



El análisis seminal en la agricultura de precisión en el siglo XXI^{1,2}

Semen analysis in precision farming in the 21st century

Carles Soler³, Anthony Valverde⁴

- ¹ Recepción: 27 de junio, 2022. Aceptación: 11 de noviembre, 2022. Este trabajo formó parte del curso PIU7300 Historia de las Ciencias Médico Biológicas del Programa de Maestría Interuniversitaria en Bioética. Universidad Nacional – Universidad de Costa Rica, llevado por el segundo autor.
- ² Este trabajo formó parte del proyecto de investigación VIE-2151076 “Evaluación de la fertilidad asociada a la calidad seminal de verracos en granjas porcinas de la Región Huetar Norte”, inscrito en la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) del Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- ³ Universitat de València, Facultat de Biologia, Biologia Funcional i Antropologia Física, Departament de Biologia Cel·lular, C/. Doctor Moliner 50, 46100 Burjassot, España. carles.soler@uv.es (<https://orcid.org/0000-0001-9809-2596>)
- ⁴ Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Escuela de Agronomía, Centro de Investigación y Desarrollo en Agricultura Sostenible del Trópico Húmedo, Laboratorio de Reproducción Animal, Campus Tecnológico Local San Carlos. Apdo. Postal 223-21002 Alajuela, Costa Rica. anvalverde@tec.ac.cr (autor para correspondencia; <https://orcid.org/0000-0002-3191-6965>).

Resumen

Introducción. La reproducción asistida de animales tiene su origen en la domesticación de las especies ganaderas útiles al ser humano. Los consiguientes procesos de selección artificial permitieron desarrollar técnicas biotecnológicas que contribuyeron a la mejora de las capacidades de producción animal. **Objetivo.** Contextualizar el análisis seminal en la agricultura de precisión en el siglo XXI. **Desarrollo.** La visualización de espermatozoides en el microscopio puede considerarse como el primer paso en el advenimiento de la biotecnología de la reproducción y la base para el desarrollo de las técnicas de reproducción asistida. Con el perfeccionamiento de los métodos de microscopía, se logró caracterizar los gametos masculinos, lo que significó un avance significativo en la tecnología de inseminación artificial. El punto de inflexión marcado por el desarrollo de técnicas de conservación espermática, implicó un cambio sustantivo en el desarrollo de estas tecnologías en las especies ganaderas, ya sea con semen crio preservado o refrigerado. Estos métodos son de alto valor en el caso de especies amenazadas, dado que se pueden crear bancos de germoplasma con propósitos de conservación genética y rescate de especies en riesgo de extinción. El análisis seminal se ha desarrollado de forma paralela con las técnicas de reproducción asistida, al punto que hoy se considera como una técnica relevante en la biotecnología de la reproducción animal, que se ha perfeccionado mediante el avance de la ciencia y la tecnología, la física óptica y la computación. **Conclusión.** El análisis seminal ha tenido un cambio de paradigma al desechar técnicas obsoletas de evaluación subjetiva de la calidad seminal y adoptar métodos objetivos de evaluación del semen, mediante el análisis de grandes volúmenes de datos y variables de movilidad, cinéticas, morfométricas, morfológicas y fragmentación del ADN, que permiten caracterizar mejor los eyaculados de los reproductores en centros de inseminación artificial.

Palabras clave: reproducción animal, andrología, espermatozoo, semen.



Abstract

Introduction. Assisted reproduction of animals traces its origins in the domestication of livestock species useful to humans. The consequent artificial selection processes allowed the development of biotechnological techniques that contributed to the improvement of animal production capacities. **Objective.** To contextualize the seminal analysis in precision farming in the 21st century. **Development.** The visualization of spermatozoa under the microscope can be considered as the first step in the advent of reproductive biotechnology and the basis for the development of assisted reproductive techniques. With the improvement of microscopy methods, it was possible to characterize male gametes, which meant a significant advance in artificial insemination technology. The turning point marked by the development of sperm conservation techniques implied a substantive change in the development of these technologies in livestock species, either with cryopreserved or refrigerated semen. These methods are of high value in the case of threatened species since germplasm banks can be created for genetic conservation and rescue of species at risk of extinction. Semen analysis has been developed alongside with assisted reproduction techniques and today it is considered a relevant technique in animal reproduction biotechnology, which has been perfected through the advancement of science and technology, optical physics, and computing. **Conclusion.** Seminal analysis has undergone a paradigm shift by rejecting obsolete techniques of subjective evaluation of semen quality and adopting objective methods of semen evaluation, through the analysis of large volumes of data and motility, kinematics, morphometrics, morphological, and DNA fragmentation variables, which allow a better characterization of the ejaculates of breeders in artificial insemination centers.

Keywords: animal reproduction, andrology, spermatozoa, semen.

Introducción

La especie humana evolucionó la mayor parte de su historia, al conformar pequeños grupos de cazadores-recolectores, forma de agrupación que representó un camino evolutivo exitoso. Todo parece indicar que el proceso de domesticación de especies animales, ya comenzó en ese tiempo, pues se estima que el perro (posiblemente procedente del lobo) ya habitaba en grupos humanos hace más de 30 000 años (Larson & Fuller, 2014).

Se considera que hace 10 000-15 000 años (Frantz et al., 2020), dio comienzo la introducción de técnicas para el cuidado y cría generalizada de algunas especies, lo que ahora se llama ganadería (Scanes, 2018). Los tiempos de coexistencia entre ambas formas de organización como cazadores-recolectores y agricultura sedentaria, debieron ser convulsos (Cherniha & Davydovych, 2019). No se puede entrar aquí en las implicaciones evolutivas que tuvo para la especie humana este proceso, baste indicar que el advenimiento del neolítico y, con él, de la vida sedentaria y del concepto de excedente de producción y la posibilidad de acumular riqueza cambió para siempre a la humanidad, no necesariamente para bien (Harari, 2014).

Entre todas las especies candidatas para su domesticación, el número final escogido fue muy reducido (Teletchea, 2019). Más allá del lugar donde se inició este proceso (los registros arqueológicos siempre serán incompletos), es evidente que ha tenido lugar repetidas veces y en las geografías más diversas (Pedrosa et al., 2005). En principio, las especies candidatas serían grandes herbívoros susceptibles de ser domesticados. Se podría pensar en caballos, toros, cerdos, pero también lo han sido otros de talla media como la oveja o la cabra e incluso pequeña, pero de cría fácil como el conejo o el cuy (Larson & Fuller, 2014). Cabría preguntarse si ¿este hecho es debido solo a la elección *per se* o a las características de las especies en sí? Si se pensara, por ejemplo, en la liebre y el conejo y por qué la primera no ha sido habitualmente domesticada mientras que el segundo sí (Diamond, 2002).

Es un hecho que en la actualidad la biomasa de la especie humana, junto con la de las especies domesticadas, suponen cerca del 96 % de la total correspondientes a los mamíferos en la tierra (Bar-On et al., 2018). Es una hipertrofia que anula seriamente la biodiversidad del planeta, con todas las consecuencias que ello tiene para su acervo genético (Scherf, 2000).

