

EFFECTO DE CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LA MORFOMETRÍA DE LA CABEZA ESPERMÁTICA EN SEMEN DE CAPRINOS

EFFECTS OF CRYOPRESERVATION ON THE SPERM HEAD MORPHOMETRY IN GOAT SEMEN

Leonardo Hernández-Corredor¹⁻²⁻³, Jorge Rubio-Parada¹⁻²⁻³ y Armando Quintero-Moreno*

¹ Laboratorio de Andrología, Unidad de Investigación en Producción Animal (UNIPA)/ Facultad de Ciencias Veterinarias, Apdo. 15252, Maracaibo 4005-A. Universidad del Zulia (LUZ). ² Doctorado en Ciencias Agrarias. Facultad de Agronomía. ³ Profesor catedrático Universidad Francisco de Paula Santander-Cúcuta-Colombia. *armando.quintero@fcv.luz.edu.ve

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los cambios de temperatura durante el proceso de criopreservación sobre las dimensiones y la forma de la cabeza espermática en semen de caprinos. Se evaluaron 56 eyaculados de 7 machos cabríos de reconocida fertilidad utilizando el sistema de Análisis Computarizado de la Morfometría Espermática (ASMA), determinando: Longitud (L), Ancho (W), Área (A), Perímetro (P), Elipticidad (E), Rugosidad (R), Elongación (El), Regularidad (RE) y el factor de forma de la cabeza espermática (P2A). Los parámetros obtenidos se analizaron mediante el procedimiento FASTCLUS para obtener las subpoblaciones espermáticas (SP) y su porcentaje en cada fase del proceso. En semen recién colectado, la SP1 estuvo representada por los espermatozoides (SPZ) de mayor longitud (35,12%), la SP2 con espermios de mayor anchura y menor elipticidad (36,81%), la SP3 obtuvo medidas promedio (9,58%), mientras que SP4 contenía los espermios más pequeños (18,48%). Durante el proceso de refrigeración, la SP1 (32,93%) mostró SPZ de mayor longitud, la SP4 (18,54%) pequeños, no obstante, la SP3 (12,88%) es más parecida a la SP1, y la SP2 (35,66%) presenta espermios no hidrodinámicos (muy anchos). Al descongelar, la SP2 (33,12%) presentó espermios de mayor anchura, la SP1 (30,92%) espermios de mayor longitud y elípticos (hidrodinámicos), la SP3 (14,43%) es parecida a la SP1 y la SP4 (21,53%) se caracteriza por presentar células pequeñas. Se observaron efectos mínimos del proceso de criopreservación sobre la morfometría espermática en el semen caprino, hecho comprobado al observar la frecuencia de distribución de espermios y las características de sus formas para cada SP. La estructura de la SP se mantuvo relativamente constante después del periodo de refrigeración y del almacenamiento en nitrógeno líquido. En conclusión, la criopreservación no modificó sustancialmente los parámetros específicos como la distribución de los SPZ dentro de las SP (menos del 5% de cambios).

Palabras clave: Morfometría; espermatozoide; caprino; subpoblación

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of temperature changes during cryopreservation process on the sperm head morphometry in the goat semen. Fifty six ejaculates of 7 male goats of recognized fertility were evaluated by using the Sperm Morphology Analysis (ASMA) to determine the sperm head size and shape: Length (L), Width (W), Area (A), Perimeter (P), Ellipticity (E), Rugosity (R), Elongation (El), and Regularity (RE). FASTCLUS procedure was done to classify the spermatozoa (SPZ) of the data set into a reduced number of subpopulations (SP). Fresh: Subpopulation 1 (SP1) consisted of long and wide spermatozoa (35.12%), SP2 with SPZ of lower ellipticity (36.81%), SP3 in SPZ of average measurements (9.58%) and SP4 in small (18.48%). Cooling: SP1 (32.93%) are SPZ long, SP4 (18.54%) small, SP3 (12.88%) are similar to SP1, SP2 (35.66%) SPZ not hydrodynamic (very wide). Post thawing: SP2 (35.66%) wide SPZ, SP1 (30.92%) long and elliptical (hydrodynamic), SP3 (14.43%) similar to SP1, SP4 (21.53%) they are small cells. The minimal effects of the sperm cryopreservation process on the morphometry in goat semen were observed in the frequency of SPZ distribution in SPs and the characteristics of their forms for each subpopulation; the structure of the SP was maintained after the period of refrigeration and cold storage. In conclusion, cryopreservation did not modify specific parameters such as SPZ distribution within SPs (less than 5% of changes).

