene sobre la estructura subpoblacional del eyaculado (Dorado et al., 2013; Dorado et al., 2011b; Dorado et al., 2010; Miró et al.,

2005; Muiño et al., 2008b; Quintero-Moreno et al., 2003). Por lo cual, pensamos que en el futuro la valoración de la cinética espermática, deberían enfocarse al estudio de distintas su poblaciones, ya que podría complementar la información que aportan los métodos de la evaluación espermática, pudiendo permitir mejorar el entendimiento de las características seminales de un eyaculado.

VI.c. Parámetros morfométricos del espermatozoide equino: identificación de subpoblaciones morfométricas en el eyaculado fresco procedentes de caballos de razas diferentes

Bajo nuestras condiciones de estudio, los valores medios de los parámetros morfométricos del espermatozoide equino fueron superiores a los obtenidos previamente por otros autores (Arruda et al., 2002; Ball and Mohammed, 1995; Casey et al., 1997; Gravance et al., 1996; Hidalgo et al., 2005), pero similares a los publicados en otros estudios (Gravance et al., 1997b; Phetudomsinsuk et al., 2008). Los sistemas CASMA han demostrado una gran precisión y repetitividad cuando se han utilizado protocolos estandarizados (Davis et al., 1992a; Gravance et al., 1997a), pero existen multitud de causas que podrían explicar la presencia de variaciones entre estudios, como son la edad (Dowsett and Knott, 1996; Kondracki et al., 2005) o la raza de los donantes (Phetudomsinsuk et al., 2008), las variaciones entre los eyaculados tanto intra- como inter-individuales (Ball and Mohammed, 1995; Hidalgo et al., 2008; Phetudomsinsuk et al., 2008), el número de espermatozoides analizados por muestra (Hidalgo et al., 2005), el tipo de tinción empleada (Hidalgo et al., 2005), la presencia de anomalías morfológicas (Arruda et al., 2002; Gravance et al., 1998b), el grado de fertilidad de las muestras (Casey et al., 1997) y la heterogeneidad propia del eyaculado del caballo (Gago et al., 1999; Soler et al., 2005b).

Nuestro estudio mostro diferencias significativas entre las razas estudiadas para todas las variables morfométricas obtenidas por el sistema SCA, resultados que están en consonancia con lo publicado en el caballo por Phetudomsinsuk et al (2008), en el búfalo de agua (Aggarwal et al.,

2007), en el perro (Dahlbom et al., 1997) o en el cerdo (Saravia et al., 2007). Este hecho sugiere que la raza es un factor a tener en cuenta a la hora de evaluar la morfometría espermática. Más concretamente, nuestros resultados mostraron que los espermatozoides del PRA poseen valores significativamente superiores en algunas variables de tamaño (Anchura y Área de la cabeza espermática), mientras que los del A-a presentaban valores máximos de algunas variables de forma (Longitud y Perímetro de la cabeza espermática). Antes del desarrollo de los sistemas CASMA, Dowsett and Knott (1996) mostraron la existencia de diferencias morfológicas entre los espermatozoides de distintas razas de caballo, pero no fue hasta la llegada de los sistemas CASMA cuando ha sido posible hacer una valoración morfométrica precisa (Arruda et al., 2002; Hidalgo et al., 2005; Hidalgo et al., 2008) que pudiera demostrar la existencia de diferencias morfométricas entre razas (Phetudomsinsuk et al., 2008). Aunque las causas de estas diferencias se desconocen a día de hoy, se piensa que podrían tener una base genética (Dowsett and Knott, 1996; Peña et al., 2005) con implicaciones biológica aun no precisadas. En este sentido, se ha demostrado que los espermatozoides difieren en la forma de la cabeza y que estas diferencias les confieren sutiles variaciones en sus características, importantes a la hora de valorar la calidad seminal (Thurston et al., 2001). Así, se ha demostrado que la morfometría espermática influye en la calidad de movimiento del espermatozoide (Gil et al., 2009; Malo et al., 2006b) y en la capacidad que presenta un eyaculado para responder a los distintos métodos de conservación (Esteso et al., 2006a). Además, en especies tan dispares como el caballo (Casey et al., 1997), el cerdo (González Villalobos et al., 2008) y el hombre (Álvarez Lledó, 2003) se han puesto en evidencia su implicación en variaciones de la fertilidad. Por todo lo expuesto, consideramos que el estudio morfométrico de la cabeza del espermatozoide debería ser incluido dentro de los análisis rutinarios del esperma, ya que nos aportaría información crucial sobre determinadas cualidades espermáticas que hoy en día pasan desapercibidas con las técnicas convencionales.

VI.c.1. Subpoblaciones morfométricas

El caballo, a diferencia de otros mamíferos, presenta una morfología espermática bastante heterogénea dentro de un mismo eyaculado (Casey et al., 1997; Gago et al., 1999; Soler et al., 2005b). Además, hoy en día, es ampliamente aceptada la existencia de distintas subpoblaciones espermáticas en el eyaculado del caballo (Hidalgo et al., 2006; Hidalgo et al., 2008) y de otras especies (Esteso et al., 2009; Maroto-Morales et al., 2012; Peña et al., 2005; Rubio-Guillén et al., 2007; Thurston et al., 2001). Esto ha sido posible al empleo de los sistemas CASMA combinado con el uso de distintos análisis estadísticos multivariantes (Esteso et al., 2009; Hidalgo et al., 2008; Maroto-Morales et al., 2012).

En consonancia con estudios previos en caballos (Gravance et al., 1996; Hidalgo et al., 2006; Hidalgo et al., 2008), nuestros resultados revelaron la presencia de 6 subpoblaciones morfométricas, empleando las 8 variables morfométricas proporcionadas por el sistema CASMA (Longitud, Anchura, Perímetro, Área, Elongación, Elipticidad, Regularidad y Rugosidad). Resulta interesante destacar que en otras especies como el cerdo (González Villalobos et al., 2008; Peña et al., 2005), el carnero (Maroto-Morales et al., 2012) o el toro (Rubio-Guillén et al., 2007), el número de subpoblaciones oscila entre 3 y 4. Este hecho podría sugerirnos la especie puede condicionar, al menos en parte, el número de subpoblaciones identificadas. Además, el diferente grado de selección reproductiva sufrido por las distintas especies animales podría influir en la mayor heterogeneidad morfológica que presentan los eyaculados del caballo (Casey et al., 1997), en comparación con otros animales domésticos (Brito, 2007; Esteso et al., 2009; Sancho et al., 1998).

De las 6 subpoblaciones morfométricas definidas en este estudio, 5 de ellas (M-1, M-2, M-3, M-4 y M-5), tradicionalmente agrupadas en la población de espermatozoides considerados como normales, únicamente son posibles identificarlas mediante el uso de los sistemas CASMA al presentar variaciones entre ellas que no pueden ser apreciadas con las técnicas subjetivas (Jago et al., 1987). Por el contrario, aquellos espermatozoides englobados en la

subpoblación M-6 (no consideradas normales) podrían ser identificados de forma visual y, por ende, incluirlos dentro de una población distinta (anormales). Estos resultados indican que el método de valoración morfométrica de la cabeza del espermatozoide equino mediante el sistema CASMA Sperm Class Analyzer nos permite discernir entre cabezas normales y anormales, aportándonos resultados similares a los que se pueden obtener subjetivamente en la valoración de los anomalías de la cabeza. Así, el porcentaje de espermatozoides con cabeza anormales obtenidos por observación visual ($8,45\% \pm 3,11\%$) fue similar a la distribución que presento la subpoblación M-6 (7,96%). No obstante, el uso del sistema CASMA usado en este estudio no permitió además identificar distintas subpoblaciones dentro de los espermatozoides considerados normales, facilitando así la determinación de las diferentes anomalías de la cabeza del espermatozoide.

El origen y el papel fisiológico que desempeñan estas distintas subpoblaciones aun no está del todo claro (Maroto-Morales et al., 2012; Thurston et al., 1999), aunque se sabe que tienen una base genética (Roldan et al., 1998; Thurston et al., 2001) y que la diferencia entre distintas subpoblaciones podría aportar distintas cualidades a un eyaculado (Núñez-Martínez et al., 2006b). Así, la subpoblación M-1 (estándar), cuyos valores morfométricos eran intermedios al resto, presento el mayor número de espermatozoides con un 78,36%. Aunque estos resultados están en consonancia con los obtenidos por otros autores en estudios previos (Esteso et al., 2009; Maroto-Morales et al., 2010; Rubio-Guillén et al., 2007), difieren de los descritos por Gravance et al (1996), quienes observan una distribución más homogénea, quizás debido a las diferencias entre laboratorios o al diferente procesado de la muestra (Davis and Katz, 1992; Dorado et al., 2011c; Rijsselaere et al., 2003; Verstegen et al., 2002). Por otra parte, el uso de un método estadístico diferente o un distinto numero de variables utilizadas para la determinación de las distintas subpoblaciones en los diferentes estudios podrían también producir esta discrepancia en los resultados (Martínez-Pastor et al., 2011).

A partir de nuestros resultados podemos concluir que la Subpoblación M-1 (estándar) podría responder al prototipo morfológico de la especie, a partir de la cual se van produciendo sutiles diferencias durante la maduración espermática,

que darían como resultado el resto de las subpoblaciones. Entre estas subpoblaciones, la M-2 (grande) pudiera estar relacionada en el descenso de la fertilidad. Así, Casey et al (1997) observaron que el tamaño de los espermatozoides es mayor en sementales sub-fértiles. La Subpoblación M-3 (pequeña), cuyas variables morfométricas son más reducidas que el resto, podría estar relacionado con una mayor capacidad para los procesos de conservación, al haberse demostrado previamente que los espermatozoides de menor tamaño presentan una mayor resistencia a los métodos de congelación (Peña et al., 2005). Finalmente, las Subpoblaciones M-4, definida como alargada, y M-5 (globosa) podrían mostrar patrones de movimiento diferentes determinados por su morfometría, debido a que es sabido que la forma de la cabeza del espermatozoide influye en el tipo de movimiento. Gaje (1998) y Malo et al (2006a) sugieren que los espermatozoides mas alargados y fusiformes podrían presentar mejores características hidrodinámicas. Futuros estudios son necesarios para profundizar en el significado biológico de las subpoblaciones morfométricas y su correlación con la calidad seminal y la fertilidad de los eyaculados.

