



Variaciones en la estructura subpoblacional cinemática del semen criopreservado de ganado lechero*

Kinematic subpopulation structure variations in cryopreserved semen from dairy cattle

Juan M. Solís¹, Francisco Sevilla², Ignacio Araya-Zúñiga³, Kenneth Matamoros¹, Laura Murillo¹, Patricia Cervantes⁴, Antonio Hernández⁴, Anthony Valverde¹

* Recepción: 14 de enero, 2025. Aceptación: 26 de febrero, 2025. Este trabajo formó parte del proyecto de investigación VIE-5402-2151-1016 “Protaminas: Evolución y papel en la protección del ADN espermático, formación de la cabeza y funcionamiento celular (PROTASPERM)” inscrito en la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

¹ Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Agronomía, Centro de Investigación y Desarrollo en Agricultura Sostenible del Trópico Húmedo, Laboratorio de Reproducción Animal, Campus Tecnológico Local San Carlos, Alajuela, Costa Rica. solissalazarjuanmanuel@gmail.com (<https://orcid.org/0009-0005-8293-3748>); kenneth.matamoros@estudiantec.cr (<https://orcid.org/0000-0002-0827-9726>); anvalverde@tec.ac.cr (autor para correspondencia, <https://orcid.org/0000-0002-3191-6965>).

² Instituto Tecnológico de Costa Rica, Universidad Nacional, Universidad Estatal a Distancia, Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE). Alajuela, Costa Rica. f.sevilla@tec.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0003-1480-4141>).

³ Instituto Tecnológico de Costa Rica, Área Académica del DOCINADE, Maestría en Ciencia y Tecnología para la Sostenibilidad, igaraya@estudiantec.cr (<https://orcid.org/0000-0002-4292-2287>).

⁴ Universidad Veracruzana, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Maestría en Ciencia Animal, Biología de la Reproducción Animal, Cuerpo académico Biotecnología y Reproducción, Veracruz 91710, México. pcervantes@uv.mx (<https://orcid.org/0000-0002-6695-4793>); anhernandez@uv.mx (<https://orcid.org/0000-0001-9719-6537>).

Resumen

Introducción. En la industria lechera, el semen congelado-descongelado es importante para la inseminación artificial y mejora genética del ganado. **Objetivo.** Evaluar la variación en la estructura subpoblacional cinemática del semen congelado-descongelado en razas Jersey y Holstein usando un sistema CASA-mot. **Materiales y métodos.** El estudio se realizó de abril a noviembre de 2023, en el Laboratorio de Reproducción Animal (AndroTEC), ubicado en el Campus Tecnológico Local San Carlos, Alajuela, Costa Rica. Se utilizaron ocho animales de las razas Holstein y Jersey, y se analizaron nueve dosis de semen congelado-descongelado por animal para cada raza. Se descongelaron a 37 °C durante 30 s, 72 dosis de semen de ocho toros (cuatro de cada raza). La movilidad y las variables cinemáticas se analizaron utilizando la tecnología CASA-mot (Computer-Assisted Semen Analysis). **Resultados.** La raza Jersey presentó mayores porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y rápidos en comparación con la raza Holstein ($P < 0,05$). El análisis de factores principales reveló dos factores significativos que explicaron el 87,5 % de la varianza total en las variables cinemáticas. Las variables cinemáticas entre subpoblaciones espermáticas (SP) presentaron diferencias ($P < 0,05$) en ambas razas. La subpoblación SP2 fue la más veloz, con valores más altos en velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL) y velocidad de trayectoria promedio (VAP) tanto para los toros Holstein como los Jersey. **Conclusiones.** Se encontraron diferencias cinemáticas entre las subpoblaciones identificadas para ambas razas. Los patrones cinemáticos de las subpoblaciones presentes en el eyaculado podrían influir en la fertilidad y rendimiento reproductivo.

Palabras clave: ciencia animal, calidad del semen, espermatozoide, toros, movilidad espermática, inseminación artificial.



Abstract

Introduction. In the dairy industry, frozen-thawed semen is crucial for artificial insemination and genetic improvement of livestock. **Objective.** To evaluate the variation in the kinematic subpopulation structure of frozen-thawed semen in Jersey and Holstein breeds using a CASA-mot system. **Materials and Methods.** The study was carried out from April to November 2023, at the Animal Reproduction Laboratory (AndroTEC), located at the Campus Tecnológico Local San Carlos, Alajuela, Costa Rica. Eight animals from the Holstein and Jersey breeds were used, and nine doses of frozen-thawed semen per animal were analyzed for each breed. A total of 72 semen doses from eight bulls (four from each breed) were thawed at 37° C for 30 s. Sperm motility and kinematic variables were analyzed using CASA-mot (Computer-Assisted Semen Analysis) technology. **Results.** The Jersey breed showed higher percentages of total motile, progressive motile, and rapid spermatozoa compared to the Holstein breed ($P < 0.05$). Principal component analysis revealed two significant factors explaining 87.5 % of the total variance in kinematic variables. The kinematics variables between sperm subpopulations (SPs) showed differences ($P < 0.05$) in both breeds. The subpopulation SP₂ was the fastest, with higher values in curvilinear speed (VCL), straight-line speed (VSL) and average trajectory speed (VAP) for Holstein and Jersey bulls. **Conclusions.** Kinematics differences were found between the subpopulations identified for both breeds. The kinematic patterns of the subpopulations present in the ejaculate could influence fertility and reproductive performance.

Keywords: animal science, semen quality, spermatozoa, bulls, sperm motility, artificial insemination.

Introducción

En la industria lechera, el semen congelado-descongelado se utiliza principalmente en inseminación artificial (IA) (Chicaiza-Cabezas et al., 2023), lo que favorece la mejora genética del ganado lechero (Koch et al., 2022). La variabilidad en la calidad del semen congelado-descongelado tiene una base genética (Selvaraju et al., 2018), sin embargo, también existen factores moleculares, como la presencia de proteínas específicas asociadas con la criotolerancia, que podrían influir en la capacidad de congelación del semen (Gomes et al., 2020). Además, los factores ambientales, por ejemplo, la temperatura y el tiempo de descongelación pueden influir en la eficiencia del proceso y la calidad del semen después de la descongelación (Yáñez-Ortiz et al., 2022).

La fertilidad de los toros utilizados en inseminación artificial debe considerar la calidad inicial de los eyaculados mediante la determinación de las características óptimas en los espermatozoides (Yániz et al., 2015). Los eyaculados se pueden considerar como conjuntos heterogéneos que se distribuyen mediante subpoblaciones espermáticas y que pueden explicar los cambios en la fertilidad de los machos (Martínez-Pastor, 2021; Valverde, Castro-Morales, et al., 2019). Esto remarca la idea de que hay variación individual entre machos respecto de la fertilidad (Valverde et al., 2016) y es necesario evaluar con mayor exactitud y precisión la calidad seminal de los reproductores.

Se ha demostrado que la validación de protocolos óptimos de descongelación del semen criopreservado (Solís et al., 2024), puede mejorar los parámetros de movilidad de los espermatozoides y la preservación de la integridad celular (Layek et al., 2016). Estos protocolos deben incluir la valoración de la calidad espermática mediante métodos objetivos de análisis (Gallagher et al., 2018; Mortimer & De Jonge, 2018; Soler, Valverde, et al., 2017; Yáñez, Silvestre, et al., 2018). Esto se logra mediante la evaluación *in vitro* de la movilidad espermática con sistemas computacionales de análisis espermático (*Computer-assisted semen analysis*, CASA) (Bompart et al., 2019; Gacem et al., 2020).

La caracterización de los eyaculados mediante subpoblaciones espermáticas en función de variables cinemáticas es posible debido a la tecnología CASA. Esto ha permitido caracterizar subpoblaciones espermáticas

en diversas especies como bovinos de leche (Valverde et al., 2016), bovinos de carne (Araya-Zúñiga et al., 2024), ovino (Barbas et al., 2018), caprino (Vázquez et al., 2015), verraco (Valverde, Madrigal, et al., 2019), caballos (Gacem et al., 2021), burros (Gacem et al., 2020), conejo (Quintero-Moreno et al., 2007), llama (Cucho et al., 2021). La información que se obtiene de estos análisis permite describir funcionalmente a los gametos masculinos y considera la variación intrínseca de los eyaculados (Barquero, Roldan, Soler, Yániz, et al., 2021; Barquero, Soler, et al., 2021; Holt & Satake, 2018).