Key words: Morphometry; sperm; goat; subpopulation

INTRODUCCION

La morfometría espermática es un tópico de actualidad, de gran discusión y que se ha venido estudiando con gran ahínco como un predictor de la fertilidad en humanos y animales [17, 24, 27]. En este contexto, la determinación rutinaria de las dimensiones de la cabeza y forma del espermatozoide (SPZ) como rutina en la valoración de la calidad seminal reviste de gran importancia e impacto. Un buen número de estudios en varias especies han abordado este tema, clasificando los eyaculados evaluados en óptimos o no en función del tamaño y forma de la célula espermática [8].

La criopreservación seminal (CS) es una herramienta útil para la mejora genética inmediata, el mantenimiento de la biodiversidad y la conservación de especies en peligro de extinción [7, 39]. En caprinos (*Capra aegagrus hircus*), la cantidad de estudios realizados sobre este tópico es minoritario si se le compara con el número encontrado en otras especies: bovinos (*Bos taurus*), porcinos (*Sus scrofa*), equinos (*Equus caballus*) e incluso ovinos (*Ovis aries*); no obstante, se han planificado investigaciones relevantes utilizando diferentes fórmulas y protocolos para asegurar el almacenamiento exitoso de muestras seminales en nitrógeno líquido, además de tratar de comprender los cambios morfológicos y de función celular que ocurren durante la CS [7, 18, 22, 25, 38, 39]. Estos estudios se han centrado en monitorear los cambios acaecidos en parámetros como la motilidad individual progresiva, la morfometría de los SPZ, la integridad estructural y funcional de la membrana de los SPZ o estado del ácido desoxirribonucleico (ADN), entre otros [7, 37]. Hasta ahora se conoce con certeza que la deshidratación progresiva durante la CS induce una alta proporción de células con daño acrosomal, cambios drásticos en la distribución de enzimas en las membranas o su efecto notable sobre la estructura de la cromatina [29]. La asociación entre las dimensiones de la cabeza espermática (CA) y el proceso de criopreservación en semen caprino ha sido valorada anteriormente, no obstante los resultados no han sido concluyentes.

En función de incrementar el conocimiento en esta área del saber se propuso investigar cómo afecta el proceso de criopreservación las dimensiones y forma de la CA y la distribución de las subpoblaciones durante los tres estados del proceso: recién colectado, durante los procesos de enfriamiento y congelación-descongelación.

MATERIALES Y METODOS

Unidades experimentales

Se colectaron y evaluaron 56 eyaculados de 7 machos cabríos adultos puros de raza alpina, con edades comprendidas entre los 18 y 36 meses de edad y de fertilidad conocida. Los animales fueron sometidos a un ritmo de recogidas 2 veces por semana (sem).

Colecta y evaluación seminal

Se recolectaron 56 eyaculados (8 eyaculados por macho) mediante vagina artificial (VA) (Walmur®, Porto Alegre, RS, Brasil) durante un periodo experimental de tres meses. Inmediatamente

tras la recogida de semen, las muestras fueron diluidas 1:1 en Biladyl® (Fracción A) y mantenidas a 37°C hasta su valoración. Con un microscopio (KRUSS/ optronic, GmbH, Alemania) de luz blanca a 400X, evaluando 100 células por eyaculado, se determinaron los parámetros convencionales de valoración seminal durante el protocolo de enfriamiento y congelación seminal para garantizar que el proceso sea óptimo y asegurar que los cambios de dimensiones de la CE sean producto de la criopreservación y no de errores inherentes al procesamiento. Se determinó el volumen mililitros (mL), el pH mediante tiras reactivas, la motilidad masal (%), individual (%) y morfología espermática por tinción vital mediante la observación por un operario entrenado y la concentración espermática (SPZ/ mL) por medio de un espectrofotómetro (Accuread®, IMV, EUA).

Tras la evaluación rutinaria, el semen procesado se centrifugó a 800 x G durante 5 minutos (min) (Centrifuga Dynac III®, Becton Dickinson, EUA). A continuación, se retiró el sobrenadante y el pellet de SPZ fue re-diluido en alícuotas con un diluyente que contiene lecitina de soya (*Glycine max*) (LS), citrato de sodio, fructosa y glicerol al 7%. Las muestras se refrigeraron por 2 h a 5°C, luego el semen fue vertido en pajuelas y sellado por ultrasonido (MRS1, IMV, EUA). Las pajuelas se congelaron a vapores de nitrógeno líquido (NL) a -115°C por 15 min y almacenadas en NL a -196°C, hasta su evaluación.