VI.c.2. Influencia de la raza en las variables morfométricas que caracterizan las subpoblaciones espermáticas definidas

En la bibliografía consultada existen varios estudios que observan diferencias raciales tanto en la morfología (Dowsett and Knott, 1996; Pickett, 1993) como en la morfometría (Ball and Mohammed, 1995; Phetudomsinsuk et al., 2008) del espermatozoide de caballo y de otras especies animales (Aggarwal et al., 2007; Boersma and Braun, 1999; Dahlbom et al., 1997; Saravia et al., 2007). Sin embargo, no hemos encontrado ningún estudio que compare tales diferencias entre las subpoblaciones morfométricas. En este sentido, este estudio demuestra por primera vez la existencia de diferencias raciales significativas para las 6 subpoblaciones morfométricas identificadas.

Todas las razas estudiadas mostraron diferencias significativas en la distribución de las distintas subpoblaciones espermáticas, excepto para la

Subpoblación M-1 (estándar). Estos resultados sugieren que esta subpoblación aportaría información relevante sobre la calidad del eyaculado, al poseer todos los caballos utilizados en el presente estudio una fertilidad contrastada. Por consiguiente, el resto de subpoblaciones identificadas aportarían diferencias sutiles a los eyaculados y que con los sistemas tradicionales pasan desapercibidas (Thurston et al., 2001).

Por lo expuesto, consideramos importante y necesario que se puedan desarrollar futuros estudios que profundicen en el conocimiento de estas subpoblaciones y en su implicación biológica en la calidad seminal y en la fertilidad de los sementales.

VI.d. Correlación entre las variables cinéticas y morfométricas del espermatozoide del caballo

El entendimiento de la evolución de la forma y el tamaño del espermatozoide y la función del mismo en las diferentes especies, tanto animales como en el ser humano, ha sido y sigue siendo un reto para los científicos, al ser éste una célula altamente especializada (Cummins and Woodall, 1985; Gil et al., 2009). Para ello, se han realizado hasta la fecha estudios conjuntos de motilidad y morfometría en distintas especies (Dott, 1975; Evans and Maxwell, 1987; Gil et al., 2009; Saacke, 1982), incluido el hombre (WHO, 1999), con el fin de intentar explicar la relación existente entre las distintas formas y los patrones de movimiento que presentan los espermatozoides.

Muchos autores defienden la teoría de que las características morfométricas del espermatozoide influyen de manera decisiva en las del movimiento espermático (Bedford, 2008). Más allá, Malo et al (2006b) han sugerido incluso que la morfometría espermática del ciervo es la llave para determinar la velocidad del espermatozoide. No obstante, si bien tanto los parámetros cinéticos como la morfología espermática son factores muy importantes en la predicción de la fertilidad (Donnelly et al., 1998), lo cierto es que en realidad hay muy pocas evidencias empíricas sobre la supuesta relación entre el diseño del espermatozoide y su función. Además, existe una

gran controversia en los escasos trabajos publicados sobre la relación entre la forma y tamaño del espermatozoide y la cinética espermática. En este sentido, diversos autores (Gomendio and Roldan, 1991; Gomendio and Roldan, 2008; Vogel, 1994) argumentan que los espermatozoides más largos son los más rápidos y que, por lo tanto, podrían estar favorecidos por la selección natural, relacionando así positivamente el tamaño espermático con la velocidad. En cambio, otros argumentan que este patrón no es universal y que en algunas especies podría estar asociado de forma negativa (Schulte-Hostedde and Millar, 2004; Stockley et al., 1997). Además, en otros estudios no se ha encontrado relación alguna entre el tamaño y la velocidad del espermatozoide (Minoretti and Baur, 2006; Stoltz and Neff, 2006).

En la bibliografía consultada, no existen estudios previos que establezcan correlaciones entre los parámetros cinéticos y morfométricos del espermatozoide del caballo. Nuestros resultados demuestran por primera vez la existencia de una correlación significativa entre algunas variables morfométricas y cinéticas, destacando la correlación positiva existente entre la Longitud, el Área y el Perímetro de la cabeza del espermatozoide con la velocidad curvilínea (VCL) y la amplitud lateral de la cabeza (ALH), mientras que observamos una correlación negativa con los índices de linealidad (LIN), rectitud (STR) y oscilación (WOB). Estos resultados sugieren que los espermatozoides de mayor tamaño nadan a una mayor velocidad, aunque con menor calidad de movimiento. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos previamente en otras especies animales por otros autores, como el cerdo (Gil et al., 2009), el ratón (Gomendio and Roldan, 2008) o el ciervo (Malo et al., 2006a). No obstante las correlaciones entre las variables cinéticas y morfométricas del espermatozoide de salmón (Gage et al., 2002) difieren de las registradas en nuestro estudio. En este sentido, ha sido demostrado que la correlación existente entre las variables morfométricas y cinéticas de un espermatozoide son diferentes en función de la especie estudiada (Schulte-Hostedde and Millar, 2004; Stockley et al., 1997).

Cuando realizamos un estudio de las correlaciones entre los parámetros morfométricos y cinéticos del espermatozoide para las diversas razas estudiadas, observamos que las correlaciones entre ambas características espermáticas fueron distintas según la raza evaluada. Estos resultados están

en consonancia con la variabilidad racial encontrada tanto en las variables cinéticas como en las morfométricas, cuando estas fueron estudiadas independientemente. Por otro lado, debemos tener en cuenta el método estadístico usado, el cual podría ser específico para cada especie, como sugieren Gil et al. (2009).

Finalmente, resaltar que el test de regresión lineal múltiple no nos ha permitido obtener suficientes modelos para predecir de forma fiable las variables cinéticas y morfométricas del espermatozoide de caballo. Nuestros resultados difieren de los obtenidos por Gil et al. (2009) en el verraco, quienes obtuvieron un mayor número de modelos. Posiblemente estas diferencias pudieran deberse a las diferencias morfológicas y morfométricas entre los espermatozoides de ambas especies (Brito, 2007; Casey et al., 1997; Estes et al., 2009; Gago et al., 1999; Sancho et al., 1998; Soler et al., 2005b), aunque esto no excluye el hecho de que el espermatozoide del caballo presente una relación entre forma y funcionalidad que a fecha de hoy desconocemos y que requiere profundizar e investigar en mayor profundidad para conocer cuál es la metodología estadística más correcta para la especie equina.

Por lo expuesto, concluimos que, considerando que la correlación observada entre el análisis morfométrico y cinético del espermatozoide no es lo suficientemente elevada, ambas pruebas de evaluación seminal son necesarias y complementarias entre sí y proponemos no excluir ninguna de ellas en la evaluación de la calidad del esperma, aunque somos conscientes de que es necesario continuar estudiando esta correlación en poblaciones más amplias y con un mayor número de razas e individuos,.

Conclusiones

Conclusiones

VII CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente estudio podemos extraer las conclusiones que se enumeran a continuación:

1. La utilización del sistema Sperm Class Analyzer (SCA) permite evaluar de forma precisa y objetiva los parámetros cinéticos y morfométricos en el eyaculado del caballo de las razas Pura Sangre Inglés, Árabe, Anglo-Árabe y Pura Raza Español.
2. El uso combinado del sistema SCA y el análisis estadístico multivariante permite identificar 4 subpoblaciones espermáticas con características de movimiento definidas en el eyaculado del caballo de las razas Pura sangre Inglés, Árabe, Anglo-Árabe y Pura Raza Español, cuya distribución varía en función de la raza, siendo la más abundante la sP4 (espermatozoides lentos y progresivos), con un valor superior al 38,04% para todos los individuos.
3. En el eyaculado del caballo de las razas Pura Sangre Inglés, Árabe, Anglo-Árabe y Pura Raza Español existen 6 subpoblaciones con características morfométricas definidas, 5 de las cuales solo son posible identificarlas mediante el sistema SCA, cuya distribución difiere entre dichas razas, siendo la denominada M-1 (estándar) la más abundante con un valor superior al 70% para todos los individuos.
4. Considerando todos los espermatozoides capturados de los eyaculados estudiados, existe correlación entre varias de las variables morfométricas y cinéticas estudiadas, destacando la correlación positiva entre la longitud, el área y perímetro de la cabeza del espermatozoide con la velocidad curvilínea (VCL) y la amplitud lateral de la cabeza (ALH), y negativa con los índice de linealidad (LIN), rectitud (STR) y oscilación (WOB), lo que sugiere que los espermatozoides con cabezas de mayor tamaño, presentan una mayor velocidad, aunque menor calidad de movimiento.

Resumen

Resumen

VIII RESUMEN

El desarrollo de las nuevas tecnologías de valoración objetiva del espermatozoide, genéricamente denominados CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis), ha permitido la valoración de forma rápida y fiable, tanto de las variables cinéticas como morfométricas del espermatozoide. En un principio este tipo de tecnologías solo estaba al alcance de unos pocos laboratorios, aunque actualmente se utilizan de manera rutinaria en la mayoría de los laboratorios de investigación para la evaluación de muestras espermáticas de distintas especies de mamíferos domésticos y silvestres.

El uso de estos sistemas junto con el análisis estadístico multivariante han demostrado la existencia de subpoblaciones tanto cinéticas como morfométricas en eyaculados de diferentes especies, desterrando la idea de que los eyaculados son homogéneos, formados por una única población espermática con distribución normal.

