

134
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN DE LA MOVILIDAD DE SEMEN BOVINO CRIOPRESERVADO
COMPARANDO EL METODO VISUAL CONTRA UN MÉTODO
COMPUTARIZADO (COMPUTER ASSISTED SPERM ANALYSIS)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

PEDRO PABLO SOTO PÉREZ

ASESORES: MVZ. M. P. A. ANTONIO PORRAS ALMERAYA
MVZ. M. P. A. ARMANDO PALACIOS ANGOLA

MÉXICO D.F.

1996.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**EVALUACIÓN DE LA MOVILIDAD DE SEMEN BOVINO CRIOPRESERVADO
COMPARANDO EL METODO VISUAL CONTRA UN METODO COMPUTARIZADO
(COMPUTER ASSISTED SPERM ANALYSIS)**

**Tesis presentada ante la División de Estudios Profesionales
de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de Médico Veterinario y Zootecnista
por
Pedro Pablo Soto Pérez**

**Asesores: MVZ. M.P.A. Antonio Porras Aliteraya.
MVZ M.P.A. Armando Palacios Angola.**

México, D. F.

1995

EL EXITO

Refr mucho y a menudo; ganarse el respeto de las personas inteligentes y el aprecio de los niños; merecer el elogio de los críticos sinceros y mostrarse tolerante con las traiciones de los falsos amigos; saber apreciar la belleza y hallar lo mejor en el prójimo; hacer un mundo algo mejor, bien sea por medio de un hijo sano, de un rincón de jardín o de una condición social redimida; saber que al menos una vida ha alentado más libremente gracias a la nuestra: eso es haber triunfado.

Ralph Waldo Emerson.

DEDICATORIAS

A mis Padres con amor, cariño y admiración, es la mejor herencia que me han dado. Gracias.

A mis Hermanos por el cariño y apoyo que me dan.

Con profundo amor y agradecimiento a **Marcela**.

AGRADECIMIENTOS

A mi Universidad por la oportunidad que me brinda.

A mis Asesores por el tiempo y apoyo que me dedicaron.

Al MVZ Cesar Soto R. por iniciarme en esta área. Descanse en Paz.

Al MVZ Humberto Soto R. por compartir conocimientos y experiencias.

A todos mis Maestros.

A mis Amigos y Compañeros.

CONTENIDO

	Página
Resumen	1
Introducción	2
Objetivo	7
Material y métodos	8
Resultados	13
Discusión	15
Conclusión	17
Literatura citada	18
Cuadros	21
Gráficas	25

RESUMEN

SOTO PEREZ PEDRO PABLO. Evaluación de la movilidad de semen bovino criopreservado comparando el método visual contra un método computarizado (Computer Assisted Sperm Analysis, CASA). (Bajo la dirección del MVZ M. P. A. Antonio Porras Almeraya y el MVZ M. P. A. Armando Palacios Angola).

En el presente trabajo se comparó el método visual contra el método computarizado Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), para la evaluación de la movilidad espermática del semen bovino descongelado. Además se estimó que tanto influye la experiencia del técnico evaluador sobre dicha evaluación. Se utilizaron 53 muestras de semen bovino criopreservado, las cuales fueron descongeladas a 37 °C por un minuto. Se realizó una grabación en video de la imagen microscópica del semen para su posterior evaluación tanto por el sistema computarizado CASA como por el método visual de evaluación de la movilidad espermática, la cual fue realizada por técnicos evaluadores (10 expertos y 10 inexpertos). No se encontraron correlaciones significativas al comparar la movilidad espermática registrada por el método computarizado (Computer Assisted Sperm Analysis CASA) y la obtenida con el método tradicional o visual ($r=0.1657$; $p=.2357$). El valor promedio otorgado por el sistema CASA (54.4% movilidad espermática) defirió significativamente del estimado por los técnicos evaluadores expertos (32.2% movilidad espermática) e inexpertos (29.0% movilidad espermática). Solamente se encontró una correlación significativa ($r=0.77$; $p<0.001$) entre las calificaciones para la movilidad espermática entre los técnicos evaluadores. Únicamente se correlacionaron significativamente las calificaciones de 4 técnicos evaluadores expertos (XII, XIII, XVII Y XIX) con las calificaciones del sistema computarizado. Concluyendo, en general se pudo apreciar que el método computarizado (CASA) otorgó mejores calificaciones a la movilidad del semen bovino.

INTRODUCCION

Las características seminales han sido estudiadas ampliamente desde el desarrollo y establecimiento de la técnica de Inseminación Artificial (I. A). Por muchos años, los investigadores en espermatozoología han tenido como un objetivo importante el desarrollar pruebas que permitan evaluar e inferir sobre la capacidad fertilizadora de los espermatozoides de un eyaculado (1,5).

En la actualidad, se cuenta con gran variedad de pruebas para realizar la evaluación del semen de bovino, las cuales incluyen la observación de características tanto macroscópicas como microscópicas. Entre las características macroscópicas del semen que se evalúan normalmente están:

- **Volumen Seminal:** Se determina por lectura directa sobre la graduación del tubo colector; el volumen normal es de 2-15 ml por eyaculado (7, 15, 16).
- **Color del Semen:** Este depende de la concentración del semen, de impurezas contenidas en la muestra y de ciertos pigmentos; el color normal es blanco marfil. En ocasiones presenta un color amarillo verdoso provocado por la presencia de pigmentos de tipo xantoflavinicos, que no afectan la calidad del semen (15, 16).
- **Pureza del Semen:** Se puede determinar a simple vista por la homogeneidad, limpieza y color (15, 16).