Existen aspectos negativos de la domesticación que son conocidos hace tiempo, como por ejemplo, la reducción de la masa cerebral de los animales de granja en relación con sus homónimos salvajes, como consecuencia de su estabulación y reducción del espacio vital (Rehkämper et al., 2008). De hecho, se ha comprobado, en el caso del visón, que la masa cerebral se reduce sobre el 11 % en aquellos animales mantenidos en jaulas respecto de los salvajes (Kruska, 1993).

En referencia a las aves, su domesticación parece haberse producido mucho después que la referida a los mamíferos. En el caso del gallo doméstico (*Gallus gallus*), hay evidencias del proceso hace unos 4000 años en la zona que ahora correspondería a Pakistán. Diferentes especies de ánades han sido domesticadas, tanto en Europa como el norte de África o en Sudamérica, hace no menos de 2500 años. Por su parte, habrían pasado unos 2000 años desde que se inició el proceso en los casos de la gallina de guinea, en la zona de lo que ahora correspondería a Mali y Sudán, y del Pavo, en Norteamérica (Larson & Fuller, 2014). En todo caso, los registros arqueológicos en aves muestran una mayor diversidad taxonómica que la referida a los mamíferos (Dirrigl et al., 2020).

Lo antedicho aplica a las especies de mamíferos y aves domesticadas, pero qué pasa con los peces y la acuicultura. Se conocen ejemplos de la cría de peces en cautividad desde la antigüedad, no menos de 2000 años en el caso de la carpa común (*Cyprinus carpio*), sin que esté claro si en su origen se trataba de una auténtica cría o del mantenimiento de peces salvajes capturados (Larson & Fuller, 2014). Pero su implantación extensiva en la llamada acuicultura data de pocas décadas atrás (Stickney, 1990). Es de destacar que el número de especies utilizadas en acuicultura supera al de mamíferos en ganadería; ello se debe, además de cuestiones económicas y de aprovechamiento, a que se han planteado soluciones que intentan evitar lo acaecido con los mamíferos. Así se plantea si focalizar la industria en una cantidad limitada de especies, lo que reporta una mayor eficiencia económica, o actuar en la diversificación interespecífica centrada en especies nativas, lo que reporta una mayor eficiencia ecológica (Sicuro, 2021). Esta consideración puede admitir una discusión bioética relevante, sin embargo, parece que la práctica se decanta por lo segundo.

En relación con los insectos, tanto por su uso en el pasado, como su proyección hacia el futuro, dos son las especies ancestrales, la mariposa de la seda (*Bombyx mori*) y las abejas melíferas (*Apis mellifera* y *Apis cerana*). La primera se domesticó en zonas de la actual China hace unos 5500 años (Chen et al., 2019) y la segunda en el antiguo Egipto, donde se estima en unos 7000 años el tiempo de su uso (Wallberg et al., 2014). El objetivo del presente trabajo fue contextualizar el análisis seminal en la agricultura de precisión en el siglo XXI.

Biología de la reproducción: ¿dónde estamos?

Tras procesos de selección artificial basados en la mera observación empírica, se hizo necesario dar un paso adelante. Si bien se puede considerar que la hembra es el “hecho reproductivo” y el macho es el “vector reproductivo”, lo que sumado al factor cantidad, es decir, millones de espermatozoides frente a unidades de ovocitos y a la fácil disponibilidad de un eyaculado frente a la dificultad de aislar los gametos femeninos, lleva a que el trabajo de selección se haya centrado en el macho (Roldan et al., 1992).

La primera descripción de los espermatozoides se debe a Antonie Philips van Leeuwenhoek en 1677 (Van Leeuwenhoek, 1679), quien los identificó como “*animáculos*” presentes en el semen. Sus descripciones resultan admirables, si se tiene en cuenta la calidad de imagen que se podía obtener con su microscopio, con ellas se dio origen al estudio de la función espermática en relación con la fertilidad y sus limitaciones (Puerta-Suárez et al., 2018). Esos estudios sentaron las bases para el desarrollo de la reproducción asistida, la cual comenzó por la

inseminación artificial (IA) a finales del siglo XVIII por John Hunter en humanos (Ombelet & Robays, 2015) y Lazzaro Spallanzani en perros (Sharma et al., 2018). Estos trabajos pioneros fueron continuados por otros científicos, en diversos campos de la reproducción animal como la conservación espermática que se tratará más adelante.

Fue en la segunda década del siglo XX cuando primero Ivanovich Ivanoff hizo progresos sensibles (Ivanoff, 1922), incluida una supuesta hibridación entre hombre y chimpancé, extremo este nunca confirmado. En todo caso, Ivanoff sentó las bases para que Viktor K. Milovanov e I.I. Sokolovskaya, diseñaran el primer esquema de inseminación artificial masiva en granjas de toda Rusia (Milovanov & Sokolovskaya, 1947). Ya solo quedaba mejorar técnicas y protocolos de extensión en diversas especies hasta el advenimiento de la fecundación *in vitro* (FIV) por parte de Patrick Steptoe y Bob Edwards en 1978, que abrió una nueva era en la reproducción asistida, en la especie humana (Edwards et al., 1980). Solo quedaba el paso de introducir el espermatozoide en el ovocito de forma manual, en lugar de esperar a su penetración funcional, lo que aconteció con la llegada de la inyección intracitoplasmática de los espermatozoides (ICSI) en 1992 por parte del grupo de Gianpiero Palermo (Palermo et al., 1992). Las técnicas de FIV e ICSI tienen una presencia menor en la ganadería extensiva y quedan reducidas a grupos de alto valor genético y a la investigación, que incluye la creación de bancos de germoplasma y de embriones.

Las últimas décadas se han centrado, de nuevo, en mejorar las técnicas y en hacerlas tan universales como ha sido posible. Dos han sido los aspectos más significantes respecto a la manipulación de los espermatozoides, su conservación (Bailey et al., 2003) y la selección de aquellos con mayor potencialidad reproductiva.

En lo referente a la conservación espermática, los métodos y las técnicas desarrolladas dependen de las especies, de su manejo y de su interés económico (Barbas & Mascarenhas, 2008). Se pueden distinguir tres grandes grupos de especies, aquellas en las que el valor genético de los machos no resulta significativo y su potencial fértil es elevado (por ejemplo, peces, la mayoría de las aves y conejos), las que tienen un mayor interés económico, y son prolíferas como el porcino, aunque también ovino o caprino, y aquellas en que el valor añadido de la genética es considerable y no siempre la fertilidad de los machos seleccionados es alta (bovino y équidos, principalmente). En los dos primeros grupos se ha utilizado la refrigeración de las muestras para inseminación (Contreras et al., 2014), mientras que en el tercero es habitual el uso de la congelación (Aurich et al., 2020). Como caso particular, se han llevado a cabo considerables esfuerzos por conseguir una criopreservación efectiva en el cerdo (Jovičić et al., 2020), lo que se debe al volumen comercial que mueve esta especie en todo el mundo.

En muchos programas de conservación de especies en peligro de extinción (Olden, 2006), se ha utilizado la criopreservación espermática, aunque no se dispusiera de protocolos específicos para cada especie en cuestión (Anel-Lopez et al., 2017). Esto, además de mantener la biodiversidad, permite la inclusión de genoma de especies salvajes semejantes a las domésticas como una posibilidad de incrementar el acervo genético, lo que aplica, al caso de los mamíferos (Hunter, 2018). Esta aproximación debe ir acompañada, además, de una salvaguarda adecuada del medio natural que permita la recuperación y desarrollo de muchas de estas especies (Comizzoli, 2017).