El eyaculado del caballo está compuesto por varias subpoblaciones espermáticas cinéticas y morfométricas con características bien definidas y diferentes entre ellas. De igual forma, todos los eyaculados analizados para este trabajo mostraron este tipo de subpoblaciones, aunque existieron diferencias en función de la raza de la cual procedían.

Las variables morfométricas influyen de manera decisiva en las características del movimiento espermático, existiendo correlaciones entre los parámetros morfométricos y cinéticos del espermatozoide en el caballo, y siendo diferentes según la raza evaluada.

Summary

SUMMARY

IX SUMMARY

In the last years, new sperm assessment technologies such as CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) have allowed a more precise and quick kinetic and morphometric sperm evaluation. Once an exclusive tool, nowadays these methodologies are a routine test in most of sperm research laboratories both in domestic and wild mammals.

These systems along with multivariate statistical analysis have proved the existence of several kinetic and morphometric subpopulations in the ejaculates of various species. Due to this fact, the old idea of a homogeneous sperm population in each ejaculate has been discarded.

Each stallion's ejaculate is composed by different sperm subpopulations defined by specific CASA-derived parameters (morphometric and kinetic characteristics). In this study, we have proved this hypothesis in different horse breeds. Moreover, we have found remarkable differences between breeds.

In stallion ejaculates, morphometric parameters had significant influence on sperm movement. Indeed, several morphometric and kinetic variables showed a strong correlation in this specie. Nonetheless, these relationships between sperm features have also demonstrated breed-related differences.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abaigar, T., Cano, M., Espeso, G., Ortiz, J., 1997, Introduction of Mhorr gazelle *Gazella dama mhorr* in Bou-Hedma National Park, Tunisia. *International Zoo Yearbook* 35, 311-316.
- Abaigar, T., Cano, M., Pickard, A.R., Holt, W.V., 2001, Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize ejaculate quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhorr*): effects of body weight, electroejaculation technique and short-term semen storage. *Reproduction (Cambridge, England)* 122, 265-273.
- Abaigar, T., Holt, W.V., Harrison, R.A.P., 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.
- Aggarwal, R.A.K., Ahlawat, S.P.S., Kumar, Y., Panwar, P.S., Singh, K., Bhargava, M., 2007, Biometry of frozen–thawed sperm from eight breeds of Indian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 68, 682-686.
- Al-Kandari, N.M., Jolliffe, I.T., 2005, Variable selection and interpretation in correlation principal components. *Environmetrics* 16, 659-672.
- Álvarez Lledó, C., 2003. Análisis integrado de morfología y movilidad espermatocaria humana con el uso del Sperm Class Analyzer. Universidad de Valencia., Valencia.
- Álvarez, M., García-Macías, V., Martínez-Pastor, F., Martínez, F., Borragán, S., Mata, M., Garde, J., Anel, L., De Paz, P., 2008, Effects of cryopreservation on head morphometry and its relation with chromatin status in brown bear (*Ursus arctos*) spermatozoa. *Theriogenology* 70, 1498-1506.
- Amann, R.P., Hammerstedt, R.H., 1993, In vitro evaluation of sperm quality: An opinion. *Journal of Andrology* 14, 397-406.
- Anel, E., 1999, Automatización en la contrastación espermática. II Congreso Ibérico de Reproducción animal, 292-296.
- Arruda, R.P., Ball, B.A., Gravance, C.G., Garcia, A.R., Liu, I.K.M., 2002, Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. *Theriogenology* 58, 253-256.
- Aurich, C., Seeber, P., Muller-Schlosser, F., 2007, Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5 degrees C. *Reprod Domest Anim* 42, 445-448.
- Ball, B.A., Fagnan, M.S., Dobrinski, I., 1997, Determination of acrosin amidase activity in equine spermatozoa. *Theriogenology* 48, 1191-1198.
- Ball, B.A., Mohammed, H.O., 1995, Morphometry of stallion spermatozoa by computer-assisted image analysis. *Theriogenology* 44, 367-377.
- Bamba, K., 1988, Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology* 29, 1245-1251.
- Bamba, K., Cran, D.G., 1988, Further studies on rapid dilution and warming of boar semen. *Journal of Reproduction and Fertility* 82, 509-518.

- Bartoov, B., Ben-Barak, J., Mayevsky, A., Sneider, M., Yogev, L., Lightman, A., 1991, Sperm motility index: A new parameter for human sperm evaluation. *Fertility and Sterility* 56, 108-112.
- Bedford, J.M., 2008, Puzzles of mammalian fertilization - and beyond. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 415-426.
- Björndahl, L., Barratt, C.L.R., Fraser, L.R., Kvist, U., Mortimer, D., 2002, ESHRE basic semen analysis courses 1995-1999: Immediate beneficial effects of standardized training. *Human Reproduction* 17, 1299-1305.
- Blanchard, T.L., Brinsko, S.P., Love, C.C., Vest, D.D., Berezowski, C.B., Wendt, K.M., Stich, K., Varner, D.D., 2012, Case Study of Processing and Insemination Techniques: Attempts to Improve Fertility of an Aged Stallion with Dilute Semen of Poor Quality. *Journal of Equine Veterinary Science* 32, 5-11.
- Blom, E., 1973, The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the spermogram. *Nord Vet Med* 25, 383.
- Boersma, A., Braun, J., 1999, Computer-assisted analysis of sperm morphology in veterinary medicine. *Computerassistierte Untersuchung der Spermienmorphologie in der Tiermedizin* 112, 81-85.
- Boersma, A., Raßhofer, R., Stolla, R., 2001, Influence of sample preparation, staining procedure and analysis conditions on bull sperm head morphometry using the morphology analyser integrated visual optical system. *Reproduction in Domestic Animals* 36, 222-229.
- Boixo, J. 1994. Valoración laboratorial de la calidad seminal. Correlación con la fertilidad. (7ª Jornadas Intenacionales de Reproducción Animal), pp. 61-69.
- Bonet, S., Briz, M., Fradera, A., Egozcue, J., 1992, Origin, development and ultrastructure of boar spermatozoa with folded tails and with two tails. *Human Reproduction* 7, 523-528.
- Bonet, S., Briz, M.D., Pinart, B., Sancho, S., García-Gil, N., Badia, E., 2000, *Morfología espermática en porcino*. Institut d'Estudis Catalans, Barcelona.
- Bosard, T., Love, C., Brinsko, S., Blanchard, T., Thompson, J., Varner, D., 2005, Evaluation and diagnosis of acrosome function/dysfunction in the stallion. *Animal reproduction science*. 89, 215-217.
- Boyers, S.P., Davis, R.O., Katz, D.F., 1989, Automated semen analysis. *Current Problems in Obstetrics, Gynecology and Fertility* 12, 165-200.
- Bravo, J.A., Montanero, J., Calero, R., Roy, T.J., 2011, Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams. *Animal Reproduction Science* 129, 22-29.
- Brito, L.F.C., 2007, Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice* 6, 249-264.
- Briz, M.D., 1994, Análisis microscopica de l'esperma ejaculada i de la maduració epididimària deis espermatozoides de *Sus domesticus*:. Departament of Biology, University of Girona, Girona.
- Briz, M.D., Bonet, S., Pinart, B., Egozcue, J., Camps, R., 1995, Comparative study of boar sperm coming from the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis. *Journal of Andrology* 16, 175-186.

- Brum, A.M., Thomas, A.D., Sabeur, K., Ball, B.A., 2006, Evaluation of Coomassie blue staining of the acrosome of equine and canine spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research* 67, 358-362.
- Brusco, M.J., Cradit, J.D., 2001, A variable-selection heuristic for K-means clustering. *Psychometrika* 66, 249-270.
- Buendía, P., Soler, C., Paolicchi, F., Gago, G., Urquieta, B., Pérez-Sánchez, F., Bustos-Obregón, E., 2002, Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm-Class Analyzer® computer-assisted system. *Theriogenology* 57, 1207-1218.
- Butler, W.J., Roberts, T.K., 1975, Effects of some phosphatidyl compounds on boar spermatozoa following cold shock or slow cooling. *Journal of Reproduction and Fertility* 43, 183-187.
- Cabrera, V., Próspero, A., Pantoja, A., 2012, VIABILIDAD ESPERMÁTICA E INTEGRIDAD DEL ACROSOMA EN SEMEN CONGELADO DE TOROS NACIONALES. *Rev. investig. vet. Perú* vol.23, p.192-200.
- Casey, P.J., Gravance, C.G., Davis, R.O., Chabot, D.D., Liu, I.K.M., 1997, Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. *Theriogenology* 47, 575-582.
- Colas, G., 1980, Seasonal variations of semen quality in adult Ile-de-France rams. I. Study of cell morphology and massal motility of sperm. *VARIATIONS SAISONNIERES DE LA QUALITE DU SPERME CHEZ LE BELIER ILE-DE-FRANCE. I. ETUDE DE LA MORPHOLOGIE CELLULAIRE ET DE LA MOTILITE MASSALE* 20, 1789-1799.
- Colenbrander, B., Gadella, B.M., Stout, T.A.E., 2003, The Predictive Value of Semen Analysis in the Evaluation of Stallion Fertility. *Reproduction in Domestic Animals* 38, 305-311.
- Comber, S.C.L., Faulkes, C.G., Look, K.J.W.V., Holt, W.V., Smith, C. 2004. Recovery of Sperm Activity After Osmotic Shock in the Three-Spined Stickleback: Implications for Pre-Oviposition Ejaculation. In *Behaviour*, pp. 1555-1569.
- Contri, A., Valorz, C., Faustini, M., Wegher, L., Carluccio, A., 2010, Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology* 74, 424-435.
- Cooper, T.G., Atkinson, A.D., Nieschlag, E., 1999, Experience with external quality control in spermatology. *Human Reproduction* 14, 765-769.
- Cremades, T., Roca, J., Rodriguez-Martinez, H., Abaigar, T., Vazquez, J.M., Martinez, E.A., 2005, Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa. *Journal of Andrology* 26, 610-618.
- Cross, N.L., Morales, P., Overstreet, J.W., Hanson, F.W., 1986, Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Research* 15, 213-226.
- Cueva., C.d.I., 1998. Estudio sobre la resistencia al estrés osmótico de espermatozoides porcinos y equinos. Universidad Autónoma de Barcelona., España.
- Cummins, J., Woodall, P., 1985, On mammalian sperm dimensions. *J Reprod Fertil.* 75, 153-175.
- Chandler, J.E., Painter, C.L., Adkison, R.W., Memon, M.A., Hoyt, P.G., 1988, Semen quality characteristics of dairy goats. *Journal of Dairy Science* 71, 1638-1646.

