



## Efecto del diluyente, la edad y el estado sexual bovino sobre la cinemática del semen<sup>1</sup>

### The effect of extender, age, and bovine sexual status on the sperm kinematics

Ignacio Araya-Zúñiga<sup>2</sup>, Francisco Sevilla<sup>2</sup>, Vinicio Barquero<sup>2,3</sup>, Anthony Valverde<sup>2</sup>

- <sup>1</sup> Recepción: 28 de septiembre, 2022. Aceptación: 20 de enero, 2023. Este trabajo formó parte de la tesis de Licenciatura en Agronomía del primer autor. Formó parte del proyecto de investigación inscrito en la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE), N° 5402-2151-1013-Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. Cofinanciado por la Fundación para el Fomento y Promoción de la Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Costa Rica (FITACORI).
- <sup>2</sup> Instituto Tecnológico de Costa Rica, Campus Tecnológico Local San Carlos, Escuela de Agronomía, Centro de Investigación y Desarrollo en Agricultura Sostenible para el Trópico Húmedo, Laboratorio de Reproducción Animal. Santa Clara, San Carlos, Alajuela, Costa Rica. [arayaz.ignacio@gmail.com](mailto:arayaz.ignacio@gmail.com) (<https://orcid.org/0000-0002-4292-2287>); [fsevillabenavides@gmail.com](mailto:fsevillabenavides@gmail.com) (<https://orcid.org/0000-0003-1480-4141>); [anvalverde@tec.ac.cr](mailto:anvalverde@tec.ac.cr) (autor para correspondencia; <https://orcid.org/0000-0002-3191-6965>).
- <sup>3</sup> Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Estación Experimental Alfredo Volio Mata, Cartago, Costa Rica. [inicio.barquero@ucr.ac.cr](mailto:inicio.barquero@ucr.ac.cr) (<https://orcid.org/0000-0003-0042-6178>).

## Resumen

**Introducción.** Los patrones cinemáticos del semen se condicionan por variación individual y/o un efecto ambiental determinado por el manejo posterior a la obtención de la muestra. **Objetivo.** Evaluar el efecto de dos diluyentes comerciales, la edad y estado sexual de los toros sobre la movilidad y cinética espermática del semen fresco bovino. **Materiales y métodos.** El estudio se realizó en las fincas ganaderas “La Vega”, San Carlos, y “La Balsa”, San Ramón, Costa Rica, entre marzo y agosto de 2021. Se utilizó el semen proveniente de trece toros Brahman, extraído por electroeyaculación. Se utilizaron 45 eyaculados en total, con un mínimo de dos y un máximo de cinco por animal. El semen se diluyó con dos diluyentes comerciales, Optixcell® y Bioxcell®, a una temperatura de 37 °C. Las muestras se analizaron mediante el Sistema Computarizado de Análisis Seminal (*Computer-Assisted Semen Analysis*, CASA)-Mot ISAS®v1 y una cámara de recuento espermática reutilizable Spermtrack® de 20 µm de profundidad. **Resultados.** Se observaron diferencias ( $p < 0,05$ ) respecto de la movilidad y cinemática de los espermatozoides, así como en los parámetros de cinética espermática, según el diluyente utilizado. Con el uso de Bioxcell® hubo mayor movilidad progresiva ( $64,03 \pm 2,01$  %) en comparación con el Optixcell®. Los eyaculados diluidos con Bioxcell® presentaron un patrón cinemático más lineal y progresivo que los diluidos con Optixcell®, en los que hubo valores menores de velocidad promedio ( $VAP = 106,67 \pm 0,24$  µm s<sup>-1</sup>) e índice de rectitud ( $STR = 79,35 \pm 0,10$  %). La edad no mostró diferencias para la movilidad total, sin embargo, la movilidad progresiva fue mayor en animales de >48 meses ( $62,27 \pm 1,87$  %). Se observó un efecto del estado sexual, durante la monta se presentó mayor linealidad, velocidad y oscilación espermática comparado al descanso sexual. **Conclusión.** La edad, el estado sexual y el diluyente utilizado para la preservación del semen condicionaron la calidad espermática de los eyaculados bovinos.

**Palabras clave:** espermatozoo, toro, biotecnología animal, andrología, reproducción.



## Abstract

**Introduction.** The kinematic patterns of semen are influenced by individual variation and/or environmental effects, determined by the handling after sample collection. **Objective.** To evaluate the effect of two commercial extenders, bull age, and sexual status on the motility and kinetics parameters of fresh bovine semen. **Materials and methods.** The study was conducted on the livestock farms “La Vega,” San Carlos, and “La Balsa”, San Ramón, Costa Rica, between March and August 2021. Donated semen from thirteen Brahman bulls was used, extracted through electroejaculation. A total of 45 ejaculates were collected, with a minimum of two and a maximum of five per animal. The semen was diluted with two commercial extenders, Optixcell® and Bioxcell®, at a temperature of 37° C. The samples were analyzed using the Computer-Assisted Semen Analysis (CASA)-Mot ISAS®v1 system and a reusable Spermtrack® counting chamber (20 µm). **Results.** Differences ( $p < 0.05$ ) were observed in sperm motility and kinematics, as well as sperm kinetic parameters, depending to the extender used. Bioxcell® showed higher progressive motility ( $64.03 \pm 2.01$  %) compared to Optixcell®. Ejaculates diluted with Bioxcell® exhibited a more linear and progressive kinematic pattern than those diluted with Optixcell®, which had lower average velocity ( $VAP = 106.67 \pm 0.24 \mu\text{m s}^{-1}$ ) and straightness index ( $STR = 79.35 \pm 0.10\%$ ). Age did not show differences in total motility, but progressive motility was higher in animals  $>48$  months ( $62.27 \pm 1.87$  %). An effect of sexual status was observed with higher linearity, velocity, and sperm oscillation during mating compared to sexual rest. **Conclusion.** Age, sexual status, and the extender used for semen preservation influenced the sperm quality of bovine ejaculates.

**Keywords:** spermatozoa, bulls, animal biotechnology, andrology, reproduction.

## Introducción

La reproducción es uno de los factores principales que limitan la productividad de un sistema ganadero y está relacionada con la demanda de alimentos a nivel mundial (Fernandes Júnior et al., 2022; Thundathil et al., 2016; Ugur et al., 2019). En la producción de ganado de carne el macho juega un rol importante, debido a que gran parte de los bajos porcentajes de preñez en los hatos están relacionados con problemas de fertilidad o subfertilidad (Barth, 2018). Un factor determinante en el desempeño reproductivo de un toro es el manejo que se le brinda, de manera que si el animal se tiene en constante monta el desempeño será diferente a los animales en descanso, lo que repercute en la posible fertilidad de este (Pongsiri et al., 2020; Şahin et al., 2020; Schenk, 2018; Taaffe et al., 2022).

La fertilidad es multifactorial (Calderón-Calderón et al., 2022; Ilacqua et al., 2018; Kondracki et al., 2012; Valverde et al., 2018; Wu et al., 2019), por lo que esta no puede ser diagnosticada a partir de un solo análisis (Thundathil et al., 2016). Uno de los métodos más utilizados para el diagnóstico de la fertilidad potencial de un macho bovino es el análisis de semen (Valverde, Madrigal, et al., 2019; Valverde, Madrigal-Valverde, et al., 2019); sin embargo, este solo evalúa la concentración, la integridad de la membrana y la movilidad de las células dentro de un eyaculado. No obstante, la determinación de estas variables no es objetiva para diagnosticar la fertilidad de un animal (Gadea et al., 2004).