- **pH del Semen:** Existen diferentes métodos para su evaluación, por ejemplo por medio de papel indicador o utilizando un potenciómetro; el pH normal del semen bovino es de 6.4 a 7.4 (7, 14, 16, 17).

En tanto que la evaluación microscópica del semen bovino considera entre otras características:

- **Concentración Espermática:** Es el número de células espermáticas por ml y se puede determinar a través de diferentes técnicas, por ejemplo: conteo en hematócrito o utilizando el fotolorímetro. En el toro normal la concentración espermática puede variar de 300,000,000 a 1,800,000,000 células por ml (3, 16).
- **Morfología Espermática:** Un eyaculado contiene normalmente cierta proporción de espermatozoides morfológicamente anormales, los cuales se pueden observar por medio del empleo de preparaciones teñidas. Contando el número de espermatozoides con algún tipo de anomalía morfológica se estima la proporción de células espermáticas normales. Las anomalías espermáticas se dividen en primarias y secundarias. Las primarias son debidas a una espermatogénesis defectuosa, ya sea, temporal o permanente, manifestada por anomalías de cabeza, cuello y colas estrechamente enrolladas o dobles, así como la presencia de gotas citoplasmáticas. Las secundarias son causadas por condiciones que influyen sobre los espermatozoides después de que estos han dejado los túbulos seminíferos, identificándose como cabezas separadas y colas flexionadas. El límite a considerar es máximo 10% de anomalías primarias y 20% de secundarias en total 30% de espermatozoides anormales (5, 16, 17).

- **Movilidad espermática:** Es quizá esta una de las características del semen bovino que se evalúan con mayor frecuencia, ya que se considera un buen indicador de la calidad del semen, más no es una forma exacta de predecir la capacidad potencial de fecundación de las células espermáticas. La valoración de la prueba comúnmente se hace observando una muestra de semen al microscopio. Esta se considera como una prueba subjetiva y requiriéndose de personal técnico con experiencia; la precisión de esta determinación varía de un técnico a otro (5, 6, 7, 15, 16, 20).

La evaluación de la movilidad espermática debe efectuarse rápidamente después de la obtención del semen, en las mejores condiciones, cuidando la temperatura de la muestra y del material utilizado, ya que la movilidad es una característica sensible a la temperatura. Se cuenta con diversos métodos para la evaluación de la movilidad espermática, entre los que destacan:

A. Estimación visual de la movilidad: Se determina colocando una gota del semen en un portaobjetos manteniendo a la temperatura adecuada (37°C). Se evalúa generalmente de dos maneras: por la observación de la movilidad en masa o general y por la movilidad individual (17).

1. La determinación de la movilidad en masa se realiza al observar en el microscopio a bajo aumento la gota de semen. Una muestra de buena calidad presenta la formación y desaparición sucesiva de remolinos más o menos enérgicos y oscuros; las muestras con baja movilidad no presentan la formación de remolinos o estos solo aparecen esporádicamente. Este tipo de movilidad se clasifica por medio de escalas numéricas o de símbolos; para establecer 4 o 5 niveles de movilidad, de 0 a 4 ó de 1 a 4 (17).

2. Para determinar la movilidad individual es necesario, colocar una gota delgada en el porta objetos, cubrirla con un cubre objetos y observarla en el microscópio a un aumento mayor. Al observar el semen se debe de poner atención en el tipo de movimiento que describen los espermatozoides y determinar la proporción de los mismos que presentan movimiento rectilíneo progresivo, que se toma como porcentaje de movilidad individual, esta puede ir de 0 a 100% en la especie bovina. Una muestra buena de semen fresco debe poseer cuando menos un 70% de movilidad espermática. (5, 6, 7, 15, 16, 20). Este método es el más utilizado tanto en centros de inseminación artificial, así como a nivel de campo, ya que es rápido y práctico sin que se requiera de un material sofisticado. Sin embargo los resultados de estos métodos están influenciados por el factor subjetivo, se indica que hay variaciones de 30 a 60% entre individuos y laboratorios al realizar la evaluación de esta manera (18).

Existen otros métodos de evaluación de la movilidad espermática que se considera más objetivos, pero menos utilizados debido a lo costoso y sofisticado del equipo, así se tiene, por ejemplo:

B. Estimación semiautomática: Este método se vale de la fotografía y la cinematografía para determinar la movilidad espermática, además de la estimación de características adicionales tales como velocidad y trayectoria de los espermatozoides, como ejemplo de estas técnicas tenemos:

1. Fotografía de tiempos: Esta se basa en emplear una cámara fotográfica adaptada a un microscopio de campo oscuro, la muestra a evaluar se diluye hasta tener 10 millones de células por ml y se toman seis exposiciones a intervalos de uno a dos segundos, después del revelado de la película se determina el número de células móviles, es decir aquellas que dejan evidencia de movimiento en la película (6, 9).

2. **Cinematografía:** Utiliza el mismo principio que la técnica anteriormente descrita, aunque en este caso se sustituye la cámara fotográfica por la cinematográfica, se filman los espermatozoides cuadro por cuadro y posteriormente se realiza una secuencia para visualizar el recorrido y determinar la movilidad, velocidad y la linealidad de la muestra (6, 9).