También se han realizado análisis de subpoblaciones espermáticas en otras especies de animales como perros (Soler, Alambiaga, et al., 2017; Valverde, Arnau, et al., 2019), zorro (Soler, Contell, et al., 2017), venado (Cucho et al., 2022), salmón (Caldeira et al., 2018; 2019), cocodrilo (Valverde et al., 2021), caimán (Valverde, Madrigal-Valverde, et al., 2019), aves (García-Herreros, 2016) y humano (García-Molina et al., 2022; 2023).

El análisis de subpoblaciones espermáticas ha permitido tener un mayor entendimiento de cómo funciona el eyaculado en las especies y explicar el fenómeno de la fertilidad (Valverde et al., 2021). Desde un punto visto biológico la distribución de subpoblaciones en el eyaculado ha servido de base para plantear la hipótesis del mecanismo de selección espermática que ha permitido el éxito de las especies con el paso de los años (Martínez-Pastor, 2021).

La evaluación de temperatura y tiempo de descongelado del semen puede proporcionar información adicional para evaluar los efectos del proceso de descongelación mediante pruebas de resistencia térmica (TRT) (Solís et al., 2024). La TRT busca simular las condiciones del tracto reproductivo femenino (Schulze et al., 2019). Las muestras de esperma son heterogéneas (Valverde et al., 2016), lo que implica que en el mismo eyaculado coexisten espermatozoides con diferentes patrones cinemáticos y de movilidad (García-Molina et al., 2020; Valverde, Castro-Morales, et al., 2019; Viquez et al., 2021).

Actualmente, el eyaculado se puede considerar como un conglomerado de subpoblaciones de espermatozoides bien definido, cuyo significado biológico se está entendiendo mejor en diversas especies (Barquero, Roldan, et al., 2021; Viquez et al., 2020). Esto ha conllevado a mejorar la caracterización de las subpoblaciones para explicar con mayor precisión la fertilidad potencial que pueda tener un eyaculado (Ibanescu et al., 2020). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la variación en la estructura subpoblacional sobre la cinemática del semen congelado-descongelado en ganado lechero a través de un sistema CASA-mot.

Materiales y métodos

Aprobación ética

Este estudio fue aprobado por el Comité de Revisión Institucional siguiendo principios éticos, y por el Comité del Centro de Investigación y Desarrollo en Agricultura Sostenible para el Trópico Húmedo del Instituto Tecnológico de Costa Rica (CIDASTH-ITCR), según la Sección 08/2023, artículo 5.0, DAGSC-075-2023 y CIE-206-2023.

Período de estudio y ubicación

El presente estudio se realizó de abril a noviembre de 2023, en el Laboratorio de Reproducción Animal (AndroTEC), ubicado en el Campus Tecnológico Local San Carlos, del Instituto Tecnológico de Costa Rica, ubicado en Santa Clara, Florencia, San Carlos, Alajuela, Costa Rica (CRTM05; X: 444296 Y: 1146016), que se encuentra a una altitud de 70 m s. n. m, y en condiciones climatológicas de trópico húmedo.

Dosis de semen, procedimientos de descongelación y diseño del estudio

En este estudio se utilizaron 72 dosis de semen congelado-descongelado de ocho toros de dos razas (Holstein, $n=4$; Jersey, $n=4$). Para los análisis se utilizaron nueve dosis de semen por toro, las cuales estaban envasadas en pajillas de 0,25 mL de volumen y almacenadas en un tanque criogénico MVE® XC 20 Signature (MVE Biological Solutions, Ball Ground, GA, EE. UU.). Cada dosis utilizada se descongeló en un baño de agua de laboratorio termorregulado (Digisystem Laboratory Instruments Inc., New Taipei City, Taiwán), a 37 °C durante 30 s. Después de la descongelación, el contenido de cada pajilla se diluyó 1:10 (vol:vol) con un diluyente comercial OptiXcell® (IMV, L'Aigle, Francia) en tubos Eppendorf® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.).

Evaluación del semen

El análisis se realizó mediante el sistema CASA-mot ISAS®v1 (Sistema Integrado de Análisis de Semen, Proiser I+D, Paterna, España) equipado con una cámara de vídeo (Proiser 782M, Proiser I+D) que capturaba imágenes a 50 fotogramas por segundo (fps) y una resolución final de 768 × 576 píxeles. La cámara se conectó a un microscopio UB203 (UOP/Proiser R+D) con un ocular de 1× y un objetivo de contraste de fase negativa de 10× (AN 0,25). El microscopio tenía una platina térmica integrada fijada a $37,0 \pm 0,5$ °C. Se colocaron submuestras de 3 µL de semen descongelado en una cámara de recuento Spermatrack® (Proiser I+D., Paterna España) precalentada a 37 °C. Para cada una de las muestras evaluadas se realizaron dos réplicas. Se capturaron al menos siete campos microscópicos, con un total mínimo de 600 espermatozoides y registrándose su motilidad y cinemática. Los porcentajes de motilidad total (TM) y motilidad progresiva (PM), junto con la velocidad rectilínea (VSL, µm s⁻¹), velocidad curvilínea (VCL, µm s⁻¹), velocidad de trayectoria promedio (VAP, µm s⁻¹), frecuencia de cruce (BCF, Hz), desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, µm), linealidad (LIN=VSL/VCL·100), rectitud (STR=VSL/VAP·100) y oscilación (WOB=VAP/VCL·100) se utilizaron para los análisis.

Análisis estadístico

Los supuestos de normalidad y homocedasticidad se evaluaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk y Levene. Además, la normalidad de los parámetros espermáticos se evaluó mediante la prueba probabilística normal. Una vez probadas las hipótesis de distribución normal y homogeneidad de varianzas, se realizó un ANDEVA de medias repetidas. El efecto de la raza sobre las características cinemáticas del esperma bovino se analizó mediante ANDEVA de medidas repetidas. Se utilizaron modelos generales lineales y mixtos para evaluar las variables cinemáticas y de movilidad del esperma bovino. Se realizaron pruebas de comparación múltiple mediante el método de mínimos cuadrados, con una corrección de Bonferroni y un nivel de significación estadística $P < 0,05$.

Se creó un subconjunto de datos a partir de las ocho variables cinemáticas. Se realizaron procedimientos multivariados para identificar grupos a partir de este subconjunto de datos cinemáticos de espermatozoides. Todos los valores de las variables cinemáticas fueron estandarizados para evitar cualquier efecto de escala. Se realizó un análisis de factores principales (PFA, por sus siglas en inglés) sobre estos datos para derivar una pequeña cantidad de combinaciones lineales que aún conservaban la mayor cantidad de información posible de las variables originales. Las comunales previas para este análisis se estimaron a partir del coeficiente máximo de correlación absoluta entre cada variable y cualquier otra. El número de factores principales (FP) a extraer se determinó a partir del criterio de Kaiser, es decir, se seleccionaron solo aquellos con un valor propio > 1 . También se obtuvo la estadística KMO (Kaiser-Meyer-Olkin) como medida de la adecuación del conjunto de datos para la extracción de factores. Como método de rotación se utilizó el método Varimax con normalización de Kaiser.

Se exploraron las correlaciones entre factores y variables cinemáticas originales para comprender mejor el significado de los factores extraídos. Además, se realizó un análisis para clasificar los espermatozoides en un número reducido de grupos, según las puntuaciones obtenidas del análisis factorial. Esto se logró en dos fases con la combinación de procedimientos de agrupamiento jerárquico y no jerárquico. En primer lugar, las puntuaciones de los factores para todos los eyaculados se agruparon jerárquicamente utilizando el método de varianza mínima de Ward. En segundo lugar, el número óptimo de conglomerados obtenido en el análisis anterior se utilizó como número objetivo de conglomerados en un análisis de conglomerados de K-medias no jerárquico.