- Chantler, E., Abraham-Peskir, J., Roberts, C., 2004, Consistent presence of two normally distributed sperm subpopulations within normozoospermic human semen: A kinematic study. *International Journal of Andrology* 27, 350-359.
- Christensen, P., Stryhn, H., Hansen, C., 2005, Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology* 63, 992-1003.
- Dadoune, J.P., Fain-Maurel, M.A., Guillaumin, M., Guillaumin, D., 1980, Scanning electron microscopic morphometry of a discriminated spermatozoa. *International Journal of Fertility* 25, 18-27.
- Dahlbom, M., Andersson, M., Vierula, M., Alanko, M., 1997, Morphometry of normal and teratozoospermic canine sperm heads using an image analyzer work in progress. *Theriogenology* 48, 687-698.
- Davis, R.O., Bain, D.E., Siemers, R.J., Thal, D.M., Andrew, J.B., Gravance, C.G., 1992a, Accuracy and precision of the CellForm-Human automated sperm morphometry instrument. *Fertility and Sterility* 58, 763-769.
- Davis, R.O., Gravance, C.G., 1993, Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis. *Fertility and Sterility* 59, 412-417.
- Davis, R.O., Gravance, C.G., Casey, P.J., 1993a, Automated morphometric analysis of stallion spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research* 54, 1808-1811.
- Davis, R.O., Gravance, C.G., Casey, P.J., 1993b, Automated morphometric analysis of stallion spermatozoa. *Am J Vet Res.* 54, 1808-1811.
- Davis, R.O., Katz, D.F., 1989, Computer-aided sperm analysis (CASA): Image digitization and processing. *Biomaterials, Artificial Cells, and Artificial Organs* 17, 93-116.
- Davis, R.O., Katz, D.F., 1992, Standardization and comparability of CASA instruments. *Journal of Andrology* 13, 81-86.
- Davis, R.O., Overstreet, J.W., Asch, R.H., Ord, T., Silber, S.J., 1992b, Movement characteristics of human epididymal sperm used for fertilization of human oocytes in vitro. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 38, 339.
- Davis, R.O., Siemers, R.J., 1995, Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. *Reprod Fertil Dev* 7, 857-869.
- De Monserrat, J.J., Pérez-Sánchez, F., Tablado, L., Soler, C., 1995, the sperm Class Analyzer: A new automater system for human sperm morphometry and classification. *Contracepcion Fertilité Sexualité* 23, S126.
- Dean, C.J., Hobgood, A.M., Blodgett, G.P., Love, C.C., Blanchard, T.L., Varner, D.D., 2012, The addition of ticarcillin-clavulanic acid to INRA 96 extender for stallion semen cooling. *Equine Veterinary Journal* 44, 95-99.
- Didion, B.A., Graves, C.N., 1986, In vivo capacitation and acrosome reaction of bovine sperm in estrous and diestrous cows. *Journal of Animal Science* 62, 1029-1033.
- Donnelly, E.T., Lewis, S.E.M., McNally, J.A., Thompson, W., 1998, In vitro fertilization and pregnancy rates: The influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertility and Sterility* 70, 305-314.
- Dorado, J., Acha, D., Gálvez, M.J., Ortiz, I., Carrasco, J.J., Díaz, B., Gómez-Arrones, V., Calero-Carretero, R., Hidalgo, M., 2013, Sperm motility

- patterns in Andalusian donkey (*Equus asinus*) semen: Effects of body weight, age, and semen quality. *Theriogenology*.
- Dorado, J., Alcaráz, L., Duarte, N., Portero, J.M., Acha, D., Hidalgo, M., 2011a, Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm® gradient. *Animal Reproduction Science* 125, 211-218.
- Dorado, J., Gálvez, M.J., Murabito, M.R., Muñoz-Serrano, A., Hidalgo, M., 2011b, Identification of sperm subpopulations in canine ejaculates: Effects of cold storage and egg yolk concentration. *Animal Reproduction Science* 127, 106-113.
- Dorado, J., Hidalgo, M., Muñoz, A., Rodríguez, I., 2009, Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. *Animal Reproduction Science* 112, 150-157.
- Dorado, J., Molina, I., Muñoz-Serrano, A., Hidalgo, M., 2010, Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Florida goats. *Theriogenology* 74, 795-804.
- Dorado, J., Rijsselaere, T., Muñoz-Serrano, A., Hidalgo, M., 2011c, Influence of sampling factors on canine sperm motility parameters measured by the Sperm Class Analyzer. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 57, 318-325.
- Dott, H.M., 1975, Morphology of stallion spermatozoa. *J reprod Fertil* 23, 41-46.
- Dowsett, K., Pattie, W., 1982, Characteristics and fertility of stallion semen. *J Reprod Fertil Suppl.* 32, 1-8.
- Dowsett, K.F., Knott, L.M., 1996, The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology* 46, 397-412.
- Dowsett, K.F., Osborne, H.G., Pattie, W.A., 1984, Morphological characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 22, 463-472.
- Dowsett, K.F., Pattie, W.A., 1987, Variation in characteristics of stallion semen caused by breed, age and season of year and service frequency. *J reprod Fertil* 35, 45.
- Dresdner, R.D., Katz, D.F., 1981, Relationships of mammalian sperm motility and morphology to hydrodynamic aspects of cell function. *Biol Reprod.* 25, 920-930.
- Drevius, L.O., Eriksson, H., 1966, Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Experimental Cell Research* 42, 136-156.
- Dufour, J.J., Fahmy, M.H., Minvielle, F., 1984, Seasonal changes in breeding activity, testicular size, testosterone concentration and seminal characteristics in rams with long or short breeding season. *J Anim Sci.* 58, 416-422.
- Eddy, E.M., 2006, Chapter 1 - The Spermatozoon, In: Jimmy, D.N., Ph.D, Tony, M.P., Donald, W.P., John, R.G.C., D.Sc, F.R.S.C, David, M.d.K., M.D, A.O, JoAnne, S.R., Paul M. Wassarman, P.D. (Eds.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)*. Academic Press, St Louis, pp. 3-54.
- Ehlers, J., Behr, M., Bollwein, H., Beyerbach, M., Waberski, D., 2011, Standardization of computer-assisted semen analysis using an e-learning application. *Theriogenology* 76, 448-454.
- ESHRE., group., A.s.i., 1998, Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. *Hum Reprod.* 13, 142-145.

- Esteso, M.C., Fernández-Santos, M.R., Soler, A.J., Montoro, V., Martínez-Pastor, F., Garde, J.J., 2009, Identification of sperm-head morphometric subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm samples. *Reproduction in Domestic Animals* 44, 206-211.
- Esteso, M.C., Fernández-Santos, M.R., Soler, A.J., Montoro, V., Quintero-Moreno, A., Garde, J.J., 2006a, The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm heads. *Reproduction in Domestic Animals* 41, 241-246.
- Esteso, M.C., Soler, A.J., Fernández-Santos, M.R., Quintero-Moreno, A.A., Garde, J.J., 2006b, Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm samples. *Journal of Andrology* 27, 662-670.
- Evans, G., Maxwell, W.M.C., 1987, *Salamon's Artificial insemination of Sheep and goats*, . Butterworth, Sydney., 85-91.
- Evenson, D.P., Wixon, R., 2006, Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology* 65, 979-991.
- Farrell, P.B., Foote, R.H., Zinaman, M.J., 1996, Motility and other characteristics of human sperm can be measured by computer-assisted sperm analysis of samples stained with Hoechst 33342. *Fertility and Sterility* 66, 446-453.
- Farrell, P.B., Presicce, G.A., Brockett, C.C., Foote, R.H., 1998, Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 49, 871-879.
- Flores, E., Fernández-Novell, J.M., Peña, A., Rodríguez-Gil, J.E., 2009, The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. *Theriogenology* 72, 784-797.
- Flores, E., Taberner, E., Rivera, M.M., Peña, A., Rigau, T., Miró, J., Rodríguez-Gil, J.E., 2008, Effects of freezing/thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. *Theriogenology* 70, 936-945.
- Foote, R.H., Swierstra, E.E., Hunt, W.L., 1992, Spermatogenesis in the dog. *Anat Rec* 137, 341-354.
- Gaddum-Rosse, P., 1981, Some observations on sperm transport through the uterotubal junction of the rat. *American Journal of Anatomy* 160, 333-341.
- Gadea, J., 1996. Predicción de la fertilidad "in vivo" de los eyaculados de verraco mediante parámetros rutinarios de contrastación seminal, pruebas bioquímicas y el test homólogo de penetración "in vivo". Universidad de Murcia,
- Gage, M., 1998, Mammalian sperm morphometry. *Proc Roy Soc Lond B* 265, 97 - 103.
- Gage, M., Macfarlane, C., Yeates, S., Shackleton, R., Parker, G., 2002, Relationships between sperm morphometry and sperm motility in the Atlantic salmon. *J Fish Biol* 61, 1528 - 1539.
- Gago, C., Pérez-Sánchez, F., Yeung, C.H., Tablado, L., Cooper, T.G., Soler, C., 1998, Standardisation of sampling and staining methods for the