C. **Estimación automática o computarizada:** Consiste en acoplar la videomicrografía a un sistema computarizado, el cual consta de sistemas de software como; CASA (Computer Assisted Semen Analysis) o PAS (Programa para Análisis de Semen) que permite evaluar la movilidad espermática, así como otras características del movimiento. (10, 18) el equipo requerido consiste en lo siguiente:

- Un microscopio de contraste de fases con iluminación halógena de 100 vatios. En el revólver debe ir un objetivo de 10x, el cual permite un fondo visual oscuro y una imagen uniforme de los espermatozoides.
- Una cámara de vídeo de alta resolución conectada a un monitor, que sirve para detallar la mejor imagen que pueda ofrecer el microscopio. Este proceso es muy importante ya que el sistema analiza lo que "ve".
- Una grabadora de vídeo convencional, necesaria en los casos en que no se pueda evaluar en el momento o lugar, o se desee evaluar con tranquilidad.
- Una microcomputadora compatible IBM, la cual contiene las tarjetas y el programa para analizar el semen. A ella va conectado un monitor y una impresora. El monitor sirve para visualizar la

imagen digitalizada, la impresora permite presentar un informe escrito de la evaluación realizada (11).

Con objeto de obtener estimaciones más precisas de la movilidad espermática, en años recientes se han empleado métodos computarizados, lo que ha originado la publicación de estudios en los que se evalúan la movilidad espermática comparando el método computarizado y la evaluación visual del semen. Así Vantman *et al* (1988) estimaron la precisión y exactitud de la medición de la densidad espermática y porcentaje de movilidad en semen humano usando el sistema CASA, comparando los resultados con la metodología tradicional, encontrando una alta correlación entre ambos métodos (19). En otro estudio Mahony *et al* (1988) compararon la relación existente entre los valores reportados por dos sistemas comerciales (CRYO Resources y HTM-2000), encontrando una alta correlación entre los dos sistemas (8). En años más recientes Tuli *et al* (1992) evaluaron la movilidad espermática del semen fresco y descongelado de bovino, porcino y caprino comparando ambos métodos (visual contra computarizado). Estos autores encontraron una alta correlación entre ambos métodos tanto para el semen fresco como descongelado. (18) En un estudio similar, Palacios A. A. (1993) encontró una alta correlación entre ambos métodos al evaluar la movilidad espermática de semen equino (11).

Sin embargo aún existe poca información donde se comparen los métodos visual y computarizado para la evaluación del semen bovino criopreservado. Esto sería de interés si se considera que dicha movilidad disminuye en forma significativa de un 40 a 60% durante los procesos a los que se somete el semen para su criopreservación, ocasionando que los criterios para la evaluación del semen criopreservado sean diferentes a los del semen fresco.

OBJETIVOS.

- 1. Comparar el método visual y el computarizado para la evaluación de la movilidad espermática del semen bovino criopreservado.**
- 2. Estimar la influencia que tiene la experiencia del técnico sobre dicha evaluación.**

MATERIAL Y METODOS.

Localización.

El proceso de colecta y congelación del semen se realizó en el Centro Genético Copalar, ubicado en el km 84. 5 de la carretera Nautla-Poza Rica. Dicho centro se encuentra localizado dentro del municipio de Tecolutla del Edo. de Veracruz, 20° 30' Latitud Norte y 97° 01' Latitud Oeste, con una altitud de 3 MSNM de acuerdo a la clasificación de Köppen, modificado por García (1988), tiene un clima AM (c)w que indica caliente húmedo con lluvias todo el año, una precipitación pluvial anual de 1576 mm y una temperatura media anual de 23.3 °C (4).

Animales.

El estudio se llevó a cabo con 53 sementales (30 **Bos indicus** y 23 **Bos taurus**) que se encontraban en fincas particulares alrededor del Centro Genético y en servicio activo de inseminación artificial. Las edades de los animales fluctuaron entre 3 y 7 años, con un peso que varió de 450 a 900 kg. Estos animales fueron manejados de acuerdo a las prácticas convencionales de salud y alimentación de la zona. Antes de iniciar el experimento se realizó un examen con la finalidad de contar con animales en buenas condiciones de salud y producción de semen, desechando aquellos que presentaron alguna anomalía patológica.

Procesamiento del semen.

El diluyente utilizado para la congelación del semen fue a base de leche semidescremada que se preparó poco antes de la colección. El diluyente A contiene 10 gr de leche en polvo, 5% de yema de huevo, 1.0 gr de fructuosa, 3% de glicerina, 100,000 UI de penicilina y 100 mg de estreptomina diluido en 100 ml de agua bidestilada y mantenido a 34 °C. El diluyente B contiene los mismos ingredientes que el diluyente A, más 11% de glicerina, y se mantuvo a 5 °C para llevar a cabo la dilución. Se determinó el volumen de semen, concentración espermática y la movilidad progresiva individual calculando el diluyente necesario para lograr una concentración final de 60 millones de espermatozoides móviles por ml. Primero se agregó el diluyente A, enfriándolo gradualmente hasta 5 °C aproximadamente en 2 horas, posteriormente se estimó la cantidad de diluyente B que debería agregarse para que cada pajilla francesa de 0.5 ml tuviera 30 millones de espermatozoides móviles. El diluyente B se dividió en cuatro porciones, añadiéndose cada una a intervalos de 15 minutos, quedando finalmente el semen diluido con 7% de glicerina. Antes del congelamiento la dilución final se mantuvo a 5 °C durante 4 a 6 horas para permitir que las células espermáticas tuvieran el proceso de equilibrio con el diluyente, de modo que los espermatozoides estuvieran bien protegidos durante el congelamiento y descongelamiento. Las pajillas se imprimieron y se usaron para envasar el semen en un cuarto frío a 5 °C. Posteriormente se colocaron las pajillas a 12 cm de la superficie del nitrógeno líquido durante 15 minutos bajando la temperatura aproximadamente a -70 °C. Ya congeladas las pajillas se sumergieron en el nitrógeno líquido a -196 °C en el termo de almacenamiento.