Se aplicó además un ANDEVA para evaluar las diferencias estadísticas entre grupos para todas las variables cinemáticas. El umbral de significación se definió como $P < 0,05$. Además, se realizó una comparación por pares entre las medias de los grupos mediante la prueba de Tukey-Kramer. Los resultados se presentaron como media $\pm$ desviación estándar de la media. Todos los datos se analizaron utilizando el programa estadístico IBM SPSS, versión 23.0, para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

Resultados

Los toros Jersey presentaron valores mayores de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y espermatozoides con movimiento categorizado como rápido que los toros Holstein ($P < 0,05$; Cuadro 1). Los porcentajes de las variables de movilidad espermática categorizados con movimiento medio y lento no fueron significativamente diferentes entre las dos razas. Así mismo, no hubo diferencias entre los porcentajes de morfo-anomalías espermáticas entre razas.

Cuadro 1. Variables de movilidad espermática (media $\pm$ EEM) en dosis seminales congeladas-descongeladas de ganado lechero. Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Laboratorio de Reproducción Animal, Costa Rica, 2023.

Table 1. Sperm motility variables (mean $\pm$ SEM) in frozen-thawed semen doses from dairy cattle. Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Laboratorio de Reproducción Animal, Costa Rica, 2023.

Variable (%)	Raza	
	Jersey	Holstein
Movilidad total	67,88 $\pm$ 3,66 ^b	55,51 $\pm$ 3,50 ^a
Movilidad progresiva	46,54 $\pm$ 2,46 ^b	38,07 $\pm$ 2,36 ^a
Movilidad progresiva (% del total de móviles)	69,27 $\pm$ 1,55 ^a	70,66 $\pm$ 1,49 ^a
Espermatozoides rápidos*	65,66 $\pm$ 3,65 ^b	52,89 $\pm$ 3,49 ^a
Espermatozoides medios	1,97 $\pm$ 0,18 ^a	2,24 $\pm$ 0,17 ^a
Espermatozoides lentos	0,26 $\pm$ 0,09 ^a	0,38 $\pm$ 0,08 ^a
Morfología normal	85,75 $\pm$ 2,10 ^a	90,00 $\pm$ 2,14 ^a
Morfología anormal	14,25 $\pm$ 2,11 ^a	10,00 $\pm$ 2,15 ^a

EEM = error estándar de la media. * Espermatozoides con movimiento categorizado como rápido ($>45 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). ^{a,b} Superíndices con diferente letra en una misma fila indican diferencias entre razas. $P < 0,05$. SEM = standard error of the mean. * Spermatozoa with movement categorized as rapid ($>45 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). ^{a,b} Superscripts with different letters in the same row indicate differences between breeds. $P < 0,05$.

El análisis de factores principales indicó un valor estadístico KMO (Kaiser, Meyer, Olkin) de 0,61, y las estimaciones finales de comunalidad estuvieron por encima de 0,90 para todas las variables cinemáticas, excepto BCF (0,05). Según el criterio de Kaiser, de estos datos se extrajeron dos FP significativos, que representaron el 87,50 % de la varianza total. El primer FP, definido como trayectoria lineal (PF_1), fue responsable del 45,40 % de la varianza y se asoció principalmente con las variables cinemáticas LIN, WOB, STR y VSL, con la mayor correlación para LIN (0,985). El segundo PF, definido como velocidad (PF_2), estuvo fuertemente asociado con las variables VCL, ALH, VAP y VSL, con la mayor correlación para VCL (0,983) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Valores propios (correlaciones) entre variables de cinética espermática en semen criopreservado de ganado lechero (solución rotada) y factores principales (PF_1 , PF_2)*. Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Laboratorio de Reproducción Animal, Costa Rica, 2023.

Table 2. Eigenvalues (correlations) between sperm kinematic variables in cryopreserved semen from dairy cattle (rotated solution) and principal components (PC_1 , PC_2)*. Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Laboratorio de Reproducción Animal, Costa Rica, 2023.

Variable	PF_1 (Lineal)	PF_2 (Velocidad)
LIN	0,98	
WOB	0,84	
STR	0,79	
VSL	0,72	0,66
VCL		0,98
ALH		0,92
VAP		0,79
BCF		-
Var Exp (%)	45,40	42,10

Var Exp: varianza explicada en cada factor principal. Varianza total explicada: 87,50 %. *Expresa las variables más importantes en cada FP. Solo autovalores > 0,6 se presentan. VCL: velocidad curvilínea ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$); VSL: velocidad rectilínea ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$); VAP: velocidad promedio ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$); LIN: índice de linealidad; STR: índice de rectitud; WOB: índice de oscilación; ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; BCF: frecuencia de entrecruzamiento. Var Exp: variance explained by each principal component. Total variance explained: 87.50%. *Indicates the most important variables in each PC. Only eigenvalues > 0.6 are presented. VCL = curvilinear velocity ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$); VSL = straight line velocity ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$); VAP = average path velocity ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$); LIN = linearity of forward progression (%); STR = straightness (%); WOB = wobble (%); ALH = amplitude of lateral head displacement (μm); BCF = beat-cross frequency (Hz).

El semen bovino congelado-descongelado se agrupó en tres grupos de acuerdo con la varianza mínima jerárquica de Ward, seguido de procedimientos de agrupamiento de k-medias no jerárquicos (Cuadro 3). Los parámetros cinemáticos caracterizaron el movimiento de los espermatozoides como: subpoblación 2 (SP_2), que fueron los espermatozoides con mayor VCL y VSL ($229,65 \pm 0,57 \mu\text{m s}^{-1}$; $104,18 \pm 0,41 \mu\text{m s}^{-1}$, respectivamente). Estos eyaculados presentan espermatozoides con mayor BCF y ALH ($15,70 \pm 0,08 \text{ Hz}$; $5,35 \pm 0,01 \mu\text{m}$, respectivamente).

Cuadro 3. Variables cinemáticas (media $\pm$ EEM) de tres subpoblaciones (SPs) espermáticas en dosis seminales congeladas-descongeladas de ganado lechero. Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Laboratorio de Reproducción Animal, Costa Rica, 2023.

Table 3. Kinematic variables (mean $\pm$ SEM) of four sperm subpopulations (SPs) in frozen-thawed semen doses from dairy cattle. Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Laboratorio de Reproducción Animal, Costa Rica, 2023.

Variable	SP ₁	SP ₂	SP ₃
VCL	106,64 $\pm$ 0,50 ^a	229,65 $\pm$ 0,57 ^c	127,59 $\pm$ 0,56 ^b
VSL	26,29 $\pm$ 0,37 ^a	104,18 $\pm$ 0,41 ^c	84,52 $\pm$ 0,41 ^b
VAP	48,33 $\pm$ 0,34 ^a	121,08 $\pm$ 0,38 ^c	89,37 $\pm$ 0,37 ^b
LIN	24,94 $\pm$ 0,16 ^a	45,52 $\pm$ 0,18 ^b	65,72 $\pm$ 0,17 ^c
STR	54,69 $\pm$ 0,22 ^a	84,05 $\pm$ 0,25 ^b	91,55 $\pm$ 0,25 ^c
WOB	45,80 $\pm$ 0,13 ^a	53,06 $\pm$ 0,15 ^b	70,24 $\pm$ 0,14 ^c
ALH	3,14 $\pm$ 0,01 ^b	5,35 $\pm$ 0,01 ^c	2,72 $\pm$ 0,01 ^a
BCF	9,17 $\pm$ 0,07 ^a	15,70 $\pm$ 0,08 ^c	15,38 $\pm$ 0,08 ^b

EEM = Error estándar de la media. SP₁: Lentos, no progresivos y movimiento no ondulatorio; SP₂: Rápidos, velocidad alta y progresiva; SP₃: Velocidad media y progresivos y movimiento ondulatorio; Número de dosis seminales = 72. VCL: Velocidad curvilínea ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$); VSL: Velocidad rectilínea ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$); VAP: Velocidad promedio ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$); LIN: Índice de linealidad (%); STR: Índice de rectitud (%); WOB: Índice de oscilación (%); ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μm); BCF: Frecuencia de entrecruzamiento (Hz). ^{a-c} Diferentes letras indican diferencias entre subpoblaciones espermáticas. $P < 0,05$. / SEM: Standard error of the mean. SP₁: Slow, non-progressive, and non-wavy movement; SP₂: Rapid, high-speed, and progressively motile spermatozoa; SP₃: Medium velocity and linear progressive. A total of 72 semen doses were analyzed. VCL = Curvilinear velocity ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$); VSL = Straight line velocity ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$); VAP = Average path velocity ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$); LIN = Linearity of forward progression (%); STR = Straightness (%); WOB = Wobble (%); ALH = Amplitude of lateral head displacement (μm); BCF = Beat-cross frequency (Hz). ^{a-c} Different letters indicate significant differences between sperm subpopulations. $P < 0.05$.

