

Revisión bibliográfica

Sistemas de análisis computadorizado de semen en la reproducción animal¹

Computer-assisted semen analysis systems in animal reproduction

Anthony Valverde², Mónica Madrigal-Valverde^{2,3}

Resumen

Los sistemas computadorizados de análisis seminal (CASA, en inglés), se utilizan en reproducción animal con el propósito de valorar de forma rápida y fiable la calidad espermática. Actualmente, en los centros de inseminación artificial se debe disponer de sistemas fiables y objetivos que garanticen una confiabilidad de datos reproductivos. El objetivo fue realizar una revisión acerca de los sistemas de análisis seminal asistidos por computadora, en especies ganaderas. El uso de sistemas CASA sustituye los análisis rutinarios que introducen sesgos y que conlleva a obtener distintos grados de imprecisión. Además, si se consideran las limitaciones intrínsecas de microscopía o espermatozoides con diferentes patrones de movilidad, lo más probable es que se introduzca una variabilidad considerable que repercute en la objetividad de la estimación. En un principio, este tipo de tecnologías eran poco accesibles, pero actualmente se utilizan en la mayoría de laboratorios para la evaluación de muestras espermáticas en distintas especies de interés zootécnico. Las técnicas computadorizadas son capaces de emitir informes con un número elevado de características, minimizar el factor subjetivo de los análisis rutinarios de semen y garantizar una mejor correlación con la capacidad fecundante de los espermatozoides, por medio de las relaciones entre la motilidad espermática y su competencia funcional. El uso de sistemas CASA junto con el análisis estadístico multivariante, han demostrado la existencia de subpoblaciones tanto cinéticas como morfométricas en eyaculados de diferentes especies, desterrando la idea de que los eyaculados son homogéneos, formados por una única población espermática con distribución normal.

Palabras clave: sistemas de información, programas de ordenador, fertilidad, ganado bovino, espermatozoo.

Abstract

Computer-assisted semen analysis (CASA) is used in animal reproduction with the objective of evaluating sperm quality, quickly and reliably. Currently, artificial insemination centers must have reliable and objective systems that ensure the reliability of reproductive data. The aim of this paper was to review computer-assisted semen analysis in livestock species. The use of CASA systems replace routine quality analyzes that introduce biases and leads to

¹ Recibido: 18 de setiembre, 2017. Aceptado: 15 de enero, 2018. Este trabajo formó parte del proyecto de investigación 2151037, inscrito en la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Costa Rica.

² Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Agronomía, Centro de Investigación y Desarrollo en Agricultura Sostenible del Trópico Húmedo, Sede Regional San Carlos. Apdo. postal 223-21001 Alajuela, Costa Rica. anvalverde@itcr.ac.cr (autor para correspondencia).

³ Becaria de la Organización de Estados Americanos-Grupo Coimbra de Universidades Brasileñas (OEA-GCUB). Grupo de Estudos de Reprodução Animal, Universidade Federal da Bahia. CEP 40170-110, Bahia, Brasil. madrigalvalverdem@gmail.com



different inaccuracy degrees. In addition, if intrinsic limitations of microscopy or sperm with different motility patterns are considered, it is most likely that considerable variability will be introduced which will have an impact on the objectivity of the estimation. At first, this type of technology was inaccessible, but they are currently used routinely in most research laboratories for the evaluation of sperm samples of different species of zootechnical interest.. Computerized techniques are able to issue reports with a high number of characteristics, to minimize the subjective factor of routine semen analysis, and to ensure a better correlation with the fertilizing capacity of spermatozoa by the relationship between sperm motility and functional competence. The use of CASA systems together with multivariate statistical analysis have demonstrated the existence of kinetic and morphometric subpopulations in ejaculates of different species, eliminating the idea that ejaculates are homogeneous, formed by a single sperm population with normal distribution.

Keywords: information systems, computer software, fertility, cattle, spermatozoa.

Introducción

El fin de cualquier análisis de semen es predecir, con cierto grado de confiabilidad, el nivel de fertilidad de la muestra. Sin embargo, esta pregunta es de carácter complejo y tiene posibles respuestas, ya que la fertilidad es multifactorial. Algunas características como el número de parto o el peso medido con posterioridad a la lactancia (Mellagi et al., 2013), influyen en el desempeño reproductivo de la hembra. No obstante, el material genético del macho, tiene un impacto económico en la granja (peso de la camada, tasa de crecimiento, eficiencia alimenticia, entre otros; Link, 2011). Además, se debe considerar que una muestra espermática está compuesta por una población de millones de células, lo que requiere de un análisis poblacional por medio de técnicas multivariantes (Babamoradi, et al., 2015). Por ello, se pueden producir sinergias o competencias que hagan que muestras aparentemente iguales tengan un comportamiento final muy distinto. En este contexto se presentan limitaciones técnicas importantes, porque el análisis seminal tradicional carece de estándares universales, lo que ocasiona la introducción de un alto grado de variación intra e interindividual por parte de los técnicos que realizan las valoraciones (Rodríguez-Martínez, 2000). Además, por lo general, se tiende a valorar el semen como un todo, aportando valores porcentuales o medios de las características que se evalúan en cada caso. Esta valoración subjetiva impide poder precisar confiablemente cualquier valoración seminal. Además del problema de la subjetividad del análisis, su realización resulta más costosa en tiempo y los resultados no son fácilmente re-analizables, porque ello implicaría grabar, *a posteriori*, una secuencia de video en cada análisis.

El uso de los sistemas computadorizados va posicionándose como una herramienta para el análisis seminal, por su velocidad de análisis (especialmente en la valoración de la concentración y la movilidad), su reducido coeficiente de variación de tipo técnico, la capacidad de cuantificar parámetros de otro modo relativos a clases como por ejemplo: rápido, rápido progresivo, normal, estático (Mortimer, 2000), la fácil capacidad de almacenamiento de la información y la posibilidad de introducir técnicas estadísticas de análisis poblacional (Martínez-Pastor et al., 2011).

Los resultados e informes que se generan en los centros de inseminación artificial y/o reproducción asistida, deben provenir de sistemas fiables y objetivos que garanticen una confiabilidad de los datos reproductivos. El objetivo del presente trabajo fue realizar una revisión acerca de los sistemas de análisis seminal asistido por computadora, en especies ganaderas.

Características de los sistemas computadorizados CASA (Computer Assisted Semen Analysis)

La principal característica de estos sistemas es la sustitución del análisis tradicional realizado por un técnico de laboratorio; por ejemplo, el espermiograma clásico; por un tipo de sistema informático artificial. Esto involucra aspectos tanto del soporte (*hardware*) como de la programación asociada (*software*) que unifica los diversos sistemas CASA, pero también lo que los distingue.

Inicialmente se requiere de un sistema de captura de imagen, es decir, una cámara de video. Este es un detalle importante a la hora de valorar las capacidades de un sistema y la utilización de los resultados que aporta, pues tanto su resolución como la frecuencia de captura de imágenes hacen variar sensiblemente dichos resultados. En el mejor de los casos es óptimo utilizar cámaras de alta resolución (no menos de 768x576) y de velocidades de captura de sesenta imágenes por segundo (fps, *frame per second*, por sus siglas en inglés) (Castellini et al., 2011). Otro factor que se debe considerar, es el relacionado con la microscopía a utilizar, ya que para la mayoría de las especies ganaderas se requiere de una iluminación por contraste de fase negativo. Este detalle es fundamental en aquellas especies con espermatozoides de estructura lateral plana (conejo, cerdo, entre otros), que no resultan adecuadamente visibles con el contraste de fase positivo.

