

Evaluación morfológica y morfométrica de espermatozoides de camélidos sudamericanos mediante la tecnología CASA

Morphological and morphometric evaluation of South American camelid spermatozoa using CASA (Computer Assisted Semen Analysis) technology.

 **Hernán Carlos Cucho Dolmos**

hernan.cucho@unsaac.edu.pe

Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Perú

 **Francisco Sevilla Benavides**

f.sevilla@tec.ac.cr

Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica

 **José Ignacio Araya-Zúñiga**

igaraya@estudiantec.cr

Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica

 **Rafael Molina-Montero**

rafmolina@tec.ac.cr

Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica

 **Anthony Valverde Abarca**

anvalverde@tec.ac.cr

Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica

Resumen | Los sistemas computarizados de análisis seminal asistido (CASA) permiten realizar evaluaciones objetivas de la calidad espermática, las cuales podrían emplearse como un indicador del potencial de fertilidad de los reproductores. El objetivo de este trabajo fue revisar el estado del arte sobre la evaluación espermática mediante la tecnología CASA-Morph en camélidos sudamericanos. Los sistemas CASA-Morph analizan objetivamente la morfometría espermática y detectan alteraciones en la cabeza y la pieza intermedia. La morfología y morfometría de los espermatozoides de las alpacas, llamas y vicuñas, proporciona información para predecir la fertilidad potencial y detectar anomalías que podrían afectar el desarrollo embrionario. Además, se elimina la subjetividad asociada a las estimaciones de la calidad espermática debido a los diferentes operarios. La cabeza del espermatozoide se ha caracterizado mediante cinco formas persistentes en el eyaculado de los camélidos sudamericanos: normal, piriforme, larga, corta y redondeada. La información obtenida de los sistemas CASA-Morph ha permitido determinar la heterogeneidad de los eyaculados mediante el análisis multivariante de parámetros morfométricos, lo que permite clasificar

subpoblaciones espermáticas. La identificación de subpoblaciones espermáticas permite comprender mejor la variabilidad intra e interindividual de los eyaculados de camélidos, lo que favorece la selección de reproductores y contribuye al desarrollo de estrategias más precisas para el manejo de la fertilidad en estas especies.

Palabras clave | análisis de semen, reproducción, morfometría espermática, camélidos

Abstract | Computerized assisted semen analysis (CASA) systems allow objective assessments of sperm quality, which could be used as an indicator of the fertility potential of breeding animals. The objective of this study was to review the state of the art on sperm evaluation using CASA-Morph technology in South American camelids. CASA-Morph systems objectively analyze sperm morphometry and detect abnormalities in the head and midpiece. The morphology and morphometry of sperm from alpacas, llamas, and vicuñas provide information to predict potential fertility and detect abnormalities that could affect embryonic development. Furthermore, the subjectivity associated with sperm quality assessments due to different operators is eliminated. The sperm head has been characterized by five persistent shapes in the ejaculate of South American camelids: normal, pear-shaped, long, short, and rounded. The information obtained from the CASA-Morph systems has allowed us to determine the heterogeneity of ejaculates through multivariate analysis of morphometric parameters, which allows us to classify sperm subpopulations. The identification of sperm subpopulations allows us to better understand the intra- and inter-individual variability of camelid ejaculates, which favors the selection of breeders and contributes to the development of more precise strategies for fertility management in these species.

Keywords | semen analysis, reproduction, sperm morphometry, camelids



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Introducción

La tecnología de análisis de semen asistido por computadora (CASA por sus siglas en inglés, Computer Assisted Semen Analysis) se desarrolló a finales de la década de los años setenta del siglo XX (Amann y Katz, 2004; Amann y Waberski, 2014; Liu y Warme, 1977; Mortimer, 2000; Mortimer y De Jonge, 2018). El propósito de esta tecnología emergente era lograr una mayor objetividad al momento de realizar un análisis de semen. Mediante los sistemas CASA es posible evaluar diferentes características de los espermatozoides y obtener una visión integral de la calidad del semen considerando parámetros como movilidad, morfología, concentración, vitalidad y fragmentación del ADN (Gallagher et al., 2018; Mortimer et al., 2015; Valverde et al., 2020).

A partir de los años 2000, los sistemas CASA se posicionaron como instrumentos para el análisis seminal, primero en humanos (García-Molina et al., 2023; Mortimer, 2000), y posteriormente en animales. La evaluación de la morfometría espermática se realiza mediante la tecnología CASA (Soler et al., 2017a; Valverde et al., 2019; van der Horst et al., 2018), que utiliza una combinación de programas informáticos junto con el análisis de imágenes, lo que proporciona una herramienta cada vez más utilizada debido a su capacidad para ofrecer resultados con mayor precisión y repetibilidad (Yániz et al., 2015). El sistema CASA incluye diversos módulos de análisis, como CASA-Mot, que evalúa la movilidad y los parámetros cinemáticos, y CASA-Morph, que se enfoca en la morfometría (Maroto-Morales et al., 2016; Soler et al., 2016a; Soler y Cooper, 2016c).

Las variables morfométricas que derivan del CASA-Morph se dividen en mediciones de cabeza y de pieza intermedia. Las variables que pueden medirse en la cabeza son: longitud (L, μm), anchura (W, μm), área (A, μm^2) y perímetro (P, μm). Además, se pueden determinar variables de la pieza intermedia del espermatozoide, tales como anchura (μm), área (μm^2), distancia de inserción (distancia entre la cabeza y el eje de la pieza intermedia, μm) y ángulo de inserción ($^\circ$) de la pieza intermedia (Soler et al., 2005a; Valverde Abarca y Madrigal-Valverde, 2018). El sistema CASA-Morph también proporciona información de cuatro variables de la forma de la cabeza del espermatozoide: elipticidad que se obtiene mediante la fórmula (L/W) y describe la forma elíptica de un objeto, de forma que su valor es 1 para un círculo y > 1 para una elipse (Gravance et al., 1996; Soler et al., 2017b). Cuando los valores son superiores a la unidad, la forma de la cabeza del espermatozoide tiende a ser más delgada. La elongación se obtiene mediante la fórmula $([L-W]/[L+W])$ y describe el grado de alargamiento de un objeto, por lo que su valor es 0 para un círculo y alcanza un valor de 1 para una línea. Cuando este valor aumenta, la cabeza del espermatozoide tiende a ser más alargada (García-Molina et al., 2022; Soler et al., 2014a). Otras variables de la forma de la cabeza que se obtienen del análisis morfométrico del espermatozoide son la regularidad ($\pi LW/4A$), que describe el grado de uniformidad de la forma de la cabeza del espermatozoide, y la rugosidad ($4\pi A/P^2$), que describe el grado de circularidad de un objeto (Sadeghi et al., 2016). Cuando se tiene un círculo ideal, el valor es 1, mientras que el valor de 0 corresponde a una línea. Cuando el valor tiende a 1, la cabeza del espermatozoide presenta una forma más circular de acuerdo con la estimación de la rugosidad (Cucho et al., 2019).