- morphometric evaluation of sperm heads in the *Cynomolgus* monkey (*Macaca fascicularis*) using computer-assisted image analysis. *International Journal of Andrology* 21, 169-176.
- Gago, C., Pérez-Sánchez, F., Yeung, C.H., Tablado, L., Cooper, T.G., Soler, C., 1999, Morphological characterization of ejaculated cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm. *American Journal of Primatology* 47, 105-115.
- Gago, C., Soler, C., Pérez-Sánchez, F., Yeung, C.H., Cooper, T.G., 2000, Effect of cetrorelix on sperm morphology during migration through the epididymis in the cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *American Journal of Primatology* 51, 103-117.
- Gamboa, S., Ramalho-Santos, J., 2005, SNARE proteins and caveolin-1 in stallion spermatozoa: Possible implications for fertility. *Theriogenology* 64, 275-291.
- Gamboa, S., Rodrigues, A.S., Henriques, L., Batista, C., Ramalho-Santos, J., 2010, Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. *Theriogenology* 73, 950-958.
- García-Artiga, C., Fontanillos, J.C., Pérez, J., García-Cuenca, I., Martí, S., Pérez García, T., 1994, Técnicas de tinción Espermática. *Porci* 21, 11-18.
- Garner, D.L., Hafer, E.S.E. 1996. Espermatozoides y plasma seminal. In *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales.*, Hafer, E.S.E., ed. (McGraw-Hill.), pp. 158-179.
- Garner, D.L., Johnson, L.A., 1995, Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction* 53, 276-284.
- Garrett, C., Baker, H.W.G., 1995, A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads. *Fertility and Sterility* 63, 1306-1317.
- Gil, M.C., García-Herreros, M., Barón, F.J., Aparicio, I.M., Santos, A.J., García-Marín, L.J., 2009, Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. *Theriogenology* 71, 254-263.
- Gomendio, M., Roldan, E., 1991, Sperm competition influences sperm size in mammals. *Proc Biol Sci* 243, 181 - 185.
- Gomendio, M., Roldan, E., 2008, Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *Int J Dev Biol* 52, 439 - 447.
- Gomendio, M., Roldan, E.R.S., 1993, Mechanisms of sperm competition: Linking physiology and behavioural ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 8, 95-100.
- González Villalobos, D., Quintero-Moreno, A., Garde López-Brea, J.J., Estes, M.C., Rocío Fernández-Santos, M., Rubio-Guillén, J., Mejía Silva, W., González Marval, Y., León Atencio, G., Bohórquez Corona, R., 2008, Morphometry characterization of boar sperm head with computer assisted analysis (preliminary results). *Caracterización morfológica de la cabeza del espermatozoide porcino mediante análisis computarizado (resultados preliminares)* 18, 570-577.
- Gopalkrishnan, K., Hinduja, I.N., Kumar, T.C., 1992, Volume of semen as a parameter of its quality. *Indian J Med Res.* 96, 361-365.

- Graham, E., Schmehl, M.K.L., Nelson, D.S., 1980, Problems with laboratory assays. Proc 8th NAAB Tech Conf AI Reprod, 1-8.
- Graham, J., Kunze, E., Hammerstedt, R., 1990, Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod.* 43, 55-64.
- Graham, J.K., 1996, Cryopreservation of stallion spermatozoa. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice* 12, 131-147.
- Gravance, C.G., Casey, M.E., Casey, P.J., 2009, Pre-freeze bull sperm head morphometry related to post-thaw fertility. *Animal Reproduction Science* 114, 81-88.
- Gravance, C.G., Champion, Z., Liu, I.K.M., Casey, P.J., 1997a, Sperm head morphometry analysis of ejaculate and dismount stallion semen samples. *Animal Reproduction Science* 47, 149-155.
- Gravance, C.G., Champion, Z.J., Casey, P.J., 1998a, Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology* 49, 1219-1230.
- Gravance, C.G., Davis, R.O., 1995, Automated sperm morphometry analysis (ASMA) in the rabbit. *Journal of Andrology* 16, 88-93.
- Gravance, C.G., Garner, D.L., Pitt, C., Vishwanath, R., Sax-Gravance, S.K., Casey, P.J., 1999, Replicate and technician variation associated with computer aided bull sperm head morphometry analysis (ASMA). *International Journal of Andrology* 22, 77-82.
- Gravance, C.G., Lewis, K.M., Casey, P.J., 1995, Computer automated sperm head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa. *Theriogenology* 44, 989-1002.
- Gravance, C.G., Liu, I.K.M., Davis, R.O., Hughes, J.P., Casey, P.J., 1996, Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 108, 41-46.
- Gravance, C.G., Russell, O.D., 1995, Computer automated head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa. *Theriogenology* 44, 989-1002.
- Gravance, C.G., Vishwanath, R., Pitt, C., Garner, D.L., Casey, P.J., 1998b, Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *Journal of Andrology* 19, 704-709.
- Gravance, C.G., White, C., Robertson, K.R., Champion, Z.J., Casey, P.J., 1997b, The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of caprine sperm heads. *Animal Reproduction Science* 49, 37-43.
- Hafer, E.S.E. 1987. Semen evaluation. In *Reproduction in Farm Animals*, Hafer, E.S.E., ed. (Philadelphia), pp. 455-480.
- Harkema, W., Boyle, M.S. 1992. Use of fluorescent stain to assess membrane integrity of equine spermatozoa. In *Proc 12th Int Congr Anim Repro AI*. (La Haya), pp. 1424-1426.
- Herreros, M.G., 2007. Estudio Morfométrico mediante sistema computerizado del espermatozoide de verraco Ibérico. Extremadura, Cáceres.
- Hidalgo, M., 2003, Valoración de la calidad esperma y su correlación con la fertilidad. I Jornadas de Reproducción Equina. Valencia. España.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., Sanz, J., Soler, C., 2005, Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Veterinarni Medicina* 50, 24-32.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., Soler, C., 2006, Morphometric classification of Spanish Thoroughbred stallion semen according to

- sperm head size measurements. *Animal Reproduction Science* 94, 26-28.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., Soler, C., 2008, Morphometric classification of Spanish thoroughbred stallion sperm heads. *Animal Reproduction Science* 103, 374-378.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J.M., 2007, The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Animal Reproduction Science* 100, 61-72.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Pérez, C., Dorado, J., Sánchez, M. 2002. Parámetros Morfométricos de la cabeza del espermatozoide de macho cabrío. In *Jornadas Internacionales de Ovinotecnia y Caprinotecnia*. (Valencia, España.), pp. 1053-1058.
- Hirai, M., Boersma, A., Hoeflich, A., Wolf, E., Föll, J., Aumüller, R., Braun, J., 2001, Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): Relation to fertility and seminal plasma growth factors. *Journal of Andrology* 22, 104-110.
- Hoflack, G., Opsomer, G., Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., De Kruif, A., Duchateau, L., 2007, Comparison of computer-assisted sperm motility analysis parameters in semen from Belgian Blue and Holstein-Friesian Bulls. *Reproduction in Domestic Animals* 42, 153-161.
- Holt, C., Holt, W.V., Moore, H.D., 1996, Choice of operating conditions to minimize sperm subpopulation sampling bias in the assessment of boar semen by computer-assisted semen analysis. *J Androl*, 587-596.
- Holt, C., Holt, W.V., Moore, H.D.M., Reed, H.C.B., Curnock, R.M., 1997, Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: Results of two fertility trials. *Journal of Andrology* 18, 312-323.
- Holt, W.V., Harrison, R.A.P., 2002, Bicarbonate stimulation of boar sperm motility via a protein kinase A-dependent pathway: Between-cell and between-ejaculate differences are not due to deficiencies in protein kinase A activation. *Journal of Andrology* 23, 557-565.
- Hoogewijs, M., Govaere, J., Rijsselaere, T., De Schauwer, C., Vanhaesebrouck, E., de Kruif, A., De Vlieghe, S., 2009, influence of technical settings on CASA Motility Parameters of Frozen Thawed Stallion Semen. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP- Las Vegas, NV, USA* 55.
- Hoogewijs, M., Rijsselaere, T., De Vlieghe, S., Vanhaesebrouck, E., De Schauwer, C., Govaere, J., Thys, M., Hoflack, G., Van Soom, A., de Kruif, A., 2010, Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. *Theriogenology* 74, 118-126.
- Huang, J.Z., Ng, M.K., Rong, H., Li, Z., 2005, Automated variable weighting in k-means type clustering. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 27, 657-668.
- Hurtgen, J.P., 1992, Evaluation of the stallion for breeding soundness. *The Veterinary clinics of North America*. *Equine practice* 8, 149-165.
- Iguer-ouada, M., Verstegen, J.P., 2001, Evaluation of the "Hamilton thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. *Theriogenology* 55, 733-749.

- Jagoe, J.R., Washbrook, N.P., Hudson, E.A., 1986, Morphometry of spermatozoa using semiautomatic image analysis. *Journal of Clinical Pathology* 39, 1347-1352.
- Jagoe, J.R., Washbrook, N.P., Pratsis, L., Hudson, E.A., 1987, Sperm morphology by image analysis compared with subjective assessment. *British Journal of Urology* 60, 457-462.
- Janett, F., Thun, R., Niederer, K., Burger, D., Hässig, M., 2003, Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology* 60, 453-461.
- Januskauskas, A., Johannisson, A., Söderquist, L., Rodriguez-Martinez, H., 2000, Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology* 53, 859-875.
- Jasko, D.J., Hathaway, J.A., Schaltenbrand, V.L., Simper, W.D., Squires, E.L., 1992, Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 37, 1241-1252.
- Jasko, D.J., Lein, D.H., Foote, R.H., 1990, Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 197, 389-394.
- Johnson, L.A., Maxwell, W.M.C., Dobrinsky, J.R., Welch, G.R., 1996, Staining sperm for viability assessment. *Reproduction in Domestic Animals* 31, 37-47.
- Jouannet, P., Volochine, B., Deguent, P., Serres, C., Davis, G., 1977, Light scattering determination of various characteristic parameters of spermatozoa motility in a series of human sperm. *Andrologia* 9.
- Katkov, I.I., Lulat, A.G.M.I., 2000, Do conventional CASA-parameters reflect recovery of kinematics after freezing?: 'CASA paradox' in the analysis of recovery of spermatozoa after cryopreservation. *Cryo-Letters* 21, 141-148.
- Katz, D.F., Overstreet, J.W., Samuels, S.J., 1986, Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. *Journal of Andrology* 7, 203-210.
- Kavak, A., Johannisson, A., Lundeheim, N., Rodriguez-Martinez, H., Aidnik, M., Einarsson, S., 2003, Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science* 76, 205-216.
- Kerr, M.K., Churchill, G.A., 2001, Bootstrapping cluster analysis: Assessing the reliability of conclusions from microarray experiments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 8961-8965.
- Khelifaoui, M., Battut, I., Bruyas, J.F., Chatagnon, G., Trimeche, A., Tainturier, D., 2005, Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: An approach of the mechanism of action at spermatozoa level. *Theriogenology* 63, 138-149.
- King, J.R., Jackson, D.A., 1999, Variable selection in large environmental data sets using principal components analysis. *Environmetrics* 10, 67-77.
- Kondracki, S., Banaszewska, D., Mielnicka, C., 2005, The effect of age on the morphometric sperm traits of domestic pigs (*Sus scrofa domestica*). *Cellular and Molecular Biology Letters* 10, 3-13.