Los primeros sistemas CASA aparecieron durante la década de los setenta del siglo XX y se basaban en técnicas estroboscópicas de iluminación, que dejaban un halo del movimiento celular en una película fotográfica. Los primeros valores objetivos se obtuvieron con métodos directos como la cine-video-micrografía (Overstreet et al., 1979). Esto abrió las puertas conceptuales a lo que fueron los primeros sistemas auténticamente computadorizados semiautomáticos, que aparecieron a finales de la década mencionada y cuyo principio se basaba en tabletas gráficas, en las que se indicaba la posición de la célula a lo largo de su trayectoria.

A través del tiempo se inició el desarrollo de sistemas completamente automáticos para el análisis cinético. El sistema pionero, fue el Hamilton Thorne. Posteriormente, se crearon otros sistemas que han tenido continuidad y otros que se han quedado rezagados. Como parte del creciente interés por el análisis computadorizado de semen, el campo de estudio se generalizó a la morfología espermática durante la década de los noventa, sin embargo, la complejidad del análisis morfométrico ha hecho que aún no se haya generalizado su uso (Gil et al., 2009).

Es relevante señalar que los sistemas CASA están completamente infrautilizados, pues, aún en algunos sitios suelen usarse tan solo para reproducir la observación subjetiva tradicional (Jasko et al., 1992). A pesar de ello, aportan un menor error técnico y suponen un ahorro de tiempo significativo. En general, los informes de análisis que aportan los sistemas CASA se limitan al porcentaje de células móviles, móviles progresivos, estáticas, células de morfología normal, concentración y los valores de cinética y morfometría de la muestra con lo que, se puede hacer una valoración real de la población espermática. Además, los informes obtenidos directamente del programa están en función de los módulos adquiridos dentro del sistema CASA.

Comparativa entre los sistemas más utilizados

Los equipos presentes en el mercado se pueden clasificar como sistemas cerrados y abiertos. La principal ventaja que presentan este tipo de sistemas, consiste en el hecho de que al ser un equipo cerrado es más difícil la manipulación de sus componentes, lo que conlleva una mayor estabilidad de los procesos (Mortimer, 2000). Los sistemas abiertos consisten en la utilización de un microscopio convencional, que lleva adaptada una cámara en su tercer ojo, conectada a un CPU convencional donde se instala el *software* específico. Esta configuración permite la integración de los datos obtenidos en otros trabajos, y además, el microscopio puede utilizarse para otros fines incluyendo la posibilidad de implementar otros programas informáticos. Se pueden citar los equipos más relevantes, el ISAS (Proiser R+D), el CEROS (Hamilton Thorne) y el CRISMAS (Image House Medical).

Existen variaciones importantes que se presentan en el algoritmo de análisis de los sistemas CASA. En el análisis de la movilidad, estas diferencias se refieren a la forma en que se definen los objetos a analizar (cabezas de los espermatozoides), el seguimiento de sus trayectorias, la capacidad de discriminar la presencia de cruzamientos entre las mismas, el número de espermatozoides a analizar, el tiempo de cálculo y las fórmulas utilizadas para el establecimiento de los diferentes parámetros a evaluar (Verstegen et al., 2002; Soler et al., 2012).

Se debe considerar que tanto el *hardware* como el *software* utilizado para la identificación y determinación del desplazamiento de las células individualmente, junto con el análisis de las características del movimiento, difieren entre sistemas comerciales. Esto, junto con el patrón específico de movimiento que presenta el espermatozoide de cada especie estudiada, hace necesaria la uniformidad de los sistemas y las condiciones óptimas de trabajo, con el propósito de que los resultados sean repetibles y comparables con los obtenidos por otros laboratorios y/o grupos de investigación (ESHRE Andrology Special Interest Group, 1998).

En relación con el análisis morfométrico, los parámetros clásicos de anchura, longitud y elipticidad no son suficientes para obtener resultados satisfactorios, por lo que, existen diferentes algoritmos para la discriminación de los límites celulares con el fondo y también, se presentan variaciones en la estimación de los parámetros entre sistemas, lo que implica la necesidad de uniformizar criterios y obtener nuevos parámetros de estimación.

Es importante considerar que, independientemente del tipo de sistema utilizado, es necesario realizar trabajos de estandarización que definan las mejores condiciones de observación y análisis en cada tipo de ensayo y/o trabajo. También, es necesario hacer estudios de replicabilidad, del número mínimo de campos o células a analizar, entre otros. Además, a pesar que hay estudios que aportan correlaciones altas y significativas entre equipos, los resultados de un sistema no son del todo extrapolables a otro equipo CASA (Soler et al., 2012).

Un gráfico que muestre la distribución de las células en varias clases dentro de cada medida, es una salida de *software* deseable (desafortunadamente, algunos sistemas CASA ofrecen posibilidades limitadas en la producción o exportación de datos). La percepción de tales gráficos para muchas muestras de reproductores (o análisis de datos por clúster), permitiría seleccionar umbrales para agrupar el esperma basado en ese atributo (por ejemplo, inmóvil, lento y satisfactoriamente rápido basado en la velocidad curvilínea, VCL). Dichos umbrales deben ser establecidos por cada usuario, porque su valor absoluto dependerá de la especie con la que trabaje, del procesamiento previo de la muestra, el intervalo tras la dilución o la descongelación, el medio de dilución, la profundidad de la cámara de recuento o el “frame rate”, entre otros (Amann y Waberski, 2014).

El porcentaje de espermatozoides móviles o el porcentaje de espermatozoides satisfactoriamente rápidos pueden calcularse. Los informes de morfología podrían categorizarse en distribuciones como normal, cabeza anormal, gota citoplasmática y cola anormal. La combinación de medidas de motilidad y morfología para cada espermatozoide podría proporcionar una subpoblación de células “normales y satisfactoriamente rápidas”, pero no se sabe si su proporción en la población total sería significativa para identificar a los reproductores “malos”. En cualquier caso, debe ser obligatorio que se reporte todas las configuraciones de *hardware* y *software* del sistema para la captura y análisis de imágenes y la categorización de las células, siempre que se difundan observaciones (por ejemplo, a clientes, reguladores o publicaciones), de lo contrario, el informe carece de sentido.

Módulos de análisis espermático

Cinética

El módulo de movilidad espermática permite realizar el análisis en diferentes condiciones de iluminación, aumento y tiempos de captura, con una platina calefactora que se incorpora y sustituye a la del microscopio convencional. En principio, al analizar la movilidad se reflejan una serie de medidas derivadas del análisis del desplazamiento de la cabeza del espermatozoide a través del tiempo (Figura 1).