Diseño experimental.

Para la realización del presente estudio, se procedió a la descongelación de 53 pajillas. El manejo y evaluación de cada pajilla fue el siguiente:

A. Proceso de descongelación.

El proceso de descongelado se realizó en un baño María a 37 °C durante un minuto, siguiendo la técnica descrita por Roberson y Middleton (1992) (13).

B. Redilución de las muestras.

De cada muestra se realizó una redilución del semen, para permitir que el análisis computarizado pudiera llevarse a cabo, debido a que el tipo de diluyente empleado (a base de yema de huevo) interfería con dicho análisis computarizado. Realizando los cálculos necesarios para que cada muestra contara con 10 millones de espermatozoides por ml, el rediluyente utilizado fue:

- 2.4 gr. de leche descremada.
- 2.9 gr. de fructuosa.
- 0.4 gr. de citrato de sodio.
- 100 ml de agua bidestilada.

C. Evaluación por el sistema Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) .

Se determinó la movilidad espermática utilizando el sistema Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), el cual requiere de ser calibrado, con objeto de fijar los parámetros necesarios para analizar semen bovino, como se indica a continuación:

- Número de cuadros a analizar [15]
- Número de cuadros por segundo [30]
- Muestra mínima para movilidad [1]
- Muestra mínima para velocidad [13]
- Velocidad máxima (micrones/seg.) [200]
- Velocidad mínima (micrones/seg.) [20]
- Nivel umbral de gris [60]
- Color de célula [blanco]
- Escala en pixel (micrones/pixel) [1.376]
- Factor de dilución [1]
- Rango de tamaño celular (pixels) [15] [60]

(2, 11).

El análisis comenzó con la colocación de una muestra de semen rediluido en un portaobjetos, una vez visualizado el campo en el microscopio se procedió a grabar en video un promedio de 20 campos por muestra. Se analizaron 20 campos por muestra utilizando el sistema señalado que para efectos del trabajo se denominó grupo I.

D. Evaluación por el método visual.

Para dicha evaluación se contó con la ayuda de 20 personas (evaluadores), los cuales se escogieron de manera arbitraria; se seleccionó a 10 médicos veterinarios zootecnistas con conocimiento y práctica en la evaluación de la movilidad espermática denominando a estos expertos o grupo II, por otro lado se conto con 10 pasantes de la carrera de médico veterinario zootecnista llamados inexpertos o grupo III.

La evaluación visual se llevó a cabo utilizando un video que contenía los campos evaluados con el método computarizado para cada muestra, de forma tal que cada persona evaluó los mismos campos. Cada persona contó con un formato donde se identificó cada muestra, procediendo a calificar la movilidad individualmente y en forma secreta.

Análisis estadístico.

Con los datos obtenidos por cada técnico evaluador y los del sistema CASA se realizó:

1. Un análisis de correlación, para determinar la relación de las calificaciones otorgadas por cada técnico evaluador con respecto a las del sistema CASA.
2. Además, se realizó un análisis de varianza donde se determinó el valor promedio para la movilidad espermática asignado por los técnicos evaluadores expertos, inexpertos y el sistema CASA, y así poder comparar dichos valores promedio otorgados a la movilidad espermática.

RESULTADOS

En el cuadro 1 se muestran los coeficientes de correlación estimados al relacionar las calificaciones de la movilidad espermática, asignadas por los técnicos evaluadores (expertos, inexpertos o ambos), con la evaluación realizada por medio del sistema computarizado CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). No se encontraron correlaciones significativas entre las calificaciones otorgadas al evaluar la movilidad espermática por el sistema CASA y los valores asignados por los evaluadores expertos ($r=0.25$), inexpertos ($r=.06$) o de ambos ($r=.16$), ($p>0.05$). Solamente se encontró un coeficiente de correlación significativo ($r=.77$; $p<0.01$) entre las calificaciones otorgadas por los evaluadores expertos y las asignadas por los técnicos inexpertos (gráfica 1).

En la gráfica 2 se observan las calificaciones de la movilidad espermática de 53 muestras de semen bovino descongelado, evaluadas por el método visual y el sistema computarizado CASA.

En el cuadro 2 se muestra el coeficiente de correlación obtenido por cada técnico, al relacionar la evaluación de la movilidad espermática realizada por cada uno de ellos con la del sistema CASA. En el citado cuadro se puede apreciar que los coeficientes de correlación logrados por los técnicos evaluadores inexpertos fluctúan entre -6.8% al 18.9%, sin que ninguno de ellos sea significativo. Mientras que los coeficientes de correlación logrados por los técnicos evaluadores expertos alcanzaron un rango de valores entre el -11% al 43.5% siendo estadísticamente significativos, los coeficientes de correlación obtenidos por los técnicos evaluadores XII, XIII, XVII y XIX con respecto a la calificación del Sistema CASA. (gráfica 3). Es importante señalar que los

coeficientes de correlación de la mitad de los técnicos evaluadores inexpertos (VI, VII, VIII, IX y X) y de un experto (XVIII) tuvieron valores negativos, es decir, que sus evaluaciones fueron contrarias a las del sistema CASA. En otras palabras, cuando asignaban una calificación baja a la movilidad de una determinada muestra, el sistema computarizado la calificaba en forma alta o viceversa (gráfica 4).