La variabilidad de la morfometría del espermatozoide dificulta la evaluación del operador, por lo que variaciones intra e inter observador reducen la fiabilidad de los resultados (Soler et al., 2000; Yeung et al., 1997). A través de la tecnología CASA-Morph (Soler et al., 2016a) se puede realizar una evaluación objetiva de la morfometría espermática (Maroto-Morales et al., 2016; Soler et al., 2005b; Yaniz et al., 2015) y evitar las evaluaciones subjetivas de los técnicos de laboratorio (Soler et al., 2016b). Los datos que se obtienen con las evaluaciones mediante los sistemas CASA permiten disponer de información espermática individual para realizar análisis multivariados para determinar diferentes patrones morfométricos en el semen en diferentes especies (Barquero et al., 2021a; 2021b; Valverde et al., 2016; Yaniz et al., 2016a; 2016b).

Además de la morfometría, el estudio de la morfología de las células espermáticas es importante durante la evaluación de la calidad del semen (Araya-Zúñiga et al., 2024; Palacios et al., 2012; Tanga et al., 2021), ya que esta podría tener un impacto sobre las tasas de gestación y el desarrollo del embrión (Moretti et al., 2022; Zhou et al., 2021). En la mayoría de las especies se observa una variabilidad intra e interindividual en los análisis seminales, lo que se incrementa al realizar estas evaluaciones de forma subjetiva. Los sistemas CASA han permitido reducir esta variabilidad subjetiva de las

evaluaciones seminales de diversas especies, incluyendo a los camélidos (Cucho et al., 2019; 2021a; 2021b; Flores Huarco et al., 2021; Meza et al., 2018; Soler et al., 2014a; 2014b). El objetivo del presente trabajo fue revisar el estado del arte sobre la evaluación espermática mediante la tecnología CASA-Morph en camélidos sudamericanos.

Morfología del espermatozoide de alpaca, llama y vicuña

Cuando el espermatozoide ha transitado normalmente por el epidídimo, se completa su proceso de maduración y se puede eyacular como una célula elongada, que, a su vez, está conformada por la cabeza, la pieza intermedia y el flagelo; este último se divide en pieza media, central y final (Nixon et al., 2020; Weigel Muñoz et al., 2024). La morfología se refiere a la evaluación de la forma de la cabeza, la pieza intermedia y la cola del espermatozoide. En la mayoría de las especies heteromórficas existe una considerable diversidad morfológica (Gu et al., 2019). El análisis de la morfología espermática constituye una prueba de control, que permite inferir de manera indirecta el estado funcional de los testículos, epidídimo y glándulas genitales accesorias de los reproductores (Tanga et al., 2021; Yániz et al., 2015).

El análisis de la morfología de las células espermáticas también incluye la evaluación de anomalías, con el propósito de ofrecer un criterio más sólido para descartar animales como posibles reproductores (Valverde Abarca y Madrigal Valverde, 2018). Sin embargo, se ha reportado que estas anomalías pueden estar influenciadas tanto por factores genéticos hereditarios como por el ambiente (Chemes, 2018; Donkin y Barrès, 2018; Gu et al., 2019). En los sistemas CASA, la morfología de las células espermáticas se evalúa de manera precisa, lo que permite identificar algunos problemas como gotas citoplasmáticas y anomalías en la pieza media, lo cual resulta especialmente relevante en la evaluación del semen de machos con alta demanda comercial (Amann y Waberski, 2014).

La evaluación de la morfología espermática en alpacas, llamas y vicuñas se realiza habitualmente mediante el uso de tinciones, como el Hemacolor®, y se observan las células espermáticas mediante microscopio de campo claro con objetivo 100x utilizando aceite de inmersión (100x) (Morrell y Abraham, 2020). La identificación de las diferentes formas de la cabeza es realizada por el mismo técnico, para evitar introducir sesgos o fuentes de variación en la evaluación (Cucho et al., 2021a; Meza et al., 2018). En camélidos sudamericanos se han descrito cinco tipos de forma de la cabeza del espermatozoide: normal, piriforme, larga, corta, y redondeada (Figura 1) y se han reportado diferencias en la distribución porcentual en el eyaculado (García-Díaz et al., 2022). Se destaca que, en los espermatozoides de alpaca y vicuña, la forma de cabeza predominante fue la normal, mientras que en el caso de llama fue la cabeza de forma larga (Tabla 1).

Figura 1. Representación de cada forma de cabeza del espermatozoide de alpaca. ↑

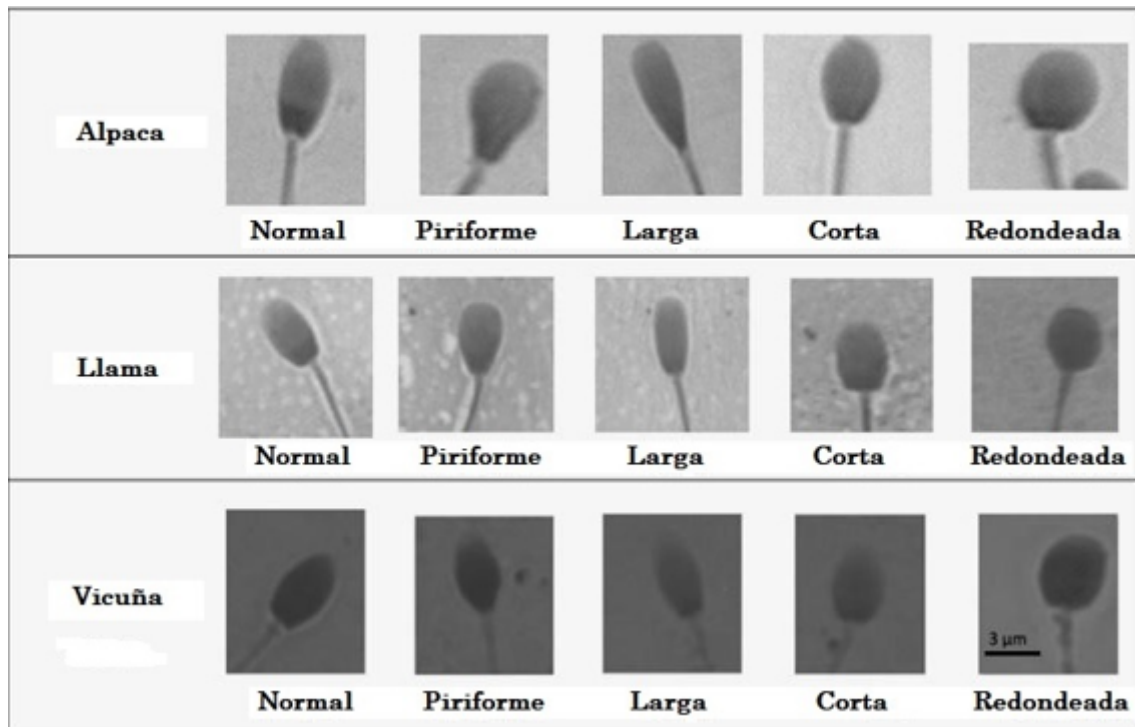


Tabla 1. Distribución porcentual de la forma de la cabeza del espermatozoide en camélidos sudamericanos.



	Forma (%)					
	Normal	Piriforme	Corta	Redondeada	Larga	Referencia
Vicuña	55,78 ^a	4,28 ^b	9,20 ^b	16,32 ^b	14,42 ^b	(Cucho et al., 2021)
Llama	14,15 ^b	1,42 ^c	29,24 ^a	7,21 ^b	47,98 ^a	(Gallegos, 2019)
Alpaca	74,91 ^a	10,39 ^b	2,73 ^c	0,70 ^c	11,27 ^b	(Cucho et al., 2019)

^{a-b}. Superíndices distintos dentro de fila indican diferencias significativas entre formas de la cabeza del espermatozoide en cada especie ($P < 0,05$).