Respecto de la selección espermática (Marzano et al., 2020), está referida a la selección del sexo de la descendencia (Bhalakiya et al., 2018). En una gran cantidad de especies, por ejemplo en la bovina, resulta mucho más rentable disponer de hembras que de machos, pues ellas producen leche, terneros y carne, mientras que los segundos se limitan a producir semen y carne, aunque antaño también aportaran fuerza de trabajo. Ello condujo al desarrollo de técnicas de separación de espermatozoides con carga de cromosoma X y Y, con el fin de definir el sexo de la descendencia en diversas especies (Kurtz & Petersen, 2019). Estos procesos de selección se han extendido a otros aspectos como una mayor integridad del DNA (Nosrati et al., 2014) o la eficiencia reproductiva (Morrell & Rodriguez-Martinez, 2011).

La espermatología: el análisis de la calidad espermática

En la filosofía moderna, definida como tal entre los siglos XVII y XVIII, y simplificado, aparecieron dos corrientes diferenciadas, el empirismo y el racionalismo. La primera, encabezada por Bacon y Hume, daba por bueno que era preciso aplicar un método satisfactorio para obtener datos que nos revelaran la naturaleza de las cosas. Todo ello basado en aquello que se podía obtener por los sentidos, fuera directa o indirectamente (Rossi, 1990). La segunda, propiciada por Descartes y Spinoza, ponía en duda la fiabilidad de lo que se puede percibir por los sentidos y centraban en la razón el único modo de alcanzar el conocimiento (Williams, 1996). La síntesis se produjo a finales del XIX y durante todo el XX con el advenimiento de la ciencia moderna que, partió de los mismos principios, para admitir la relatividad de los conocimientos que se obtienen por los sentidos (ahora ampliados a través del desarrollo tecnológico), al tiempo que se admitió que la mera racionalidad no lleva a un acercamiento real a la naturaleza de las cosas (Moore, 1999). Por eso, un científico contemporáneo, más allá de algunos limitados casos de certezas, habla en términos de probabilidad (ahí se tiene el principio de incertidumbre de Heisenberg, como perfecto ejemplo) y somete sus resultados a la crítica racional basada en el método científico (Jaynes, 2003).

El análisis seminal se ha basado en la valoración de la concentración, movilidad y morfología de los espermatozoides (Valverde & Madrigal-Valverde, 2018). A estas variables se han añadido otras, como la estabilidad de la membrana (De Ambrogi et al., 2006), la maduración y fragmentación del ADN (Sadeghi et al., 2016), los niveles de apoptosis, la presencia de especies reactivas de oxígeno (Martinez-Alborcia et al., 2012), la consideración de las más útiles en el campo de la investigación para la práctica clínica. Desde un inicio, el análisis de las características espermáticas se realizaba de forma subjetiva (lo que sigue siendo práctica habitual en el ámbito veterinario), pese a que desde los años ochenta del siglo pasado se dispone de la tecnología computacional para hacer estos análisis de forma automática, se trata de los llamados sistemas CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*) (Amann & Waberski, 2014; Soler et al., 2017; Valverde et al., 2020).

El análisis subjetivo implica una considerable variabilidad en los resultados obtenidos, lo que limita su valor diagnóstico. Esto se pone de manifiesto no solo entre observadores, sino en un mismo técnico analista. Ello condujo, en el caso del análisis de muestras humanas, a la introducción de cuidadosos programas de control de calidad (Cooper et al., 2002). Además, los valores obtenidos presentan una significación muy limitada. Incluso en el caso de las muestras humanas, donde la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido diversos manuales para la definición de protocolos universales (World Health Organization, 2021), donde se establece, por ejemplo, que un espermatozoide se puede clasificar como de rápido progresivo si se mueve a partir de 25 $\mu\text{m/s}$, con un movimiento activo, lineal o en grandes círculos, que cubra una distancia de unas 25 μm (aproximadamente la mitad de la longitud de su cola) en un segundo.

Al analizar esa definición, surge la consideración de que el cerebro humano es incapaz de medir unidades, se precisa de elementos de comparación para realizar una medida (Kedia et al., 2014). Así pues, la definición de rápido (un adjetivo comparativo), solo puede referirse, como se hace en el manual de la OMS respecto de una cantidad, por definición no medible, o por comparación a la mitad de la longitud de su cola. Si se tiene en cuenta que en un campo microscópico hay decenas, cuando no centenas, de espermatozoides moviéndose, tal tipo de medición es imposible. Por tanto, solo se puede definir aquello rápido por oposición a aquello lento. Esto podría plantear el oxímoron de que en las poblaciones naturales puede haber guepardos lentísimos y caracoles rapidísimos. Todo ello lleva a una medida insegura y poco eficiente (Valverde, Madrigal-Valverde, et al., 2019). Eso mismo aplicaría a cualquier otra variable espermática, en lo que no se redundaría aquí.

Para paliar las limitaciones que se acaban de abordar, se desarrolló la tecnología CASA, donde los espermatozoides son analizados mediante algoritmos computacionales, lo que consiste en la definición de su centroide y el análisis de su desplazamiento en el espacio cartesiano, con el cálculo de toda una serie de parámetros cinéticos (Bompart et al., 2018). Parámetros relativos a concentración, morfología, fragmentación del ADN y otros algoritmos de análisis

de imagen específicos en cada caso, que rinde siempre valores cuantitativos, cuyo significado excede con mucho a aquellas clasificaciones subjetivas antes mencionadas. Dada la confusión terminológica asociada al desarrollo de esta tecnología, se propuso utilizar el término CASA para toda ella, determinado por un sufijo que indicara qué medía en cada caso. Así se tienen los sistemas CASA-Mot (movilidad y cinética), CASA-Morph (morfología y morfometría), CASA-DNAf (fragmentación del DNA) y así sucesivamente (Soler & Cooper et al., 2016).

Surgen ahora dos problemas, uno relativo a la precisión y exactitud de las medidas y otro al sistema de clasificación empleado (se recomienda la revisión de los números especiales de las revistas *Asian Journal of Andrology* [sobre análisis morfológico en 2016, vol. 18] (Soler & Cooper, 2016) y *Reproduction Fertility and Development* [sobre análisis cinético en 2018, vol. 30 número 6] (Holt et al., 2018)). Este segundo aspecto se tratará más adelante.

Diversos son los elementos que operan en la fiabilidad y significado de las medidas obtenidas, los más importantes son las características de los microscopios empleados, la temperatura de análisis, la cámara de recuento utilizada, las características de las cámaras de vídeo empleadas y, como es lógico, del software con que se hacen los cálculos (Barquero, Sevilla, et al., 2021; Bompert et al., 2019; Gacem, Bompert, et al., 2020; Valverde, Areán, et al., 2019).