En el cuadro 3, se comparó el valor promedio de la movilidad espermática obtenido por los técnicos evaluadores expertos, inexpertos y por el sistema computarizado. Se encontraron diferencias significativas entre el valor promedio otorgado por el sistema computarizado (54.5 ± 1.8) con respecto al de los técnicos evaluadores expertos (30.6 ± 1.8) e inexpertos (29.0 ± 2.0).

En el cuadro 4, se muestran los coeficientes de correlación obtenidos al relacionar los valores otorgados a la movilidad espermática por los técnicos expertos e inexpertos. Encontrando que tienen una correlación significativa entre ellos.

DISCUSIÓN

En general, las calificaciones obtenidas al evaluar la movilidad espermática del semen bovino descongelado con el sistema computarizado (CASA), fueron más altas que las estimadas por los técnicos evaluadores (expertos o inexpertos). Para entender dichas diferencias se necesita comprender como realiza esta evaluación el sistema CASA. Este programa es, básicamente, un analizador de imágenes, el cual previa calibración determinará que estructuras deberán ser consideradas como espermatozoides siendo estos su objeto de estudio; además tiene la capacidad de cuadricular la imagen de cada campo, para analizar el recorrido de cada espermatozoide, su velocidad, así como la concentración y el tamaño de célula (2). Por lo tanto, el sistema CASA, evalúa de cada muestra, la concentración espermática, velocidad, linealidad, el patrón de movimiento y el porcentaje de movilidad que presentan los diferentes campos estudiados. En general se observó que un problema frecuente en la mayoría de las muestras descongeladas, fue la visualización de partículas, posiblemente de albúmina que estaban suspendidas en el diluyente de congelación del semen, esto hace suponer dos posibilidades, por una parte el Sistema CASA sobrevaluara las muestras pensando en que al momento de calibrar los tamaños mínimos y máximos de las partículas que se deseaban estudiar, estas miscelas fueran captadas como parte de la evaluación y que por fuerzas electrostáticas o por ondulaciones de los espermatozoides vecinos dichas partículas logaran algún movimiento detectable por el equipo. Sin embargo es importante recordar que CASA tiene dos restricciones adicionales para definir el objeto de estudio y son, el tipo de luminosidad que refleja un espermatozoide, distinta a cualquier otro elemento, y la velocidad mínima permitida a la que se deben movilizar toda partícula para que sea tomada en cuenta para el estudio y en ese sentido, podría haber algún error en la detección de si una partícula es móvil o no por aquellos movimientos no intencionados, pero difícilmente se podría movilizar lo

suficiente para aprobar esta segunda restricción. La otra posibilidad que persiste es que, aunado a la contaminación visual por partículas más grandes que las células espermáticas, lo cual hacía más difícil la evaluación tanto por la computadora como por los evaluadores, se podría sugerir que en todo proceso de evaluación visual de rutina vaya implícito y quizá de forma inconciente, una merma con respecto a la calificación real, esto con el objeto de definir el mínimo seguro en el cálculo del porcentaje de movilidad, de hecho la razón de mayor peso por la cual se implementó la utilización de analizadores computarizados fue para reducir de forma considerable el error involuntario que se comete en la evaluación visual simple (10, 12, 17). Entre los técnicos evaluadores (expertos e inexpertos), si hubo una correlación significativa entre sus calificaciones, aunque en general, los técnicos evaluadores inexpertos, evaluaron más bajo el porcentaje de movilidad espermática de semen bovino criopresevado. Esto podría explicarse, por que, se conoce que la movilidad espermática de semen bovino disminuye significativamente después de los procesos de congelación y descongelación (17), por lo tanto, si esto no es considerado, por una persona que no tenga la experiencia suficiente en este tipo de evaluación, puede subvaluar dicha característica.

Al analizar las evaluaciones de la movilidad espermática de manera individual se encontró que solo cuatro de los técnicos evaluadores expertos (XII, XIII, XVII y XIX) tuvieron calificaciones que se correlacionaron significativamente con las del sistema CASA, esto podría deberse a la práctica y el tipo de semen (fresco o descongelado), que evalúan normalmente estos técnicos. Respecto a los técnicos inexpertos, se encontró que cinco de estos (VI, VII, VIII, IX y X) reportaron valores negativos, es decir, que sus calificaciones para la movilidad espermática eran contrarias a las del sistema CASA, lo cual indica su nula experiencia en la evaluación de la movilidad espermática con semen bovino criopreservado.

CONCLUSIONES

1. En general se pudo apreciar que el método computarizado (CASA) otorgó mejores calificaciones a la movilidad del semen bovino, después de su descongelación, que la asignada por los técnicos evaluadores (método visual), esto pudo deberse, a las partículas contenidas en el diluyente de congelación, algunas de estas al ser similares en tamaño, color y al adquirir movimiento, pueden ser consideradas como células espermáticas, aumentando así las calificaciones otorgadas. Por lo tanto se recomienda que se seleccionen los diluyentes a utilizar, para evitar en lo posible la presencia de partículas en suspensión. También se recomienda establecer para futuros estudios una técnica a base de centrifugación, para tratar de eliminar las partículas presentes en los diluyentes de las muestras a evaluar, logrando con esto que la evaluación sea más exacta.
2. En general los técnicos evaluadores expertos obtuvieron mejores coeficientes de correlación al evaluar la movilidad de semen bovino descongelado en relación con el Sistema CASA y los evaluadores inexpertos.