Dada la relevancia de la evaluación del semen en la reproducción de las especies, la tecnología CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*) fue desarrollada en la penúltima década del siglo XX (Amann & Waberski, 2014; Mortimer et al., 2015). Esta tecnología fue diseñada para la evaluación de la movilidad de los espermatozoides, sin embargo, debido a su potencial se ha ampliado su funcionalidad, lo cual ha permitido un análisis más profundo de las características cinemáticas y morfométricas del eyaculado (Waberski et al., 2022). La implementación de estos sistemas de análisis seminal sustituye los diagnósticos subjetivos realizados bajo otras metodologías, disminuye el error de muestreo y brinda un ahorro considerable de tiempo en el análisis de las muestras (Valverde & Madrigal-Valverde, 2018).

A pesar de que los sistemas CASA son una herramienta en la predicción de la fertilidad asociada al macho, aplicable a la hora de utilizar un padrote o utilizar su semen en inseminación artificial (IA) dentro del hato (Sundararaman et al., 2012), existen una serie de factores que pueden condicionar el análisis de las muestras como es el caso del *frame rate* (Bompart et al., 2018; 2019; Caldeira et al., 2019; Valverde, Madrigal et al., 2019; van der Horst, 2020), profundidad y tipo de cámara de recuento utilizada (Ibănescu et al., 2016; Valverde, Madrigal et al., 2019; van der Horst, 2020; Viquez et al., 2021), la temperatura de análisis (Viquez et al., 2021) y resolución de la cámara de video (van der Horst, 2020), especie (Kondracki et al., 2012), dilución (Broekhuijse et al., 2011), tiempo entre la extracción y el análisis (Hahn et al., 2019) y el diluyente utilizado (Viquez et al., 2021).

La principal función del empleo de sustancias para dilución de las muestras de semen es proveer una fuente de energía a las células, la cual permita su conservación por un tiempo mayor (Tvrdá et al., 2013), con el fin de mantener la integridad de la membrana *in vitro* de las células (Siudzińska & Łukaszewicz, 2008). Los diluyentes tienen la función de regular el pH y mantener la presión osmótica sin importar si son isotónicos o hipertónicos (Gadea, 2003) y pueden también tener en su composición antioxidantes que evitan que los espermatozoides sufran estrés oxidativo, lo que disminuye el daño celular y la afectación de las características de las células (Sikka, 2004).

La composición y características propias de los medios de dilución afectan la cinética de las células espermáticas (Morrell et al., 2018) y la dinámica de las subpoblaciones (Viquez et al., 2021), ya sea por la temperatura, el tipo utilizado (Murphy et al., 2016; Murphy, Eivers, et al., 2018), la disolución empleada (Büyükleblebici et al., 2014) y la especie que se analice (Viquez et al., 2021). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de dos diluyentes comerciales, la edad y estado sexual de los toros sobre la movilidad y cinética espermática del semen fresco bovino.

## Materiales y métodos

### Sitio de estudio y periodo experimental

El estudio se llevó a cabo durante el periodo de marzo a agosto del 2021, en las fincas ganaderas “La Vega”, ubicada en La Vega de Florencia, San Carlos (10°25'20,98" norte; 84°31'17,57" oeste); este sistema de producción se encuentra a una altitud de 70 m s. n. m.; y la finca “La Balsa” localizada en San Lorenzo, San Ramón (10°21'8,60" norte, 10°31'17,13" oeste) a 180 m s. n. m. Ambos sistemas de producción corresponden a la Unidad de Ganado de Carne, del Programa de Producción Agropecuario (PPA) de la Escuela de Agronomía del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Campus Tecnológico Local San Carlos. Al momento de realizar la investigación, las fincas contaban con un certificado veterinario de operación (CVO) vigente, los hatos se encontraban libres de tuberculosis y brucelosis, se contó con un control sanitario mediante vacunaciones y desparasitaciones, y se llevaban registros genealógicos y productivos de todos los animales.

### Animales y recolección de las muestras

El uso y cuidado de los animales en tratamientos experimentales cumplió con los principios éticos en la investigación científica, aprobados por el Comité Técnico del Centro de Investigación y Desarrollo de la Agricultura Sostenible para el Trópico Húmedo del Instituto Tecnológico de Costa Rica (CIDASTH-ITCR), de acuerdo con la sección 01/2019, artículo 1.0, DAGSC-074.

Se utilizaron trece animales seleccionados como reproductores de la raza Brahman (*Bos indicus*), cuya edad promedio fue de  $45,50 \pm 19,24$  meses. Se definieron dos cohortes de animales por edad, con un punto de inflexión en 48 meses. Los grupos de edades tuvieron una edad promedio de  $57,29 \pm 13,59$  meses (>48 meses) y  $25,83 \pm 1,60$  meses (<48 meses).

Se definió el estado sexual de los animales en función de si provenían de exposición a vacas (monta) o descanso sexual. Los animales en monta natural rotaron en parejas con el grupo de hembras durante intervalos de siete días. A cada toro se le extrajeron al menos dos eyaculados por medio de la técnica de electroeyaculación descrita por Ball y Furman (1972). El intervalo de extracción de una muestra a otra fue de al menos siete días y se obtuvo 45 eyaculados en total. Para la extracción de las muestras se utilizó un electroeyaculador marca Pulsator V® (Lane Manufacturing Inc, Denver, CO, EEUU) y una prensa hidráulica para inmovilizar el animal sin sedación. Una vez el animal estaba inmovilizado se evaluó la condición física en general y en los testículos se examinó la movilidad dentro de la bolsa escrotal, simetría, consistencia y circunferencia escrotal (CE).

Previo a la implementación de la técnica de electroeyaculación, se revisó el área del prepucio, se limpió y recortó el pelo del área con el fin de evitar la contaminación de la muestra. De igual forma, se introdujo la mano con guante en el área del recto para extraer la materia fecal que se encontraba en el intestino del animal. Una vez se hizo el retiro de la materia fecal, se procedió a realizar un masaje transrectal del área cuyo fin fue estimular las glándulas accesorias (glándulas vesiculares y ampollas de los conductos deferentes) y la próstata por un lapso de uno a dos minutos, para lograr un relajamiento del esfínter anal previo a la introducción de la sonda-electrodo del electroeyaculador.

Para la introducción de la sonda transrectal, de 75 mm, se lubricó la misma y luego se ingresó en el recto del animal. La cola del animal se levantó a 90° para facilitar el proceso de introducción, una vez se introdujo la sonda se dirigió hacia abajo con movimientos rotatorios. Se utilizó el modo automático del electroeyaculador (Pulsator®) como se ha descrito por Romano et al. (2021). Se comenzó con estímulos mínimos que según la reacción el animal se aumentaron. De forma automática se aplicaron estímulos de 36 ciclos (dos segundos por ciclo). Sin embargo, si no se observó una respuesta del animal (exposición del pene) o este no eyaculaba durante el lapso supra citado, este se dejó descansar desde cinco a ocho minutos y se volvió a iniciar con otros 36 ciclos.