Evaluación morfométrica

Se realizó sobre el semen recién colectado (sin diluir), refrigerado y sobre el semen descongelado. Las muestras fueron teñidas y fijadas con la tinción de Diff quick® (Jorgensen laboratories, Loveland CO, 80538, EUA), utilizando la metodología descrita por Hidalgo y col. [21] y Hernández-Corredor y col. [19]. En el portaobjetos se colocó 10 microlitros (µL) de semen (fresco, refrigerado y descongelado) luego se colocó en la platina de calentamiento (Osaka, OK 51, España) a 38°C por 20 min, se tomó el portaobjetos y se hicieron cinco inmersiones (rápidas) en la tinción fijadora (#1) Diff quick, seis inmersiones (rápidas) en la solución de tinción (#2) Diff quick, siete inmersiones (rápidas) en la tinción de contraste (#3) Diff quick, en esta última parte se hace un lavado con agua estéril, hasta que el portaobjetos de un color rosado transparente; al cabo de 30 min de secado se almacenan para su posterior evaluación morfométrica.

La evaluación de la morfometría espermática fue realizada mediante el módulo de morfometría de un software disponible comercialmente (I/SAS® V 1.2, Proiser, Barcelona, España). Este sistema consta de un microscopio (KRUSS/ optronic, GmbH, Alemania) con un objetivo de campo claro y una cámara de vídeo (Sony/CCD AVC-D7CE, Sony Corporation, Tokyo, Japón), conectada a un computador (Acer, ZQK, Core i3, China). La intensidad de la fuente de iluminación y el desplazamiento de la cámara fueron iguales para todas las muestras. Las dimensiones morfométrica para el largo (L), ancho (W), área (A), perímetro (P) y la forma (elipticidad, rugosidad, elongación, regularidad y angulosidad) y el factor de forma de la cabeza espermática, conocido como p2a (relación P-A: $P^2/(4 \times \pi \times A)$), que toma un valor de 1, cuando la cabeza espermática es circular; incrementando su valor a medida que la célula experimenta elongación (FIG 1). Se tomaron 200 imágenes por frotis; lo cual asegura un mínimo de 150 siluetas (cabezas) capturadas de manera efectiva,

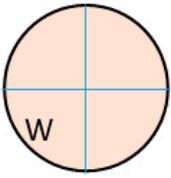
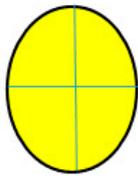
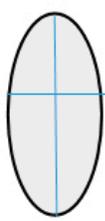
Cabeza circular	Cabeza ligeramente alargada	Cabeza alargada
		
Largo (L)= 1	Largo (L)=8,96	Largo=9,98
Ancho (W)= 1	Ancho (W)= 4,41	Ancho= 4,62
Área (A) = $\pi \cdot r^2$	Área (A)=34,83	Área =37,57
Perímetro (P)= $2\pi \cdot r$	Perímetro= 24,25	Perímetro= 27,20
P2a= $P^2/4\pi A = 1$	P2a= 1,34	P2a= 1,56

FIGURA 1. DESCRIPCIÓN DEL FACTOR DE FORMA. Si la cabeza espermática fuese circular, el valor de p2a sería igual a 1 (cuadrante izquierdo). a medida que aumenta el valor de p2a, la forma de la cabeza será más alargada (cuadrantes medio y derecho) [39, 43].

desechando aquellas medidas inapropiadas que fueron excluidas del análisis. Las células espermáticas se seleccionaron al azar, para el análisis biométrico. Las medidas de cada CA de cada reproductor, fueron guardadas en una base de datos.

Metodología estadística

Los datos obtenidos (dimensiones de la cabeza y forma del espermatozoide) del sistema ASMA (*Assisted Sperm Head Morphometry Analysis*) son almacenados por el programa en una hoja de cálculo Excel®. Luego se realizó un traslado a un archivo TXT®, posteriormente a Word® y finalmente se concretó el análisis mediante el programa “*Statistical Analysis System*”, software 8.2 (SAS Inst. Inc.; Carry, NC. EUA. 2002), para Windows. Para identificar la presencia de subpoblaciones (SP) en los eyaculados, las dimensiones y forma de la CA fueron sometidas a un análisis multivariado de agrupamiento nos anchos, de menor área y menos angulosos; sin embargo, son los más elongados y de mayor P2a. En el semen recién colectado representa una población de 9,58%, que incrementa durante en proceso de enfriamiento (12,88%) y congelación-descongelación (14,43%). Esta situación podría deberse a la pérdida de dimensiones de la SP1 y/o SP2 durante el proceso de criopreservación.