En lo referente a la microscopía, se hace necesario el uso del contraste de fase, al tratarse de células no teñidas y de tamaño pequeño. Pero de esta tecnología se dispone de dos alternativas, el positivo y el negativo (Soler, García-Molina, et al., 2016). Cada uno tiene sus pros y sus contras, por lo que, como suele pasar en la ciencia, no se puede decir sin más que uno sea más conveniente que el otro. Eso sí, puesto que el objetivo último de los sistemas CASA-Mot es la obtención de datos cinéticos, el contraste de fase negativo ofrece mejores resultados al mostrar al espermatozoide blanco sobre un fondo oscuro, lo que facilita su discriminación y análisis.

Aspectos como la movilidad están ligados a la temperatura, ya que el metabolismo celular se ve alterado por ella. En cambio, es frecuente que se hable de temperatura ambiente cuando eso no indica a qué grados Celsius se trabaja (Viquez et al., 2021). Parece que lo más indicado para la evaluación del semen, es utilizar la temperatura del tracto genital femenino donde debería alojarse tras la eyaculación. En muestras humanas y animales, se ha podido comprobar que la temperatura afecta significativamente a la cinética espermática y eso referido tanto a la temperatura de incubación como a la de análisis. Por ello, se recomendó utilizar ambas temperaturas a 37 °C con el fin de estandarizar las condiciones y por ser la temperatura fisiológica, a pesar de que los mayores valores se obtuvieron tras incubar a 37 °C y analizar las muestras a 22 °C. Por su parte, el análisis morfométrico mostró que los espermatozoides presentaban un tamaño inferior tras ser incubados a 37 °C, respecto de los valores observados a 22 °C, mientras que las células se hacían menos elípticas, lo que indica que esa reducción fue superior en la longitud que en la anchura (García-Molina et al., 2022). Es de señalar que, en ese mismo estudio, la valoración subjetiva de las muestras, no permitió observar diferencias entre las dos temperaturas, lo que refuerza la idea de que este tipo de valoración no es suficiente para una correcta evaluación de la funcionalidad espermática.

Otro elemento a considerar, es el referido a la cámara de recuento utilizada. Hay dos tipos de cámaras, las que se basan en el desplazamiento de la gota y las que lo hacen en la difusión capilar (Bompert et al., 2018). Las primeras parten del uso tradicional de un porta objetos y cubre objetos. De todas formas, su uso no permite asegurar una distribución uniforme de la gota de semen, ya que el cubre objetos flota sobre su superficie, lo que, además, produce movimientos pasivos del fluido. Por ello, se desarrollaron cámaras específicas (Makler®, Spermtrack®), que con base en el mismo concepto, comprenden un cubre objeto con cierto peso, lo que asegura la expansión del fluido sobre la base de la cámara. Su diseño permite asegurar una altura entre la base y el cubre objetos que puede ser de 10 o 20 µm, según el modelo (Valverde & Madrigal-Valverde, 2019). El otro tipo de cámaras de recuento parten del uso de las clásicas cámaras para recuento hemático (como la Neubauer), solo que, en este caso, el cubre objetos está soldado por un pegamento al porta objetos que asegura unas alturas como las antes indicadas. En este tipo de cámaras, la muestra se deposita en la zona de carga, donde el cubre objetos y porta objetos entran en contacto y avanzan por dentro del espacio capilar. El diseño de dicho espacio resulta fundamental, pues pueden

producirse movimientos pasivos de reflujo que distribuyan de forma no uniforme a los espermatozoides (Valverde, Madrigal, et al., 2019).

Con respecto de las cámaras de recuento, los tipos existentes ofrecen resultados diferentes y, por lo tanto, no se pueden mezclar unos con otros, lo que dificulta la interpretación y comparación entre trabajos que utilicen diferentes cámaras o, incluso, diferentes modos de uso de una misma cámara (Caldeira et al., 2019; Valverde, Areán, et al., 2019). Si se supone que se haya tenido en cuenta todo lo antes dicho, el siguiente elemento determinante es el que se refiere a la cámara de vídeo utilizada (Valverde, Madrigal-Valverde, et al., 2019). La resolución de la imagen resulta fundamental, pero eso hace mucho que no resulta un factor limitante.

Una variable que sí limita el análisis seminal es la frecuencia de captura de imágenes (Valverde, Madrigal, et al., 2019). Cuando se desarrolló la primera tecnología CASA-Mot, dichas cámaras apenas capturaban veinticinco imágenes por segundo (i/s). Así, la mayoría de los valores históricos están obtenidos a esa frecuencia, pero la disposición de mejoras tecnológicas permite trabajar a frecuencias superiores. El análisis del efecto de la frecuencia de captura, muestra cómo a bajas frecuencias se está lejos de analizar una trayectoria cercana a la real. La relación entre la frecuencia de captura y los parámetros cinemáticos (en particular la VCL), sigue una curva exponencial, por lo que se hace necesario estudiar cuál es la frecuencia óptima (aquella que supone el punto de asíntota de la curva) (Cuadro 1), lo que depende de la especie (y aún de la raza) que se considere (Bompart et al., 2019). Debido a que las frecuencias óptimas están lejos de lo que históricamente se ha podido emplear e incluso, en algunos casos, de lo que en la actualidad permite la tecnología, no invalida los resultados obtenidos, pero sí indica que cierta parte de la variabilidad real de las muestras ha quedado enmascarada por esa limitación técnica.

Cuadro 1. Frecuencias óptimas de captura de imágenes para el estudio cinético con sistemas CASA-Mot en función de la especie considerada.

Table 1. Optimal image capture frequencies for the kinematic analysis with CASA-Mot systems according with the species considered.

Nombre común	Nombre científico	Imágenes por segundo
Anguila ^a	<i>Anguilla anguilla</i>	200
Burro ^b	<i>Equus asinus</i>	275
Caballo ^c	<i>Equus caballus</i>	300
Cerdo ^d	<i>Sus scrofa domesticus</i>	225
Esturión ^a	<i>Acipenser baerii</i>	225
Hombre ^e	<i>Homo sapiens sapiens</i>	140
Salmón ^a	<i>Salmo salar</i>	250
Toro ^f	<i>Bos taurus</i>	250

^aCaldeira et al. (2019); ^bGacem, Catalán, et al. (2020); ^cGacem, Bompart, et al. (2020); ^dValverde, Madrigal, et al. (2019); ^eGarcía-Molina et al. (2022); ^fBompart et al. (2019).

Otro factor que se tiene que considerar es el *software*. Una de las características de todo sistema CASA es que presenta un coeficiente de variación nulo cuando se analiza una misma muestra diversas veces, ya que los algoritmos utilizados se aplicarán siempre de la misma forma. Así se evita la variabilidad debida a la subjetividad que está sometida a diversos factores relativos al observador (cansancio, enfermedad, estados de ánimo, entre otros).

Un aspecto fundamental que se va a tratar en adelante, tiene que ver con la evaluación seminal, y se iniciará por la morfología. Los espermatozoides son células muy pequeñas, por lo que para su observación detallada se

hace necesario un aumento mínimo de 400x. Además, su observación en campo claro es imperceptible, a no ser que se realice una adecuada tinción de los espermatozoides. Si bien puede realizarse una tinción *in toto*, lo más común es realizar una extensión, que se seca al aire y luego se fija y tiñe. Al analizar estas etapas e iniciar por la deshidratación, sin duda se provoca una modificación de las estructuras celulares (Soler & Cooper, 2016). Si se utiliza el siguiente símil, un grano de uva deshidratado se convierte en una pasa que ya jamás podrá revertir en el grano de uva original. Eso mismo ocurre con el proceso de fijación química que modifica las proteínas y la interacción entre el contenido celular y el medio (Cooper et al., 2004).