La recolección del semen se hizo de forma directa del pene del animal, mediante un tubo colector estéril desechable (tubo Falcon® de 15 mL). Se colocaron submuestras del eyaculado en dos tubos Eppendorf® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU), que contenían los diluyentes Optixcell® (IMV Technologies, L'Aigle, Francia) y Bioxcell® (IMV Technologies, L'Aigle, Francia) en una proporción 1:1 v/v y a 37 °C.

La preparación de cada uno de los diluyentes se hizo previo a la recolección de las muestras y de acuerdo con las instrucciones del fabricante mediante una dilución 1:2 v/v con agua bidestilada. Las muestras se colocaron en una placa calefactora a 37 °C mientras se extraía la del siguiente toro, con el fin de evitar el choque térmico en las células espermáticas. Una vez se finalizó con la labor de extracción, tanto los tubos Eppendorf® con las disoluciones y los tubos Falcon® con los eyaculados se transportaron en una hielera de poliestireno a 37 °C al Laboratorio de Reproducción Animal del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Campus Tecnológico Local San Carlos para su posterior análisis.

### **Análisis espermático**

Se colocaron 2,7 µL de la muestra en una cámara de recuento espermático Spermtrack®; de 20 µm de profundidad, que estuvo precalentada por una placa calefactora a 37 °C antes de colocar la muestra, previo a la toma de la alícuota de la muestra, esta se mezcló y homogenizó. Para el análisis de la movilidad del semen se utilizó el sistema comercial de análisis de esperma asistido por computadora, el sistema CASA-Mot ISAS®v1 (Proiser R + D, S.L., Paterna, España), equipado con una cámara de video Proiser 782M (Proiser R + D). Se tomaron veinticinco imágenes con una velocidad de fotogramas de 40 fotogramas/s por un periodo de 0,625 s con una resolución final de 768 x 576 píxeles. La cámara se conectó al microscopio UB203 (UOP / Proiser R + D) con un ocular IX, un objetivo de contraste de fase negativa 10X (AN 0,25) y una placa calefactora integrada a 37,0±0,5 °C. Los demás parámetros utilizados para la especie fueron los del equipo por defecto.

Se realizaron dos repeticiones de cada uno de los eyaculados, uno por cada diluyente, en los cuales se capturaron siete campos por repetición a lo largo de la cámara de recuento espermático para alcanzar un promedio de seiscientos espermatozoides por muestra. Los resultados obtenidos se almacenaron para realizar el análisis detallado de las trayectorias de cada una de las células estudiadas. Las variables de respuesta en el análisis de movilidad fueron la frecuencia de entrecruzamiento (BCF) en Hz, los porcentajes de movilidad total (MT), movilidad progresiva (MP), linealidad (LIN), rectitud (STR), oscilación (WOB), velocidad rectilínea (VSL  $\mu\text{ms}^{-1}$ ), velocidad curvilínea (VCL  $\mu\text{ms}^{-1}$ ), velocidad media (VAP  $\mu\text{ms}^{-1}$ ), el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) en  $\mu\text{m}$  y la variable dance (DNC) en  $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ , la cual es producto de  $\text{VCL} \times \text{ALH}$  (Contri et al., 2012).

Se calculó la concentración de espermatozoides en el eyaculado mediante el uso de un fotómetro marca Accuread® (IMV Technologies, L'Aigle, Francia). Previo a realizar el cálculo de la concentración, se calibró el fotómetro con agua destilada. Una vez calibrado el equipo en una micro cubeta, se realizó una disolución en una proporción 1:100 v/v de semen puro con agua destilada. De cada eyaculado se realizaron dos repeticiones y se reportó el promedio en millones de espermatozoides por mililitro de semen.

### Análisis estadístico

El análisis de normalidad y homocedasticidad se realizaron mediante las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene, respectivamente, para los datos de los análisis CASA-Mot de todos los espermatozoides analizados. Se confirmó el supuesto de la distribución normal mediante la utilización del papel probabilístico normal. Se realizó un análisis de varianza para determinar los efectos del diluyente, la edad y el estado sexual de los toros, así como las interacciones entre factores. El efecto de los factores se determinó sobre las variables cinéticas y de movilidad espermática. Se agregó un efecto residual aleatorio al modelo para tomar en cuenta las correlaciones entre diferentes eyaculados obtenidos del mismo toro. Cuando los efectos antes descritos fueron significativos se realizaron pruebas de comparación de medias  $\pm$  error estándar de la media (EE) mediante la prueba de Bonferroni. La significancia estadística se definió con un p-valor ( $p < 0,05$ ). Los datos se analizaron con el paquete IBM SPSS, versión 23.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU).

## Resultados

En el análisis de movilidad espermática, no hubo un efecto significativo ( $p > 0,05$ ) al utilizar los diluyentes comerciales Bioxcell® y Optixcell® sobre la MT. Sin embargo, sí se observó un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) sobre la MP, donde los valores más altos se obtuvieron en Bioxcell® ( $64,03 \pm 2,01$  %) respecto a un  $54,10 \pm 2,01$  % en Optixcell® (Cuadro 1). Los espermatozoides diluidos en Bioxcell® presentaron un movimiento lineal rápido y progresivo en relación con un movimiento más lento, no progresivo y oscilatorio presentado con el diluyente Optixcell® (Figura 1). La VSL ( $103,70 \pm 0,26 \mu\text{m s}^{-1}$ ) y VAP ( $110,65 \pm 0,26 \mu\text{m s}^{-1}$ ) fueron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) en Bioxcell® en comparación con Optixcell® con  $86,60 \pm 0,24 \mu\text{m s}^{-1}$  y  $106,67 \pm 0,24 \mu\text{m s}^{-1}$ , respectivamente (Cuadro 1).

La VCL presentó un patrón significativamente diferente, con un valor mayor con el diluyente Optixcell® ( $179,27 \pm 0,37 \mu\text{m s}^{-1}$ ) respecto a Bioxcell® ( $140,88 \pm 0,40 \mu\text{m s}^{-1}$ ). Las variables de relaciones de la velocidad espermática LIN ( $72,47 \pm 0,11$ ), STR ( $89,99 \pm 0,11$ ) y WOB ( $78,05 \pm 0,08$ ) fueron mayores significativamente con el diluyente Bioxcell®. Las variables de oscilación espermática ALH ( $3,77 \pm 0,01 \mu\text{m}$ ) y BCF ( $17,17 \pm 0,03$  Hz) fueron mayores significativamente en el diluyente comercial Optixcell®. La variable DNC ( $814,98 \pm 2,84$ ) fue significativamente mayor en Optixcell® (Cuadro 1).

El efecto de la edad de los animales sobre la variable MT no fue estadísticamente significativo ( $p > 0,05$ ), sin embargo, sí influyó significativamente sobre la MP. Los animales mayores a 48 meses presentaron MP de

**Cuadro 1.** Variables de movilidad y cinética espermática (media  $\pm$  EE) en semen fresco de toros Brahman (*Bos indicus*), medidas en dos diluyentes seminales. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Laboratorio de Reproducción Animal, Campus Tecnológico Local San Carlos, Costa Rica. 2021.

**Table 1.** Motile and kinematics sperm variables (mean  $\pm$  SEM) in fresh semen from Brahman (*Bos indicus*) bulls, measured in two semen extenders. Costa Rica Institute of Technology, Animal Reproduction Laboratory, San Carlos Campus, Costa Rica. 2021.