- Krause, W., Viethen, G., 1999, Quality assessment of computer-assisted semen analysis (CASA) in the andrology laboratory. *Andrologia* 31, 125-129.
- Kruger, T.F., Acosta, A.A., Simmons, K.F., Swanson, R.J., Matta, J.F., Oehninger, S., 1988 Predictive value of abnormal sperm morphology in *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 49, 112-117.
- Kruger, T.F., Coetzee, K., 1999, The role of sperm morphology in assisted reproduction. *Human Reproduction Update* 5, 172-178.
- Kruger, T.F., Du toit, T.C., Franken, D.R., Acosta, A.A., Oehninger, S.C., Menkveld, R., Lombard, C.J., 1993, A new computerized method of reading sperm morphology (Strict Criteria) is as efficient as technician reading. *Fertil Steril* 59, 202-209.
- Kumar, V., Rani, S., 1999, Light sensitivity of the photoperiodic response system in higher vertebrates: Wavelength and intensity effects. *Indian Journal of Experimental Biology* 37, 1053-1064.
- Kusunoki, H., Kato, S., Kanda, S., 1988, Identification of acrosome reacted goat sperm by trypan blue-giensa method. *Jpn. J. Zootech.Sci.* 59, 235-240.
- Larsen, L., Scheike, T., Jensen, T.K., Bonde, J.P., Ernst, E., Hjollund, N.H., Zhou, Y., Skakkebæk, N.E., Giwercman, A., Bonde, J.P.E., Hjollund, N.H.I., Henriksen, T.B., Kolstad, H.A., Anderson, A.M., Olsen, J., 2000, Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Human Reproduction* 15, 1562-1567.
- Leib, Z., Bartoov, B., Eltes, F., Servadio, C., 1994, Reduced semen quality caused by chronic abacterial prostatitis: An enigma or reality? *Fertility and Sterility* 61, 1109-1116.
- Levine, R.J., 1999, Seasonal variation of semen quality and fertility. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health* 25, 34-37.
- Lewis, S.E.M., 2007, Is sperm evaluation useful in predicting human fertility. *Reproduction in Domestic Animals* 134, 31-40.
- Lizaraso, A., 2009, Comparación Morfométrica de Espermatozoides Humanos y de Animales Domésticos, Teñidos con la Coloración Árbol de Navidad.
- Long, P.L., Pickett, B.W., Sawyer, H.R., Shideler, R.K., Amann, R.P., Squires, E.L., 1993, Relationship between morphologic and seminal characteristics of equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* 13, 143-149.
- Love, C., Varner, D., Thompson, J., 2000;, Intra- and inter-stallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility. *J Reprod Fertil Suppl* (56), 93-100.
- Love, C.C., 2012, Measurement of Concentration and Viability in Stallion Sperm. *Journal of Equine Veterinary Science* 32, 464-466.
- Love, C.C., Garcia, M.C., Riera, F.R., Kenney, R.M., 1991, Evaluation of measures taken by ultrasonography and caliper to estimate testicular volume and predict daily sperm output in the stallion. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 44, 99-105.
- Love, C.C., Thompson, J.A., Brinsko, S.P., Rigby, S.L., Blanchard, T.L., Lowry, V.K., Varner, D.D., 2003, Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology* 60, 1127-1138.

- Lu, J., Lü, N., Huang, Y., Li, P.S., Fisch, H., 2004, Quality evaluation of three different sperm counting chambers. *Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology* 10, 755-757, 760.
- Ludwig, G., Frick, J., 1990, A simple fluorometric method for the determination of serum free carnitine. *Clin. Chim. Acta.* 171, 311-316.
- Macías García, B., Morrell, J.M., Ortega-Ferrusola, C., González-Fernández, L., Tapia, J.A., Rodríguez-Martínez, H., Peña, F.J., 2009, Centrifugation on a single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed stallion semen. *Animal Reproduction Science* 114, 193-202.
- Magistrini, M., Guitton, E., Levern, Y., Nicolle, J.C., Vidament, M., Kerboeuf, D., Palmer, E., 1997, New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. *Theriogenology* 48, 1229-1235.
- Malo, A., Gomendio, M., Garde, J., Lang-Lenton, B., Soler, A., Roldan, E., 2006a, Sperm design and sperm function. *Biol Letts* 2, 246 - 249.
- Malo, A.F., Gomendio, M., Garde, J., Lang-Lenton, B., Soler, A.J., Roldan, E.R.S., 2006b, Sperm design and sperm function. *Biology Letters* 2, 246-249.
- Manet, B., Vieitez, G., Milhet, P., Richoilley, G., Lesourd, F., Parinaud, J., 2000, Computer-Assisted assessment of sperm morphology: comparison with conventional techniques. *Int. J. Androl* 23.
- Maroto-Morales, A., Ramón, M., García-Álvarez, O., Soler, A.J., Estes, M.C., Martínez-Pastor, F., Pérez-Guzmán, M.D., Garde, J.J., 2010, Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the Sperm-Class Analyzer. *Theriogenology* 73, 437-448.
- Maroto-Morales, A., Ramón, M., García-Álvarez, O., Soler, A.J., Fernández-Santos, M.R., Roldan, E.R.S., Gomendio, M., Pérez-Guzmán, M.D., Garde, J.J., 2012, Morphometrically-distinct sperm subpopulations defined by a multistep statistical procedure in Ram ejaculates: Intra- and interindividual variation. *Theriogenology* 77, 1529-1539.
- Martínez-Pastor, F., Cabrita, E., Soares, F., Anel, L., Dinis, M.T., 2008, Multivariate cluster analysis to study motility activation of *Solea senegalensis* spermatozoa: A model for marine teleosts. *Reproduction* 135, 449-459.
- Martínez-Pastor, F., Díaz-Corujo, A.R., Anel, E., Herraiz, P., Anel, L., De Paz, P., 2005a, Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. *Theriogenology* 64, 958-974.
- Martínez-Pastor, F., García-Macias, V., Alvarez, M., Chamorro, C., Herraiz, P., Paz, P.D., Anel, L., 2006, Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology* 65, 471-485.
- Martínez-Pastor, F., García-Macias, V., Alvarez, M., Herraiz, P., Anel, L., De Paz, P., 2005b, Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. *Biology of Reproduction* 72, 316-327.
- Martínez-Pastor, F., Tizado, E.J., Garde, J.J., Anel, L., de Paz, P., 2011, Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology* 75, 783-795.

- Maxwell, W.M.C., 1996, Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction, Fertility and Development* 8, 1165-1178.
- Maxwell, W.M.C., Johnson, L.A., 1999, Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* 52, 1353-1362.
- Meggiolaro, D., Porcelli, F., Scanziani, E., Consiglio, A.L., Carnevali, A., Ferrandi, B., 2003, ILA 147 immunoreactivity of the bull spermatozoa membrane during epididymal maturation. *Acta Histochemica* 105, 231-238.
- Memon, M.A., Ott, R.S., 1981, Methods of semen preservation and artificial insemination in sheep and goats. *World Rev. Ani. Prod.* 17, 19-25.
- Menkveld, R., Stander, F.S.H., Kotze vW, T.J., Kruger Van Zyl, T.F.J.A., 1990, The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Human Reproduction* 5, 586-592.
- Minoretti, N., Baur, B., 2006, Among- and within-population variation in sperm quality in the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum*. *Behav Ecol Sociobiol* 60, 270 - 280.
- Miró, J., Lobo, V., Quintero-Moreno, A., Medrano, A., Peña, A., Rigau, T., 2005, Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen. *Theriogenology* 63, 1706-1716.
- Miró, J., Taberner, E., Rivera, M., Peña, A., Medrano, A., Rigau, T., Peñalba, A., 2009, Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen. *Theriogenology* 72, 1017-1022.
- Mocé, E., Graham, J.K., 2008, In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science* 105, 104-118.
- Montoto, L.G., Sánchez, M.V., Tourmente, M., Martín-Coello, J., Luque-Larena, J.J., Gomendio, M., Roldan, E.R.S., 2011, Sperm competition differentially affects swimming velocity and size of spermatozoa from closely related murid rodents: Head first. *Reproduction* 142, 819-830.
- Morrow, E.H., Gage, M.J.G., 2001, Consistent significant variation between individual males in spermatozoal morphometry. *Journal of Zoology* 254, 147-153.
- Mortimer, D., 2000a, The future of male infertility management and assisted reproduction technology. *Human Reproduction* 15, 98-110.
- Mortimer, S.T., 1997, A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update* 3, 403-439.
- Mortimer, S.T., 2000b, Casa - Practical aspects. *Journal of Andrology* 21, 515-524.
- Mortimer, S.T., Maxwell, W.M.C., 2004, Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction* 127, 285-291.
- Moruzzi, J.F., Wyrobek, A.J., Mayall, B.H., Gledhill, B.L., 1988, Quantification and classification of human sperm morphology by computer-assisted image analysis. *Fertility and Sterility* 50, 142-152.
- Muiño, R., 2008. Evaluación de la Motilidad y Viabilidad del Semen Bovino Mediante el Uso de Sistemas CASA y Citometría de Flujo Identificación de Subpoblaciones Espermáticas UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA,