La SP4 consta el 20,11% de SPZ de menor longitud, área y perímetro, por ende la población de cabezas más pequeñas, lo cual se complementa al tener los espermios con formas menos elongadas, es decir más circulares y de menor regularidad. Durante el proceso de refrigeración solo una muy pequeña población de células espermáticas incrementan (18,48 a 18,54%), pero durante la fase de congelación-descongelación el

incremento es mayor, no obstante, insignificante sin superar el 3% (21,53%).

En esta investigación, los cambios en las SP durante las diferentes fases del proceso de criopreservación fueron mínimos (menos del 5%), sin embargo, los valores medios morfométricos obtenidos en las subpoblaciones durante todo el proceso de criopreservación fueron superiores a los reportado por la mayoría de los trabajos revisados [4, 9, 13, 15, 21, 25, 44, 45, 47]. Es importante destacar que esta investigación fue realizada bajo condiciones tropicales y la comparativa se realizó con trabajos realizados en países de clima templado, lo cual apertura una línea de investigación que determine si los SPZ de caprino u otras especies poseen mayores dimensiones debido al efecto medioambiental del trópico. En un trabajo previo [36] se aseveró que, las diferencias en dimensiones entre cada investigación podrían explicarse por la tinción usada, no obstante, en esta investigación se utilizó la tinción de Diff quick®, la cual fue utilizada en algunas de las investigaciones referidas donde las dimensiones fueron inferiores a las obtenidas en este ensayo; este hecho descarta que los valores obtenidos sean debido a la tinción utilizada.

La dinámica biométrica de las subpoblaciones espermáticas sometidas a estrés térmico con frío es muy cambiante debido a que la célula adopta su forma dependiendo del medio donde se encuentre. Este cambio de forma y dimensión se debe al deterioro de la membrana acrosomal, lo cual afecta sustancialmente las dimensiones del SPZ. Este hecho se produce debido a que la asociación entre el estrés por frío y el diluyente de congelación que se utiliza de manera rutinaria causa una deshidratación progresiva de los SPZ, que comienza con la

TABLA I
SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS DE LA MORFOMETRÍA DE LA CABEZA DURANTE
LOS TRES DIFERENTES PROCESOS DE CRIOPRESERVACIÓN SEMINAL

Parámetros	Subpoblaciones			
	SP1	SP2	SP3	SP4
Largo (μm)	9,96 \pm 0,41 ^a	9,52 \pm 0,33 ^c	9,64 \pm 0,28 ^b	9,05 \pm 0,26 ^d
Ancho (μm)	4,98 \pm 0,19 ^b	5,10 \pm 0,15 ^a	4,66 \pm 0,12 ^c	4,78 \pm 0,13 ^b
Área (μm^2)	41,29 \pm 2,85 ^b	42,53 \pm 1,88 ^a	39,10 \pm 2,05 ^c	38,10 \pm 1,64 ^d
Perímetro (μm)	26,52 \pm 1,01 ^a	26,52 \pm 0,69 ^a	25,89 \pm 0,72 ^b	25,08 \pm 0,61 ^c
Elipticidad	2,00 \pm 0,10 ^b	1,86 \pm 0,07 ^d	2,06 \pm 0,04 ^a	1,89 \pm 0,07 ^c
Rugosidad	0,73 \pm 0,03 ^b	0,76 \pm 0,02 ^a	0,73 \pm 0,02 ^b	0,76 \pm 0,02 ^a
Elongación	0,33 \pm 0,02 ^b	0,30 \pm 0,01 ^c	0,34 \pm 0,01 ^a	0,30 \pm 0,01 ^c
Regularidad	0,94 \pm 0,02 ^a	0,89 \pm 0,02 ^c	0,90 \pm 0,02 ^b	0,89 \pm 0,02 ^c
Angulosidad	0,50 \pm 0,02 ^c	0,53 \pm 0,02 ^a	0,48 \pm 0,01 ^d	0,52 \pm 0,02 ^b
p2a	1,35 \pm 0,06 ^b	1,31 \pm 0,04 ^c	1,36 \pm 0,04 ^a	1,31 \pm 0,03 ^c
Total de la muestra, N (%)	2715 (32,36)	2901 (34,58)	1087 (12,96)	1687 (20,11)
Fresco, N (%)*	667 (35,12)	699 (36,81)	182 (9,58)	351 (18,48)
Refrigerado, N (%)*	675 (32,93)	731 (35,66)	264 (12,88)	380 (18,54)
Descongelado, N (%)*	1373 (30,92)	1471 (33,12)	641 (14,43)	956 (21,53)
Fresco Vs. Descongelado (%)	-4,21	-3,69	4,85	3,04