LITERATURA CITADA

1. Alba, J.: Reproducción Animal. ed. Prensa Médica Mexicana. México D.F., 1985.
2. Ast, M., Kahn, D. and Rosenberg, S.: Cellsoft version 3.0 User Manual. ed Cryo Resources Ltd. New York, U.S.A.. (1986).
3. Fornus C. C., Moses D. F., and Matos D. G: Computer assisted sperm analysis in ram:Sample conditions. 12th International Congress on Animal Reproduction. The Hague, 1992. 458-463. The Hague (1992).
4. García, E.: Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Koppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 1988.
5. Herrick J. Evaluacion de la Fertilidad del Toro y del Verraco. ed. Acribia, Zaragoza, España. 1965.
6. Jascko, D. J. Evaluation of Stallion Semen. Memorias del Curso Internacional de Reproducción Equina. México, D. F. 1993. p.p. 99-108.
7. León: V. H. Efecto del método de colecta sobre las características de semen de ganado cebú y europeo. Tesis de maestría Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 1990.

8. Mahony, M. C., Alexander, N. J. and Swason, R. J.: Evaluation of semen parameters by means of automated sperm motion analyzers; Fertility and Sterility; 49: 876-886 (1988).
9. Palacios A. A.: Uso de la computadora en la evaluación de semen. Vet., Méx. 24:93,95 (1993).
10. Palacios A. A.: La computadora como herramienta para la evaluación espermática uso del programa, para análisis de semen. V Curso Internacional de Reproducción Bovina. Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. México D. F. 1992. p.p. 193-199.
11. Palacios A. A. Efecto de la sustitución de yema de huevo por albúmina sérica bovina, suero equino o suero bovino en el diluyente de congelación sobre la viabilidad posdescongelado del espermatozoide equino. Tesis de maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 1993.
12. Palacios A. A. Efecto del Sistema de envasado y la concentración espermática sobre el daño acrosomal y la motilidad posdescongelación del semen de equino. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 1990.
13. Roberson L. and Middleton Y. A.: Use of htm 20-30 computerised motility analysis for the analysis of frozen thawed bull spermatozoa. 12 th International Congress on Animal Reproduction. The Hague. 1992. 517-519.
14. Rodríguez, P. V.: Inseminación Artificial. ed. Pueblo y Educación P. 47-89 Cuba 1981.

15. Silva M. C. Evaluación de la Calidad Reproductiva del Macho Bovino. Manual. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Mérida, Yucatán 1989.
16. Sorensen, A. M.: Reproducción Animal. ed. Mc Gray-Hill. México, 1982.
17. Taylor, J.: Bovine Semen Collection and Processing Techniques. 2th. ed. Saskatchewan Agriculture Development Found. Canada 1991.
18. Tuli, R. K. and Midt, R.: Computer assisted motility assement of spermatozoa from fresh and frozen thawed semen of the bull, boar and goat. Theriogenology 38:487-490 (1992).
19. Vantman, D., Koukoulis, G., Dennison, L., Zinaman, M. and Shen, R.: Computer-assisted semen analysis. Fertility and Sterility; 49: 510-515 (1988)
20. Zatulni G. I., Goldsmith A. and Spieler M. S.: Sperm movement characteristics. International Workshop on Male Contraception: Advances and Future Prospects. Geneva, Switzweland. 1985. 143-146.

CUADRO 1. COEFICIENTES DE CORRELACION ESTIMADOS AL RELACIONAR LAS CALIFICACIONES PARA LA MOVILIDAD ESPERMATICA DE SEMEN BOVINO CRIOPRESERVADO OTORGADAS POR TECNICOS EVALUADORES (EXPERTOS E INEXPERTOS) Y UN SISTEMA COMPUTARIZADO (CASA)

	TECNICOS EVALUADORES		
	INEXPERTOS	EXPERTOS	AMBOS
COMPUTADORA (SISTEMA CASA)	r = 0.0634 (n = 53) (p = .6520)	r = 0.2555 (n = 53) (p = .0648)	r = 0.1657 (n = 53) (p = .2357)
T. EVALUADORES INEXPERTOS		r = 0.7783 (n = 53) (p = < .0001)	r = 0.9468 (n = 53) (p = < .0001)
T. EVALUADORES EXPERTOS			r = 0.9389 (n = 53) (p = < .0001)

* CASA = COMPUTER ASSISTED SPERM ANALYSIS

r = COEFICIENTE DE CORRELACION.

n = NUMERO DE MUESTRAS EVALUADAS.

p = PROBABILIDAD

CUADRO 2. COEFICIENTES DE CORRELACION OBTENIDOS AL RELACIONAR LAS CALIFICACIONES DE LA MOVILIDAD ESPERMATICA DE SEMEN BOVINO CRIOPRESERVADO OTORGADAS POR TECNICOS EVALUADORES Y UN SISTEMA COMPUTARIZADO (CASA) *

		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
SITEMA COMPUTARIZADO (CASA)	N° TECNICO EVALUADOR INEXPERTO										
	r =	0.1478	0.1239	0.0992	0.1875	0.1898	-0.0684	-0.0518	-0.0429	-0.0237	-0.0657
	n =	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53
	p =	0.2808	0.3769	0.4798	0.1788	0.1735	0.6265	0.7124	0.7805	0.8863	0.64
		XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX
SITEMA COMPUTARIZADO (CASA)	N° TECNICO EVALUADOR EXPERTO										
	r =	0.2423	0.3291	0.307	0.181	0.0505	0.2592	0.2834	-0.1118	0.4354	0.1332
	n =	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53
	p =	0.0804	0.0161	0.0254	0.1945	0.7194	0.0609	0.0367	0.4255	0.0011	0.3418