- Muiño, R., Peña, A.I., Rodríguez, A., Tamargo, C., Hidalgo, C.O., 2009, Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. *Theriogenology* 72, 860-868.
- Muiño, R., Rivera, M.M., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E., Peña, A.I., 2008a, Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *Animal Reproduction Science* 109, 50-64.
- Muiño, R., Tamargo, C., Hidalgo, C.O., Peña, A.I., 2008b, Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Animal Reproduction Science* 109, 27-39.
- Núñez-Martínez, I., Moran, J.M., Peña, F.J., 2006a, A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: Changes after cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals* 41, 408-415.
- Núñez-Martínez, I., Morán, J.M., Peña, F.J., 2006b, Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. *Journal of Andrology* 27, 596-603.
- Oettle, E.E., 1986, Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology. *Vet Med Mar*, 263-266.
- Olds-Clarke, P., 1996, How does poor motility alter sperm fertilizing ability? *Journal of Andrology* 17, 183-186.
- Ortega-Ferrusola, C., Maclás García, B., Suárez Rama, V., Gallardo-Bolaños, J., González-Fernández, L., Tapia, J., Rodríguez-Martínez, H., Peña, F., 2009, Identification of sperm subpopulations in stallion ejaculates: Changes after cryopreservation and comparison with traditional statistics. *Reproduction in Domestic Animals* 44, 419-423.
- Overstreet, J.W., Katz, D.F., Hanson, F.W., Fonseca, J.R., 1979, A simple inexpensive method for objective assessment of human sperm movement characteristics. *Fertility and Sterility* 31, 162-172.
- Paccamonti, D.L., Buiten, A.V., Parlevliet, J.M., Colenbrander, B., 1999, Reproductive parameters of miniature stallions. *Theriogenology* 51, 1343-1349.
- Pace, M.M., Sullivan, J.J., Elliott, F.I., Graham, E.F., Coulter, G.H., 1981, Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 0.5-ml French straws. *J Anim Sci* 53, 693-701.
- Palmer, E., Magistrini, M., 1992, Automated analysis of stallion semen post-thaw motility. *Acta Vet Scand Suppl.* 88, 137-152.
- Parlevliet, J.M., Kemp, B., Colenbrander, B., 1994, Reproductive characteristics and semen quality in maiden Dutch Warmblood stallions. *Journal of Reproduction and Fertility* 101, 183-187.
- Peña, F.J., Saravia, F., García-Herreros, M., Núñez-Martínez, I., Tapia, J.A., Johannisson, A., Wallgren, M., Rodríguez-Martínez, H., 2005, Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality. *Journal of Andrology* 26, 716-723.
- Pérez-Llano, B., García-Casado, P., Lorenzo, T.L., Sánchez, R. 1998a. Resposte of the boar sperm to the HOS test and relationship between

- HOST and ORT result. In England 15 th 1PVS Congress 69 abstr. (Birmingham).
- Pérez-Llano, B., González, J.L., García-Casado, P., 1998b, Nueva técnica de ORT corta para su evaluación. *Albéitar* 21, 6-7.
- Pérez-Llano, B., Yenes-García, P., García-Casado, P., 2003, Four subpopulations of boar spermatozoa defined according to their response to the short hypoosmotic swelling test and acrosome status during incubation at 37°C. *Theriogenology* 60, 1401-1407.
- Perez-Sanchez, E., de Monserrat, J.J., Soler, C., 1994, Morphometric analysis of human sperm morphology. *International Journal of Andrology* 17, 248-255.
- Pérez-Sanchez, F., Tablado, L., Soler, C., 1998, Quantitative changes in sperm head morphology during passage through the male excurrent duct system of the rabbit. *Mol Reprod Dev* 51, 203-209.
- Petrunkina, A.M., Harrison, R.A.P., 2011, Cytometric solutions in veterinary andrology: Developments, advantages, and limitations. *Cytometry Part A* 79 A, 338-348.
- Phetudomsinsuk, K., Sirinarumitr, K., Laikul, A., Pinyopummin, A., 2008, Morphology and head morphometric characters of sperm in Thai native crossbred stallions. *Acta Veterinaria Scandinavica* 50.
- Pickett, B.W., 1993, Reproductive evaluation of the stallion. Philadelphia, 755-768 pp.
- Pickett, B.W., Voss, J.L., Bowen, R.A., Squires, E.L., McKinnon, A.O., 1988, Seminal characteristics and total scrotal width (T.S.W.) of normal and abnormal stallions. Proceedings of the ... annual convention - American Association of Equine Practitioners., 487-518.
- Pickett, B.W., Voss, J.L., Bowen, R.A., Squires, E.L., McKinnon., A.O., 1987, Seminal characteristics and total scrotal width (T.S.W.) of normal and abnormal stallions. Proceedings of the 33rd Annual Convention of the America of Equine Practitioners., 487-518.
- Pinart, E., Sancho, S., Briz, M.D., Bonet, S., García, N., 1999, Characterization of the semen quality of postpuberal boars with spontaneous unilateral abdominal cryptorchidism on the right side. *Animal Reproduction Science* 55, 269-278.
- Pursel, V.G., Johnson, L.A., 1974, Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology* 1, 63-68.
- Quintero-Moreno, A., Miró, J., Teresa Rigau, A., Rodríguez-Gil, J.E., 2003, Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 59, 1973-1990.
- Quintero-Moreno, A., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E., 2007, Multivariate Cluster Analysis Regression Procedures as Tools to Identify Motile Sperm Subpopulations in Rabbit Semen and to Predict Semen Fertility and Litter Size. *Reproduction in Domestic Animals* 42, 312-319.
- Quintero-Moreno, A., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E., 2004, Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology* 61, 673-690.
- Ramió, L., Rivera, M.M., Ramírez, A., Concha, I.I., Peña, A., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E., 2008, Dynamics of motile-sperm subpopulation structure in boar ejaculates subjected to "in vitro" capacitation and further "in vitro" acrosome reaction. *Theriogenology* 69, 501-512.

- Rigby, S.L., Brinsko, S.P., Cochran, M., Blanchard, T.L., Love, C.C., Varner, D.D., 2001, Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. *Animal Reproduction Science* 68, 171-180.
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Hoflack, G., Maes, D., De Kruif, A., 2004, Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser. *Theriogenology* 62, 1292-1306.
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., De Kruif, A., 2003, Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology* 60, 1553-1568.
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Tanghe, S., Coryn, M., Maes, D., De Kruif, A., 2005, New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. *Theriogenology* 64, 706-719.
- Rivera, M.M., Quintero-Moreno, A., Barrera, X., Palomo, M.J., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E., 2005, Natural Mediterranean photoperiod does not affect the main parameters of boar-semen quality analysis. *Theriogenology* 64, 934-946.
- Rivera, M.M., Quintero-Moreno, A., Barrera, X., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E., 2006, Effects of constant, 9 and 16-h light cycles on sperm quality, semen storage ability and motile sperm subpopulations structure of boar semen. *Reproduction in Domestic Animals* 41, 386-393.
- Roca, J., Martínez, E., Vázquez, J.M., Coy, P., 1992, Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area. *Animal Reproduction Science* 29, 255-262.
- Rodríguez-Gil, J.E., Montserrat, A., Rigau, T., 1994, Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology* 42, 815-829.
- Rodríguez-Martínez, H., 2000., Evaluación del semen congelado: métodos tradicionales y de actualidad. Ithaca, New York, International Veterinary Information Service.
- Rodríguez-Martínez, H., Tienthai, P., Suzuki, K., Funahashi, H., Ekwall, H., Johannisson, A., 2001, Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement* 58, 129-145.
- Roldan, E.R.S., Cassinello, J., Abaigar, T., Gomendio, M., 1998, Inbreeding, fluctuating asymmetry and ejaculate quality in an endangered ungulate. *Proc R Soc Lond B*. 265, 243-248.
- Rubio-Guillén, J., González, D., Garde, J.J., Estes, M.C., Fernández-Santos, M.R., Rodríguez-Gil, J.E., Madrid-Bury, N., Quintero-Moreno, A., 2007, Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reproduction in Domestic Animals* 42, 354-357.
- Rubio-Guillén, J.L., Quintero-Moreno, A.A., González Villalobos, D.M., 2009, Effect of cryopreservation on integrity of plasmatic and acrosomal membrane of bulls sperm. Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros 19, 382-389.
- Saacke, R.G., 1972, Introduction. *Journal of Dairy Science* 55, 1307.
- Saacke, R.G., 2008, Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology* 70, 473-478.
- Saacke, R.G., 1982, Components of semen quality. *J Anim Sci* 55, 1-13.