En estudios realizados en llama, con semen obtenido mediante electro eyaculación, se observaron diferencias en la distribución porcentual de las formas de cabeza (Gallegos Ibarra, 2019; Soler et al., 2014a). En estos análisis, las células de cabeza con forma larga fueron las más frecuentes. Estos hallazgos contrastan considerablemente con los reportados por Cucho et al. (2019) en alpacas, en los que los espermatozoides de cabeza de forma normal representaron el 75% del total. Además, en llamas, los espermatozoides con cabeza piriforme presentaron el menor porcentaje, en contraste con los hallazgos de Cucho et al. (2019) en alpacas, quien observó una mayor proporción de esta forma. Con respecto a la vicuña, se han reportado diferencias en la distribución porcentual de la forma de la cabeza, siendo la más recurrente la forma normal (Cucho et al., 2021b) esto es similar a lo reportado en alpaca (Cucho et al., 2019). La cabeza piriforme es la menos frecuente en vicuña, lo que coincide con lo reportado por Gallegos Ibarra (2019) en llamas.

Morfometría del espermatozoide de alpaca, llama y vicuña

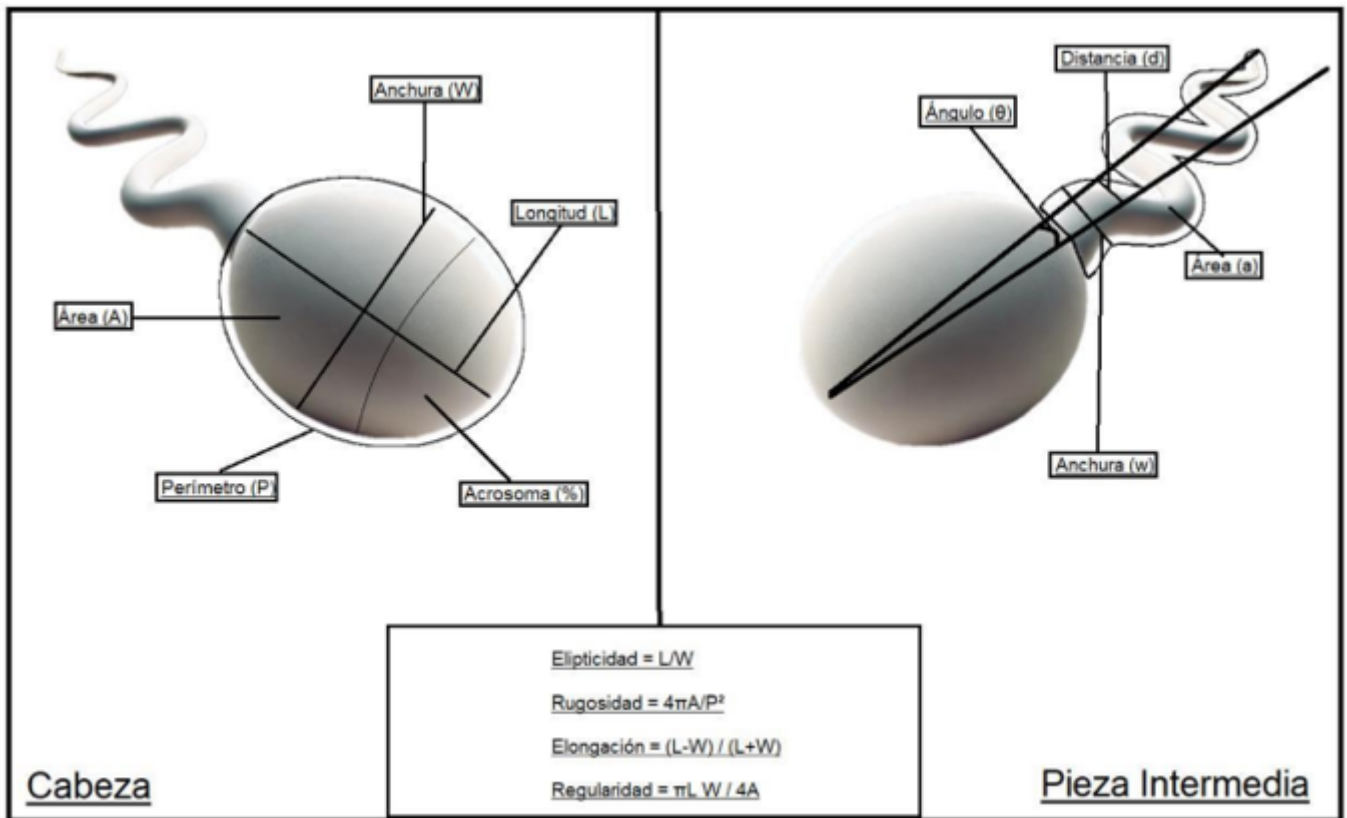
El proceso de maduración espermática se caracteriza por modificaciones estructurales en el gameto masculino, que se inician durante el tránsito de los espermatozoides a través del conducto epididimario (Wysokińska et al., 2021). La evaluación de la morfometría de un espermatozoide permite detectar alteraciones en la espermiogénesis y en la maduración epididimaria (Hidalgo et al., 2006; Yániz et al., 2016a), lo que podría favorecer una selección eficiente de los reproductores. La evaluación de parámetros morfométricos de los espermatozoides representa un posible indicador de su capacidad fecundante (Wysokińska et al., 2021). Diversas investigaciones sobre la morfometría espermática en diferentes especies de mamíferos (Hidalgo et al., 2008; Saravia et al., 2007) han evidenciado una correlación entre las dimensiones espermáticas y los niveles de fertilidad (Brito et al., 2011).

Para evaluar la morfometría de un espermatozoide es necesario fijarlo y teñirlo, para distinguir sus diferentes componentes: cabeza, pieza intermedia, cola y acrosoma (Banaszewska et al., 2015; Yániz et al., 2015; 2016a). Respecto a las tinciones, se pueden usar hematoxilina de Harris, Diff-Quik® y Hemacolor®. Los componentes del sistema de análisis morfométrico CASA-Morph consisten en un objetivo con magnificación de 100x con aceite de inmersión y la cámara de video digital. En los espermatozoides de camélidos se podría emplear una cámara de video digital montada en un tubo de proyección de la cámara en un microscopio trinocular. Esta cámara será utilizada para la captura de imágenes monocromáticas de 8 bits, logrando, de esta manera, un rango dinámico de 256 tonalidades de gris. La resolución espacial de las imágenes se podría configurar a 0,084 µm/píxel en ambos ejes del plano cartesiano.

Los diferentes métodos utilizados para evaluar la morfometría del espermatozoide pueden influir en la variabilidad de los resultados morfométricos (Waheed et al., 2015). Algunos trabajos han demostrado que los métodos de tinción, la temperatura durante la fijación, e incluso el sistema CASA (Rijsselaere et al., 2004) pueden introducir variabilidad en las mediciones realizadas, lo que podría influir significativamente sobre las dimensiones espermáticas (Czubaszek et al., 2019; Wysokińska y Kondracki, 2019). Las tinciones permiten la identificación de las diferentes áreas de las células espermáticas (Maroto-Morales et al., 2016) y han sido empleadas en alpacas, llamas y vicuñas (Cucho et al., 2019; Ordóñez et al., 2012).