La subpoblación 3 (SP₃) incluyó espermatozoides caracterizados por VSL alto ($84,52 \pm 0,41 \mu\text{m s}^{-1}$) y los valores más altos de LIN y STR ($65,72 \pm 0,17 \%$; $91,55 \pm 0,25 \%$, respectivamente). La subpoblación 1 (SP₁) presentó espermatozoides menos lineales, como lo indican los menores VSL y VAP ($26,29 \pm 0,37 \mu\text{m s}^{-1}$; $48,33 \pm 0,34 \mu\text{m s}^{-1}$, respectivamente). Los espermatozoide de esta subpoblación también presentaron la menor progresividad, con los valores más bajos de LIN y STR ($24,94 \pm 0,16 \%$; $54,69 \pm 0,22 \%$, respectivamente) (Cuadro 3).

Se presentaron diferencias ($P < 0,05$) entre las subpoblaciones espermáticas (SP₁, SP₂ y SP₃) para las razas Jersey y Holstein. En la raza Jersey, la SP₂ presentó los valores más altos en VCL ($244,54 \pm 0,76 \mu\text{m s}^{-1}$), mientras que la SP₁ tuvo los valores más bajos en esta variable. En la raza Holstein, se observó un patrón similar. El grupo SP₂ presentó los valores más altos en VCL ($201,00 \pm 0,80 \mu\text{m s}^{-1}$) (Figura 1).

Al analizar los índices de linealidad y progresividad celular se encontró que en la raza Jersey, la SP₃ mostró valores más altos ($P < 0,05$) en LIN ($67,52 \pm 0,24 \%$). En la raza Holstein se observó un patrón similar con valores de LIN ($63,07 \pm 0,26 \%$) más altos en la SP₃. Los valores más bajos en ambas razas se mostraron en la SP₁ (Figura 2).

Los valores de ondulación espermática mayores ($P < 0,05$) en la raza Jersey, se presentaron en la SP₂ con una frecuencia de entrecruzamiento, BCF ($15,93 \pm 0,11 \text{ Hz}$), mientras que en la SP₁ se presentaron los valores más bajos en esta variable. En la raza Holstein se observó un patrón similar. La SP₂ presentó los valores más altos ($P < 0,05$) en BCF ($15,40 \pm 0,12 \text{ Hz}$), mientras que SP₁ tuvo los valores más bajos (Figura 3).

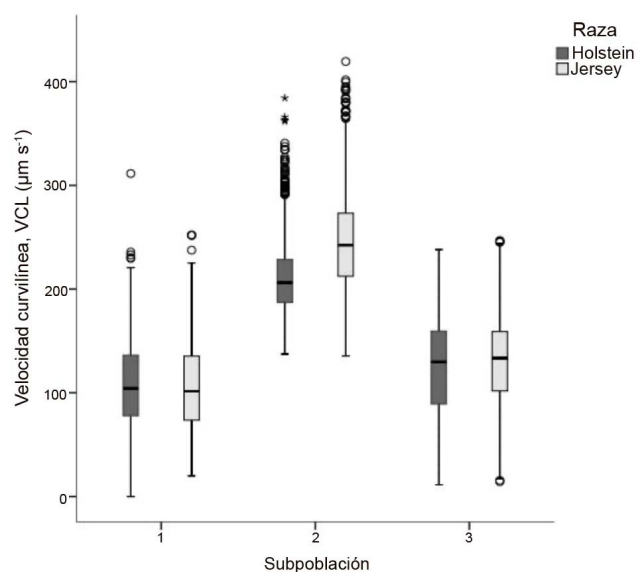


Figura 1. Diagrama de cajas para valores medios de velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m s}^{-1}$) en subpoblaciones espermáticas de semen congelado-descongelado de ganado lechero. Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Laboratorio de Reproducción Animal, Costa Rica, 2023.

Figure 1. Box plot for mean curvilinear velocity (VCL, $\mu\text{m s}^{-1}$) values in sperm subpopulations of frozen-thawed semen from dairy cattle. Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Laboratorio de Reproducción Animal, Costa Rica, 2023.

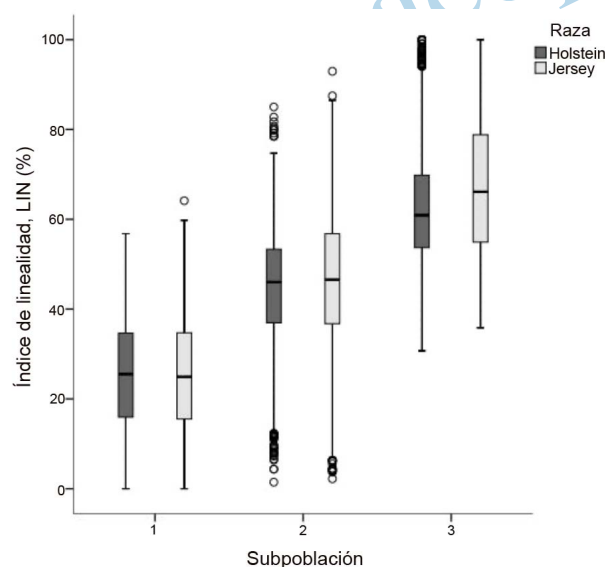


Figura 2. Diagrama de cajas para valores medios de índice de linealidad en subpoblaciones espermáticas de semen congelado-descongelado de ganado lechero. Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Laboratorio de Reproducción Animal, Costa Rica, 2023.

Figure 2. Box plot for mean linearity index values in sperm subpopulations of frozen-thawed semen from dairy cattle. Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Laboratorio de Reproducción Animal, Costa Rica, 2023.

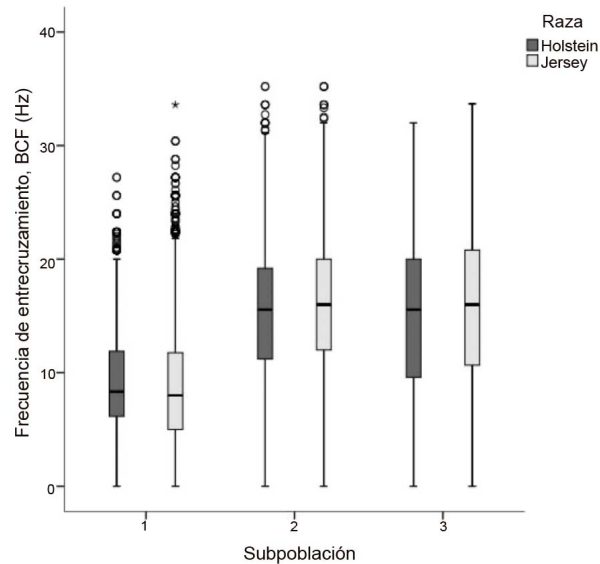


Figura 3. Diagrama de cajas para valores medios de frecuencia de entrecruzamiento en subpoblaciones espermáticas de semen congelado-descongelado de ganado lechero. Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Laboratorio de Reproducción Animal, Costa Rica, 2023.

Figure 3. Box plot for mean beat-cross frequency values in sperm subpopulations of frozen-thawed semen from dairy cattle. Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Laboratorio de Reproducción Animal, Costa Rica, 2023.