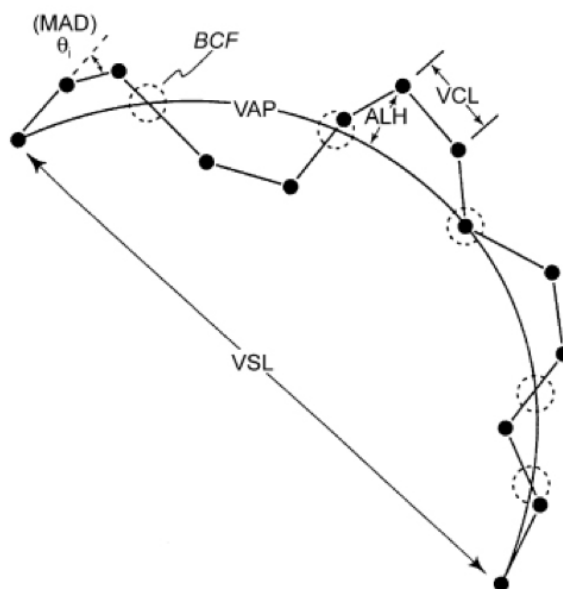


Figura 1. Representación esquemática de algunos de los patrones de motilidad medidos por el sistema Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) (Boyer et al., 1989). Los círculos negros representan imágenes sucesivas (centroides) de la cabeza de un espermatozoide móvil y se unen por líneas rectas. Adaptado de Rurangwa et al. (2004).

MAD: desplazamiento angular medio, BCF: frecuencia de cruzamientos, VAP: velocidad de trayectoria media, ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, VCL: velocidad curvilínea, VSL: velocidad de línea recta.

Figure 1. Schematic representation of the motility patterns measured by the Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) system (Boyer et al., 1989). Black circles represent successive (centroid) images of the head of a motile spermatozoa and are joined by straight lines. Adapted from Rurangwa et al. (2004).

MAD: mean angular displacement, BCF: beat-cross frequency, VAP: average path velocity, ALH: amplitude of lateral head displacement, VCL: curvilinear velocity, VSL: straight line velocity.

En la Figura 1, el proceso de captura inicial de la imagen proporciona un centroide para cada espermatozoide en el primer fotograma de una captura, y en imágenes sucesivas la localización de la célula a partir del centroide más probable, es deducida. La conexión entre los centroides para un espermatozoide proporciona su trayectoria real, llamada trayectoria curvilínea. La velocidad promedio en el tiempo a lo largo de esta trayectoria se denomina velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$). La trayectoria promedio se calcula, y la velocidad promediada en el tiempo a lo largo de esta trayectoria se denomina velocidad de trayectoria media (VAP; $\mu\text{m/s}$). Cuando se traza una trayectoria recta, desde la primera hasta la última posición de una cabeza de espermatozoide, la velocidad a lo largo de esta trayectoria se denomina velocidad de línea recta (VSL; $\mu\text{m/s}$). Para cada posición del centroide hay una desviación de la trayectoria media, y esto se llama la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH; μm). De manera similar, hay puntos en los que la trayectoria curvilínea interseca la trayectoria promedio, y el número de tales intersecciones se denomina frecuencia de cruzamientos (BCF, Hz).

Las condiciones óptimas de análisis de semen para cada especie se definen en cada caso, con el fin de determinar las mejores condiciones de uso y evitar sobreestimar o subestimar resultados. Algunas de las especies que tienen *software* específico para su análisis son equinos (Ball y Mohammed, 1995; Hidalgo et al., 2008), porcinos (Peña et al., 2005), bovinos (Muiño et al., 2009), ovinos (Dorado et al., 2010), caprinos, camélidos, caninos (Dorado et al., 2011a), así como diferentes especies de peces.

Los parámetros que se obtienen del sistema son los comunes, pero se pueden incorporar otros según el interés del usuario (Cuadro 1). La trayectoria correspondiente a la VCL, que se calcula mediante la unión de las

Cuadro 1. Medias y desviaciones estándar de espermatozoides de toro obtenidos con sistemas Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) en tres tipos de cámaras desechables.

Table 1. Mean values and standard deviation obtained with the computer-assisted semen analysis (CASA) of bull sperm in three types of disposable chambers.

Tipo de cámara	Leja (20 μm)	MofA (20 μm)	Minitube (20 μm)
n (células)	60	60	60
Concentración ($\times 10^6/\text{ml}$)	68,1 \pm 4,5 ^a	73,4 \pm 12,6 ^b	63,8 \pm 5,1 ^c
Motilidad total (%)	48,4 \pm 7,2 ^{ac}	43,9 \pm 7,8 ^b	45,2 \pm 7,7 ^{bc}
Motilidad progresiva (%)	44,7 \pm 7,1 ^{ac}	39,8 \pm 7,7 ^b	41,7 \pm 7,7 ^{bc}
VCL ($\mu\text{m/s}$)	86,3 \pm 13,7 ^a	70,5 \pm 9,7 ^b	83,0 \pm 13,9 ^a
VSL ($\mu\text{m/s}$)	41,9 \pm 6,1 ^a	33,9 \pm 6,0 ^b	40,8 \pm 6,7 ^a
VAP ($\mu\text{m/s}$)	51,8 \pm 6,4 ^a	43,1 \pm 5,5 ^b	50,3 \pm 6,8 ^a
LIN (VSL/VCL)	0,48 \pm 0,04 ^a	0,48 \pm 0,05 ^a	0,79 \pm 0,04 ^a
STR (VSL/VAP)	0,80 \pm 0,04 ^a	0,78 \pm 0,06 ^b	0,80 \pm 0,05 ^a
WOB (VAP/VCL)	0,60 \pm 0,02 ^a	0,61 \pm 0,02 ^a	0,60 \pm 0,02 ^a
ALH (μm)	3,40 \pm 0,42 ^a	3,02 \pm 0,39 ^b	3,29 \pm 0,42 ^a
BCF (Hz)	25,1 \pm 3,0 ^a	23,8 \pm 3,8 ^a	24,9 \pm 3,1 ^a

VCL= velocidad curvilínea; VSL= velocidad rectilínea; VAP= velocidad media; LIN= índice de linearidad; STR= índice de rectitud; WOB= índice de oscilación; ALH= desplazamiento lateral de la cabeza; BCF= frecuencia de entrecruzamiento; SD= desviación estándar / VCL= curvilinear velocity; VSL= straight line velocity; VAP= average path velocity; LIN= linearity of forward progression; STR= straightness; WOB= wobble; ALH= amplitude of lateral head displacement; BCF= beat-cross frequency; SD= standard deviation. ^{ab} Letras distintas dentro de fila indican diferencias significativas $p < 0,05$ / Within the same row, different superscripts show significant difference at $p < 0,05$.

Adaptado de Ibănescu et al. (2016) / Adapted from Ibănescu et al. (2016).

coordenadas del centroide del espermatozoide en cada una de las imágenes analizadas; la trayectoria que se refiere a la VSL, une el primer y último punto de la trayectoria anterior, indicando el desplazamiento neto de la célula en el tiempo (t) considerado y finalmente, la trayectoria que corresponde a la VAP se calcula como una interpolación entre los puntos correspondientes a la trayectoria de la VCL, en un intento por lograr una mejor aproximación al desplazamiento real de la célula. A partir de estas tres trayectorias se calculan tres índices, la linearidad (LIN= VSL/VCL), la rectitud (STR= VSL/VAP) y la oscilación (WOB= VAP/VCL) de las trayectorias, con lo que queda caracterizada la calidad del movimiento espermático. Además, se aportan la BCF (frecuencia de batido de la cola), expresada como número de veces que la trayectoria curvilínea cruza la lineal, y la ALH (desplazamiento lateral de la cabeza) como la altura máxima (o media) de la amplitud del movimiento oscilatorio de la trayectoria curvilínea.