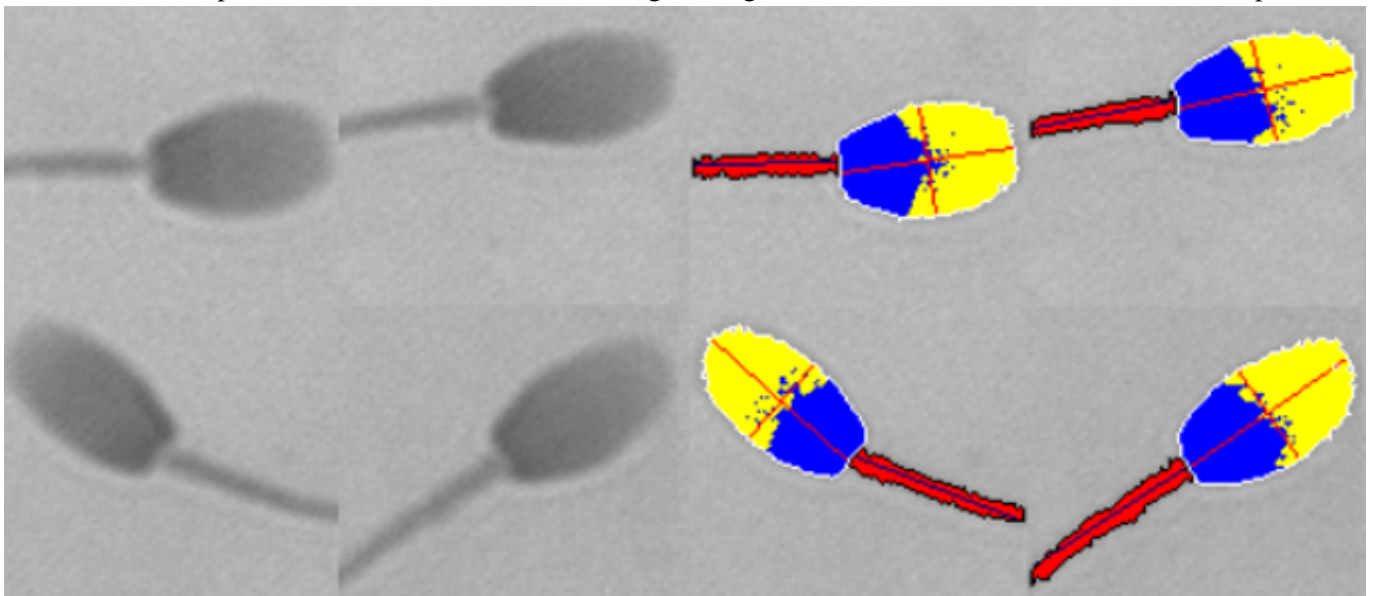
Los protocolos de evaluación de la morfometría espermática en camélidos sudamericanos indican que se deben contabilizar, al menos, 200 espermatozoides por cada muestra analizada. Las variables de tamaño de la cabeza del espermatozoide que se cuantifican son: anchura (W; µm), longitud (L; µm), perímetro (P; µm), área (A, µm²) y los parámetros de forma son: elipticidad, rugosidad, elongación y regularidad, que son adimensionales. Los variables de la pieza intermedia del espermatozoide que se estiman son: distancia (d; µm), anchura (w; µm), área (a; µm²) y ángulo de inserción (θ; °) (Cucho et al., 2021a; Meza et al., 2018) (Figura 2).

Figura 2. Parámetros morfométricos de la cabeza y pieza intermedia del espermatozoide de camélidos sudamericanos. ↑



El sistema CASA-Morph captura las imágenes de cada espermatozoide de acuerdo con los criterios establecidos para cada especie. La imagen capturada es asociada a una “máscara” o imagen digitalizada que delimita la cabeza y la pieza intermedia. La imagen digitalizada presenta las líneas de medición de las variables de tamaño de la cabeza para que sea evaluada por el profesional a cargo y se pueda determinar que no haya inconsistencias en la máscara que se asocien a partículas de contaminación en el eyaculado (Soler et al., 2016a) (Figura 3).

Figura 3. Espermatozoides de alpaca teñidos con Hemacolor®. A la izquierda se presentan las imágenes capturadas con el microscopio. A la derecha se observan las imágenes digitalizadas mediante un sistema CASA-Morph®. ↑



En camélidos sudamericanos se han realizado diversos estudios sobre la morfometría del espermatozoide, particularmente en cuanto al tamaño y la forma de la cabeza. Las primeras investigaciones reportaron estos parámetros utilizando técnicas de tinción específicas, como Hemacolor® (Buendía et al., 2002). Posteriormente, algunos estudios comparativos han evaluado el desempeño de diferentes métodos de tinción, entre ellos la hematoxilina de Harris, el Diff-Quik® y Hemacolor®. Los resultados sugieren que la tinción Hemacolor® presenta una mayor precisión y claridad para la evaluación morfométrica, en comparación con otros métodos (Cucho et al., 2019).

Además de la tinción, la criopreservación ha sido evaluada en diversas especies de camélidos sudamericanos para determinar su efecto en las dimensiones morfométricas del espermatozoide (Santiago-Moreno et al., 2023). Se ha observado una reducción significativa en parámetros como el área y el perímetro de la cabeza en espermatozoides criopreservados, en comparación con semen fresco bajo diferentes métodos de análisis (Huanca-Marca et al., 2020; Zampini et al., 2020). Estos hallazgos han sido consistentes con estudios realizados en especies domésticas y de interés zootécnico, lo que sugiere que los procesos de congelación y descongelación impactan de manera adversa en la estructura espermática (Ciprian Archicana, 2019; Pomeroy et al., 2022; Sieme y Oldenhof, 2015). Estos resultados resaltan la importancia de seleccionar un método de tinción adecuado y de considerar los efectos de la criopreservación para lograr una evaluación morfométrica de los espermatozoides que sea precisa y reproducible en estudios reproductivos.

Algunos trabajos han realizado un análisis detallado de las variables morfométricas de la cabeza y la pieza intermedia de los espermatozoides de llama, en muestras obtenidas mediante electroeyaculación. Este estudio encontró un efecto significativo del individuo en las medidas de la cabeza del espermatozoide, particularmente en variables como longitud, ancho y área. Las mayores variaciones se observaron en las características morfométricas de la pieza intermedia, destacándose variables como la distancia, el ángulo de inserción y el área, con coeficientes de variación de 78,0%, 82,1% y 29,1%, respectivamente (Cucho et al., 2021a). También, un estudio en el que se utilizó Hemacolor® como método de tinción para la evaluación morfológica realizó una evaluación detallada de la morfometría espermática en vicuña, y demostró diferencias entre individuos en variables relacionadas con la cabeza del espermatozoide (Cucho et al., 2021b). En contraste con lo observado en la llama, las características morfométricas asociadas a la pieza intermedia y la regularidad no mostraron diferencias significativas y fueron más consistentes entre animales.

La información disponible sobre la morfometría de los espermatozoides de vicuña indica diferencias significativas respecto a las alpacas y llamas (Tabla 2). Algunos autores indican que estas diferencias también estarían asociadas a mecanismos de aislamiento gamético, lo que en términos biológicos se puede interpretar como una contribución a la diferenciación reproductiva entre estas especies (Soler et al., 2014b).