Se presentaron diferencias ($P < 0,05$) entre las subpoblaciones espermáticas (SP_1 , SP_2 y SP_3) para las razas Jersey y Holstein. En la raza Jersey la SP_2 presentó los valores más altos en VSL ($112,36 \pm 0,60 \mu\text{m s}^{-1}$) y VAP ($130,32 \pm 0,53 \mu\text{m s}^{-1}$), mientras que la SP_1 tuvo los valores más bajos en estas mismas variables. En la raza Holstein se observó un patrón similar. El grupo SP_2 presentó los valores más altos en VSL ($93,49 \pm 0,53 \mu\text{m s}^{-1}$) y VAP ($109,00 \pm 0,51 \mu\text{m s}^{-1}$) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Variables cinemáticas (media $\pm$ EEM) en subpoblaciones espermáticas (SPs) de semen criopreservado de ganado lechero. Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Laboratorio de Reproducción Animal, Costa Rica, 2023.

Table 4. Kinematic variables (mean $\pm$ SEM) in sperm subpopulations (SPs) of cryopreserved semen from dairy cattle. Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Laboratorio de Reproducción Animal, Costa Rica, 2023.

Variable	Jersey			Holstein		
	SP_1	SP_2	SP_3	SP_1	SP_2	SP_3
VSL	$25,84 \pm 0,57^a$	$112,36 \pm 0,60^c$	$89,18 \pm 0,57^b$	$26,71 \pm 0,43^a$	$93,49 \pm 0,53^c$	$77,70 \pm 0,54^b$
VAP	$48,18 \pm 0,51^a$	$130,32 \pm 0,53^c$	$94,53 \pm 0,51^b$	$48,49 \pm 0,41^a$	$109,00 \pm 0,51^c$	$81,80 \pm 0,52^b$
STR	$53,62 \pm 0,32^a$	$83,81 \pm 0,33^b$	$91,25 \pm 0,32^c$	$55,69 \pm 0,32^a$	$84,37 \pm 0,40^b$	$92,00 \pm 0,40^c$
WOB	$46,32 \pm 0,20^a$	$53,85 \pm 0,21^b$	$72,35 \pm 0,20^c$	$45,33 \pm 0,17^a$	$52,02 \pm 0,21^b$	$67,14 \pm 0,22^c$
ALH	$3,07 \pm 0,02^b$	$5,52 \pm 0,02^c$	$2,67 \pm 0,02^a$	$3,21 \pm 0,02^b$	$5,13 \pm 0,02^c$	$2,79 \pm 0,02^a$

SP_1 : Lentos, no progresivos y movimiento no ondulatorio; SP_2 : Rápidos, velocidad alta y progresiva; SP_3 : Velocidad media y progresivos y movimiento ondulatorio; VSL: Velocidad rectilínea ($\mu\text{m s}^{-1}$); VAP: Velocidad promedio ($\mu\text{m s}^{-1}$); STR: Índice de rectitud (%); WOB: Índice de oscilación (%); ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μm). ^{a-d} Diferentes letras indican diferencias entre subpoblaciones espermáticas. $P < 0,05$. / SP_1 : Slow, non-progressive, and non-wavy movement; SP_2 : Rapid, high-speed, and progressively motile spermatozoa; SP_3 : Medium velocity and linear progressive. VSL = Straight line velocity ($\mu\text{m s}^{-1}$); VAP = Average path velocity ($\mu\text{m s}^{-1}$); STR = Straightness (%); WOB = Wobble (%); ALH = Amplitude of lateral head displacement (μm). ^{a-d} Different letters indicate significant differences between sperm subpopulations. $P < 0.05$.

Al analizar los índices de linealidad y progresividad celular se encontró que en la raza Jersey, la SP₃ mostró valores más altos ($P < 0,05$) en STR ($91,25 \pm 0,32 \%$) y WOB ($72,35 \pm 0,20 \%$). La raza Holstein presentó un patrón similar con valores de STR ($92,00 \pm 0,40 \%$) y WOB ($67,14 \pm 0,22 \%$) más altos en la SP₃. La ALH en la raza Jersey fue mayor ($P < 0,05$) en la SP₂ ($5,52 \pm 0,02 \mu\text{m}$) respecto a las otras subpoblaciones. Mientras en la raza Holstein, se observó un patrón similar. La SP₂ presentó los valores más altos ($P < 0,05$) en ALH ($5,13 \pm 0,02 \mu\text{m}$), respecto a las otras subpoblaciones (Cuadro 4).

Las trayectorias promedio para las variables de velocidad de cada subpoblación y cada raza se observan en la Figura 4. En general los patrones de velocidad de las células espermáticas por subpoblación y raza son similares para los grupos SP₁ y SP₂. En el caso de la SP₃ difiere, debido a que trayectoria de la raza Holstein muestra una tendencia a ser un movimiento más lineal respecto a la presente para la raza Jersey.

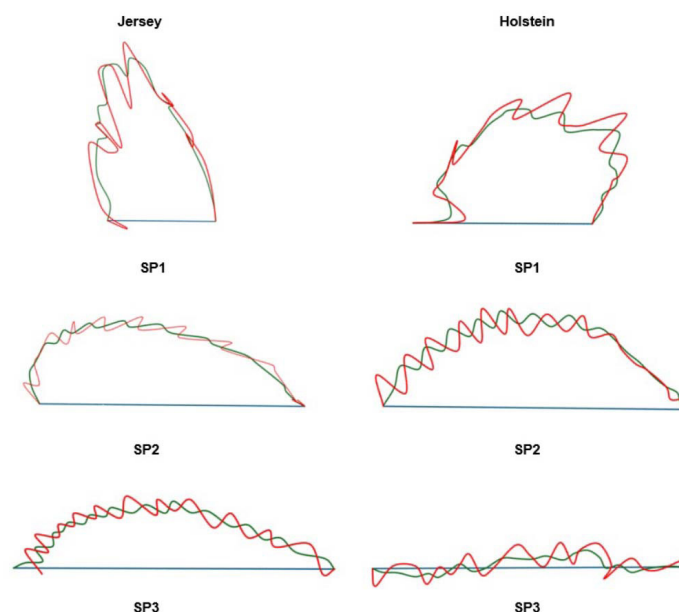


Figura 4. Patrones de natación exhibido por cada subpoblación espermática de semen congelado-descongelado de ganado lechero. Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Laboratorio de Reproducción Animal, Costa Rica, 2023.

SP1 = subpoblación 1; SP2 = subpoblación 2; SP3 = subpoblación 3.

Figure 4. Swimming patterns exhibited by each sperm subpopulations of frozen-thawed semen from dairy cattle. Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Laboratorio de Reproducción Animal, Costa Rica, 2023.

SP1 = subpopulation 1; SP2 = subpopulation 2; SP3 = subpopulation 3.

Discusión

Las dosis de semen criopreservado de razas lecheras pueden presentar variaciones en los patrones de movilidad y cinemáticos de los espermatozoides asociadas con los procesos de descongelación como se ha demostrado en el presente trabajo. Esto podría deberse a la variación individual dentro de la misma especie con respecto a la calidad seminal post-descongelación (Morrell et al., 2018) y los protocolos de congelación y descongelación utilizados

(Botta et al., 2019). Estos resultados son contrarios a los descritos en otros trabajos donde se evaluó la movilidad progresiva de razas lecheras y se reportó valores mayores de movilidad progresiva de los espermatozoides en la raza Holstein (Hoflack et al., 2006).

Algunos trabajos han asociado las tasas de preñez en bovino con las subpoblaciones espermáticas de grupos de animales previamente definidos como de alta y baja fertilidad (Hidalgo et al., 2021). Toros de alta fertilidad han presentado mayor porcentaje de espermatozoides con movilidad total y progresiva elevada porque presentan células con velocidad rápida. En trabajos previos en ganado lechero se han reportados valores altos de movilidad, progresividad, velocidad rápida y mayor amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH) y esto se ha correlacionado con una mayor criotolerancia y alta fertilidad (Kathiravan et al., 2011). Se ha demostrado que las variables cinemáticas de los espermatozoides varían según las razas y pueden estar afectadas por factores extrínsecos (Viquez et al., 2020).