Variable	Bioxcell®	Optixcell®
MT	71,33 $\pm$ 2,20	73,88 $\pm$ 2,20
MP	64,03 $\pm$ 2,01 <sup>a</sup>	54,10 $\pm$ 2,01 <sup>b</sup>
VCL	140,88 $\pm$ 0,40 <sup>b</sup>	179,27 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>
VSL	103,70 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	86,60 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>
VAP	110,65 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	106,67 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>
LIN	72,47 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	50,34 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>
STR	89,99 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	79,35 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>
WOB	78,05 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	61,26 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>
ALH	2,63 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	3,77 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
BCF	15,24 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	17,17 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
DNC	429,54 $\pm$ 3,08 <sup>b</sup>	814,98 $\pm$ 2,84 <sup>a</sup>

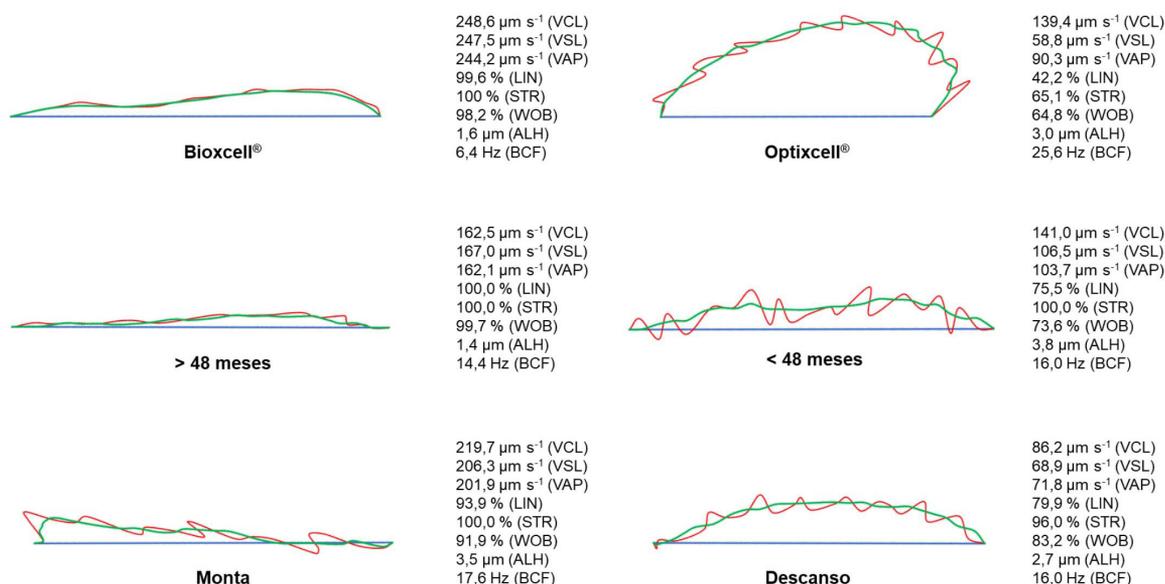
MT: movilidad total (%); MP: movilidad progresiva (%); VCL: velocidad curvilínea ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); VSL: velocidad rectilínea ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); VAP: velocidad promedio de la trayectoria ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); LIN: linealidad de la progresión (%); STR: índice de rectitud (%); WOB: oscilación de la trayectoria (%); ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza ( $\mu\text{m}$ ); BCF: frecuencia de entrecruzamiento (Hz); DNC: dance ( $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ). EE: error estándar de la media. <sup>a-b</sup> Letras diferentes dentro de línea, indican diferencias entre los diluyentes  $p < 0,05$ . / MT= total motility (%); MP= progressive motility (%); VCL: curvilinear velocity ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); VSL: straight-line velocity ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); VAP: average path velocity ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); LIN: linearity of forward progression (%); STR: straightness index (%); WOB: oscillation of the trajectory (%); ALH: amplitude of lateral head displacement ( $\mu\text{m}$ ); BCF: beat-cross frequency (Hz); DNC: dance ( $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ). EE: standard error of the mean. <sup>a-b</sup> Different letters within rows, indicate differences between extenders  $p < 0,05$ .

62,27 $\pm$ 1,87 % respecto a 55,86 $\pm$ 2,14 % en los toros menores de 48 meses. Se observó un efecto ( $p < 0,05$ ) de la edad de los animales sobre la VSL, los animales mayores de 48 meses presentaron los valores medios más altos respecto a los menores de 48 meses con 95,66 $\pm$ 0,26  $\mu\text{m s}^{-1}$  y 94,64 $\pm$ 0,26  $\mu\text{m s}^{-1}$ , respectivamente (Cuadro 2).

Los parámetros de velocidad espermática (VAP y VCL) no presentaron diferencias entre los dos grupos de edades ( $p > 0,05$ ). Sí hubo un efecto de la edad ( $p < 0,05$ ) sobre LIN, STR y WOB. La LIN fue superior ( $p < 0,05$ ) en animales menores de 48 meses respecto de los adultos ( $> 48$  meses) con valores de 61,63 $\pm$ 0,11 % y 61,19 $\pm$ 0,11 %, respectivamente. Un fenómeno similar se presentó para la variable WOB. Esto sugiere un comportamiento menos lineal y oscilatorio en la trayectoria de estos últimos (Figura 1).

La STR fue mayor ( $p < 0,05$ ) en los animales de mayores de 48 meses (85,14 $\pm$ 0,10 %) respecto a los menores de esa edad (84,20 $\pm$ 0,10 %). Los animales menores de 48 meses presentaron valores más altos para la ALH (3,24 $\pm$ 0,01  $\mu\text{m}$ ) y DNC (639,22 $\pm$ 2,99), que fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) a los observados para los animales mayores de 48 meses. La BCF presentó diferencias significativas entre los dos grupos de edades ( $p < 0,05$ ), y los valores más altos se observaron en los animales mayores de 48 meses (Cuadro 2).

En cuanto al estado sexual de los animales, no se encontró un efecto estadísticamente significativo ( $p > 0,05$ ) sobre las variables MT y MP. Sin embargo, este sí influyó ( $p < 0,05$ ) sobre las variables de cinética espermática. La



**Figura 1.** Trayectoria de espermatozoides según diluyente, edad y estado sexual en toros Brahman (*Bos indicus*). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Laboratorio de Reproducción Animal, Campus Tecnológico Local San Carlos, Costa Rica. 2021.

Línea azul: velocidad rectilínea (VSL); línea roja: velocidad curvilínea (VCL); línea verde: velocidad promedio de la trayectoria (VAP); linealidad de la progresión (LIN); índice de rectitud (STR); oscilación de la trayectoria (WOB); amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH); frecuencia de entrecruzamiento (BCF).

**Figure 1.** Sperm tracks according to extender, age, and sexual status in Brahman (*Bos indicus*) bulls. Costa Rica Institute of Technology, Animal Reproduction Laboratory, San Carlos Campus, Costa Rica. 2021.

Blue line: straight-line velocity (VSL); red line: curvilinear velocity (VCL); green line: average path velocity (VAP); linearity of forward progression (LIN); straightness index (STR); oscillation of the trajectory (WOB); amplitude of lateral head displacement (ALH); beat-cross frequency (BCF).