* CASA = COMPUTER ASSISTED SPERM ANALYSIS

r = COEFICIENTE DE CORRELACION

n = 53 NUMERO DE MUESTRAS EVALUADAS

p = PROBABILIDAD

CUADRO 3. VALORES PROMEDIO OBTENIDOS AL EVALUAR LA MOVILIDAD ESPERMATICA DE SEMEN BOVINO CRIOPRESERVADO POR TECNICOS EVALUADORES (EXPERTOS E INEXPERTOS) Y UN SISTEMA COMPUTARIZADO (CASA) *

SISTEMA DE EVALUACION	n	\bar{x}	ERROR ESTANDAR	INTERVALO DE CONFIANZA AL 95%
CASA *	53	54.5 a	\pm 1.8	50.8 a 58.2
TECNICOS EVALUADORES INEXPERTOS	53	29.0 b	\pm 2.6	25.2 a 32.7
TECNICOS EVALUADORES EXPERTOS	53	32.2 b	\pm 1.8	28.5 a 36.0

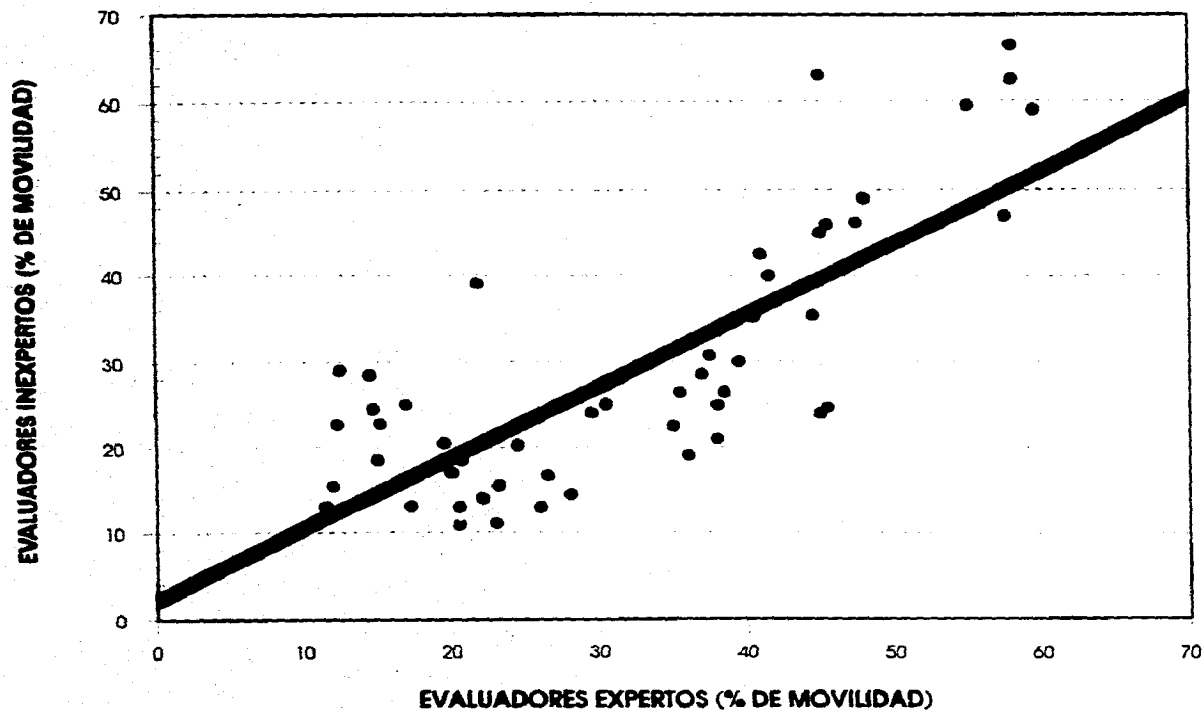
VALORES PROMEDIO CON DIFERENTE LITERAL VARIAN SIGNIFICATIVAMENTE ($p < 0.01$)