Morfología/morfometría

El análisis morfológico de los espermatozoides es una prueba de control de calidad que, refleja el estado fisiológico o patológico de la funcionalidad de los testículos, epidídimo y glándulas accesorias de los reproductores (Figura 2). Las morfo anomalías se producen por una espermatogénesis defectuosa, por herencia, enfermedades, estrés por calor o frío, exposiciones a condiciones medio ambientales adversas, reposo sexual prolongado (mayor de sesenta días) o por el uso de técnicas inadecuadas en la manipulación del semen (Barth, 2000).

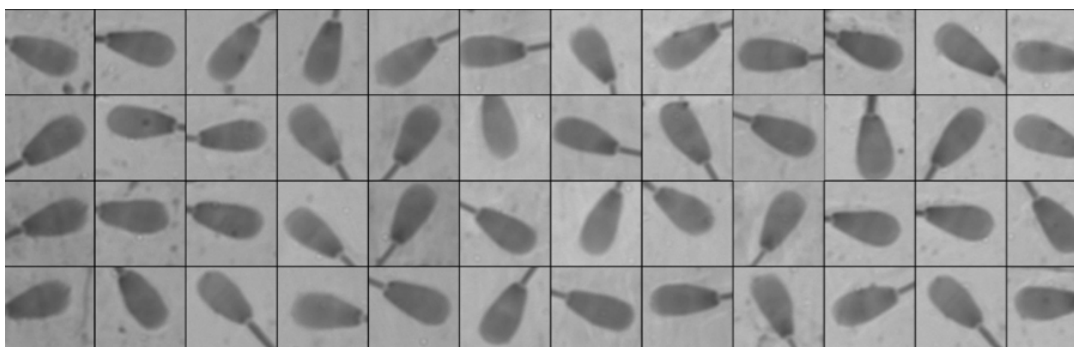


Figura 2. Morfología de espermatozoides de bovino obtenidos por fijación de muestras con hematoxilina de Harris.
Figure 2. Morphology of bovine spermatozoa obtained by fixing samples with Harris haematoxylin.

Las anomalías de los espermatozoides se han clasificado en función de:

La morfología: cabeza, cola, pieza intermedia y presencia de gotas citoplasmáticas (acúmulos de citoplasma no reabsorbido en el proceso de maduración del espermatozoide).

La importancia: defectos mayores y menores (Blom, 1983).

El origen: primarias, originadas durante la espermiogénesis en el testículo y secundarias: originadas en el epidídimo o post eyaculación (Barth y Oko, 1989).

Además de la valoración de la motilidad, el estudio de la morfometría espermática (Figura 3) es otra prueba determinante de la calidad de un eyaculado (Hidalgo et al., 2006); permitiendo además, detectar alteraciones en la espermiogénesis y en la maduración epididimaria, lo cual, puede resultar muy útil a la hora de eliminar reproductores con baja calidad seminal, cuando estas anomalías indiquen patologías genitales mayores. Esto último es particularmente importante, por cuanto el porcentaje de morfo anomalías presentes en un eyaculado ha demostrado ser un importante indicador del descenso de la fertilidad en diversas especies animales (Chandler et al., 1988).

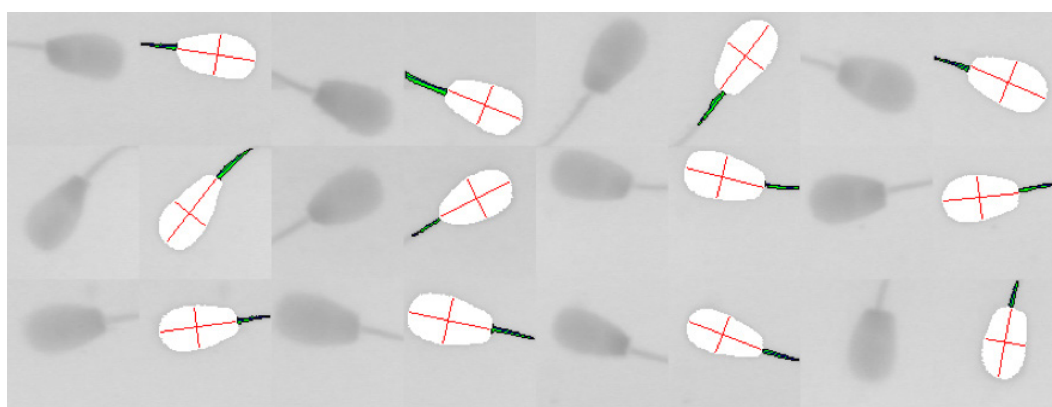


Figura 3. Resultado de aplicación del software de morfometría en espermatozoides de bovino, teñidos con hematoxilina de Harris. A la derecha de cada célula se observa la máscara correspondiente a partir de la cual se obtienen las medidas respectivas.
Figure 3. Result of the application of morphometry software in bovine spermatozoa, stained with Harris hematoxylin. At right of each cell, the corresponding mask is observed, from which the respective measurements are obtained.

Al igual que en la valoración subjetiva de la motilidad, la correlación (r) de los resultados obtenidos en la valoración morfológica del semen con la fertilidad, varía ampliamente en función del estudio considerado, reportándose valores de r entre 0,06 a 0,86 (Rodríguez-Martínez, 2003).

El módulo de morfometría requiere de la fijación y la tinción de las células, pues de ello depende la correcta discriminación con respecto del medio, así como de sus diferentes componentes (acrosoma, cabeza y pieza intermedia). Con el análisis de la cola, es posible reconocer las gotas citoplasmáticas como ensanchamientos de la pieza intermedia, lo que podría introducir un factor de variación importante y sobreestimar el resultado. Con esta metodología, las muestras seminales, previamente fijadas y teñidas, pueden ser analizadas individualmente para determinar las características morfométricas de la cabeza del espermatozoide en cuanto a tamaño (área, perímetro, longitud y anchura) y forma (elipticidad, elongación, regularidad y rugosidad). Además, se obtienen datos sobre la proporción de la cabeza que pertenece al acrosoma (Álvarez-Lledó, 2003). Algunos sistemas ofrecen incluso información sobre la pieza intermedia (área y anchura) y datos referentes a la inserción de la pieza intermedia en la cabeza, como son la distancia y el ángulo de la inserción (Gil et al., 2009).

Los programas objetivos de morfometría miden la longitud de la cabeza [L], el ancho [W], el área (número total de píxeles) [A] y el perímetro [P] (Amann y Katz, 2004; Martí et al., 2012), lo que permite calcular parámetros de forma como la elipticidad ($[L] / [W]$), la elongación ($([L] - [W]) / ([L] + [W])$), la rugosidad ($([P] / [W/4])$) para cada cabeza de espermatozoide (Cuadro 2). Además, las variables de tamaño se pueden someter a transformaciones de Fourier para proporcionar amplitudes armónicas que describen la forma nuclear (Ostermeier et al., 2001).

Cuadro 2. Valores medios (\pm SD) de los parámetros morfométricos correspondientes a distintas subpoblaciones celulares en espermatozoides congelados-descongelados de bovino.

Table 2. Mean values (\pm SD) of each morphometric parameter corresponding to different subpopulations from frozen/thawed bull spermatozoa.