Diferentes fijadores y/o tinciones, conducen a modificaciones significativas en los valores morfométricos (Cucho et al., 2019), mientras que estas diferencias no son fáciles de discriminar en una observación subjetiva de la morfología celular. Pese a todas estas limitaciones, mucho es lo que se ha avanzado en las últimas décadas en los estudios de morfometría espermática y de sus implicaciones en el éxito reproductivo (Maroto-Morales et al., 2016).

La introducción de la técnica llamada Trumorph[®], vino a solucionar ese conflicto (Soler et al., 2015; Soler, Cooper, et al., 2016). Se trata de colocar una gota en un porta objetos y encima un cubre objetos, preparación que se somete a una temperatura de 65 °C durante 5 s (lo que hace que dicha preparación llegue a 45 °C) y se ejerce una presión de unos 6 kp, para proceder a la observación de la muestra en un microscopio de contraste de fase negativo a 400x. La temperatura inmoviliza los espermatozoides y la presión asegura la expansión del fluido forzando la posición de máxima exposición de los espermatozoides, pero sin presionarlos directamente. Se ha demostrado, al menos en el caso de la anguila, que tras el tratamiento con Trumorph[®] se mantiene la integridad de membrana y la consecuente respuesta activa los cambios de osmolaridad del medio (Caldeira et al., 2022).

Las imágenes que rinde el Trumorph[®], en el caso de mamíferos, permite distinguir los componentes celulares, se observa el acrosoma, la zona post-acrosómica, el cuello, la pieza intermedia (donde la presencia de restos citoplasmáticos es muy superior a lo observado tras fijación y tinción), la pieza principal y la pieza terminal del flagelo (Figura 1).

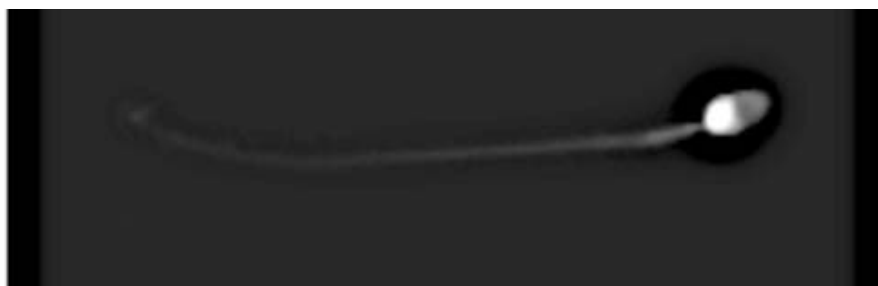


Figura 1. Imagen de un espermatozoide humano observado con la técnica de Trumorph[®]. Se pueden apreciar los diferentes componentes celulares.

Figure 1. Image of a human sperm observed with the Trumorph[®] technique. It showed the different cellular components.

Otro aspecto de la calidad espermática evaluable con tecnología CASA, es la fragmentación del DNA. La evaluación de esta característica implica el uso de alguna de las técnicas específicas que ponen de manifiesto el nivel de rotura de las cadenas de DNA, sea en cadena simple o en doble cadena. Entre estas técnicas cabe señalar alguna sencilla, como la basada en el uso del naranja de acridina y otras más complejas como el COMETT, el efecto Tunel o el SCD (*Sperm Chromatin Dispersion*). La técnica del SCD se fundamenta en una digestión de las proteínas que empaquetan al DNA, con lo que las hebras de esta molécula tienden a expandirse, más cuanto más intactas estén, lo que genera un halo alrededor del *core* original, que viene a equivaler a lo que era la cabeza del

espermatozoide. Así pues, el análisis consiste en una medición tanto del halo como del *core* y de su relación. Como en casos anteriores, se ha visto que los resultados son específicos y dependen del kit utilizado en cada caso, por lo que es preciso tener en cuenta esos factores (Sadeghi et al., 2016; 2018).

Un elemento de interés técnico y científico, se relaciona con la medición de la movilidad a profundidades cercanas a lo fisiológico. La profundidad de campo que se puede utilizar con el uso de la microscopía óptica se limita a los 20 μm , lo que obliga a los espermatozoides a un movimiento condicionado por esta variable. Poder trabajar a mayores profundidades (a partir de 100 μm) implica el uso de microscopía láser (Soler et al., 2018). Pero esta tecnología no solo permite acercarse a una profundidad similar a aquella en que los espermatozoides se mueven en el tracto genital femenino, sino que permite hacer una valoración tridimensional de dicho movimiento (Figura 2). Otro aspecto que requiere atención es el análisis del movimiento flagelar (Gallagher et al., 2019), lo que permite entender cómo se mueven los espermatozoides en su conjunto y no solo individual (Schoeller et al., 2020). Estos descubrimientos influyen en la idea de que solo hay que tener en cuenta espermatozoides con “buena movilidad” (Tung et al., 2017).

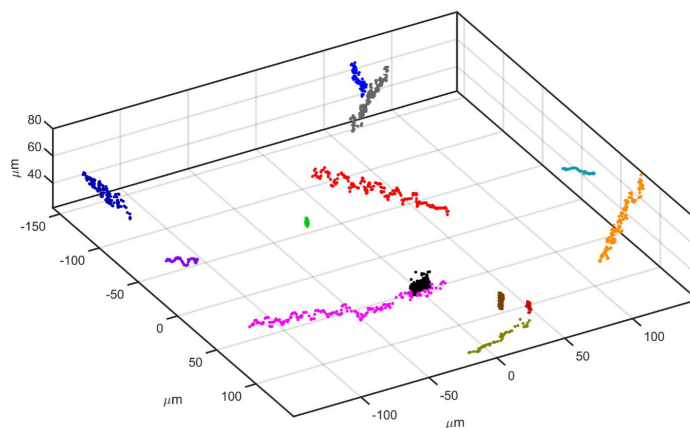


Figura 2. Reconstrucción tridimensional de trayectorias espermáticas de verraco, obtenidas con microscopía láser sin lentes.

Figure 2. Three-dimensional reconstruction of boar sperm track, obtained with laser microscopy without lenses.

Una referencia a las más novedosas técnicas que permiten a un tiempo valorar diversos aspectos de la funcionalidad espermática, lo constituye la morfometría de diversos componentes celulares, la estabilidad de las membranas celular y acrosómica y la cinética de su movimiento (Yániz et al., 2017) (Figura 3).

Hacia un nuevo paradigma de qué es el eyaculado

Desde el descubrimiento de los espermatozoides, se pensó que el eyaculado era un conjunto de células equivalentes, donde cada una compite por ser la que fecunde al ovocito (u ovocitos, según la especie). Se valoraban como positivos los espermatozoides con una movilidad rápida y progresiva, eso sí, con una buena morfología (lo que es síntoma de una buena formación y maduración de la célula).