Tabla 2. Variables morfométricas de la cabeza y pieza intermedia (medias±desviación estándar) del espermatozoide de alpaca (*Vicugna pacos*), llama (*Lama glama*) y vicuña (*Vicugna vicugna*). ↑

Variable	Alpaca ^α	Llama ^β	Vicuña ^γ
Longitud cabeza (μm)	5,80±0,51	5,23±0,48	5,01±0,46
Anchura cabeza (μm)	3,16±0,31	3,10±0,30	3,15±0,28
Área cabeza (μm ²)	15,03±2,03	13,55±1,87	13,00±1,66
Perímetro cabeza (μm)	17,04±1,75	16,61±1,69	15,94±1,70
Elipticidad	1,85±0,22	1,70±0,20	1,60±0,18
Rugosidad	0,66±0,09	0,62±0,05	0,65±0,09
Elongación	0,29±0,05	0,26±0,03	0,23±0,05
Regularidad	0,96±0,05	0,94±0,04	0,95±0,05
Anchura PI (μm)	1,37±0,44	1,39±0,40	1,25±0,48
Área PI (μm ²)	3,71±0,94	2,89±0,87	2,75±0,74
Distancia inserción PI (μm)	0,22±0,16	0,23±0,15	0,27±0,19
Ángulo inserción PI (°)	15,28±14,16	10,72±9,83	11,61±9,91

(Ciprian Archicana, 2019) ^β (Cucho et al., 2021a) ^γ (Cucho et al., 2021b)

Subpoblaciones espermáticas

La identificación de subpoblaciones en una muestra de semen se realiza principalmente a través del análisis de variables cuantitativas obtenidas mediante los sistemas CASA y el uso de análisis multivariantes (Buchelly Imbachí et al., 2022; Yániz et al., 2016b). Los análisis de la varianza no proporcionan información suficiente para comprender el comportamiento de las subpoblaciones de espermatozoides dentro de un eyaculado (García-Molina et al., 2020; Valverde et al., 2016). Por esta razón, el análisis multivariante de datos, obtenido a partir de los sistemas CASA, permite una explicación más precisa del comportamiento de las subpoblaciones, mediante el análisis de componentes principales (Valverde et al., 2019). Esto facilita la creación de modelos más sencillos que mejoran la comprensión del comportamiento de las variables en estudio (Soler y Cooper, 2016c).

En las evaluaciones de la morfología espermática se considera a la muestra como una población homogénea, con una distribución normal, lo cual puede llevar a errores de interpretación, toda vez que existen subpoblaciones espermáticas en el eyaculado (Gacem et al., 2021; Martínez-Pastor et al., 2011). La caracterización de estas subpoblaciones en función de la morfometría espermática se puede determinar a partir del análisis multivariado de las variables de tamaño y forma de la cabeza del espermatozoide (Hirai et al., 2001). En diversos trabajos en especies ganaderas, como bovinos y ovinos, se han descrito subpoblaciones espermáticas en función de la morfometría (Martí et al., 2011; Rubio-Guillén et al., 2007; Valverde et al., 2016), así como en especies silvestres, tales como ciervos rojos y pumas (Cucho et al., 2016; Estes et al., 2009).

En camélidos sudamericanos, algunos trabajos han determinado las subpoblaciones espermáticas en función de su

morfometría. Las subpoblaciones espermáticas, descritas por algunos autores en llama como resultado del análisis morfométrico, se pueden caracterizar como: (1) células pequeñas con baja elongación y elipticidad, (2) espermatozoides de tamaño intermedio en longitud y anchura de la cabeza, (3) células alargadas con valores bajos de anchura de la cabeza y pieza intermedia y (4) espermatozoides con una anchura de la pieza intermedia alta. Estas diferencias en la distribución de las subpoblaciones espermáticas, tanto entre eyaculados de un mismo individuo como entre individuos distintos, refuerza la idea de la heterogeneidad del eyaculado y su condicionamiento por factores individuales, genéticos o ambientales (Cucho et al., 2021a).

En vicuña, los trabajos realizados en subpoblaciones espermáticas muestran una amplia diversidad en la morfometría, lo que podría reflejar variabilidad biológica propia de la especie (Cucho et al., 2021b). Al comparar entre especies de camélidos, se observó que el comportamiento de las subpoblaciones espermáticas en función de su morfometría fue diferente. Esto podría estar asociado con la manera en que las células se agrupan en subpoblaciones bien definidas de acuerdo con sus características cinéticas y/o morfométricas. Además, se ha evidenciado que la distribución subpoblacional varía entre individuos, lo que sugiere la existencia de distintas estrategias de competencia entre eyaculados en los mamíferos (Firman et al., 2011; Gomendio y Roldán, 1991; Humphries et al., 2008). Estos resultados podrían indicar que, probablemente, las estrategias de agrupación que emplean los espermatozoides de llamas y vicuñas sean diferentes. Es necesario continuar con el estudio de la naturaleza heterogénea del eyaculado en camélidos sudamericanos para mejorar nuestra comprensión actual sobre la estructura de la distribución espermática funcional del eyaculado y su posible relación con la calidad seminal y el potencial reproductivo.

Conclusiones

La tecnología CASA optimiza el estudio de la biología reproductiva y la calidad seminal en camélidos sudamericanos. El análisis CASA-Morph permite una evaluación objetiva y precisa de la morfometría espermática en estas especies y mejora la fiabilidad de los resultados. El análisis de la heterogeneidad del eyaculado a través del análisis de subpoblaciones espermáticas proporciona información sobre las diferencias intra e interindividuales para la selección de reproductores y la conservación genética. La estandarización de protocolos de tinción y procesamiento es esencial para minimizar la variabilidad y garantizar la comparabilidad de datos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) del Instituto Tecnológico de Costa Rica. F.S.B. y J.I.A.Z., agradecen a la Dirección de Posgrados del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Financiación

Esta investigación fue financiada por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica y la Oficina de Posgrado. Este trabajo formó parte del proyecto de investigación VIE-2151083, "Optimización de la conservación y búsqueda de parámetros de la fertilidad en espermatozoides de animales de interés productivo"

Declaración de autoría

Conceptualización, A.V.A, H.C.C.D; metodología, A.V.A, H.C.C.D, F.S.B; investigación, A.V.A, H.C.C.D, F.S.B;

escritura: preparación del borrador, H.C.C.D, A.V.A, F.S.B; escritura- revisión y edición, A.V.A, H.C.C.D, F.S, B, J.I. A-Z., R.M-M.; visualización, A.V.A, H.C.C.D, F.S.B, J.I.A-Z.; supervisión, A.V., H.C.C.D; administración del proyecto, A.V.A, H.C.C.D, Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Referencias