Diferentes letras en los valores de las filas (superíndices: a, b, c, d) denota diferencias significativas ($P \leq 0,01$).

reacción del acrosoma producto del cambio en la distribución de enzimas en las membranas [29] y termina con los cambios de estructura del ADN; para algunos autores el efecto final es la fragmentación del ADN y para otros la sobre condensación. Es conocido que, después de la adición del medio crio protector (lo cual ocurre antes de la congelación) las células funcionales se deshidratan y disminuyen de dimensión debido al agua que fluye al exterior de la célula, no obstante, al descongelarse los SPZ que no se les han deteriorado sus membranas se hidratan de nuevo y recuperan "parcialmente" sus dimensiones porque el agua y el crioprotector entran al interior de la célula, debido a la recuperación del equilibrio osmótico [2].

El uso del parámetro p2a utilizado en este experimento explica que durante el proceso de refrigeración las células espermáticas caprinas tienden a hincharse, no obstante, una vez descongelada la muestra seminal los SPZ adquieren parcialmente su tamaño original [23, 39, 43]. Cuando los espermios contenidos en una muestra seminal han experimentado pérdida sustancial de sus dimensiones y forma es porque el proceso de criopreservación ha propiciado una mortalidad espermática acentuada. Los SPZ muertos han modificado la función de la membrana y han perdido parte de su contenido intracelular como resultado de la degeneración [16]. Esto explica el daño incurrido en las células espermáticas frente a los cambios físico-químicos y de adaptación fisiológica de las células a los diferentes estresores criobiológicos. Se ha enfatizado que la vitalidad espermática en semen criopreservado depende de muchos factores como: la técnica de congelación, la composición de los diluyentes, la dilución en sí, los lapsos de tiempos adecuados entre la

refrigeración y la congelación y el método de descongelación [1]. También es sumamente importante congelar muestras seminales que tengan un 80% de SPZ normales para lograr tasas más altas de fecundación [6].

El efecto de la criopreservación sobre la morfometría de la CA ha sido estudiado en caprinos [20, 25]. Estos estudios han referido una reducción importante de las dimensiones de la cabeza e incluso variación en su forma. Diferentes hipótesis han sido propuestas para explicar la causa de la reducción de las dimensiones del SPZ debido al proceso de criopreservación, que incluyen los cambios osmóticos [5, 10], alteración de los compartimientos celulares [5, 16], daño o pérdida del acrosoma [30, 46] y un aumento de la condensación de la cromatina espermática [3, 40].

Es conocido también que pueden existir respuestas variadas al proceso de criopreservación, entre individuos e incluso entre eyaculados de un mismo individuo [28]. Este hecho se ha utilizado para realizar una clasificación de buenos o malos congeladores basándose en el porcentaje de pérdida de su calidad seminal entre el semen recién colectado y descongelado, siendo la morfometría espermática una herramienta óptima para lograr este objetivo. Este hecho se fundamenta en trabajos previos [28]. Hidalgo y col. [20] observaron en espermios de caprinos, que los cambios morfométricos fueron menores en muestras de excelente calidad en semen recién colectado, mientras que, en muestras de peor calidad, la pérdida de dimensiones debido al choque por frío fue muy superior. Esteso y col. [12] observaron que los SPZ con mayor resistencia al proceso de criopreservación se caracterizan por tener menor área de la cabeza e incremento

del factor de forma de cabeza (definido como la relación longitud / anchura). Aunado a esto se observan cambios mínimos en las dimensiones de los SPZ. Ramon y col. [38] han avanzado un poco más en la predicción de la crio-resistencia de SPZ. Si bien un estudio general de las características morfométricas de la CA de carnero en cada etapa del proceso de congelación no permitió una identificación adecuada de los machos con mejor potencial, condujo a la identificación de diferentes patrones claramente definidos que propician su crio-conservación. Además, estos autores demostraron que cada macho conservaba su patrón de respuesta para todos los eyaculados examinados, y que los machos que compartían el mismo patrón de respuesta estaban estrechamente relacionados, lo que sugiere la posibilidad de un control genético de la respuesta.