Todo análisis seminal es, por definición, condicionado, porque no se puede garantizar que el comportamiento que se observa sea equivalente al que tendría en dicho tracto, algo que recuerda mucho al gato de Schrödinger

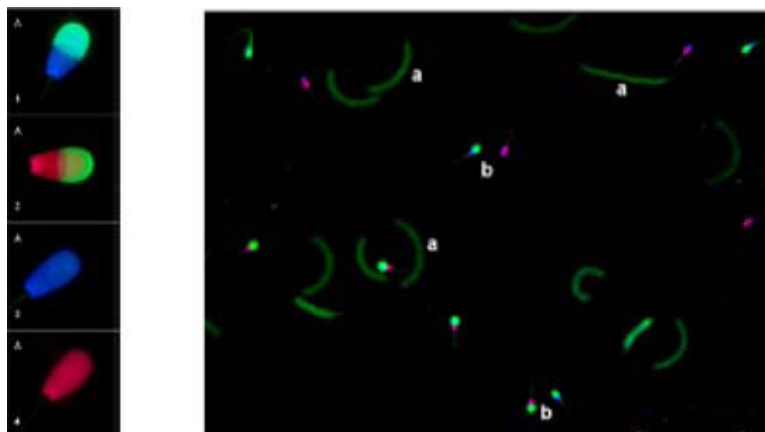


Figura 3. Pruebas de funcionalidad de membrana espermática en bovinos. Adaptado de Yániz et al. (2017).

En la izquierda se observan cabezas de espermatozoides con las diferentes combinaciones de arriba hacia abajo: membrana plasmática y acrosoma intacto; membrana plasmática dañada y acrosoma intacto; membrana plasmática intacta y acrosoma dañado; y ambas membranas dañadas. En la derecha se observa cómo es posible analizar el movimiento de las células al mismo tiempo que se analiza el estado de sus membranas.

Figure 3. Sperm membrane functionality test in cattle. Adapted from Yániz et al. (2017).

On the left are sperm heads with the different combinations from top to bottom: plasmatic membrane and intact acrosome, damaged plasmatic membrane and intact acrosome, intact plasmatic membrane and damaged acrosoma; and both membranes damaged. On the right you can see how it is possible to analyze the sperm movement of cells at the same time that the state of their plasmalemma and acrosome membranes are analyzed.

(Hernández-Caravaca et al., 2017). El tracto femenino es un sitio con cambios de pH, de temperatura, presencia de anticuerpos, de los más diversos leucocitos, polimorfonucleares, que ponen a prueba la resistencia de los espermatozoides (Rodríguez-Martínez et al., 2005).

En muchas especies, el propio eyaculado se presenta en diversas fracciones con espermatozoides que exhiben características diferentes (Dziekońska et al., 2017). Como se indicó, el uso de los sistemas CASA aporta toda una batería de datos cuantitativos de diversa índole, lo que permite abordar el estudio espermático desde una perspectiva poblacional. Tras diversos intentos con el empleo de la estadística multivariante, se acabó por establecer el uso de análisis de clúster en dos etapas, una primera de reducción de variables por el cálculo de componentes principales y una segunda de “*clusterización*” a partir de dichos componentes (Ramón & Martínez-Pastor, 2018).

La aplicación de estos cálculos, ha puesto de manifiesto que la presencia de subpoblaciones espermáticas es universal en las más diversas especies y condiciones (Caldeira et al., 2018; Valverde et al., 2016). Este hecho ha cambiado el viejo paradigma antes comentado por uno nuevo, en la que el conjunto de espermatozoides eyaculados se asemeja más a un equipo que a una carrera en solitario. Esto se ha analizado también con el uso de técnicas de análisis bayesiano, lo que ha producido resultados interesantes, pero todavía por explorar en mayor medida (Viquez et al., 2020). Aún se desconoce la funcionalidad relativa de cada una de estas subpoblaciones, pero ya hay indicios de su relación con la capacidad fecundante del eyaculado (Barquero, Roldan, Soler, Vargas-Leitón, et al., 2021; Barquero, Roldan, Soler, Yániz, et al., 2021; Barquero, Soler, et al., 2021).

Dónde nos dirigimos: hacia una agricultura de precisión

Con base en el cambio de paradigma de cómo se concibe la realidad de lo que supone la población espermática total presente en el eyaculado, los trabajos punteros desarrollados en los últimos años se dirigen a la identificación

y selección de aquellas subpoblaciones o conjuntos de subpoblaciones que puedan resultar más interesantes para el propósito que se haya definido. Ello implica la combinación de nuevas tecnologías como la genómica (Selvaraju et al., 2018), la microfluídica (Vasilescu et al., 2021) y la nanotecnología (Neculai-Valeanu & Ariton, 2021).

El uso de la microfluídica no puede ser aplicado a programas de selección masiva de espermatozoides, pero, por el contrario, permite trabajar en los procesos de selección basados en diferentes principios de interacción con los espermatozoides (Ataei et al., 2021).

La genómica aplicada a los espermatozoides y los estudios epigenéticos, han puesto de manifiesto cómo el estilo de vida y diversos factores ambientales no solo afectan la vida del individuo, sino que pueden afectar el fenotipo de las siguientes generaciones (Donkin & Barrès, 2018). Por su parte, la edición del genoma por la técnica de CRISPR también comienza a ser una realidad (Ahmed et al., 2019). Y si bien las implicaciones legales y éticas de estas técnicas están siendo analizadas por su potencial repercusión (Cohen et al., 2020), no hay duda de que marcan el futuro de la selección dirigida, al menos en el campo de la agricultura.

Un problema de difícil abordaje experimental ha sido el conocer cómo se comportan los espermatozoides en su interacción con el tracto genital femenino (Saint-Dizier et al., 2020). El diseño de componentes microfluídicos específicos, permite entender este complejo proceso, y al considerar lo indicado sobre las curvaturas del tracto a que se enfrentan los espermatozoides en su avance hacia el ovocito, condicionan las interacciones entre la superficie de estos y la superficie externa (Reza Raveshi et al., 2021). La microfluídica puede servir para una selección espermática precisa y basada en quimiotaxis (Karbalaeei & Cho, 2018), termotaxis (Pérez-Cerezales et al., 2018) o reotaxis (Hwang et al., 2019), lo que permitirá separar aquellas subpoblaciones que sean de interés en cada caso (Khodamoradi et al., 2021).

El uso de nanopartículas ha mostrado su utilidad en la mejora de la selección espermática y su potencial fecundante (Feugang et al., 2019), así como en su conservación tras congelación (Nadri et al., 2019). Al mismo tiempo, se estudia la interacción negativa entre nanopartículas contaminantes y la funcionalidad espermática (Iftikhar et al., 2021). También se están utilizando como marcadores que permiten el seguimiento de los espermatozoides en su recorrido, sea *in vivo* o *in vitro* (Vasquez et al., 2016). Esto último, conduce al diseño de los llamados robots espermáticos que se pueden guiar o incluso programar para llegar a su destino (Patil et al., 2020).