La tecnología CASA permite la evaluación de variables avanzadas de cinética espermática y contabilizar el registro individual de cada célula mediante una tasa de fotogramas (Barquero, Viquez, et al., 2021; Bompart et al., 2018; 2019). Esto permite una mayor confiabilidad en las estimaciones de las trayectorias medidas en el sistema (van der Horst, 2020). Para mayor practicidad el sistema puede promediar los valores cinemáticos para generar informes y esto puede causar pérdida de información relevante bajo la premisa de la uniformidad del eyaculado (Martínez-Pastor et al., 2011; Ramón & Martínez-Pastor, 2018).

Actualmente, se reconoce en diversos estudios en especies animales como porcino (Valverde, Madrigal, et al., 2019), bovino (Araya-Zúñiga et al., 2024; Pichardo-Matamoros et al., 2023; Solís et al., 2024), equino (Gacem et al., 2021), perro (Valverde, Arnau, et al., 2019), camélidos (Cucho et al., 2021), aves (García-Herreros, 2016), peces (Caldeira et al., 2018), cocodrilo (Valverde et al., 2021), la heterogeneidad del eyaculado y se ha asociado a variabilidad en la fertilidad de los machos como en el presente estudio. Este trabajo utilizó el análisis de subpoblaciones espermáticas para cuantificar la calidad seminal a la descongelación en semen criopreservado de ganado lechero, al utilizar toda la información disponible de los sistemas CASA.

La caracterización de las variables cinemáticas se realizó mediante tres conjuntos o subpoblaciones espermáticas con patrones de natación similares en trabajos previos (Hidalgo et al., 2021; Ibănescu et al., 2018; Ibănescu et al., 2020). El estudio demostró que los toros Jersey poseen mejores patrones de espermatozoides móviles y progresivamente móviles que los de Holstein. Esto indica que los toros Jersey tienen mejores datos de fertilidad potencial y los resultados de las subpoblaciones espermáticas mostraron que los mejores valores de movilidad se presentaron en la SP₂, al igual que en la raza Holstein, aunque la distribución del número de células asociado con cada subpoblación fue diferente.

Varios autores han afirmado que los valores cinemáticos están relacionados con datos de la tasa de preñez y el índice de fertilidad (Winters et al., 2018). La subpoblación espermática predominante fue la SP₂, compuesta por espermatozoides con cinética rápida y ondulatoria. Esta subpoblación muestra características distintivas de espermatozoides hiperactivados; y valores intermedios de progresividad, sólo superados por los valores de linealidad e índice de rectitud en la SP₃. La cinética de las células hiperactivadas se caracteriza por un patrón de natación robusto, no lineal con una gran amplitud y un batido flagelar asimétrico, que permite a los espermatozoides penetrar la zona pelúcida (Kathiravan et al., 2011).

Algunos trabajos han reportado que patrones de hiperactivación del semen se han presentado en toros con mayor fertilidad en inseminación artificial (Gallego et al., 2015; Shojaei et al., 2012). Algunos autores han indicado que existe una correlación positiva entre la proporción de espermatozoides con movimientos rápidos y no lineales y las tasas de no retorno al estro de las vacas (Ibănescu et al., 2020). Otros estudios en otras especies como equino (Quintero-Moreno et al., 2003), ovino (Yániz et al., 2015) sugieren que la subpoblación espermática que contiene espermatozoides rápidos y lineales se relaciona con mayores tasas de fertilidad, sin embargo, las condiciones experimentales de estos trabajos fueron en semen fresco y diferentes a las del presente estudio.

Diversos trabajos han determinado subpoblaciones espermáticas en ganado lechero, sin embargo, los algoritmos utilizados para describir estos conjuntos celulares en el eyaculado no siempre tienen relevancia biológica (Viquez et al., 2020). Esto hace necesario que se validen los resultados desde el pragmatismo biológico de su significado, además del método de agrupamiento estadístico válido para determinar las subpoblaciones de espermatozoides en muestras seminales. Estos resultados constituyen una herramienta que incorpora el volumen de datos aportado por los sistemas CASA (Valverde et al., 2020) y el análisis multivariado de datos para describir animales con mayor proporción de gametos con patrones de natación en subpoblaciones espermáticas con mayor velocidad y linealidad, para proporcionar información adicional sobre la fertilidad de los machos (Barquero, Roldan, et al., 2021).

En el presente trabajo, se caracterizó el semen congelado-descongelado de toros de razas Holstein y Jersey con base en variables como la velocidad y la progresividad espermática, por lo que se pudo describir tanto eyaculados rápidos y progresivos como eyaculados lentos y no progresivos. El presente estudio describe las dosis congeladas-descongeladas en términos de subpoblaciones espermáticas para la caracterización de la fertilidad de los machos de acuerdo con la calidad seminal. Otros estudios también han descrito subpoblaciones de espermatozoides (Valverde et al., 2016; Yániz, Palacín, et al., 2018).

La fertilidad es multifactorial, y el semen sólo influye en el resultado final; en cambio, la vaca tiene múltiples factores que influyen. Entre los principales factores que influyen en la fertilidad de las hembras pero también en los machos se encuentran el clima (Stefanska et al., 2024), el estado nutricional (Butler, 2014), o la actividad endocrina (Sitko et al., 2024). Adicionalmente, las interacciones de factores externos en los procesos de post-congelación, como la temperatura y el tiempo en que se descongelan las células, podría ser condicionantes de las características que estas puedan presentar y limitar su funcionalidad.

Conclusiones

El análisis de factores principales mostró que dos factores explican el 87,50 % de la varianza total en las variables cinemáticas del semen congelado-descongelado y permitió su clasificación en tres subpoblaciones de espermatozoides. Se encontraron diferencias en la distribución y los patrones de natación de las subpoblaciones identificadas para ambas razas lecheras. Estos hallazgos sugieren que, aunque existieron diferencias en la movilidad y cinética espermática entre los toros Jersey y Holstein, ambos grupos tuvieron subpoblaciones espermáticas con características distintivas que podrían influir en su fertilidad y rendimiento reproductivo.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) del Instituto Tecnológico de Costa Rica, por financiar el proyecto de investigación VIE-5402-2151-1016 “*Protaminas: Evolución y papel en la protección del ADN espermático, formación de la cabeza y funcionamiento celular (PROTASPERM)*”, del que formó parte este trabajo. F.S., e I.A.-Z., agradecen a la Dirección de Posgrados del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Referencias

- Araya-Zúñiga, I., Sevilla, F., Molina-Montero, R., Roldan, E. R. S., Barrientos-Morales, M., Silvestre, M. A., & Valverde, A. (2024). Kinematic and morphometric assessment of fresh semen, before, during and after mating period in brahman bulls. *Animals*, 14(1), Article 132. <https://doi.org/10.3390/ANI14010132>
- Barbas, J. P., Leahy, T., Horta, A. E., & García-Herreros, M. (2018). Sperm kinematics and subpopulational responses during the cryopreservation process in caprine ejaculates. *Cryobiology*, 82, 137–147. <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2018.03.005>
- Barquero, V., Roldan, E. R. S., Soler, C., Yániz, J. L., Camacho, M., & Valverde, A. (2021). Predictive capacity of boar sperm morphometry and morphometric sub-populations on reproductive success after artificial insemination. *Animals*, 11(4), Article 920. <https://doi.org/10.3390/ANI11040920>
- Barquero, V., Soler, C., Sevilla, F., Calderón-Calderón, J., & Valverde, A. (2021). A Bayesian analysis of boar spermatozoa kinematics and head morphometrics and their relationship with litter size fertility variables. *Reproduction in Domestic Animals*, 56(7), 1024–1033. <https://doi.org/10.1111/RDA.13946>
- Barquero, V., Viquez, L., Calderón, J. C., & Valverde, A. (2021). Optimal frame rate to evaluate boar sperm kinematic with a CASA-Mot system. *Agronomía Mesoamericana*, 32(1), 1–18. <https://doi.org/10.15517/am.v32i1.41928>
- Bompart, D., García-Molina, A., Valverde, A., Caldeira, C., Yániz, J., Núñez de Murga, M., & Soler, C. (2018). CASA-Mot technology: how results are affected by the frame rate and counting chamber. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6), 810–819. <https://doi.org/10.1071/RD17551>
- Bompart, D., Vázquez, R., Gómez, R., Valverde, A., Roldán, E., García-Molina, A., & Soler, C. (2019). Combined effects of type and depth of counting chamber, and rate of image frame capture, on bull sperm motility and kinematics. *Animal Reproduction Science*, 209, Article 106169. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2019.106169>
- Botta, D., de Arruda, R. P., Watanabe, Y. F., de Carvalho Balieiro, J. C., Romanello, N., do Nascimento Barreto, A., de Andrade Pantoja, M. H., Giro, A., de Carvalho, C. P. T., de Sousa Oliveira, A., & Garcia, A. R. (2019). Influence of post-thawing thermal environment on bovine sperm characteristics and *in vitro* fertility. *Andrologia*, 51(6), Article e13266. <https://doi.org/10.1111/AND.13266>
- Butler, S. T. (2014). Nutritional management to optimize fertility of dairy cows in pasture-based systems. *Animal*, 8(Suppl. 1), 15–26. <https://doi.org/10.1017/S1751731114000834>
- Caldeira, C., García-Molina, A., Valverde, A., Bompart, D., Hassane, M., Martin, P., & Soler, C. (2018). Comparison of sperm motility subpopulation structure among wild anadromous and farmed male Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr using a CASA system. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6), 897–906. <https://doi.org/10.1071/RD17466>
- Caldeira, C., Hernández-Ibáñez, S., Valverde, A., Martin, P., Herranz-Jusado, J. G., Gallego, V., Asturiano, J. F., Dzyuba, B., Pšenička, M., & Soler, C. (2019). Standardization of sperm motility analysis by using CASA-Mot for Atlantic salmon (*Salmo salar*), European eel (*Anguilla anguilla*) and Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Aquaculture*, 502, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.001>
- Chicaiza-Cabezas, N., Garcia-Herreros, M., & Aponte, P. M. (2023). Germplasm cryopreservation in bulls: Effects of gonadal tissue type, cryoprotectant agent, and freezing-thawing rates on sperm quality parameters. *Cryobiology*, 110, 24–35. <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2023.01.001>