- Amann, R. P. y Katz, D. F. (2004). Andrology Lab Corner*: reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*, 25(3), 317-325. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02793.x> ↑ ↑
- Amann, R. P. y Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81(1), e3. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.004> ↑ ↑
- Araya-Zúñiga, I., Sevilla, F., Molina-Montero, R., Roldán, E. R. S., Barrientos-Morales, M., Silvestre, M. A. y Valverde, A. (2024). Kinematic and morphometric assessment of fresh semen, before, during and after mating period in Brahman bulls. *Animals*, 14(1), 132. <https://doi.org/10.3390/ani14010132> ↑ ↑
- Banaszewska, D., Andraszek, K., Czubaszek, M. y Biesiada-Drzazga, B. (2015). The effect of selected staining techniques on bull sperm morphometry. *Animal Reproduction Science*, 159, 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.06.019> ↑ ↑
- Barquero, V., Roldán, E. R. S., Soler, C., Yániz, J. L., Camacho, M. y Valverde, A. (2021). Predictive capacity of boar sperm morphometry and morphometric sub-populations on reproductive success after artificial insemination. *Animals*, 11(4), 920. <https://doi.org/10.3390/ani11040920> ↑ ↑
- Barquero, V., Soler, C., Sevilla, F., Calderón-Calderón, J. y Valverde, A. (2021). A Bayesian analysis of boar spermatozoa kinematics and head morphometrics and their relationship with litter size fertility variables. *Reproduction in Domestic Animals*, 56(7), 1024-1033. <https://doi.org/10.1111/rda.13946> ↑ ↑
- Brito, L. F. C., Greene, L. M., Kelleman, A., Knobbe, M. y Turner, R. (2011). Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. *Theriogenology*, 76(4), 745-750. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.04.007> ↑ ↑
- Buchelly Imbachí, F., Zalazar, L., Pastore, J. I., Nicolli, A., Ledesma, A., Hozbor, F. A., Cesari, A. y Ballarin, V. (2022). Clustering and classification software for sperm subpopulation analysis. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering: Imaging & Visualization*, 10(6), 585-598. <https://doi.org/10.1080/21681163.2021.2012831> ↑ ↑
- Buendía, P., Soler, C., Paolicchi, F., Gago, G., Urqujeta, B., Pérez-Sánchez, F. y Bustos-Obregón, E. (2002). Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm-Class Analyzer® computer-assisted system. *Theriogenology*, 57(4), 1207-1218. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00724-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00724-5) ↑ ↑
- Chemes, H. E. (2018). Phenotypic varieties of sperm pathology: genetic abnormalities or environmental influences can result in different patterns of abnormal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 194, 41-56. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.04.074> ↑ ↑
- Ciprian Archicana, R. (2019). *Uso de la dimetilformamida en la criopreservación de semen de alpaca (Vicugna pacos)* [Tesis de grado, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco]. <https://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/20.500.12918/4083> ↑ ↑
- Cucho, H., Alarcón, V., Ordóñez, C., Ampuero, E., Meza, A. y Soler, C. (2016). Puma (Puma concolor) epididymal sperm morphometry. *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 879-881. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.187584> ↑ ↑
- Cucho, H., Gallegos, M., Ccoiso, R., Meza, A., Ampuero, E., Ordóñez, C. y Valverde, A. (2021). Morfometría y subpoblaciones de espermatozoides de llama (Lama glama) usando el sistema ISAS® CASA-Morph. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(1), e19506. <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i1.19506> ↑ ↑

Cucho, H., López, Y., Caldeira, C., Valverde, A., Ordóñez, C. y Soler, C. (2019). Comparison of three different staining methods for the morphometric characterization of alpaca (*Vicugna pacos*) sperm, using ISAS® CASA-Morph system. *Nova Biologica Reperta*, 6(3), 284-291. <https://doi.org/10.29252/nbr.6.3.284> ↑ ↑

Cucho, H., Puellas, O., Meza, A., Urquiza, D., Coila, L. y Valverde, A. (2021). Morphometric characterization and classification of vicuña sperm (*Vicugna vicugna*) using ISAS® CASA-Morph system. *Spernova*, 11(2), 115-123. <https://doi.org/10.18548/aspe/0009.16> ↑ ↑

Czubaszek, M., Andraszek, K., Banaszewska, D. y Walczak-Jędrzejowska, R. (2019). The effect of the staining technique on morphological and morphometric parameters of boar sperm. *PLoS ONE*, 14(3), e0214243. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214243> ↑ ↑

Donkin, I. y Barrès, R. (2018). Sperm epigenetics and influence of environmental factors. *Molecular Metabolism*, 14, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.02.006> ↑ ↑

Esteso, M. C., Fernández-Santos, M. R., Soler, A. J., Montoro, V., Martínez-Pastor, F. y Garde, J. J. (2009). Identification of sperm-head morphometric subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm samples. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(2), 206-211. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.01029.x> ↑ ↑

Firman, R. C., Cheam, L. Y. y Simmons, L. W. (2011). Sperm competition does not influence sperm hook morphology in selection lines of house mice. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(4), 856-862. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2010.02219.x> ↑ ↑

Flores Huarco, N. H., Giuliano, S. M., Fumuso, F. G., Miragaya, M. H., Cucho Dolmos, H. C. y Carretero, M. I. (2021). Use of dimethylformamide to cryopreserve alpaca semen previously incubated with collagenase. *Reproduction in Domestic Animals*, 56(11), 1387-1397. <https://doi.org/10.1111/rda.14003> ↑ ↑

Gacem, S., Valverde, A., Catalán, J., Yáñez Ortiz, I., Soler, C. y Miró, J. (2021). A new approach of sperm motility subpopulation structure in donkey and horse. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 651477. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.651477> ↑ ↑

Gallagher, M. T., Smith, D. J. y Kirkman-Brown, J. C. (2018). CASA: tracking the past and plotting the future. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6), 867-874. <https://doi.org/10.1071/RD17420> ↑ ↑

Gallegos Ibarra, M. L. (2019). *Determinación de las características macroscópicas, microscópicas y subpoblaciones espermáticas del semen de llama (Lama glama) colectado por electroeyaculación y vagina artificial* [Tesis de grado, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco]. <http://hdl.handle.net/20.500.12918/4257> ↑ ↑

García-Díaz, J. R., Chicaiza Sánchez, L. A., Garzón Jarrin, R. A. y Masabanda-Soria, E. B. (2022). Influence of two electroejaculation voltages on the seminal quality of alpacas (*Vicugna pacos*). *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 9(1), 15-22. <https://doi.org/10.36610/j.jsaas.2022.090100015x> ↑ ↑

García-Molina, A., Navarro, N., Valverde, A., Bompert, D., Caldeira, C., Vendrell, A. y Soler, C. (2022). Human kinematic and morphometric sperm subpopulation analysis using CASA technology: A new approach to spermatozoa classification. *Revista Internacional de Andrología*, 20(4), 257-265. <https://doi.org/10.1016/j.androl.2021.05.003> ↑ ↑

García-Molina, A., Navarro, N., Valverde, A., Sadeghi, S., Garrido, N. y Soler, C. (2023). Optimization of human semen analysis using CASA-Mot technology. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 69(2), 166-174. <https://doi.org/10.1080/19396368.2023.2170297> ↑ ↑