Conclusiones

El análisis seminal ha tenido un cambio importante de paradigma, al abandonar técnicas de evaluación subjetiva de la calidad seminal y adoptar métodos objetivos de evaluación del semen, mediante el análisis de grandes volúmenes de datos y variables espermáticas de movilidad, cinéticas, morfométricas, morfológicas y de fragmentación del ADN, que permiten caracterizar mejor los eyaculados de los reproductores en centros de inseminación artificial. Algunos puntos de inflexión importantes en la biología de la reproducción, han significado un avance importante en las técnicas de reproducción asistida, como la criopreservación de gametos, la inseminación artificial o la fecundación *in vitro*, para la producción animal e incrementar los niveles de productividad.

La adopción de nuevas tecnologías y la implementación de nuevos métodos científicos, sumado a que la reproducción animal se incorpore dentro de la biología de sistemas, permitirán mejorar el entendimiento sobre lo que sucede a nivel fisiológico. Además, la sociedad actual está siendo partícipe de un nuevo cambio de paradigma sobre lo que es un eyaculado y se está desechando la idea de este como una unidad global para dar paso al nuevo concepto de heterogeneidad del eyaculado, lo que sin duda abrirá nuevas líneas de investigación para mejorar el entendimiento actual de la fertilidad masculina.

Las implicaciones éticas sobre las nuevas técnicas de reproducción asistida en donde puede editarse el genoma de embriones mediante genómica aplicada, deben ser tomadas en consideración con base en equipos multi, inter y

transdisciplinarios a lo interno de los comités de bioética, para que estos nuevos métodos reproductivos dentro de la agricultura de precisión del siglo XX tengan un asidero legal, moral y ético.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Rodolfo Meoño por la revisión crítica del manuscrito desde la filosofía de la ciencia. Se agradece al programa de becas y a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Referencias

- Ahmed, H. M. M., Hildebrand, L., & Wimmer, E. A. (2019). Improvement and use of CRISPR/Cas9 to engineer a sperm-marking strain for the invasive fruit pest *Drosophila suzukii*. *BMC Biotechnology*, *19*, Article 85. <https://doi.org/10.1186/S12896-019-0588-5>
- Amann, R. P., & Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, *81*(1), Article 5–17.e3. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.004>
- Anel-Lopez, L., Ortega-Ferrusola, C., Álvarez, M., Borragán, S., Chamorro, C., Peña, F. J., Morrell, J., Anel, L., & de Paz, P. (2017). Improving sperm banking efficiency in endangered species through the use of a sperm selection method in brown bear (*Ursus arctos*) thawed sperm. *BMC Veterinary Research*, *13*, Article 200. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1124-2>
- Ataei, A., Lau, A., & Asghar, W. (2021). A microfluidic sperm-sorting device based on rheotaxis effect. *Microfluidics and Nanofluidics*, *25*, Article 52. <https://doi.org/10.1007/s10404-021-02453-8>
- Aurich, J., Kuhl, J., Tichy, A., & Aurich, C. (2020). Efficiency of semen cryopreservation in Stallions. *Animals*, *10*(6), Article 1033. <https://doi.org/10.3390/ANI10061033>
- Bailey, J., Morrier, A., & Cormier, N. (2003). Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Canadian Journal of Animal Science*, *83*(1), 393–401. <https://doi.org/10.4141/A03-024>
- Bar-On, Y. M., Phillips, R., & Milo, R. (2018). The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(25), 6506–6511. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1711842115>
- Barbas, J. P., & Mascarenhas, R. D. (2008). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking*, *10*, 49–62. <https://doi.org/10.1007/S10561-008-9081-4>
- Barquero, V., Roldan, E. R. S., Soler, C., Vargas-Leitón, B., Sevilla, F., Camacho, M., & Valverde, A. (2021). Relationship between fertility traits and kinematics in clusters of boar ejaculates. *Biology*, *10*(7), Article 595. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10070595>
- Barquero, V., Roldan, E. R. S., Soler, C., Yániz, J. L., Camacho, M., & Valverde, A. (2021). Predictive capacity of boar sperm morphometry and morphometric sub-populations on reproductive success after artificial insemination. *Animals*, *11*(4), Article 920. <https://doi.org/10.3390/ANI11040920>
- Barquero, V., Sevilla, F., Calderón-Calderón, J., Madrigal-Valverde, M., Camacho, M., Cucho, H., & Valverde, A. (2021). Condiciones óptimas del análisis CASA-Mot del semen de verraco: efecto de la tasa de fotografías

- para diferentes cámaras y campos de recuento espermático. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(5), Artículo e19832. <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i5.19832>
- Barquero, V., Soler, C., Sevilla, F., Calderón-Calderón, J., & 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>
- Bhalakiya, N., Haque, N., Patel, D., Chaudhari, A., Patel, G., Madhavatar, M., Patel, P., Hossain, S., & Kumar, R. (2018). Sperm sexing and its application in livestock sector. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2018(Special 7), 259–272. <https://www.ijemas.com/special/7/Nikita%20Bhalakiya,%20et%20al.pdf>
- Bompart, D., García-Molina, A., Valverde, A., Caldeira, C., Yániz, J., Núñez de Murga, M., & Soler, C. (2018). CASA-Mot technology: how results are affected by the frame rate and counting chamber. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6), 810–819. <https://doi.org/10.1071/RD17551>
- Bompart, D., Vázquez, R., Gómez, R., Valverde, A., Roldán, E., García-Molina, A., & Soler, C. (2019). Combined effects of type and depth of counting chamber, and rate of image frame capture, on bull sperm motility and kinematics. *Animal Reproduction Science*, 209, Article 106169. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2019.106169>
- Caldeira, C., García-Molina, A., Valverde, A., Bompart, D., Hassane, M., Martin, P., & Soler, C. (2018). Comparison of sperm motility subpopulation structure among wild anadromous and farmed male Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr using a CASA system. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6), 897–906. <https://doi.org/10.1071/RD17466>
- Caldeira, C., Hernández-Ibáñez, S., Valverde, A., Martin, P., Herranz-Jusdado, J. G., Gallego, V., Asturiano, J. F., Dzyuba, B., Pšenička, M., & Soler, C. (2019). Standardization of sperm motility analysis by using CASA-Mot for Atlantic salmon (*Salmo salar*), European eel (*Anguilla anguilla*) and Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Aquaculture*, 502, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.001>
- Caldeira, C., Hernández-Ibáñez, S., Vendrell, A., Valverde, A., García-Molina, A., Gallego, V., Asturiano, J. F., & Soler, C. (2022). Characterisation of European eel (*Anguilla anguilla*) spermatozoa morphometry using Trumorph tool in fixed and non-fixed samples. *Aquaculture*, 553, Article 738047. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.738047>
- Chen, D. -B., Zhang, R. -S., Bian, H. -X., Li, Q., Xia, R. -X., Li, Y. -P., Liu, Y. -Q., & Lu, C. (2019). Comparative mitochondrial genomes provide new insights into the true wild progenitor and origin of domestic silkworm *Bombyx mori*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 176–183. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.03.002>
- Cherniha, R. M., & Davydovych, V. V. (2019). A hunter-gatherer-farmer population model: Lie symmetries, exact solutions and their interpretation. *European Journal of Applied Mathematics*, 30(2), 338–357. <https://doi.org/10.1017/S0956792518000104>
- Cohen, I. G., Sherkow, J. S., & Adashi, E. Y. (2020). Gene Editing Sperm and Eggs (not Embryos): Does it make a legal or ethical difference? *The Journal of Law, Medicine & Ethics: A Journal of the American Society of Law, Medicine & Ethics*, 48(3), 619–621. <https://doi.org/10.1177/1073110520958891>
- Comizzoli, P. (2017). Biobanking and fertility preservation for rare and endangered species. *Animal Reproduction*, 14, 30–33. <http://doi.org/10.21451/1984-3143-AR889>