Variable	Subpoblación 1	Subpoblación 2	Subpoblación 3	Subpoblación 4
n/%	3100/17,65	4233/24,10	5440/30,97	4791/27,28
Longitud cabeza (μm)	9,40 \pm 0,46	8,39 \pm 0,32	9,16 \pm 0,29	8,54 \pm 0,35
Anchura cabeza (μm)	4,52 \pm 0,20	4,75 \pm 0,19	4,90 \pm 0,18	4,37 \pm 0,18
Área cabeza (μm^2)	36,23 \pm 2,44	34,40 \pm 2,05	38,31 \pm 1,97	32,46 \pm 2,14
Perímetro cabeza (μm)	26,34 \pm 1,46	24,36 \pm 0,83	26,07 \pm 0,88	24,33 \pm 0,89
Elipticidad	2,08 \pm 0,14	1,77 \pm 0,08	1,87 \pm 0,08	1,96 \pm 0,09
Rugosidad	0,66 \pm 0,05	0,73 \pm 0,03	0,71 \pm 0,03	0,69 \pm 0,04
Elongación	0,35 \pm 0,02	0,28 \pm 0,02	0,30 \pm 0,02	0,32 \pm 0,02
Regularidad	0,92 \pm 0,03	0,91 \pm 0,03	0,92 \pm 0,03	0,90 \pm 0,03

Elipticidad (L/W), Rugosidad ($4\pi A/P^2$), Elongación ($(L-W)/(L+W)$), Regularidad ($\pi LW/4A$) / Ellipticity(L/W), Rugosity ($4\pi A/P^2$), Elongation ($(L-W)/(L+W)$), Regularity ($\pi LW/4A$).

SD= desviación estándar / SD: standard deviation.

Adaptado de Valverde et al. (2016) / Adapted from Valverde et al. (2016).

La información sobre la morfometría de la cabeza espermática es considerada importante en la industria bovina, porcina, caprina y equina por veterinarios clínicos que, realicen exámenes reproductivos profundos y para la investigación toxicológica. Independientemente del *software*, la evaluación CASA de la morfometría del

espermatozoide es una importante herramienta, más en el ámbito de la reproducción animal, sin embargo, no reemplazará los exámenes realizados por los técnicos competentes usando microscopios de luz y de electrones. La estimación de la calidad del movimiento espermático por medio de los sistemas CASA se relaciona con el porcentaje de células con movimiento normal, sin embargo, esta estimación se realiza por extrapolación puntual del movimiento del esperma (Rabinovith, 2007).

Las características del análisis estarán en función de la tinción utilizada en cada especie. Sin embargo, se puede utilizar la hematoxilina de Harris como medio de tinción para la mayoría de las especies ganaderas. Para estudios que requieren mayor detalle de la morfología espermática puede recurrirse a la microscopía de contraste interferencial de Nomarski y a la microscopía electrónica de barrido o de transmisión (Bonet et al., 2000).

Fragmentación ADN

El mantenimiento de la integridad del ácido desoxirribonucleico (ADN) es uno de los condicionantes necesarios para que el proceso reproductivo tenga éxito, ya que, aunque un espermatozoide con aberraciones en el material genético sea perfectamente capaz de fecundar un ovocito, el embrión resultante sufrirá un proceso de apoptosis, cuando se encuentre en estado de cuatro a ocho células (Bordignon y Smith, 1999; Graham, 2001; Fatehi et al., 2006). Así, la determinación del estado del ADN se configura como un parámetro independiente en el estudio de la calidad seminal y un potencial instrumento en la predicción de la fertilidad (Evenson, 2002). Las técnicas empleadas por García et al. (2006), se basan en la detección de roturas en la cadena de ADN del núcleo del espermatozoide, mediante el uso de enzimas o tratamientos de lisis inducida por calor o por ácidos, y la posterior tinción de los espermatozoides tratados.

La fragmentación del ADN se basa en la producción de un halo periférico de dispersión del material genético (identificado mediante la tinción de Wright o fluorescente) en aquellos espermatozoides que lo contengan fragmentado tras un tratamiento de lisis, definiéndose un índice de fragmentación del ADN (Figura 4) (García et al., 2006).

El módulo de fragmentación del ADN, permite la valoración automática del nivel de fragmentación del ADN, tras el tratamiento de las muestras con diversos protocolos entre los que se puede citar Halotech®. Las células con el ADN intacto responden al tratamiento, produciendo un halo que es mayor en función de su nivel de integridad. Cuando la fragmentación es muy alta no se produce respuesta, por lo que, no se observa la formación del halo en esos casos. La cuantificación permite establecer niveles de tamaño del halo para la determinación de los porcentajes de diferentes daños del ADN. Esta técnica fue inicialmente desarrollada para semen humano (Fernández et al., 2003) y ha sido empleada en la evaluación de semen de toro (García-Macías et al., 2007) y verraco (Enciso et al., 2006); siendo un método rápido y sencillo, que puede ser utilizado en un laboratorio de análisis convencional (García et al., 2006).

Fluorescencia

El análisis de fluorescencia se basa en la determinación de la proporción de espermatozoides con integridad o no de la membrana (se podría hacer referencia a células vivas y muertas en función de la permeabilidad de membrana). Existe una alta correlación entre el número de células viables en una dosis de inseminación y la capacidad fecundante *in vivo* (Amann y Hammerstedt, 1993; Shannon y Vishwanath, 1995; Den-Daas et al., 1998).

El proceso de criopreservación del semen, produce un estrés térmico para el espermatozoide que afecta a sus membranas (membrana plasmática, membrana externa del acrosoma y membranas mitocondriales), produciendo modificaciones en la organización, fluidez, permeabilidad y composición lipídica, causando daños irreversibles y comprometiendo su supervivencia (Watson, 1981; Thomas et al., 1998).

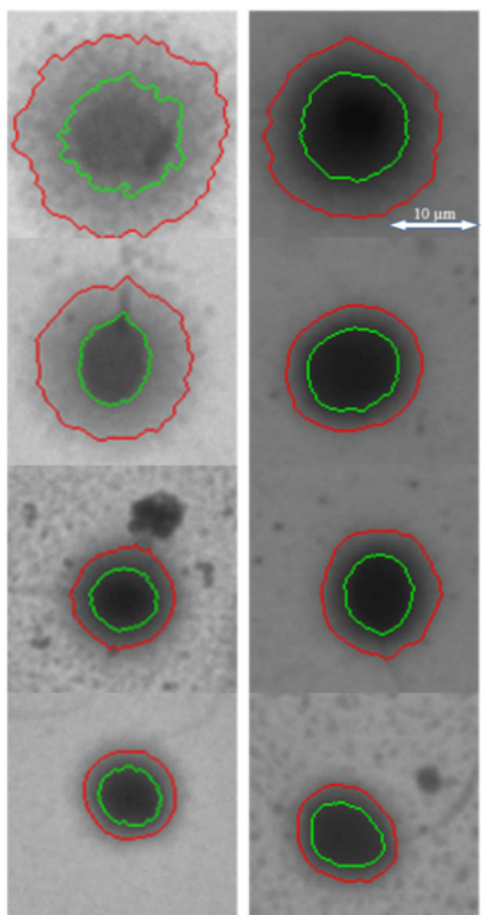


Figura 4. Imágenes de células espermáticas humanas con ADN reaccionado después de tratamiento con diferentes tipos de test (columna izquierda Halosperm®, columna derecha SFDA™). Escala, barra = 10 μm aplicable a cada figura. Adaptado de Sadeghi et al. (2016).