- García-Molina, A., Valverde, A., Bompart, D., Caldeira, C., Vendrell, A. y Soler, C. (2020). Updating semen analysis: a subpopulation approach. *Asian Journal of Andrology*, 22(1), 118-119. https://doi.org/10.4103/aja.aja_33_19 ↑ ↑
- Gomendio, M. y Roldán, E. R. S. (1991). Sperm competition influences sperm size in mammals. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 243(1308), 181-185. <https://doi.org/10.1098/rspb.1991.0029> ↑ ↑
- Gravance, G. G., Vishwanath, R., Pitt, C. y Casey, P. J. (1996). Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. *Theriogenology*, 46(7), 1205-1215. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(96\)00291-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(96)00291-9) ↑ ↑
- Gu, N. H., Zhao, W. L., Wang, G. S. y Sun, F. (2019). Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17, 66. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0510-y> ↑ ↑
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J. y Soler, C. (2008). Morphometric classification of Spanish thoroughbred stallion sperm heads. *Animal Reproduction Science*, 103(3-4), 374-378. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.06.001> ↑ ↑
- Hidalgo, M., Rodríguez, I. y Dorado, J. (2006). Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology*, 66(4), 996-1003. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.02.039> ↑ ↑
- Hirai, M., Boersma, A., Hoeflich, A., Wolf, E., Föll, J., Aumüller, R. y Braun, J. (2001). Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): Relation to fertility and seminal plasma growth factors. *Journal of Andrology*, 22(1), 104-110. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02159.x> ↑ ↑
- Huanca-Marca, N. F., Ordóñez-Rodríguez, C. D., Quispe-Ccasa, H. A., Antezana-Julián, W. O., Jordán-Misme, L. A., Ampuero-Casquino, E. y Cucho-Dolmos, H. C. (2020). Morphometric parameters of alpaca spermatozoa (*Vicugna pacos*), obtained by three collection methods. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 7(2), 50-62. <https://doi.org/10.36610/j.jsaas.2020.070200050x> ↑ ↑
- Humphries, S., Evans, J. P. y Simmons, L. W. (2008). Sperm competition: linking form to function. *BMC Evolutionary Biology*, 8, 319. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-319> ↑ ↑
- Liu, Y. T. y Warme, P. K. (1977). Computerized evaluation of sperm cell motility. *Computers and Biomedical Research*, 10(2), 127-138. [https://doi.org/10.1016/0010-4809\(77\)90030-1](https://doi.org/10.1016/0010-4809(77)90030-1) ↑ ↑
- Maroto-Morales, A., García-Álvarez, O., Ramón, M., Martínez-Pastor, F., Fernández-Santos, M. R., Soler, A. J. y Garde, J. J. (2016). Current status and potential of morphometric sperm analysis. *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 863-870. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.187581> ↑ ↑
- Martí, J. I., Aparicio, I. M. y García-Herreros, M. (2011). Sperm morphometric subpopulations are differentially distributed in rams with different maturity age in cryopreserved ejaculates. *Theriogenology*, 76(1), 97-109. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.01.022> ↑ ↑
- Martínez-Pastor, F., Tizado, E. J., Garde, J. J., Anel, L. y de Paz, P. (2011). Statistical series: opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology*, 75(5), 783-795. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.034> ↑ ↑
- Meza, A., Caldeira, C., Valverde, A., Ordóñez, C., Ampuero, E., Cucho, H. y Soler, C. (2018). Sperm kinematic characterization of alpaca (*Vicugna pacos* L.) during the reproductive season. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(6), 1415-1423. <https://doi.org/10.1111/rda.13284> ↑ ↑

- Moretti, E., Signorini, C., Noto, D., Corsaro, R. y Collodel, G. (2022). The relevance of sperm morphology in male infertility. *Frontiers in Reproductive Health*, 4, 945351. <https://doi.org/10.3389/frph.2022.945351> ↑ ↑
- Morrell, J. M. y Abraham, M. C. (2020). Semen handling in South American camelids: state of the art. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 586858. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.586858> ↑ ↑
- Mortimer, S. T. (2000). CASA- Practical aspects. *Journal of Andrology*, 21(4), 515-524. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb02116.x> ↑ ↑
- Mortimer, S. T. y De Jonge, C. J. (2018). CASA—Computer-aided sperm analysis. En M. K. Skinner (Ed.), *Encyclopedia of reproduction* (2.^a ed., pp. 59-63). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64935-8> ↑ ↑
- Mortimer, S., van der Horst, G. y Mortimer, D. (2015). The future of computer-aided sperm analysis. *Asian Journal of Andrology*, 17(4), 545-553. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.154312> ↑ ↑
- Nixon, B., Cafe, S. L., Eamens, A. L., De Iuliis, G. N., Bromfield, E. G., Martin, J. H., Skerrett-Byrne, D. A. y Dun, M. D. (2020). Molecular insights into the divergence and diversity of post-testicular maturation strategies. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 517, 110955. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110955> ↑ ↑
- Ordóñez, C., Ampuero, E., Cucho, H. y Franco, E. (2012). Progress in the determination of alpaca sperm velocity in diluted semen using the integrated sperm analysis system (ISAS). *Spermova*, 2(1), 63-64. ↑ ↑
- Palacios, E. R., Clavero, A., Gonzalvo, M. C., Rosales, A., Mozas, J., Martínez, L., Ramírez, J. P., Bjorndahl, L., Morancho-Zaragoza, J., Fernández-Pardo, E. y Castilla, J. A. (2012). Acceptable variability in external quality assessment programmes for basic semen analysis. *Human Reproduction*, 27(2), 314-322. <https://doi.org/10.1093/humrep/der413> ↑ ↑
- Pomeroy, K. O., Comizzoli, P., Rushing, J. S., Lersten, I. L. y Nel-Themaat, L. (2022). The ART of cryopreservation and its changing landscape. *Fertility and Sterility*, 117(3), 469-476. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.01.018> ↑ ↑
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Hoflack, G., Maes, D. y de Kruif, A. (2004). Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser. *Theriogenology*, 62(7), 1292-1306. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.005> ↑ ↑
- Rubio-Guillén, J., González, D., Garde, J. J., Estes, M. C., Fernández-Santos, M. R., Rodríguez-Gíl, J. E., Madrid-Bury, N. y Quintero-Moreno, A. (2007). Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(4), 354-357. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00788.x> ↑ ↑
- Sadeghi, S., García-Molina, A., Celma, F., Valverde, A., Fereidounfar, S. y Soler, C. (2016). Morphometric comparison by the ISAS ® CASA-DNAf system of two techniques for the evaluation of DNA fragmentation in human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 835-839. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.186875> ↑ ↑
- Santiago-Moreno, J., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Velázquez, R., Bóveda, P., O'Brien, E., Peris-Frau, P., Pequeño, B., Martínez-Madrid, B. y Estes, M. C. (2023). Review: Sperm cryopreservation in wild small ruminants: Morphometric, endocrine and molecular basis of cryoresistance. *Animal*, 17(1), 100741. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100741> ↑
- Saravia, F., Núñez-Martínez, I., Morán, J. M., Soler, C., Muriel, A., Rodríguez-Martínez, H. y Peña, F. J. (2007). Differences in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity. *Theriogenology*, 68(2), 196-203. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.052> ↑ ↑