Es importante destacar que, la mayoría de los estudios sobre el efecto de la crio-conservación en la morfología de los SPZ se han centrado en la evaluación de las características de la CA, sin embargo, recientemente se demostró que ciervos (*Cervus elaphus*) que no diferían en las dimensiones de la cabeza de sus SPZ mostraron diferencias significativas en la crio-resistencia de los SPZ, relacionado la respuesta al volumen de la pieza principal [41]. Este estudio indica un papel clave del flagelo del SPZ durante la crio-conservación y sugiere nuevos enfoques para la caracterización de los SPZ con buena crio-resistencia [28].

Actualmente, el estudio de muestras seminales agrupadas en subpoblaciones de acuerdo a la biometría espermática en caprinos [11, 22] y otras especies [14, 15, 26, 31, 42] están establecidas, no obstante, el origen de estas diferencias grupales no ha sido dilucidado aún, y se han planteado algunas hipótesis bien fundamentadas que atribuye al proceso de maduración en el epidídimo como posible explicación a las diferencias en la morfología. [14, 31].

CONCLUSIÓN

Al observar los efectos de la criopreservación, sobre la morfometría espermática en el semen caprino, se puede concluir que las CE de los SPZ se adaptan muy bien al estrés por frío, propiciando un cambio sutil en el porcentaje de las subpoblaciones espermáticas desde el proceso de recolección y durante la refrigeración y congelación- descongelación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] ABOAGLA, E.; TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing step preservative on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenol.** 62:1160-1172. 2004.
- [2] AGCA, Y.; GILMORE, J.; BYERS, M.; WOODS, E.; LIU, J.; CRITSER, J. Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars. **Biol. Reprod.** 67:1493-1501. 2002.
- [3] ÁLVAREZ, M.; GARCIA-MACIAS, V.; MARTINEZ-PASTOR, F.; MARTINEZ, F.; BORRAGAN, S.; MATA, M.; GARDE, J.J.; ANEL, L.; DE PAZ, P. Effects of cryopreservation on head morphometry and its relation with chromatin status in brown bear (*Ursus arctos*) spermatozoa. **Theriogenol.** 70:1498-1506. 2008.
- [4] ARAGÃO, F. Otimização da criopreservação seminal e fertilização assistida em cyprinus carpio (Actinopterygii) no semiárido brasileiro. Universidade Estadual Do Ceará. Tese (Doctourado). 93 pp. 2016.
- [5] ARRUDA, RP.; BALL, BA.; GRAVANCE, CG.; GARCIA, RP.; LIU, IK. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. **Theriogenol.** 58:252-256. 2002.
- [6] ATTIA, S.; KATILA, T.; ANDERSSON, M. The effect of sperm morphology and sire fertility on calving rate of Finnish Ayrshire AI bulls. **Reprod. Domest. Anim.** 51:54-58. 2016.
- [7] BENSON, JD.; WOODS, EJ.; WALTERS, EM.; CRITSER, JK. The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenol.** 78:1682-1699. 2012.
- [8] CASEY, P.J.; GRAVANCE, CG.; DAVIS, RO.; CHABOT, DD.; LIU, IK. Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. **Theriogenol.** 47:575-582. 1997.
- [9] CAVALCANTE, T. Plasma concentrations of testosterone and fertility of bucks of the Alpine and Boer breed during breeding and nonbreeding season. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP, Jaboticabal-SP. Thesis of Grade. 77pp. 013.
- [10] CURRY, MR.; KLEINHANS, FW.; WATSON, PF. Measurement of the water permeability of the membranes of boar, ram, and rabbit spermatozoa using concentration-dependent self-quenching of an entrapped fluorophore. **Cryobiol.** 41:167-73. 2000.
- [11] DORADO, J. Respuesta a la congelación-descongelación del esperma de macho cabrío. Universidad de Córdoba. Facultad de Veterinaria. Tesis Doctoral. 203pp. 2003.
- [12] ESTESO, MC.; SOLER, AJ.; FERNÁNDEZ-SANTOS, MR.; QUINTERO-MORENO, A.; GARDE, J.J. Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm samples. **J. Androl.** 27:662-670. 2006.
- [13] ESTESO, M.; RODRÍGUEZ, E.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; CASTAÑO, C.; PRADIEE, J.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; SANTIAGO-MORENO, J. Descriptive analysis of sperm head morphometry in Iberian ibex (*Capra pyrenaica*): optimum sampling procedure and staining methods using Sperm-Class Analyzer®. **Anim. Reprod. Sci.** 155:42-49. 2015.
- [14] GONZÁLEZ, D.; QUINTERO-MORENO, A.; GARDE, J.; ESTESO, M.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.; RUBIO-GUILLÉN, J.; MEJÍA, W.; GONZÁLEZ, Y.; LEÓN, G.; BOHÓRQUEZ, R. Caracterización morfométrica de la cabeza del espermatozoide porcino mediante análisis computarizado (resultados preliminares). **Rev. Cientif. FVC-LUZ.** XVIII (5): 570-577. 2008.
- [15] GRAVANCE, C.; WHITE, C.; ROBERTSON, K.; CHAMPION,