Figure 4. Human sperm cell images with DNA reacted after treatment with different types of test (left column Halosperm®, right column SFDA™). Scale, bar = 10 μm applicable to each figure. Adapted from Sadeghi et al. (2016).

Actualmente, se utilizan técnicas precisas para valorar la viabilidad espermática que, consisten en el marcaje fluorescente del ADN (Figura 5), el estudio de determinadas enzimas intracitoplasmáticas o la medición del potencial de membrana. El módulo de análisis de fluorescencia está contrastado en la actualidad para la valoración del estado de la membrana de la cabeza espermática y para pruebas de vitalidad. Por otro lado, este módulo permite el estudio de otros análisis de tinciones fluorescentes como los relacionados al estado de las mitocondrias de la pieza intermedia.

En algunos trabajos se ha observado que, el porcentaje de espermatozoides móviles no siempre se corresponde con el porcentaje de espermatozoides viables, pues tras la conservación hay un mayor porcentaje de espermatozoides viables que móviles, por ejemplo, en ganado porcino (Jonson et al., 1996). Se ha observado incluso una correlación positiva entre el porcentaje de espermatozoides vivos y la fertilidad *in vivo* (bovino, $r = 0,58$; $p < 0,05$; Januskauskas et al., 2001).

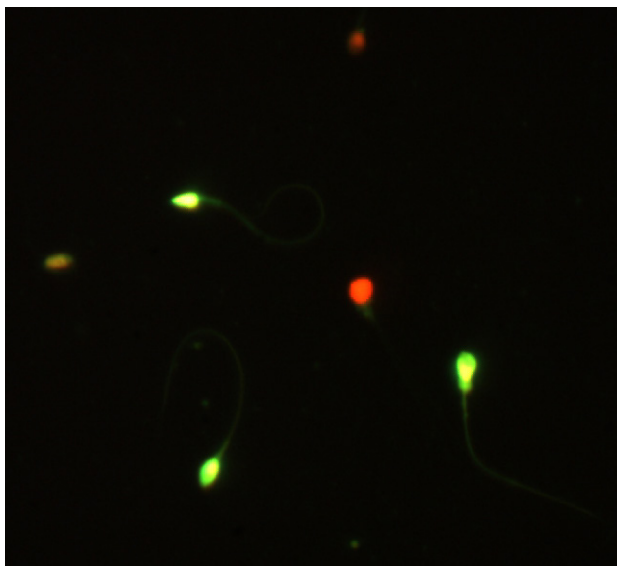


Figura 5. Espermatozoides de verraco teñidos con fluorocromos ioduro de propidio (IP) y naranja de acridina. La fluorescencia verde indica espermatozoide viable con integridad de la membrana mientras que la fluorescencia roja es indicativo de algún daño en la membrana. 40x. Sistema Integral de Análisis de Semen (ISAS)®, ISAS-Proiser (2016).

Figure 5. Boar spermatozoa stained with fluorochromes Propidium iodide (IP) and acridine orange. Green fluorescence indicates viable spermatozoa with membrane integrity while red fluorescence indicates some damage to the membrane. 40x. Integrated Semen Analysis System (ISAS)®, ISAS-Proiser (2016).

Por lo general, las tinciones que estiman el porcentaje de células viables, se basan en la capacidad de la membrana plasmática de los espermatozoides de evitar la entrada de colorantes en el caso de que no esté dañada, por lo que, son indicadores de la integridad estructural de la membrana plasmática. Como en el caso de la evaluación de los acrosomas, se han descrito tinciones para la evaluación de las muestras en microscopios de campo claro (la más utilizada es la de eosina-nigrosina descrita por Hancock (1956)), o en microscopios de fluorescencia (una de las más utilizadas en la actualidad es la combinación de SYBR-14 y yoduro de propidio-PI, descrita por Garner et al. (1994)).

Análisis cuantitativo de las características espermáticas

En la actualidad, las características espermáticas se analizan de acuerdo con algunas técnicas estadísticas de análisis multivariado como los componentes principales, con el fin de generar nuevas variables matemáticas de fácil comprensión y gran poder descriptivo de la muestra, a partir de la información cinética aportada por los sistemas CASA. Se trata de una técnica estadística de cierta complejidad cuya explicación excede el ámbito del presente trabajo, pero que merece ser conocida. Por ejemplo, se han aplicado estas técnicas al conjunto de parámetros de cinética y morfometría aportados por los sistemas CASA, en donde se han obtenido dos resultados que se describen a continuación. El primero hace referencia al primer componente principal (el que más explica las características conjuntas de la muestra, con respecto a la variación total), el cual hace alusión a la forma de la cabeza espermática, lo cual indica que, el conjunto de parámetros que la definen son los más representativos del semen, según los criterios de morfología y la cinética. El segundo está relacionado con los criterios de clasificación utilizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el semen humano (WHO, 1999).

En relación con la cinética, se considera una muestra como astenospermica (con mala movilidad) cuando presenta menos de un 50% de móviles progresivos o al menos 25% de movilidad progresiva y rápida. En este caso, una muestra normozoospermica para la movilidad puede serlo con al menos un 50% de células que se muevan a partir de 45 $\mu\text{m/s}$ y un 80% de STR, siendo igual que lo hagan a 45 $\mu\text{m/s}$ o a cualquier valor superior. Igualmente, se clasifica como astenospermica una muestra que puede presentar un 49% de células con una movilidad superior al punto de corte fijado, que probablemente será mucho mejor que otra con un 55% de células moviéndose en ese mismo límite. Esto plantea una interrogante y es que los resultados obtenidos en el laboratorio cuando se comparan con los parámetros de la OMS (valores cuantitativos por separado o tras el análisis de componentes principales) indican que es necesario cambiar dichos parámetros. Esto implica que, se debe continuar con el estudio específico de la andrología de cada especie para precisar de mejor forma y más detalladamente los parámetros del análisis espermático.

Análisis de subpoblaciones

Un tema de gran relevancia en la actualidad en la investigación andrológica, se refiere al análisis de subpoblaciones espermáticas. Después de considerar el semen como una unidad, desde hace algunos años se está abordando como un conjunto de subpoblaciones, cuya importancia en el transporte y fecundación puede ser diverso y necesario en todos los casos. Por ello, a pesar que solo un espermatozoide fecundará un ovocito, es muy probable que se necesiten otros que le ayuden a hacerlo, no solo otros que compitan en igualdad de condiciones, como se afirma actualmente. Esto supone que probablemente se deba considerar hacer un alto en la forma sobre cómo se valora el criterio de evaluación seminal.

El uso combinado de los sistemas CASA y la estadística multivariante, ha permitido demostrar la existencia de diferentes subpoblaciones cinéticas y morfométricas de espermatozoides dentro de un eyaculado en diversas especies animales (Hidalgo et al., 2008; Muño et al., 2008; Esteso et al., 2009; Miró et al., 2009; Dorado et al., 2010; 2011a; 2011b; Maroto-Morales et al., 2012), modificando así la idea de que un eyaculado se comporta como una población uniforme de distribución normal.

Los esfuerzos en investigación andrológica en el futuro, deberán concentrarse en aportar más datos y variables que intenten explicar la variación observada y permitan dejar a un lado las valoraciones cualitativas para dar paso al uso de variables continuas tratables en su conjunto mediante análisis multivariados y de subpoblaciones espermáticas. Es necesario aclarar que, cuando se hacía referencia a que se debe aportar más datos y variables, no se refería a los que puedan aportar los sistemas CASA de los que se ha tratado en este artículo, sino que será muy importante definir nuevos parámetros de nuevas técnicas analíticas.