- Cucho, H., Gallegos, M., Ccoiso, R., Meza, A., Ampuero, E., Ordóñez, C., & Valverde, A. (2021). Morphometry and subpopulation of llama (*Lama glama*) sperm using the ISAS® CASA-Morph system. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 32(1), Article e19506. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V32I1.19506>
- Cucho, H., Nina, G., Meza, A., Ccalta, R., Ordóñez, C., & Valverde, A. (2022). Subpoblaciones morfológicas de espermatozoides epididimarios del venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus peruvianus*). *Agronomy Mesoamerican*, 33(2), Article 46938. <https://doi.org/10.15517/AM.V33I2.46938>
- Gacem, S., Catalán, J., Valverde, A., Soler, C., & Miró, J. (2020). Optimization of Casa-mot analysis of donkey sperm: Optimum frame rate and values of kinematic variables for different counting chamber and fields. *Animals*, 10(11), Article 1993. <https://doi.org/10.3390/ani10111993>
- Gacem, S., Valverde, A., Catalán, J., Yáñez Ortiz, I., Soler, C., & Miró, J. (2021). A New Approach of Sperm Motility Subpopulation Structure in Donkey and Horse. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, Article 424. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2021.651477>
- Gallagher, M. T., Smith, D. J., & Kirkman-Brown, J. C. (2018). CASA: tracking the past and plotting the future. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6), 867–874. <https://doi.org/10.1071/RD17420>
- Gallego, V., Vilchez, M. C., Peñaranda, D. S., Pérez, L., Herráez, M. P., Asturiano, J. F., & Martínez-Pastor, F. (2015). Subpopulation pattern of eel spermatozoa is affected by post-activation time, hormonal treatment and the thermal regimen. *Reproduction, Fertility and Development*, 27(3), 529–543. <https://doi.org/10.1071/RD13198>
- García-Herreros, M. (2016). Sperm subpopulations in avian species: a comparative study between the rooster (*Gallus domesticus*) and Guinea fowl (*Numida meleagris*). *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 889–894. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.188448>
- García-Molina, A., Navarro, N., Valverde, A., Bompert, D., Caldeira, C., Vendrell, A., & Soler, C. (2022). Human kinematic and morphometric sperm subpopulation analysis using CASA technology: A new approach to spermatozoa classification. *Revista Internacional de Andrología*, 20(4), 257–265. <https://doi.org/10.1016/J.ANDROL.2021.05.003>
- García-Molina, A., Navarro, N., Valverde, A., Sadeghi, S., Garrido, N., & Soler, C. (2023). Optimization of human semen analysis using CASA-Mot technology. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 69(2), 166–174. <https://doi.org/10.1080/19396368.2023.2170297>
- García-Molina, A., Valverde, A., Bompert, D., Caldeira, C., Vendrell, A., & Soler, C. (2020). Updating semen analysis: a subpopulation approach. *Asian Journal of Andrology*, 22(1), 118–119. https://doi.org/10.4103/aja.aja_33_19
- Gomes, F. P., Park, R., Viana, A. G., Fernandez-Costa, C., Topper, E., Kaya, A., Memili, E., Yates, J. R., & Moura, A. A. (2020). Protein signatures of seminal plasma from bulls with contrasting frozen-thawed sperm viability. *Scientific*, 10, Article 14661. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71015-9>
- Hidalgo, M. M. T., Almeida, A. B. M. de, Moraes, F. L. Z. de, Marubayashi, R. Y. P., Souza, F. F. de, Barreiros, T. R. R., & Martins, M. I. M. (2021). Sperm subpopulations influence the pregnancy rates in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 56(8), 1117–1127. <https://doi.org/10.1111/RDA.13955>
- Hoflack, G., Opsomer, G., Van Soom, A., Maes, D., de Kruif, A., & Duchateau, L. (2006). Comparison of sperm quality of Belgian Blue and Holstein Friesian bulls. *Theriogenology*, 66(8), 1834–1846. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2006.05.007>

- Holt, W. V., & Satake, N. (2018). Making the most of sperm activation responses: experiments with boar spermatozoa and bicarbonate. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6), 842–849. <https://doi.org/10.1071/RD17476>
- Ibănescu, I., Leiding, C., & Bollwein, H. (2018). Cluster analysis reveals seasonal variation of sperm subpopulations in extended boar semen. *Journal of Reproduction and Development*, 64(1), 33–39. <https://doi.org/10.1262/jrd.2017-083>
- Ibanescu, I., Siuda, M., & Bollwein, H. (2020). Motile sperm subpopulations in bull semen using different clustering approaches – Associations with flow cytometric sperm characteristics and fertility. *Animal Reproduction Science*, 215, Article 106329. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106329>
- Kathiravan, P., Kalatharan, J., Karthikeya, G., Rengarajan, K., & Kadirvel, G. (2011). Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system - A review. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(1), 165–172. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01603.x>
- Koch, J., Weber, L. P., Heppelmann, M., Freise, F., Klingelmann, M., & Bachmann, L. (2022). Effect of different Thawing methods for frozen bull semen and additional factors on the conception rate of dairy cows in Artificial Insemination. *Animals*, 12(18), Article 2330. <https://doi.org/10.3390/ANI12182330>
- Layek, S. S., Mohanty, T. K., Kumaresan, A., & Parks, J. E. (2016). Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*, 172, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2016.04.013>
- Martínez-Pastor, F. (2021). What is the importance of sperm subpopulations? *Animal Reproduction Science*, 246, Article 106844. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2021.106844>
- Martínez-Pastor, F., Tizado, E., Garde, J., Anel, L., & de Paz, P. (2011). Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology*, 75(5), 783–795. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2010.11.034>
- Morrell, J. M., Valeanu, A. S., Lundeheim, N., & Johannisson, A. (2018). Sperm quality in frozen beef and dairy bull semen. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 60, Article 41. <https://doi.org/10.1186/S13028-018-0396-2>
- Mortimer, S. T., & De Jonge, C. J. (2018). CASA—Computer-Aided Sperm Analysis. In M. Skinner (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 59–63). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.64935-8>
- Pichardo-Matamoros, D., Sevilla, F., Elizondo-Salazar, J., Jiménez-Sánchez, C., Roldan, E. R. S., Soler, C., Gacem, S., & Valverde, A. (2023). Exploration of semen quality analyzed by casa-mot systems of brahman bulls infected with BLV and BHV-1. *Scientific Reports*, 13, Article 18659. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45981-9>
- 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(9), 1973–1990. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01297-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01297-9)
- Quintero-Moreno, A., Rigau, T., & Rodríguez-Gil, J. (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(3), 312–319. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00785.x>
- Ramón, M., & Martínez-Pastor, F. (2018). Implementation of novel statistical procedures and other advanced approaches to improve analysis of CASA data. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6), 860–866. <https://doi.org/10.1071/RD17479>