- Z.; CASEY, P. The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of caprine sperm beads. **Anim. Reprod. Sci.** 49:37-43. 1997.
- [16] GRAVANCE, C.; VISHWANATH, R.; PITT, C.; GARNER, D.; CASEY, P. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. **J. Androl.** 19:704-709. 1998.
- [17] GRAVES, JE.; HIGDON, HL.; BOONE, WR.; BLACKHURST, DW. Developing techniques for determining sperm morphology in today's andrology laboratory. **J. Assisted Reprod. Genet.** 22: 219-225. 2005.
- [18] HERNÁNDEZ-CORREDOR, L.; NIVIA-OSUNA, A.; HERNÁNDEZ-VILLAMIZAR, D.; RUBIO-PARADA, J.; QUINTERO-MORENO, A. Evaluación de la movilidad espermática de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes a través del sistema CASA. **Rev. Respuesta** 2: 16-27. 2013.
- [19] HERNÁNDEZ-CORREDOR, L.; DORADO, J.; QUINTERO-MORENO, A.; ORTIZ, I.; BUZÓN A.; CORZO, M.; HIDALGO, M. Efecto de dos diluyentes a base de lecitina de soya sobre parámetros morfométricos en semen caprino. **Rev. SENNOVA** 1(1): 30-43. 2014.
- [20] HIDALGO, M.; RODRIGUEZ, I.; DORADO, J.M. The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. **Anim. Reprod. Sci.** 100: 61-72. 2001.
- [21] HIDALGO, M.; RODRÍGUEZ, I.; DORADO, J.M. Influence of staining and sampling procedures on gota sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. **Theriogenol.** 66: 996-1003. 2006.
- [22] HIDALGO, M.; RODRÍGUEZ, I.; DORADO, J. The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. **Anim. Reprod. Sci.** 100: 61-72. 2007.
- [23] JIMÉNEZ-RABADÁN, P.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; VIDAL, A.; MAROTO-MORALES, A.; INIESTA-CUERDA, M.; RAMÓN, M.; DEL OLMO, E.; FERNÁNDEZ-SANTOS, R.; GARDE, J.J.; SOLER, A.J. Effects of vitrification on ram spermatozoa using free-egg yolk extenders. **Cryobiol.** 71: 85-90. 2015.
- [24] LASIENE, K.; GEDRIMAS, V.; VITKUS, A.; GLINSKYTE, S.; LASYS, V.; VALANCIUTE, A.; SIENKIEWICZ, W. Evaluation of morphological criteria of sperm quality before in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. **Pol. J. Vet. Sci.** 16:773-785. 2013.
- [25] MARCO-JIMENEZ, F.; VIUDES-DE C, M.; BALASCH, S.; MOCE, E.; SILVESTRE, M.; GOMEZ, E.; VICENTE, J. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. **Cryobiol.** 52:295-304. 2006.
- [26] MAROTO-MORALES, A. Evaluación objetiva de la morfometría de los espermatozoides de ovino (*Ovis aries*). Relaciones con la fertilidad. Universidad de Castilla-La Mancha. Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos. Tesis Doctoral. 112pp. 2012.
- [27] MAROTO-MORALES, A.; RAMÓN, M.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MONTORO, V.; SOLER, AJ.; FERNÁNDEZ-SANTOS, MR.; ROLDAN, ERS.; PÉREZ-GUZMÁN, MD.; GARDE, JJ. Sperm head phenotype and male fertility in ram semen. **Theriogenol.** 84:1536-1541. 2015.
- [28] MAROTO-MORALES, A.; GARCIA-ALVAREZ, O.; RAMÓN, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; FERNANDEZ-SANTOS, MR.; SOLER, J.; GARDE, JJ. Current status and potential of morphometric sperm analysis. **Asian J. Androl.** 18: 863-870. 2016.
- [29] MARTI, J.; APARICIO, I.; GARCÍA-HERREROS, M. Head Morphometric changes in cryopreserved ram spermatozoa are related to sexual maturity. **Theriogenol.** 75: 473-481. 2011.
- [30] PEÑA, AI.; LUGILDE, LL.; BARRIO, M.; HERRADON, PG.; QUINTELA, LA. Effects of Equex from different sources on post thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration of dog spermatozoa. **Theriogenol.** 59: 1725-1739. 2003.
- [31] PEÑA, F.; SARAVIA, F.; GARCÍA-HERREROS, M.; NUÑEZ-MARTÍNEZ, I.; TAPIA, J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to post thaw quality. **J. Androl.** 26(6): 716-723. 2005.
- [32] QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, JE. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. **Theriogenol.** 59: 1973-1990. 2003.
- [33] QUINTERO-MORENO, A.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, JE. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analyses. **Theriogenol.** 61:673-690. 2004.
- [34] QUINTERO-MORENO, A.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, JE. Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulations in rabbit semen and to predict semen fertility and litter size. **Reprod. Domest. Anim.** 42:312-319. 2007.
- [35] QUINTERO-MORENO, A.; GONZÁLEZ, D.; GARDE, J.J.; ESTESO, M.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.; CARVALHO, J.L.; MEJÍA, W.; LEÓN, G. Valoración morfométrica de la cabeza del espermatozoide del cerdo doméstico según su edad. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XIX (2): 153-156. 2009.
- [36] QUINTERO-MORENO, A.; RAMÍREZ, M.; NAVA-TRUJILLO, H.; HIDALGO, M. Comparison of two histologic stains in the evaluation of sperm head morphometric measurements in frozen-thawed bull semen. **Acta Microscop.** 24(2): 103-110. 2015.