Conclusiones

Los sistemas CASA son una herramienta de análisis objetivo de la calidad espermática en muchas especies ganaderas y con ello, disminuye la subjetividad y el error asociado a los análisis convencionales de semen. A través de los módulos que conforman el equipo CASA, se puede valorar la calidad del movimiento de los espermatozoides, la morfología, la morfometría, la integridad de las membranas, la fragmentación del ADN y la fluorescencia. El volumen de información que se puede procesar con los programas computadorizados permite hacer valoraciones más precisas y analizar más reproductores por unidad de tiempo. El análisis multivariado ha permitido determinar la existencia de subpoblaciones espermáticas en el eyaculado, descartando la idea de una muestra seminal como una unidad global.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por la Fundación para el Fomento y la Promoción de la Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria (FITTACORI) y el Programa de Innovación y Transferencia de Tecnología (PITTA) cerdos del Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica. Los autores agradecen al Programa de Producción Agropecuaria (PPA) de la Escuela de Agronomía del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Literatura Citada

- Álvarez-Lledó, C. 2003. Análisis integrado de morfología y movilidad espermática humana con el uso del sperm class analyzer. Tesis Dr., Universidad de Valencia, Valencia, ESP.
- Amann, R.P., and R.H. Hammerstedt. 1993. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J. Androl.* 14:397-406. doi:10.1002/j.1939-4640.1993.tb03247.x
- Amann, R.P., and D.F. Katz. 2004. Andrology Lab Corner: Reflections on CASA after 25 years. *J. Androl.* 25:317-25. doi:10.1002/j.1939-4640.2004.tb02793.x
- Amann, R.P., and D. Waberski. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81:5-17. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.004.
- Babamoradi, H., J.M. Amigo, F. van-den-Berg, M.R. Petersen, N. Satake, and G. Boe-Hansen. 2015. Quality assessment of boar semen by multivariate analysis of flow cytometric data. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 142:219-230. doi:10.1016/j.chemolab.2015.02.008
- Ball, B.A., and H.O. Mohammed. 1995. Morphometry of stallion spermatozoa by computer assisted image analysis. *Theriogenology* 44:367-377. doi:10.1016/0093-691X(95)00191-A
- Barth, A.D. 2000. Bull breeding soundness evaluation manual. 2nd ed. The Western Canadian Association of Bovine Practitioners, Saskatoon, CAN.
- Barth, A.D., and J. Oko. 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press, Ames, IA, USA.
- Blom, E. 1983. Pathological conditions in the genital organs and in the semen as grounds for rejection of breeding bulls for import and export to or from Denmark (an andrologic retrospective, 1958-1982). *Nord.Vet. Med.* 35:105-130.
- Bonet, S., M.D. Briz, E. Pinart, S. Sancho, N. García-Gil, y E. Badia. 2000. Morfología espermática en porcino (Morphology of boar spermatozoa / Morfologia espermàtica en porcí). Institut d'Estudis Catalans, Barcelona ESP.
- Bordignon, V., and L. Smith. 1999. Ultraviolet-irradiated spermatozoa activate oocytes but arrest preimplantation Development after fertilization and nuclear transplantation in cattle. *Biol. Reprod.* 61:1513-1520. doi:10.1095/biolreprod61.6.1513
- Boyer, S.P., R.O. Davis, and D.F. Katz. 1989. Automated semen analysis. *Curr. Probl. Ob-stet. Gynecol. Fertil.* 5:167-200.
- Castellini, C., A. Dal-Bosco, S. Ruggeri, and G. Collodel. 2011. What is the best frame rate for evaluation of sperm motility in different species by computer-assisted sperm analysis? *Fertil Steril* 96:24-27. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.04.096
- Chandler, J.E., C.L. Painter, R.W. Adkison, M.A. Memon, and P.G. Hoyt. 1988. Semen quality characteristics of dairy goats. *J. Dairy Sci.* 71:1638-1646. doi:10.3168/jds.S0022-0302(88)79728-3
- Den-Daas, J.H., G. De-Jong, L.M. Lansbergen, and A.M. Van-Wagtendonk-De-Leeuw. 1998. The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. *J. Dairy Sci.* 81:1714-1723. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75739-X

- Dorado, J., L. Alcaráz, N. Duarte, J.M. Portero, D. Acha, S. Demyda, A. Muñoz-Serrano, and M. Hidalgo. 2011a. Centrifugation on PureSperm(®) density-gradient improved quality of spermatozoa from frozen-thawed dog semen. *Theriogenology* 76:381-385. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.02.026
- Dorado, J., L. Alcaráz, N. Duarte, J.M. Portero, D. Acha, and M. Hidalgo. 2011b. Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm(®) gradient. *Anim. Reprod. Sci.* 125:211-218. doi:10.1016/j.anireprosci.2011.03.013
- Dorado, J., A. Muñoz-Serrano, and M. Hidalgo. 2010. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. *Anim. Reprod. Sci.* 121:115-123. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.04.182
- Enciso, M., C. López-Fernández, J.L. Fernández, P. García, A. Gosálvez, and J.A. Gosálvez. 2006. A new method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright-field or fluorescence microscopy. *Theriogenology* 65:308-316. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.05.044
- ESHRE (European Society for Human Reproduction and Embriology) Andrology Special Interest Group. 1998. Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. *Hum. Reprod.* 13:142-145.
- Esteso, M.C., M.R. Fernández-Santos, A.J. Soler, V. Montoro, F. Martínez-Pastor, and J.J. Garde. 2009. Identification of Sperm-Head Morphometric Subpopulations in Iberian Red Deer Epididymal Sperm Samples. *Reprod. Domest. Anim.* 44:206-211. doi:10.1111/j.1439-0531.2007.01029.x
- Evenson, D.P., K.L. Larson, and L.K. Jost. 2002. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.* 23:25-43. doi:10.1002/j.1939-4640.2002.tb02599.x
- Fatehi, A.N., M.M. Bevers, E. Schoevers, B.A. Roelen, B. Colenbrander, and B.M. Gadella. 2006. DNA damage in bovine sperm cells does not block fertilization but induces apoptosis after the first cleavages. *J. Androl.* 27:176-188. doi:10.2164/jandrol.04152
- Fernández, J.L., L. Muriel, M.T. Rivero, V. Goyanes, R. Vázquez, and J.G. Álvarez. 2003. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J. Androl.* 24:59-66. doi:10.1002/j.1939-4640.2003.tb02641.x
- García, P., B. Pérez, y J. Gosálvez. 2006. Estudio del nivel de fragmentación del ADN en semen de verraco. En: S. Bonet et al., editores, *Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino*. Universidad de Gerona, y Red temática nacional de reproducción porcina, Gerona, ESP, p. 125-132.
- García-Macías, V., P. de-Paz, F. Martínez-Pastor, M. Álvarez, S. Gomes-Alves, J. Bernardo, E. Anel, and L. Anel. 2007. DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull semen. *Int. J. Androl.* 30:88-98. doi:10.1111/j.1365-2605.2006.00723.x
- Garner, D.L., L.A. Johnson, S.T. Yue, B.L. Roth, and R.P. Haugland. 1994. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J. Androl.* 15:620-629. doi: 10.1002/j.1939-4640.1194.tb00510.x
- Graham, J.K. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim. Re-prod. Sci.* 68:249-265. doi: 10.1016/S0378-4320(01)00160-9
- Gil, M.C., M. García-Herreros, F.J. Barón, I.M. Aparicio, A.J. Santos, and L.J. García-Marín. 2009. Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. *Theriogenology* 71:254-263. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.07.007
- Hancock, J.L. 1956. The morphology of boar spermatozoa. *J. Royal Microscop. Soc.* 76:84-97. doi: 10.1111/j.1365-2818.1956.tb00443.x