VSL y VAP fueron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) en los animales que estuvieron en monta ( $99,09 \pm 0,32 \mu\text{m s}^{-1}$ ;  $112,13 \pm 0,31 \mu\text{m s}^{-1}$ ) respecto a los que estaban en descanso ( $91,21 \pm 0,17 \mu\text{m s}^{-1}$ ;  $105,20 \pm 0,17 \mu\text{m s}^{-1}$ ). La VCL ( $163,22 \pm 0,26 \mu\text{m s}^{-1}$ ) fue significativamente mayor en los animales que estuvieron en descanso. Se evidenció un efecto ( $p < 0,05$ ) sobre las variables de linealidad y rectitud de las células (LIN, STR y WOB), que fueron las medias mayores durante la monta (Cuadro 3), lo que describe una mayor progresividad en la trayectoria respecto al descanso (Figura 1). Las variables de oscilación espermática ALH y BCF fueron mayores ( $p < 0,05$ ) durante el descanso sexual. La variable DNC presentó el mismo comportamiento, ya que fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) durante el descanso sexual respecto a la monta natural (Cuadro 3).

La interacción entre las variables fijas diluyente  $\times$  edad y edad  $\times$  estado sexual del animal, presentaron diferencias significativas estadísticamente ( $p < 0,05$ ) para todas las variables de cinética espermática (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF y DNC). La interacción diluyente  $\times$  estado sexual del animal fue significativa para VCL, VSL, LIN, WOB, ALH y DNC, sin embargo, esta no fue significativa para la variable de velocidad VAP, la relación de velocidades STR y la variable de oscilación espermática BCF. La interacción de las tres variables fijas diluyente  $\times$  estado sexual  $\times$  edad fue significativa para todas las variables de cinética espermática con excepción de la VCL (Cuadro 4).

**Cuadro 2.** Variables de movilidad y cinética espermática (media  $\pm$  EE) en semen fresco de toros Brahman (*Bos indicus*), medidas en diferentes edades. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Laboratorio de Reproducción Animal, Campus Tecnológico Local San Carlos, Costa Rica. 2021.

**Table 2.** Motile and kinematics sperm variables (mean  $\pm$  SEM) in fresh semen from Brahman (*Bos indicus*) bulls, measured at different ages. Costa Rica Institute of Technology, Animal Reproduction Laboratory, San Carlos Campus, Costa Rica. 2021.

Variable	>48 meses	<48 meses
MT	75,20 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup>	70,00 $\pm$ 2,34 <sup>a</sup>
MP	62,27 $\pm$ 1,87 <sup>a</sup>	55,86 $\pm$ 2,14 <sup>b</sup>
VCL	159,93 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	160,22 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>
VSL	95,66 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	94,64 $\pm$ 0,26 <sup>b</sup>
VAP	108,66 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	108,66 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>
LIN	61,19 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	61,63 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>
STR	85,14 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	84,20 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>
WOB	69,08 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	70,23 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>
ALH	3,16 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	3,24 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
BCF	16,43 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	15,97 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>
DNC	605,29 $\pm$ 2,93 <sup>b</sup>	639,22 $\pm$ 2,99 <sup>a</sup>

MT: movilidad total (%); MP: movilidad progresiva (%); VCL: velocidad curvilínea ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); VSL: velocidad rectilínea ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); VAP: velocidad promedio de la trayectoria ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); LIN: linealidad de la progresión (%); STR: índice de rectitud (%); WOB: oscilación de la trayectoria (%); ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza ( $\mu\text{m}$ ); BCF: frecuencia de entrecruzamiento (Hz); DNC: dance ( $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ). EE: error estándar de la media. <sup>a,b</sup> Letras diferentes dentro de línea, indican diferencias entre las edades de los toros  $p < 0,05$ . / MT: total motility (%); MP: progressive motility (%); VCL: curvilinear velocity ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); VSL: straight-line velocity ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); VAP: average path velocity ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); LIN: linearity of forward progression (%); STR: straightness index (%); WOB: oscillation of the trajectory (%); ALH: amplitude of lateral head displacement ( $\mu\text{m}$ ); BCF: beat-cross frequency (Hz); DNC: dance ( $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ). EE: standard error of the mean. <sup>a,b</sup> Different letters within rows, indicate differences between bull ages  $p < 0,05$ .

**Cuadro 3.** Variables de movilidad y cinética espermática (media  $\pm$  EE) en semen fresco de toros Brahman (*Bos indicus*), medidas según estado sexual. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Laboratorio de Reproducción Animal, Campus Tecnológico Local San Carlos, Costa Rica. 2021.

**Table 3.** Motile and kinematics sperm variables (mean  $\pm$  SEM) in fresh semen from Brahman (*Bos indicus*) bulls, measured according to sexual state. Costa Rica Institute of Technology, Animal Reproduction Laboratory, San Carlos Campus, Costa Rica. 2021.

Variable	Descanso	Monta
MT	74,76 $\pm$ 1,72 <sup>a</sup>	70,44 $\pm$ 2,60 <sup>a</sup>
MP	59,71 $\pm$ 1,57 <sup>a</sup>	58,42 $\pm$ 2,37 <sup>a</sup>
VCL	163,22 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	156,93 $\pm$ 0,48 <sup>b</sup>
VSL	91,21 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>	99,09 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>
VAP	105,20 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>	112,13 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>
LIN	57,50 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	65,32 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>
STR	83,47 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	85,87 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>
WOB	66,10 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	73,21 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
ALH	3,38 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	3,02 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
BCF	16,51 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	15,89 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
DNC	660,77 $\pm$ 2,00 <sup>a</sup>	583,75 $\pm$ 3,68 <sup>b</sup>

MT: movilidad total (%); MP: movilidad progresiva (%); VCL: velocidad curvilínea ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); VSL: velocidad rectilínea ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); VAP: velocidad promedio de la trayectoria ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); LIN: linealidad de la progresión (%); STR: índice de rectitud (%); WOB: oscilación de la trayectoria (%); ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza ( $\mu\text{m}$ ); BCF: frecuencia de entrecruzamiento (Hz); DNC: dance ( $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ). EE: error estándar de la media. <sup>a,b</sup> Letras diferentes dentro de línea, indican diferencias entre el estado sexual del animal  $p < 0,05$ . / MT: total motility (%); MP: progressive motility (%); VCL: curvilinear velocity ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); VSL: straight-line velocity ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); VAP: average path velocity ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); LIN: linearity of forward progression (%); STR: straightness index (%); WOB: oscillation of the trajectory (%); ALH: amplitude of lateral head displacement ( $\mu\text{m}$ ); BCF: beat-cross frequency (Hz); DNC: dance ( $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ). SEM: standard error of the mean. <sup>a,b</sup> Different letters within rows, indicate differences between sexual state of the animal  $p < 0,05$ .

**Cuadro 4.** Valores p de las interacciones bidireccionales de las variables fijas (diluyente, edad y estado sexual) en semen fresco de toros Brahman (*Bos indicus*). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Laboratorio de Reproducción Animal, Campus Tecnológico Local San Carlos, Costa Rica. 2021.

**Table 4.** P-values of the two-way interactions of the fixed variables (extender, age, and sexual status) in fresh semen from Brahman (*Bos indicus*) bulls. Costa Rica Institute of Technology, Animal Reproduction Laboratory, San Carlos Campus, Costa Rica. 2021.