* CASA = COMPUTED ASSISTED SPERM ANALYSIS

n = NUMERO DE MUESTRAS EVALUADAS

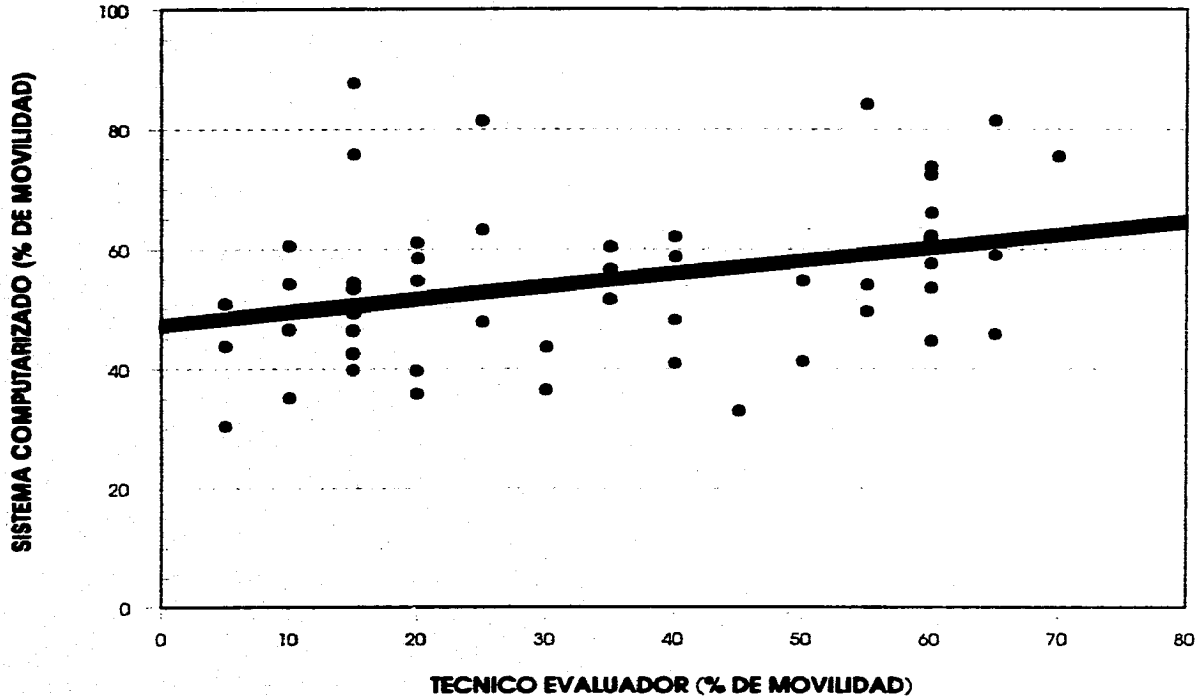
\bar{x} = VALORES PROMEDIO

GRAFICA 1: VALORES MEDIOS ESTIMADOS PARA LA MOVILIDAD ESPERMATICA DE 53 MUESTRAS DE SEMEN BOVINO CRIOPRESERVADO, AL EVALUARSE POR TECNICOS EXPERTOS E INEXPERTOS



$r = 0.7783$ ($p = 0.0001$)

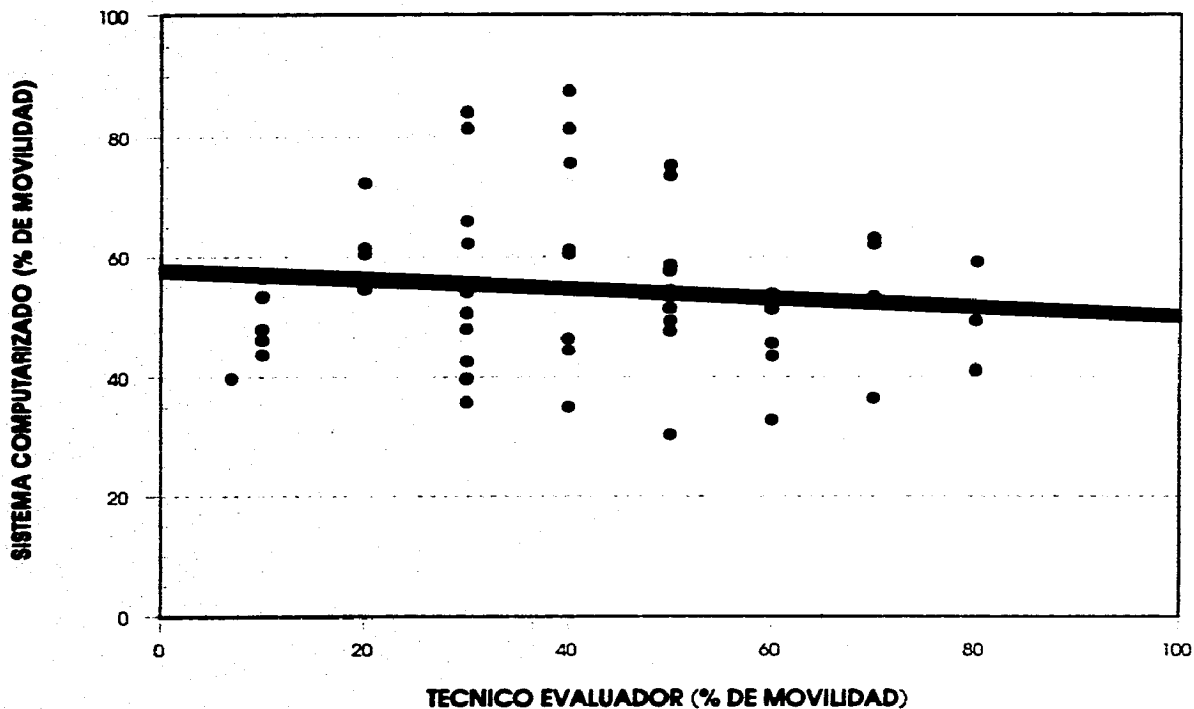
GRAFICA 3: CALIFICACIONES PARA LA MOVILIDAD ESPERMATICA DE 53 MUESTRAS DE SEMEN BOVINO CRIOPRESERVADO, EVALUADAS POR UN SISTEMA COMPUTARIZADO (CASA)* Y UN TECNICO EVALUADOR (XII)



*(CASA) COMPUTER ASSISTED SPERM ANALYSIS

$r = 0.3291$ $n = 53$ ($p = 0.2357$)

GRAFICA 4: CALIFICACIONES PARA LA MOVILIDAD ESPERMATICA DE 53 MUESTRAS DE SEMEN BOVINO CRIOPRESERVADO, EVALUADAS POR UN SISTEMA COMPUTARIZADO (CASA)* Y UN TECNICO EVALUADOR QUE OBTUVO UN COEFICIENTE DE CORRELACION NEGATIVO (XVIII)



* (CASA) COMPUTER ASSISTED SPERM ANALYSIS

$r = 0.1118$ $n = 53$ ($p = 0.4255$)