- Hidalgo, M., I. Rodríguez, and J. Dorado. 2006. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology* 66:996-1003. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.0239
- Hidalgo, M., I. Rodríguez, J. Dorado, and C. Soler. 2008. Morphometric classification of Spanish thoroughbred stallion sperm heads. *Anim. Reprod. Sci.* 103:374-378. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.06.001
- Ibănescu, I., C. Leiding, Ş.G. Ciornei, P. Roşca, I. Sfartz, and D. Drugociu. 2016. Differences in CASA output according to the chamber type when analyzing frozen-thawed bull sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 166:72-79. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.01.005.
- Januskauskas, A., A. Johannisson, and H. Rodríguez-Martínez. 2001. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish Ai bulls. *Theriogenology* 55:947-961. doi:10.1016/S0093-691X(01)00456-3
- Jasko, D.J., T.V. Little, D.H. Lein, and R.H. Foote. 1992. Comparison of spermatozoal movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 200:979-985.
- Johnson, J.E., W.R. Boone, and D.W. Blackhurst. 1996. Manual versus computer-automated semen analysis. Part III: Comparison of old versus new design MicroCell chambers. *Fertil. Steril.* 65:446-447. doi:10.1016/S0015-0282(16)58115-1
- Link, L. 2011. Avaliação de machos reprodutores suínos: Como otimizar seu potencial genético e fertilidade. Trabajo final Médico Veterinario. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, BRA.
- Maroto-Morales, A., M. Ramón, O. García-Álvarez, A.J. Soler, M.R. Fernández-Santos, E. R.S. Roldan, M. Gomendio, M.D. Pérez-Guzmán, and J.J. Garde. 2012. Morphometrically-distinct sperm subpopulations defined by a multi-step statistical procedure in ram Ejaculates: intra- and inter individual variation. *Theriogenology* 77:1529-1539. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.11.020
- Martí, J.I., I.M. Aparicio, C.L.V. Leal, and M. García-Herreros. 2012. Seasonal dynamics of sperm morphometric subpopulations and its association with sperm quality parameters in ram ejaculates. *Theriogenology* 78:528-41. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.02.035
- Martínez-Pastor, F., E.J. Tizado, J.J. Garde, L. Anel, and P. de-Paz. 2011. Statistical series: opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology* 75:783-795. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.11.034
- Mellagi, A.P.G., A. Panzardi, T. Bierhals, N.B. Gheller, M.L. Bernardi, L. Wentz, e F.P. Bortolozzo. 2013. Efeito da ordem de parto e da perda de peso durante a lactação no desempenho reprodutivo subsequente de matrizes suínas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 65:819-825. doi:10.1590/S0102-09352013000300030
- Miró, J., E. Taberner, M. Rivera, A. Peña, A. Medrano, T. Rigau, and A. Peñalba. 2009. Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen. *Theriogenology* 72:1017-1022. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.06.012
- Mortimer, S.T. 2000. CASA-practical aspects. *J. Androl.* 21:515-524. doi:10.1002/j.1939-4640.2000.tb02116.x
- Muiño, R., A.I. Peña, A. Rodríguez, C. Tamargo, and C.O. Hidalgo. 2009. Effects of cryo-preservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. *Theriogenology* 72:860-868. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.06.009
- Muiño, R., M.M. Rivera, T. Rigau, J.E. Rodríguez-Gil, and A.I. Peña. 2008. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *Anim. Reprod. Sci.* 109:50-64. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.11.028
- Ostermeier, G.C., G.A. Sargeant, B.S. Yandell, and J.R. Parrish. 2001. Measurement of bovine sperm nuclear shape using Fourier harmonic amplitudes. *J. Androl.* 22:584-94. doi:10.1002/j.1939-4640.2001.tb02218.x

- Overstreet, J.W., D.F. Katz, F.W. Hanson, and J.R. Fonseca. 1979. A simple, inexpensive method for objective assessment of human sperm movement characteristics. *Fertil. Steril.* 31:162-172. doi:10.1016/S0015-0282(16)43817-3
- Peña, F.J., F. Saravia, M. García-Herreros, I. Núñez-Martínez, J.A. Tapia, A. Johannisson, M. Wallgren, and H. Rodríguez-Martínez. 2005. Identification of sperm morphometric sub-populations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to post thaw quality. *J. Androl.* 26:716-723. doi:10.2164/jandrol.05030
- Rabinovith, J. 2007. SQA: Determining % normal morphology. Medical Electronic Systems. www.mes-global.com/LiteratureRetrieve.aspx?ID=92176 (accessed 10 Aug. 2017).
- Rodríguez Martínez, H. 2000. Evaluation of frozen semen: Traditional and new approaches. In: P.J. Chenoweth, editor, *Topics in bull fertility*. International Veterinary Information Service. Ithaca, NY, USA. p. 502-600.
- Rodríguez-Martínez, H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod. Domest. Anim.* 38:312-318. doi:10.10466/j.1439-0531.2003.00436.x
- Rurangwa, E., D.E. Kime, F. Ollevier, and J.P. Nash. 2004. The measurements of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234:1-28. doi:10.1016/j.aquaculture.2003.12.006
- Sadeghi, S., A. García-Molina, F. Celma, A. Valverde, S. Fereidounfar, and C. Soler. 2016. Morphometric comparison by the ISAS® CASA-DNAf system of two techniques for the evaluation of DNA fragmentation in human spermatozoa. *Asian J. Androl.* 18:835-839. doi:10.4103/1008-682X.186875
- Shannon, P., and R. Vishwanath. 1995. The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. *Anim. Reprod. Sci.* 39:1-10. doi:10.1016/0378-4320(95)01376-B
- Soler, C., J. Kekäläinen, M. Núñez, M. Sancho, J. Núñez, I. Yaber, and R. Gutiérrez. 2012. Male facial anthropometry and attractiveness. *Perception* 41:1234-1245. doi:10.1068/p7214
- Thomas, C.A., D.L. Garner, J.M. DeJarnette, and C.E. Marshall. 1998. Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 58:786-793. doi:10.1095/biolreprod58.3.786
- Valverde, A., H. Arenán, M. Sancho, J. Contell, J. Yániz, A. Fernández, and C. Soler. 2016. Morphometry and subpopulation structure of Holstein bull spermatozoa: variations in ejaculates and cryopreservation straws. *Asian J. Androl.* 18:851-857. doi:10.4103/1008-682X.187579
- Verstegen, J., M. Iguer-Ouada, and K. Onclin. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57:149-179. doi:10.1016/S0093-691X(01)00664-1
- Watson, P.F. 1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees °C by egg-yolk lipoprotein. *J. Reprod. Fert.* 62:483-492.
- WHO (World Health Organization). 1999. *Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*, 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge, GBR.