- Schulze, M., Jakop, U., Jung, M., & Cabezón, F. (2019). Influences on thermo-resistance of boar spermatozoa. *Theriogenology*, 127, 15–20. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2018.12.022>
- Selvaraju, S., Parthipan, S., Somashekar, L., Binsila, B. K., Kolte, A. P., Arangasamy, A., Ravindra, J. P., & Krawetz, S. A. (2018). Current status of sperm functional genomics and its diagnostic potential of fertility in bovine (*Bos taurus*). *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 64(6), 484–501. <https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1444816>
- Shojaei, H., Kroetsch, T., Wilde, R., Blondin, P., Kastelic, J. P., & Thundathil, J. C. (2012). Moribund sperm in frozen-thawed semen, and sperm motion end points post-thaw and post-swim-up, are related to fertility in Holstein AI bulls. *Theriogenology*, 77(5), 940–951. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2011.09.026>
- Sitko, E. M., Laplacette, A., Duhatschek, D., Rial, C., Perez, M. M., Tompkins, S., Kerwin, A. L., & Giordano, J. O. (2024). Reproductive physiological outcomes of dairy cows with different genomic merit for fertility: biomarkers, uterine health, endocrine status, estrus features, and response to ovarian synchronization. *Journal of Dairy Science*, 107(10), 8670–8687. <https://doi.org/10.3168/JDS.2023-24376>
- Soler, C., Alambiaga, A., Martí, M. A., García-Molina, A., Valverde, A., Contell, J., & Campos, M. (2017). Dog sperm head morphometry: its diversity and evolution. *Asian Journal of Andrology*, 19(2), 149–153. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.189207>
- Soler, C., Contell, J., Bori, L., Sancho, M., García-Molina, A., Valverde, A., & Segarvall, J. (2017). Sperm kinematic, head morphometric and kinetic-morphometric subpopulations in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Asian Journal of Andrology*, 19(2), 154–159. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.188445>
- Soler, C., Valverde, A., Bompert, D., Fereidounfar, S., Sancho, M., Yániz, J., García-Molina, A., & Korneenko-Zhilyaev, Yu. A. (2017). New methods of semen analysis by casa. *Sel'skokhozyaystvennaya Biologiya (Agricultural Biology)*, 52(2), 232–241. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.2.232eng>
- Solís, J. M., Sevilla, F., Silvestre, M. A., Araya-Zúñiga, I., Roldán, E. R. S., Saborío-Montero, A., & Valverde, A. (2024). Effect of thawing procedure and thermo-resistance test on sperm motility and kinematics patterns in two bovine breeds. *Animals*, 14(19), Article 2768. <https://doi.org/10.3390/ANI14192768>
- Stefanska, B., Sobolewska, P., Fievez, V., Pruszyńska-Oszmałek, E., Purwin, C., & Nowak, W. (2024). The effect of heat stress on performance, fertility, and adipokines involved in regulating systemic immune response during lipolysis of early lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 107(4), 2111–2128. <https://doi.org/10.3168/JDS.2023-23804>
- Valverde, A., Arenán, H., Sancho, M., Contell, J., Yániz, J., Fernández, A., & Soler, C. (2016). Morphometry and subpopulation structure of Holstein bull spermatozoa: variations in ejaculates and cryopreservation straws. *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 851–857. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.187579>
- Valverde, A., Arnau, S., García-Molina, A., Bompert, D., Campos, M., Roldán, E., & Soler, C. (2019). Dog sperm swimming parameters analysed by computer-assisted semen analysis of motility reveal major breed differences. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(5), 795–803. <https://doi.org/10.1111/rda.13420>
- Valverde, A., Barquero, V., & Soler, C. (2020). The application of computer-assisted semen analysis (CASA) technology to optimise semen evaluation. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 29(3), 189–198. <https://doi.org/10.22358/jafs/127691/2020>

- Valverde, A., Castro-Morales, O., Madrigal-Valverde, M., Camacho, M., Barquero, V., Soler, C., & Roldan, E. R. S. (2021). Sperm kinematic subpopulations of the American crocodile (*Crocodylus acutus*). *PLOS ONE*, 16(3), Article e0248270. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248270>
- Valverde, A., Castro-Morales, O., Madrigal-Valverde, M., & Soler, C. (2019). Sperm kinematics and morphometric subpopulations analysis with CASA systems: A review. *Revista de Biología Tropical*, 67(6), 1473–1487. <https://doi.org/10.15517/rbt.v67i6.35151>
- Valverde, A., Madrigal, M., Caldeira, C., Bompert, D., de Murga, J. N., Arnau, S., & Soler, C. (2019). Effect of frame rate capture frequency on sperm kinematic parameters and subpopulation structure definition in boars, analysed with a CASA-Mot system. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(2), 167–175. <https://doi.org/10.1111/rda.13320>
- Valverde, A., Madrigal-Valverde, M., Castro-Morales, O., Gadea-Rivas, A., Johnston, S., & Soler, C. (2019). Kinematic and head morphometric characterisation of spermatozoa from the Brown Caiman (*Caiman crocodilus fuscus*). *Animal Reproduction Science*, 207, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.06.011>
- van der Horst, G. (2020). Computer Aided Sperm Analysis (CASA) in domestic animals: Current status, three D tracking and flagellar analysis. *Animal Reproduction Science*, 220, Article 106350. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106350>
- Vázquez, A. J. F., Cedillo, M. J., Quezada, V. J., Rivas, A. C., Morales, E. C. L., Ayala, E. M. E., Hernández, M. J., González, R. A., & Aragón, M. A. (2015). Effects of repeated electroejaculations on kinematic sperm subpopulations and quality markers of Mexican creole goats. *Animal Reproduction Science*, 154, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.12.009>
- Viquez, L., Barquero, V., Soler, C., Roldan, E. R. S., & Valverde, A. (2020). Kinematic sub-populations in bull spermatozoa: A comparison of classical and Bayesian approaches. *Biology*, 9(6), Article 138. <https://doi.org/10.3390/biology9060138>
- Viquez, L., Barquero, V., & Valverde, A. (2021). Optimal conditions for the kinematic analysis in fresh semen of Brahman bulls with a CASA-Mot system. *Agronomía Mesoamericana*, 32(3), 920–938. <https://doi.org/10.15517/AM.V32I3.42768>
- Winters, R. A., Hamilton, D. N., Bhatnagar, A. S., Fitzgerald, R., Bovin, N., & Miller, D. J. (2018). Porcine sperm binding to oviduct cells and glycans as supplements to traditional laboratory semen analysis. *Journal of Animal Science*, 96(12), 5265–5275. <https://doi.org/10.1093/jas/sky372>
- Yáñez-Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez-Gil, J. E., Miró, J., & Yeste, M. (2022). Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*, 246, Article 106904. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2021.106904>
- Yániz, J., Palacín, I., Caycho, K., Soler, C., Silvestre, M., & Santolaria, P. (2018). Determining the relationship between bull sperm kinematic subpopulations and fluorescence groups using an integrated sperm quality analysis technique. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6), 919–923. <https://doi.org/10.1071/RD17441>
- Yániz, J., Palacín, I., Vicente-Fiel, S., Sánchez-Nadal, J., & Santolaria, P. (2015). Sperm population structure in high and low field fertility rams. *Animal Reproduction Science*, 156, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.03.012>
- Yániz, J., Silvestre, M., Santolaria, P., & Soler, C. (2018). CASA-Mot in mammals: an update. *Reproduction, Fertility, and Development*, 30(6), 799–809. <https://doi.org/10.1071/RD17432>