- [37] RAMÓN, M.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; SOLER, J.; JIMÉNEZ-RABADÁN, P.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; BERNABÉU, R.; GARDE, J. Taking advantage of the use of supervised learning methods for characterization of sperm population structure related with freezability in the Iberian red deer. **Theriogenol.** 77:1661-1672. 2012.
- [38] RAMÓN, M.; PÉREZ-GUZMÁN, MD.; JIMÉNEZ-RABADÁN, P.; ESTESO, MC.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; ANEL-LÓPEZ, L.; SOLER, AJ.; FERNÁNDEZ-SANTOS, R.; GARDE, JJ. Sperm Cell Population Dynamics in Ram Semen during the Cryopreservation Process. **PLoS ONE** 8(3): e59189. 2013a.
- [39] RAMÓN, M.; SOLER, A.; ORTIZ, J.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; ROLDAN, E.; GARDE, J.J. Sperm population structure and male fertility: an intraespecific study of sperm design and velocity in red deer. **Biol. Reprod.** 89:110. 2013b.
- [40] RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; HOFACK, G.; MAES, D.; DE KRUIF, A. Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton Thorne analyzer. **Theriogenol.** 62: 1292-1306. 2004.
- [41] ROS-SANTAELLA, JL.; DOMINGUEZ-REBOLLEDO, AE.; GARDE, JJ. Sperm flagellum volume determines freezability in red deer spermatozoa. **PLoS One** 9: e112382. 2014.
- [42] RUBIO-GUILLÉN, J.; GONZÁLEZ, D.; GARDE, J.J.; ESTESO, M.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; MADRID-BURY, N.; QUINTERO-MORENO, A. Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. **Reprod. Domest. Anim.** 42: 354-357. 2007.
- [43] SAILER, BL.; JOST, LK.; EVENSON, DP. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. **Cytometry** 24:167-173. 1996.
- [44] SINHA, C.; YADAV, S.; YADAV, B.; KUMAR, J.; SINGH, K. Objective assessment of sperm morphometry of Barbari Bucks. **Ind. J. Small Rumin.** 20(2): 129-131. 2014.
- [45] TABAREZ, A. Optimización del protocolo de crioconservación de semen caprino de la raza autóctona en peligro de extinción Blanca de Rasquera. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. Tesis Doctoral. 264 pp. 2014.
- [46] THOMAS, C.; GARNER, D.; DEJARNETTE, J.; MARSHALL, C. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biol. Reprod.** 56: 991-998. 1997.
- [47] VICENTE-FIEL, S.; PALACIN, I.; SANTOLARIA, P.; YANIZ, J. A comparative study of sperm morphometric subpopulations in cattle, goat, sheep and pigs using a computer-assisted fluorescence method (CASMA-F). **Anim. Reprod. Sci.** 139: 182-189. 2013.