Variable	Interacción			
	Diluyente × edad	Diluyente × estado sexual	Edad × estado sexual	Diluyente × estado sexual × edad
VCL	*	*	*	0,42
VSL	*	*	*	*
VAP	*	0,65	*	*
LIN	*	*	*	*
STR	*	0,54	*	*
WOB	*	*	*	*
ALH	*	*	*	*
BCF	*	0,22	*	*
DNC	*	*	*	*

VCL: velocidad curvilínea ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); VSL: velocidad rectilínea ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); VAP: velocidad promedio de la trayectoria ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); LIN: linealidad de la progresión (%); STR: índice de rectitud (%); WOB: oscilación de la trayectoria (%); ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza ( $\mu\text{m}$ ); BCF: frecuencia de entrecruzamiento (Hz); DNC: dance ( $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ). \*:  $p < 0,05$ . / VCL: curvilinear velocity ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); VSL: straight-line velocity ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); VAP: average path velocity ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); LIN: linearity of forward progression (%); STR: straightness index (%); WOB: oscillation of the trajectory (%); ALH: amplitude of lateral head displacement ( $\mu\text{m}$ ); BCF: beat-cross frequency (Hz); DNC: dance ( $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ). \*:  $p < 0,05$ .

## Discusión

En los análisis seminales diversos factores influyeron sobre el resultado final. Uno de ellos fue el diluyente utilizado para preservar el eyaculado, pero para lograr obtener un resultado sobre el mejor diluyente, según el material genético que se desea preservar, se deben realizar pruebas que permitan comparar la movilidad y cinética de los espermatozoides contenidos en el eyaculado (Viquez et al., 2021).

El efecto del diluyente en semen fresco ha sido estudiado en gallos (Łukaszewicz et al., 2020; Siudzińska & Łukaszewicz, 2008), macho cabrío (Yodmingkwan et al., 2016), morueco (Fernandes et al., 2021; Kumar Paul et al., 2019; Leugoué Kameni et al., 2021; O'Hara et al., 2010), búfalo (Akhter et al., 2011; Kumar et al., 2015), caballo (Hernández-Avilés et al., 2018) y toro (Beran et al., 2012; Murphy et al., 2017; Murphy, Eivers, et al., 2018; Teik Chung et al., 2019; Viquez et al., 2021). Lo anterior debido a que sin un correcto análisis se podría asumir que los diluyentes no influyen sobre el movimiento, tal como se obtuvo en esta investigación para la movilidad total. Sin embargo, al ser más robusto el análisis se podrían presentar diferencias que generan un impacto significativo en la calidad seminal y hasta en la rentabilidad.

Al utilizar Optixcell® se generó una disminución sobre la cinética espermática al reducirse el movimiento rectilíneo de los espermatozoides, lo que impactó de forma directa la movilidad progresiva. La evidencia causa-efecto indica que el diluyente fue el responsable de esta disminución, debido a que se analizó el mismo eyaculado y el movimiento total fue similar; sin embargo, mediante las variables cinéticas se obtiene una reducción en la progresividad, de manera que las características de cada diluyente condicionan los resultados (Viquez et al., 2021), lo que genera una desventaja considerable sobre el potencial de fecundación de los espermatozoides.

La práctica habitual de reducir la cantidad de dosis seminales debido a que se debe aumentar la concentración espermática para contrarrestar la disminución en la calidad espermática, es una rutina que debe minimizarse en los laboratorios de inseminación artificial. Esto hace que se necesite una mayor cantidad de espermatozoides para producir una dosis y por ende, la cantidad de dosis totales disminuirá. Además, se genera una disminución en la eficiencia reproductiva y, en los centros de biotecnologías reproductivas, los ingresos por concepto de dosis serán menores. Por lo tanto, no se aprovecharía la ventaja competitiva del semen fresco que permite generar más dosis seminales por eyaculado (Murphy, Eivers, et al., 2018).

Factores intrínsecos del animal como la edad generan diferentes resultados (García et al., 2017; Kondracki et al., 2012; Snoj et al., 2013; Tatman et al., 2004). Esto debido a que los animales muy jóvenes están en crecimiento y cuando inician en su edad de servicio no se ha completado su desarrollo fisiológico (Majić Balić et al., 2012; Murphy, Kelly, et al., 2018). En contraparte, los animales longevos ya han alcanzado su desarrollo y su comportamiento reproductivo es muy estándar a lo largo de su ciclo; sin embargo, al alcanzar cierta edad, la cual estará determinada por su raza, su rendimiento decae y deben descartarse como reproductores (Argiris et al., 2018; Schenk, 2018).

En este estudio se analizaron animales de  $45,50 \pm 19,24$  meses y se clasificaron según su edad en longevos ( $>48$  meses) y jóvenes ( $<48$  meses), donde los animales de  $>48$  meses presentaron un mejor rendimiento al presentar una mayor movilidad progresiva en comparación con los animales jóvenes. Además, al analizar el patrón del movimiento y ondulación de la célula se obtiene un mayor movimiento circular por parte de los espermatozoides de animales  $<48$  meses.

Los datos de movilidad y cinética espermática observados son consistentes con estudios realizados en macho cabrío, donde se demuestra que la edad del animal influye sobre parámetros espermáticos, animales más maduros presentan mayores valores para el volumen del eyaculado (macroscópico) y a nivel microscópico la concentración, viabilidad, integridad de la membrana, movilidad y anomalías de las células espermáticas (García et al., 2017). Este efecto se ha estudiado en toros, donde se correlaciona la edad y desarrollo del animal con la circunferencia escrotal, por consiguiente la circunferencia escrotal es un parámetro determinante en la calidad seminal (Fuerst-Waltl et al., 2006; Snoj et al., 2013).

Hubo diferencias en la linealidad, velocidad y oscilación espermática, de manera que los animales en descanso poseían mayor movimiento circular y menor progresividad en comparación con los animales en periodo de monta. Algunos investigadores han demostrado que los animales en descanso sexual no poseen una alta tasa de renovación de espermatozoides y almacenan los que producen, con el tiempo los reabsorben y producen más espermatozoides (Clermont, 1972; Staub & Johnson, 2018). En contraparte, los animales con actividad sexual se encuentran en constante producción de espermatozoides y esto se asocia con una mejor calidad espermática, debido a la alta tasa de renovación y el tiempo de sobrevivencia de estos gametos.

## Conclusiones

Con base en los diluyentes de semen bovino analizados, el tipo de diluyente influyó sobre la movilidad y cinética espermática medida con sistemas CASA-Mot. Los animales de mayor edad presentaron patrones cinemáticos más progresivos que animales más jóvenes. El estado sexual en monta presentó valores de progresividad celular mayores que los animales que se encontraban en descanso sexual. Es necesario realizar estudios posteriores, a la luz de los resultados del presente trabajo, para estandarizar protocolos de manejo seminal en semen fresco y determinar umbrales óptimos de edad, así como optimizar los tiempos de descanso y monta de toros en edad reproductiva.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) por el financiamiento de este estudio. Este trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE), del Instituto Tecnológico de Costa Rica, proyecto VIE-5402-2151-1013 (Desarrollo de la metodología de análisis integrado de semen en ganado *Bos indicus*). Los patrocinadores no tuvieron ninguna participación en el diseño del estudio, la recopilación y el análisis de datos, la decisión de publicar o la preparación del manuscrito.

## Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

## Referencias

- Akhter, S., Ansari, M. S., Rakha, B. A., Ullah, N., Andrabi, S. M. H., & Khalid, M. (2011). In vitro evaluation of liquid-stored buffalo semen at 5°C diluted in soya lecithin based extender (Bioxcell®), tris-citric egg yolk, skim milk and egg yolk-citrate extenders. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(1), 45–49. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2009.01561.X>
- Amann, R. P., & Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81(1), 5–17.e3. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2013.09.004>
- Argiris, A., Ondho, Y. S., Santoso, S. I., & Kurnianto, E. (2018). Effect of age and bulls on fresh semen quality and frozen semen production of holstein bulls in Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 119(1), Article 012033. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/119/1/012033>
- Ball, L., & Furman, J. W. (1972). Electroejaculation of the bull. *The Bovine Practitioner*, 7, 46–48. <https://doi.org/10.21423/bovine-vol1972no7p46-48>
- Barth, A. D. (2018). Review: The use of bull breeding soundness evaluation to identify subfertile and infertile bulls. *Animal*, 12(S1), s158–s164. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000538>
- Beran, J., Stádník, L., Bezdříček, J., Louda, F., Čítek, J., & Ducháček, J. (2012). Effect of sire and extender on sperm motility and share of live or dead sperm in bulls' fresh ejaculate and in AI doses after thawing. *Archives Animal Breeding*, 55(3), 207–218. <https://doi.org/10.5194/AAB-55-207-2012>
- 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. R. S., 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>
- Broekhuijse, M. L. W. J., Šoštarić, E., Feitsma, H., & Gadella, B. M. (2011). Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. *Theriogenology*, 76(8), 1473–1486.e1. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.040>

- Büyükleblebici, S., Barbaros Tuncer, P., Numan Bucak, M., Eken, A., Sariözkan, S., Taşdemir, U., & Ünlü Endirlik, B. (2014). Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. *Animal Reproduction Science*, *150*(3–4), 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.006>
- Caldeira, C., Hernández-Ibáñez, S., Valverde, A., Martín, 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>
- Calderón-Calderón, J., Sevilla, F., Roldan, E. R. S., Barquero, V., & Valverde, A. (2022). Influence of fat-soluble vitamin intramuscular supplementation on kinematic and morphometric sperm parameters of boar ejaculates. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*, Article 908763. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2022.908763>
- Clermont, Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews*, *52*(1), 198–236. <https://doi.org/10.1152/physrev.1972.52.1.198>
- Contri, A., Zambelli, D., Faustini, M., Cunto, M., Gloria, A., & Carluccio, A. (2012). Artificial neural networks for the definition of kinetic subpopulations in electroejaculated and epididymal spermatozoa in the domestic cat. *Reproduction*, *144*(3), 339–347. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0125>
- Fernandes, M., Rodríguez Hernández, P., Simões, J., & Barbas, J. P. (2021). Effects of three semen extenders, breeding season month and freezing–thawing cycle on spermatozoa preservation of portuguese Merino sheep. *Animals*, *11*(9), Article 2619. <https://doi.org/10.3390/ANI11092619>
- Fernandes Júnior, G. A., Alves Silva, D., Macedo Mota, L. F., Pinto de Melo, T., Simielli Fonseca, L. F., dos Santos Silva, D. B., Carvalheiro, R., & Galvão Albuquerque, L. (2022). Sustainable intensification of beef production in the tropics: The role of genetically improving sexual precocity of heifers. *Animals*, *12*(2), Article 174. <https://doi.org/10.3390/ani12020174>
- Fuerst-Waltl, B., Schwarzenbacher, H., Perner, C., & Sölkner, J. (2006). Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. *Animal Reproduction Science*, *95*(1–2), 27–37. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2005.09.002>
- Gadea, J. (2003). Review: semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*, *1*(2), 17–27. <https://doi.org/10.5424/sjar/2003012-17>
- Gadea, J., Sellés, E., & Marco, M. A. (2004). The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Reproduction in Domestic Animals*, *39*(5), 303–308. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00513.x>
- García, W., Tabarez, A., & Palomo, M. J. (2017). Effect of the type of egg yolk, removal of seminal plasma and donor age on ram sperm cryopreservation. *Animal Reproduction*, *14*(4), 1124–1132. <http://doi.org/10.21451/1984-3143-AR916>
- Hahn, K., Failing, K., & Wehrend, A. (2019). Effect of temperature and time after collection on buck sperm quality. *BMC Veterinary Research*, *15*(1), Article 355. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2135-y>
- Hernández-Avilés, C., Serafini, R., Love, C. C., Teague, S. R., LaCaze, K. A., Lawhon, S. D., Wu, J., Blanchard, T. L., & Varner, D. D. (2018). The effects of antibiotic type and extender storage method on sperm quality and antibacterial

- effectiveness in fresh and cooled-stored stallion semen. *Theriogenology*, *122*, 23–29. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2018.08.022>
- Ibănescu, I., Leiding, C., Ciornei, Ș. G., Roșca, P., Sfartz, I., & Drugociu, D. (2016). Differences in CASA output according to the chamber type when analyzing frozen-thawed bull sperm. *Animal Reproduction Science*, *166*, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.005>
- Ilaqua, A., Izzo, G., Emerenziani, G. P., Baldari, C., & Aversa, A. (2018). Lifestyle and fertility: the influence of stress and quality of life on male fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *16*(1), Article 115. <https://doi.org/10.1186/S12958-018-0436-9>
- Kondracki, S., Iwanina, M., Wysokińska, A., & Huszno, M. (2012). Comparative analysis of Duroc and Pietrain boar sperm morphology. *Acta Veterinaria Brno*, *81*(2), 195–199. <https://doi.org/10.2754/avb201281020195>
- Kumar, P., Saini, M., Kumar, D., Balhara, A. K., Yadav, S. P., Singh, P., & Yadav, P. S. (2015). Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science*, *159*, 38–45. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2015.05.010>
- Kumar Paul, R., Balaganur, K., Kumar, D., & Singh, R. (2019). Mimicking the cauda epididymal plasma-like osmolality in extender improves liquid preservation of ram semen at 3–5°C. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *65*(6), 474–482. <https://doi.org/10.1080/19396368.2019.1642416>
- Leugoué Kameni, S., Meutchieye, F., & Ngoula, F. (2021). Liquid storage of ram semen: associated damages and improvement. *Open Journal of Animal Sciences*, *11*, 473–500. <https://doi.org/10.4236/OJAS.2021.113033>
- Łukaszewicz, E., Jerysz, A., & Kowalczyk, A. (2020). Effect of semen extenders on viability of ISA Brown and Hubbard Flex roosters' sperm stored for 24 h. *Poultry Science*, *99*(5), 2766–2774. <https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2019.12.055>
- Majić Balić, I., Milinković-Tur, S., Samardžija, M., & Vince, S. (2012). Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in simmental bulls. *Theriogenology*, *78*(2), 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.022>
- Morrell, J. M., Valeanu, A. S., Lundeheim, N., & Johannisson, A. (2018). Sperm quality in frozen beef and dairy bull semen. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *60*(1) Article 41. <https://doi.org/10.1186/s13028-018-0396-2>
- Mortimer, S. T., van der Horst, G., & Mortimer, D. (2015). The future of computer-aided sperm analysis. *Asian Journal of Andrology*, *17*(4), 545–553. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.154312>
- Murphy, E., Eivers, B., O'Meara, C. M., Lonergan, P., & Fair, S. (2018). Effect of increasing equilibration time of diluted bull semen up to 72 h prior to freezing on sperm quality parameters and calving rate following artificial insemination. *Theriogenology*, *108*, 217–222. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.034>
- Murphy, C., Holden, S. A., Murphy, E. M., Cromie, A. R., Lonergan, P., & Fair, S. (2016). The impact of storage temperature and sperm number on the fertility of liquid-stored bull semen. *Reproduction, Fertility and Development*, *28*(9), 1349–1359. <https://doi.org/10.1071/RD14369>
- Murphy, E. M., Kelly, A. K., O'Meara, C., Eivers, B., Lonergan, P., & Fair, S. (2018). Influence of bull age, ejaculate number, and season of collection on semen production and sperm motility parameters in holstein friesian bulls in a commercial artificial insemination centre. *Journal of Animal Science*, *96*(6), 2408–2418. <https://doi.org/10.1093/jas/sky130>