- Sieme, H. y Oldenhof, H. (2015). Cryopreservation of semen from domestic livestock. En W. F. Wolkers y H. Oldenhof (Eds.), *Cryopreservation and freeze-drying protocols* (Vol. 1257, pp. 277-287). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5_10 ↑ ↑
- Soler, C., Contell, J., Bori, L., Sancho, M., García-Molina, A., Valverde, A. y Segarvall, J. (2017). Sperm kinematic, head morphometric and kinetic-morphometric subpopulations in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Asian Journal of Andrology*, 19(2), 154-159. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.188445> ↑ ↑
- Soler, C., Cooper, T. G., Valverde, A. y Yániz, J. L. (2016). Afterword to sperm morphometrics today and tomorrow special issue in Asian Journal of Andrology. *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 895-897. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.188451> ↑ ↑
- Soler, C., Gadea, B., Soler, A. J., Fernández-Santos, M. R., Estes, M. C., Núñez, J., Moreira, P. N., Núñez, M., Gutiérrez, R., Sancho, M. y Garde, J. J. (2005). Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red deer sperm morphometry by computerized analysis with ISAS®. *Theriogenology*, 64(5), 1236-1243. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.02.018> ↑ ↑
- Soler, C., García-Molina, A., Sancho, M., Contell, J., Núñez, M. y Cooper, T. G. (2016). A new technique for analysis of human sperm morphology in unstained cells from raw semen. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(4), 428-433. <https://doi.org/10.1071/RD14087> ↑ ↑
- Soler, C., Gaßner, P., Nieschlag, E., de Montserrat, J. J., Gutiérrez, R., Sancho, M., Buendía, P., Álvarez, J. G., Behre, H. M. y Cooper, T. G. (2005). Utilización del Integrated Semen Analysis System (ISAS)® para el análisis morfológico espermático humano y su significado en las técnicas de reproducción asistida. *Revista Internacional de Andrología*, 3(3), 112-119. [https://doi.org/10.1016/S1698-031X\(05\)73257-X](https://doi.org/10.1016/S1698-031X(05)73257-X) ↑ ↑
- Soler, C., Pérez-Sánchez, F., Schulze, H., Bergmann, M., Oberpenning, F., Yeung, C. y Cooper, T. G. (2000). Objective evaluation of the morphology of human epididymal sperm heads. *International Journal of Andrology*, 23(2), 77-84. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.2000.00211.x> ↑ ↑
- Soler, C., Sancho, M., García, A., Fuentes, M., Núñez, J. y Cucho, H. (2014). Ejaculate fractioning effect on llama sperm head morphometry as assessed by the ISAS® CASA system. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(1), 71-78. <https://doi.org/10.1111/rda.12226> ↑ ↑
- Soler, C., Sancho, M., García-Molina, A., Núñez, J., Parráquez, V. H., Contell, J. y Bustos-Obregón, E. (2014). Llama and alpaca comparative sperm head morphometric analysis. *Journal of Camelid Science*, 7, 48-58. ↑ ↑
- Soler, C., Valverde, A., Bompert, D., Fereidounfar, S., Sancho, M., Yániz, J. L., García-Molina, A. y Korneenko-Zhilyaev, Y. A. (2017). New methods of semen analysis by CASA. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*, 52(2), 232-241. <https://doi.org/10.15389/agrobiologia.2017.2.232eng> ↑ ↑
- Soler, C. y Cooper, T. G. (2016). Foreword to sperm morphometrics today and tomorrow special issue in Asian Journal of Andrology. *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 815-818. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.187582> ↑ ↑
- Tanga, B. M., Qamar, A. Y., Raza, S., Bang, S., Fang, X., Yoon, K. y Cho, J. (2021). Semen evaluation: Methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment. A review. *Animal Bioscience*, 34(8), 1253-1270. <https://doi.org/10.5713/ab.21.0072> ↑ ↑
- Valverde Abarca, A. y Madrigal Valverde, M. (2018). Sistemas de análisis computadorizado de semen en la reproducción animal. *Agronomía Mesoamericana*, 29(2), 469-484. <https://doi.org/10.15517/ma.v29i2.30613> ↑ ↑

- Valverde, A., Arenán, H., Sancho, M., Contell, J., Yániz, J., Fernández, A. y Soler, C. (2016). Morphometry and subpopulation structure of Holstein bull spermatozoa: variations in ejaculates and cryopreservation straws. *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 851-857. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.187579> ↑ ↑
- Valverde, A., Barquero, V. y Soler, C. (2020). The application of computer-assisted semen analysis (CASA) technology to optimise semen evaluation. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 29(3), 189-198. <https://doi.org/10.22358/jafs/127691/2020> ↑ ↑
- Valverde, A., Castro-Morales, O. y Madrigal-Valverde, M. (2019). Sperm kinematics and morphometric subpopulations analysis with CASA systems: a review. *Revista de Biología Tropical*, 67(6), 1473-1487. <https://doi.org/10.15517/rbt.v67i6.35151> ↑ ↑
- van der Horst, G., Maree, L. y du Plessis, S. S. (2018). Current perspectives of CASA applications in diverse mammalian spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6), 875-888. <https://doi.org/10.1071/RD17468> ↑ ↑
- Waheed, M. M., Ghoneim, I. M. y Abdou, M. S. S. (2015). Morphometric characteristics of spermatozoa in the Arabian horse with regard to season, age, sperm concentration, and fertility. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(3), 244-249. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.01.005> ↑ ↑
- Weigel Muñoz, M., Cohen, D. J., Da Ros, V. G., González, S. N., Rebagliati Cid, A., Sulzyk, V. y Cuasnicu, P. S. (2024). Physiological and pathological aspects of epididymal sperm maturation. *Molecular Aspects of Medicine*, 100, 101321. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2024.101321> ↑ ↑
- Wysokińska, A., Wójcik, E. y Chłopik, A. (2021). Evaluation of the morphometry of sperm from the epididymides of dogs using different staining methods. *Animals*, 11(1), 227. <https://doi.org/10.3390/ani11010227> ↑ ↑
- Wysokińska, A. y Kondracki, S. (2019). Heterosis for morphometric characteristics of sperm cells from Duroc x Pietrain crossbred boars. *Animal Reproduction Science*, 211, 106217. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106217> ↑ ↑
- Yeung, C. H., Pérez-Sánchez, F., Soler, C., Poser, D., Kliesch, S. y Cooper, T. G. (1997). Maturation of human spermatozoa (from selected epididymides of prostatic carcinoma patients) with respect to their morphology and ability to undergo the acrosome reaction. *Human Reproduction Update*, 3(3), 205-213. <https://doi.org/10.1093/humupd/3.3.205> ↑ ↑
- Yániz, J. L., Capistrós, S., Vicente-Fiel, S., Hidalgo, C. O. y Santolaria, P. (2016). A comparative study of the morphometry of sperm head components in cattle, sheep, and pigs with a computer-assisted fluorescence method. *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 840-843. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.186877> ↑ ↑
- Yániz, J. L., Soler, C. y Santolaria, P. (2015). Computer assisted sperm morphometry in mammals: A review. *Animal Reproduction Science*, 156, 1-12. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2015.03.002> ↑ ↑
- Yániz, J. L., Vicente-Fiel, S., Soler, C., Recreo, P., Carretero, T., Bono, A., Berné, J. M. y Santolaria, P. (2016). Comparison of different statistical approaches to evaluate morphometric sperm subpopulations in men. *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 819-823. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.186872> ↑ ↑
- Zampini, R., Castro-González, X. A., Sari, L. M., Martín, A., Díaz, A. V., Argañaráz, M. E. y Apichela, S. A. (2020). Effect of cooling and freezing on llama (*Lama glama*) sperm ultrastructure. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 587596. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.587596> ↑ ↑
- Zhou, W. J., Huang, C., Jiang, S. H., Ji, X. R., Gong, F., Fan, L. Q. y Zhu, W. B. (2021). Influence of sperm morphology on pregnancy outcome and offspring in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Asian Journal of*

Andrology, 23(4), 421-428. https://doi.org/10.4103/aja.aja_91_20 ↑ ↑