- Saacke, R.G., Dalton, J.C., Nadir, S., Nebel, R.L., Bame, J.H., 2000, Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Animal Reproduction Science* 60-61, 663-677.
- Saacke, R.G., Marshall, C.E., 1968, Observations on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 16, 511-514.
- Saacke, R.G., Vinson, W.E., O` Connor, I.V.L., Chandler, T.E., Mullins, J., Amann, R.P., Marshall, C.E., Wallace, R.A., Vincel, W.N., Kellgren, H.C., 1980, The relationship of semen quality and fertility: a heterospermic study. *Proc 8th NAAB Tech Conf AI Reprod*, 71-78.
- Samper, J.C. 2009a. *Equine breeding management and artificial insemination*, 2nd, ed., p. 58.
- Samper, J.C. 2009b. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*, 2nd, ed., p. 57.
- Samper, J.C. 2009c. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*, 2nd, ed., p. 59.
- Samper, J.C. 2009d. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*, 2nd, ed., p. 51.
- Samper, J.C. 2009e. *Equine breeding management and artificial insemination*, 2nd, ed., p. 62.
- Samper, J.C., Hellander, J.C., Crabo, B.G., 1991, Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *J Reprod Fertil Suppl* 44, 107-114.
- Sancho, M., Pérez-Sánchez, F., Tablado, L., De Monserrat, J.J., Soler, C., 1998, Computer assisted morphometric analysis of ram sperm heads: Evaluation of different fixative techniques. *Theriogenology* 50, 27-37.
- Saravia, F., Núñez-Martínez, I., Morán, J.M., Soler, C., Muriel, A., Rodríguez-Martínez, H., Peña, F.J., 2007, Differences in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity. *Theriogenology* 68, 196-203.
- Schäfer-Somi, S., Aurich, C., 2007, Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. *Animal Reproduction Science* 102, 1-13.
- Schulte-Hostedde, A., Millar, J., 2004, Intraspecific variation of testis size and sperm length in the yellow-pine chipmunk (*Tamias amoenus*): implications for sperm competition and reproductive success. *Behav Ecol Sociobiol* 55, 272 - 277.
- Sekoni, V.O., Gustafsson, B.K., 1987, Seasonal variations in the incidence of sperm morphological abnormalities in dairy bulls regularly used for artificial insemination. *British Veterinary Journal* 143, 312-317.
- Serres, C., Feneux, D., Jouannet, P., David, G., 1984, Influence of the flagellar wave development and propagation on the human sperm movement in seminal plasma. *Gamete Research* 9, 183-195.
- Setchell, B.P., Sánchez-Partida, L.G., Chairussyuhur, A., 1993., Epididymal constituents and related substances in the storage of spermatozoa: a review. *Reprod Fertil Dev* 5(6), 601-612.
- Sieme, H., Echte, A., Klug, E., 2002, Effect of frequency and interval of semen collection on seminal parameters and fertility of stallions. *Theriogenology* 58, 313-316.

- Sieme, H., Katila, T., Klug, E., 2004, Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology* 61, 769-784.
- Sieme, H., Martinsson, G., Rauterberg, H., Walter, K., Aurich, C., Petzoldt, R., Klug, E., 2003, Application of Techniques for Sperm Selection in Fresh and Frozen-Thawed Stallion Semen. *Reproduction in Domestic Animals* 38, 134-140.
- Söderquist, L., Madrid-Bury, N., Rodriguez-Martinez, H., 1997, Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology* 48, 1115-1125.
- Soler, C., Gadea, B., Soler, A.J., Fernández-Santos, M.R., Estes, M.C., Núñez, J., Moreira, P.N., Núñez, M., Gutiérrez, R., Sancho, M., Garde, J.J., 2005a, Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red deer sperm morphometry by computerized analysis with ISAS®. *Theriogenology* 64, 1236-1243.
- Soler, C., Gaßner, P., Nieschlag, E., de Montserrat, J.J., Gutiérrez, R., Sancho, M., Buendía, P., Álvarez, J.G., Behre, H.M., Cooper, T.G., 2005b, Use of the integrated semen analysis system (ISAS®) for morphometric analysis and its role in assisted reproduction technologies. *Utilización del Integrated Semen Analysis System (ISAS)® para el análisis morfométrico espermático humano y su significado en las técnicas de reproducción asistida* 3, 112-119.
- Sousa, A.P.M., Gomes-Santos, C.S.S., Ramalho-Santos, J., 2006, Localization of SNAREs., NSF and Caveolin 1 in human spermatozoa: Relationship with seminal parameters. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 52, 347-353.
- Steigerwald, P., Krause, W., 1998, Estimation of sperm morphology using a new CASA system. *Andrologia* 30, 23-27.
- Steinley, D., Brusco, M.J., 2008, Selection of variables in cluster analysis: An empirical comparison of eight procedures. *Psychometrika* 73, 125-144.
- Stockley, P., Gage, M., Parker, G., Moller, A., 1997, Sperm competition in fishes: the evolution of testis size and ejaculate characteristics. *Am Nat* 149, 933 - 954.
- Stoltz, J., Neff, B., 2006, Sperm competition in a fish with external fertilization: the contribution of sperm number, speed and length. *J Evol Biol* 19, 1873 - 1881.
- Talbot, P., Chacon, R.S., 1981, A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *Journal of Experimental Zoology* 215, 201-208.
- Thurston, L.M., Watson, P.F., Holt, W.V., 1999, Sources of variation in the morphological characteristics of sperm subpopulations assessed objectively by a novel automated sperm morphology analysis system. *Journal of Reproduction and Fertility* 117, 271-280.
- Thurston, L.M., Watson, P.F., Mileham, A.J., Holt, W.V., 2001, Morphologically distinct sperm subpopulations defined by fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *Journal of Andrology* 22, 382-394.
- Tourmente, M., Gomendio, M., Roldan, E.R.S., Gójalas, L.C., Chiaraviglio, M., 2009, Sperm competition and reproductive mode influence sperm dimensions and structure among snakes. *Evolution* 63, 2513-2524.

- Trimeche, A., Yvon, J.M., Vidament, M., Palmer, E., Magistrini, M., 1999, Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 52, 181-191.
- Tuli, R.K., Schmidt-Baulain, R., Holtz, W., 1992, Computer-assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen-thawed semen of the bull, boar and goat. *Theriogenology* 38, 487-490.
- Turner, R.M., 2003, Tales from the Tail: What Do We Really Know about Sperm Motility? *Journal of Andrology* 24, 790-803.
- Uwland, J., 1984, Correlation between the number of inseminated spermatozoa and results of fertilization in dairy cattle. *Verband tussen het aantal geïnsemineerde zaadcellen en de bevruchtingsresultaten bij melkvee*. 109, 405-412.
- Vantman, D., Banks, S.M., Koukoulis, G., Dennison, L., Sherins, R.J., 1989, Assessment of sperm motion characteristics from fertile and infertile men using a fully automated computer-assisted semen analyzer. *Fertility and Sterility* 51, 156-161.
- Vantman, D., Gutiérrez, G., Madariaga, M., Ponce, J., Smith, R., 1994, Variability of seminal analysis and of objective parameters of sperm motility in semen during sperm capacitation in subjects with proved fertility. *Variabilidad del análisis seminal y de los parámetros objetivos del movimiento espermático en semen y durante la capacitación espermática en individuos con fertilidad probada*. 59, 197-202.
- Vantman, D., Koukoulis, G., Dennison, L., Zinaman, M., Sherins, R.J., 1988, Computer-assisted semen analysis: Evaluation of method and assessment of the influence of sperm concentration on linear velocity determination. *Fertility and Sterility* 49, 510-515.
- Varner, D.D., 2008, Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* 70, 448-462.
- Varner, D.D., Blanchard, T.L., Love, C.L., Garcia, M.C., Kenney, R.M., 1987, Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology* 28, 709-723.
- Varner, D.D., Vaughan, S.D., Johnson, L., 1991, Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoal motility. *Am J Vet Res*. 52, 224-230.
- Vázquez, J.M., Martínez, E., Pastor, L.M., Roca, J., Matas, C., Calvo, A., 1996, Lectin histochemistry during in vitro capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa: New lectins for evaluating acrosomal status of boar spermatozoa. *Acta Histochemica* 98, 93-100.
- Vázquez, J.M., Martínez, E., Roca, J., Coy, P., Ruiz, S., 1992, Use of triple stain technique for simultaneous assessment of vitality and acrosomal status in boar spermatozoa. *Theriogenology* 38, 843-852.
- Vázquez, J.M., Martínez, E.A., Roca, J., Blanco, O., Lucas, X., Matás, C., 1997, Utilización del analizador de imágenes para la evaluación de la motilidad de los espermatozoides de verraco. *IV Simposium Internacional de Reproducción e Inseminación Artificial*, 83-90.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K., 2002, Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 149-179.
- Vidament, M., Vincent, P., Martin, F.X., Magistrini, M., Blesbois, E., 2009, Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and

- frozen semen containing glycerol or not. *Animal Reproduction Science* 112, 22-35.
- Vogel, S., 1994, Life in moving fluids.
- Voss, J.L., Pickett, B.W., Squires, E.L., 1981, Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 178, 287-289.
- Waite, J.A., Love, C.C., Brinsko, S.P., Teague, S.R., Salazar, J.L., Jr., Mancill, S.S., Varner, D.D., 2008, Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. *Theriogenology* 70, 704-714.
- Warnke, C., Tuchscherer, A., Alm, H., Kanitz, W., Blottner, S., Torner, H., 2003, Characterisation of movement pattern and velocities of stallion spermatozoa depending on donor, season and cryopreservation. *Acta Veterinaria Hungarica* 51, 395-408.
- Watson, P.F., 1975, Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Veterinary Record* 97, 12-15.
- Wells, M.E., Awa, O.A., 1970, New Technique for Assessing Acrosomal Characteristics of Spermatozoa. *Journal of Dairy Science* 53, 227-232.
- Wenkoff, M.S., 1975, The use of prostaglandins in reproduction. *Canadian Veterinary Journal* 16, 97-101.
- WHO 1999. *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm Cervical Mucus* International Press, C.U., ed.
- Wilson-Leedy, J.G., Ingermann, R.L., 2007, Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 67, 661-672.
- Xu, R., Wunsch li, D., 2005, Survey of clustering algorithms. *IEEE Transactions on Neural Networks* 16, 645-678.
- Yanagimachi, R., Okada, A., Tung, K.S.K., 1981, Sperm autoantigens and fertilization: II. Effects of anti-guinea pig sperm autoantibodies on sperm-ovum interactions. *Biology of Reproduction* 24, 512-518.
- Yeung, K.Y., Ruzzo, W.L., 2001, Principal component analysis for clustering gene expression data. *Bioinformatics* 17, 763-774.