- Murphy, E. M., Murphy, C., O'Meara, C., Dunne, G., Eivers, B., Lonergan, P., & Fair, S. (2017). A comparison of semen diluents on the *in vitro* and *in vivo* fertility of liquid bull semen. *Journal of Dairy Science*, *100*(2), 1541–1554. <https://doi.org/10.3168/JDS.2016-11646>
- O'Hara, L., Hanrahan, J. P., Richardson, L., Donovan, A., Fair, S., Evans, A. C. O., & Lonergan, P. (2010). Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, *73*(4), 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.009>
- Pongsiri, W., Rungruangsak, J., Pant, S. D., & Stephen, C. P. (2020). The effect of false mount on quality of frozen-thawed semen in *Bos indicus* beef bulls. *Journal of Veterinary Medical Science*, *82*(5), 673–677. <https://doi.org/10.1292/JVMS.20-0025>
- Romano, J. E., Mari, G., Stradaoli, G., & Mislei, B. (2021). Effect of fasting prior to electroejaculation on behavioral responses and reproductive parameters in young Simmental bulls. *Theriogenology*, *173*, 19–22. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2021.05.019>
- Şahin, D., Baştan, İ., Çil, B., Tekin, K., Akçay, E., Daşkın, A., & Stelletta, C. (2020). The number of false mounting affects the quality of semen in bulls. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, *60*(1), 9–14. <https://doi.org/10.46897/LAHAED.701388>
- Schenk, J. L. (2018). Review: Principles of maximizing bull semen production at genetic centers. *Animal*, *12*(S1), s142–s147. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000472>
- Sikka, S. C. (2004). Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *Journal of Andrology*, *25*(1), 5–18. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02751.x>
- Siudzińska, A., & Łukaszewicz, E. (2008). Effect of semen extenders and storage time on sperm morphology of four chicken breeds. *Journal of Applied Poultry Research*, *17*(1), 101–108. <https://doi.org/10.3382/japr.2007-00048>
- Snoj, T., Kobal, S., & Majdic, G. (2013). Effects of season, age, and breed on semen characteristics in different *Bos taurus* breeds in a 31-year retrospective study. *Theriogenology*, *79*(5), 847–852. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2012.12.014>
- Staub, C., & Johnson, L. (2018). Review: Spermatogenesis in the bull. *Animal*, *12*(1), s27–s35. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000435>
- Sundararaman, M. N., Kalatharan, J., & Thalik Pon Jawahar, K. (2012). Computer assisted semen analysis for quantification of motion characteristics of bull sperm during cryopreservation cycle. *Veterinary World*, *5*(12), 723–726. <https://doi.org/10.5455/vetworld.2012.723-726>
- Taaffe, P., O'Meara, C. M., Stivnicka, M., Byrne, C. J., Eivers, B., Lonergan, P., & Fair, S. (2022). Increasing the frequency of ejaculate collection in young dairy bulls increases semen production and field fertility. *Theriogenology*, *182*, 45–52. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2022.01.030>
- Tatman, S. R., Neuendorff, D. A., Wilson, T. W., & Randel, R. D. (2004). Influence of season of birth on growth and reproductive development of Brahman bulls. *Theriogenology*, *62*(1–2), 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.07.027>

- Teik Chung, E. L., Nayan, N., Mohammad Nasir, N. S., Hing, P. S. A., Ramli, S., Abdul Rahman, M. H., & Hamidi Kamalludin, M. (2019). Effect of honey as an additive for cryopreservation on bull semen quality from different cattle breeds under tropical condition. *Journal of Animal Health and Production*, 7(4), 171–178. <https://doi.org/10.17582/JOURNAL.JAHP/2019/7.4.171.178>
- Thundathil, J. C., Dance, A. L., & Kastelic, J. P. (2016). Fertility management of bulls to improve beef cattle productivity. *Theriogenology*, 86(1), 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.054>
- Tvrda, E., Kňazická, Z., Lukáčová, J., Schneidgenová, M., Goc, Z., Greň, A., Szabó, C., Massányi, P., & Lukáč, N. (2013). The impact of lead and cadmium on selected motility, prooxidant and antioxidant parameters of bovine seminal plasma and spermatozoa. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 48(10), 1292–1300. <https://doi.org/10.1080/10934529.2013.777243>
- Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Iis Arifiantini, R., Purwantara, B., Kaya, A., & Memili, E. (2019). Advances in cryopreservation of bull sperm. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, Article 268. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>
- Valverde, A., Madrigal, M., Caldeira, C., Bompert, D., Núñez de Murga, J., 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. (2018). Sistemas de análisis computadorizado de semen en la reproducción animal. *Agronomía Mesoamericana*, 29(2), 469–484. <https://doi.org/10.15517/ma.v29i2.30613>
- Valverde, A., Madrigal-Valverde, M., Camacho-Calvo, M., Zambrana-Jiménez, A., & López, L. (2018). Efecto de la composición racial sobre la calidad espermática de verracos. *Agronomía Mesoamericana*, 29(3), 485–506. <https://doi.org/10.15517/ma.v29i3.32445>
- Valverde, A., Madrigal-Valverde, M., Lotz, J., Bompert, D., & Soler, C. (2019). Effect of video capture time on sperm kinematic parameters in breeding boars. *Livestock Science*, 220, 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.12.008>
- 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>
- Viquez, L., Barquero, V., & Valverde, A. (2021). Condiciones óptimas de análisis cinético en semen fresco de toros Brahman con un sistema CASA-Mot. *Agronomía Mesoamericana*, 32(3), 920–938. <https://doi.org/10.15517/am.v32i3.42768>
- Waberski, D., Suarez, S. S., & Henning, H. (2022). Assessment of sperm motility in livestock: Perspectives based on sperm swimming conditions *in vivo*. *Animal Reproduction Science*, 246, Article 106849. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106849>
- Wu, Y., Wang, C., Tan, J., Wei, H-k., Sun, H., & Peng, J. (2019). Logistic regression analysis factors affecting sperm motility and abnormal sperm morphology in boars. *Animals*, 9(12), Article 1004. <https://doi.org/10.3390/ANI9121004>
- Yodmingkwan, P., Guntaprom, S., Jaksamrit, J., & Lertchunhakiat, K. (2016). Effects of extenders on fresh and freezing semen of Boer goat. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 11, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.12.021>