- Contreras, J., Raventós, H., Rodríguez, G., & Leandro, M. (2014). Call for a change in research funding priorities: the example of mental health in Costa Rica. *Revista Panamericana de Salud Publica*, 36(4), 266–269. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/9692>
- Cooper, T., Björndahl, L., Vreeburg, J., & Nieschlag, E. (2002). Semen analysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization. *International Journal of Andrology*, 25(5), 306–311. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.2002.00370.x>
- Cooper, T., Yeung, C. -H., Fetic, S., Sobhani, A., & Nieschlag, E. (2004). Cytoplasmic droplets are normal structures of human sperm but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology. *Human Reproduction*, 19(10), 2283–2288. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEH410>
- Cucho, H., López, Y., Caldeira, C., Valverde, A., Ordóñez, C., & 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>
- De Ambrogi, M., Ballester, J., Saravia, F., Caballero, I., Johannisson, A., Wallgren, M., Andersson, M., & Rodríguez-Martínez, H. (2006). Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 29(5), 543–552. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2006.00694.x>
- Diamond, J. (2002). Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature*, 418, 700–707. <https://doi.org/10.1038/nature01019>
- Dirrigl, F. J., Brush, T., Morales-Muñiz, A., & Bartosiewicz, L. (2020). Prehistoric and historical insights in avian zooarchaeology, taphonomy and ancient bird use. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 12, Article 57. <https://doi.org/10.1007/s12520-020-01016-2>
- Donkin, I., & 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>
- Dziekońska, A., Świąder, K., Koziorowska-Gilun, M., Mielenska, K., Zasiadczyk, L., & Kordan, W. (2017). Effect of boar ejaculate fraction, extender type and time of storage on quality of spermatozoa. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 20(1), 77–84. <https://doi.org/10.1515/PJVS-2017-0011>
- Edwards, R. G., Steptoe, P. C., & Purdy, J. M. (1980). Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown *in vitro*. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 87(9), 737–756. <https://doi.org/10.1111/J.1471-0528.1980.TB04610.X>
- Feugang, J. M., Rhoads, C. E., Mustapha, P. A., Tardif, S., Parrish, J. J., Willard, S. T., & Ryan, P. L. (2019). Treatment of boar sperm with nanoparticles for improved fertility. *Theriogenology*, 137, 75–81. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2019.05.040>
- Frantz, L. A. F., Bradley, D. G., Larson, G., & Orlando, L. (2020). Animal domestication in the era of ancient genomics. *Nature Reviews Genetics*, 21, 449–460. <https://doi.org/10.1038/S41576-020-0225-0>
- Gacem, S., Bompard, D., Valverde, A., Catalán, J., Miró, J., & Soler, C. (2020). Optimal frame rate when there were stallion sperm motility evaluations and determinations for kinematic variables using CASA-Mot analysis in different counting chambers. *Animal Reproduction Science*, 223, Article 106643. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106643>
- Gacem, S., Catalán, J., Valverde, A., Soler, C., & Miró, J. (2020). Optimization of Casa-mot analysis of donkey sperm: Optimum frame rate and values of kinematic variables for different counting chamber and fields. *Animals*, 10(11), Article 1993. <https://doi.org/10.3390/ani10111993>

- Gallagher, M. T., Cupples, G., Ooi, E. H., Kirkman-Brown, J. C., & Smith, D. J. (2019). Rapid sperm capture: high-throughput flagellar waveform analysis. *Human Reproduction*, *34*(7), 1173–1185. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez056>
- García-Molina, A., Navarro, N., Valverde, A., Bompard, D., Caldeira, C., Vendrell, A., & 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>
- Harari, Y. N. (2014). *Sapiens: A brief history of humankind*. Vintage-Books.
- Hernández-Caravaca, I., Llamas-López, P. J., Izquierdo-Rico, M. J., Soriano-Úbeda, C., Matás, C., Gardón, J. C., & García-Vázquez, F. A. (2017). Optimization of post-cervical artificial insemination in gilts: Effect of cervical relaxation procedures and catheter type. *Theriogenology*, *90*, 147–152. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2016.11.027>
- Holt, W. V., Cummins, J. M., & Soler, C. (2018). Computer-assisted sperm analysis and reproductive science; a gift for understanding gamete biology from multidisciplinary perspectives. *Reproduction, Fertility and Development*, *30*(6), iii–v. https://doi.org/10.1071/RDV30N6_FO
- Hunter, P. (2018). The genetics of domestication: Research into the domestication of livestock and companion animals sheds light both on their “evolution” and human history. *EMBO Reports*, *19*(2), 201–205. <https://doi.org/10.15252/EMBR.201745664>
- Hwang, B., Lee, D., Hwang, S. J., Baek, J. H., & Kim, B. (2019). Rheotaxis based high-throughput motile sperm sorting device. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, *20*, 1037–1045. <https://doi.org/10.1007/s12541-019-00144-7>
- Iftikhar, M., Noureen, A., Uzair, M., Jabeen, F., Daim, M. A., & Cappello, T. (2021). Perspectives of nanoparticles in male infertility: Evidence for induced abnormalities in sperm production. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(4), Article 1758. <https://doi.org/10.3390/IJERPH18041758>
- Ivanoff, E. I. (1922). On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia. *The Journal of Agricultural Science*, *12*(3), 244–256. <https://doi.org/10.1017/S002185960000530X>
- Jaynes, E. T. (2003). *Probability theory: The logic of science* (Annotated ed.). Cambridge University Press.
- Jovičić, M., Chmelíková, E., & Sedmíková, M. (2020). Cryopreservation of boar semen. *Czech Journal of Animal Science*, *65*(4), 115–123. <https://doi.org/10.17221/47/2020-CJAS>
- Karbalaei, A., & Cho, H. J. (2018). Microfluidic Devices Developed for and Inspired by Thermotaxis and Chemotaxis. *Micromachines*, *9*(4), Article 149. <https://doi.org/10.3390/MI9040149>
- Kedia, G., Mussweiler, T., & Linden, D. E. J. (2014). Brain mechanisms of social comparison and their influence on the reward system. *NeuroReport*, *25*(16), 1255–1265. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000255>
- Khodamoradi, M., Rafizadeh Tafti, S., Mousavi Shaegh, S. A., Aflatoonian, B., Azimzadeh, M., & Khashayar, P. (2021). Recent microfluidic innovations for sperm sorting. *Chemosensors*, *9*(6), Article 126. <https://doi.org/10.3390/CHEMOSENSORS9060126>
- Kruska, D. (1993). Evidence of decrease in brain size in ranch mink, *Mustela vison* f. dom., during subadult postnatal ontogenesis. *Brain, Behavior and Evolution*, *41*(6), 303–315. <https://doi.org/10.1159/000113851>
- Kurtz, S., & Petersen, B. (2019). Pre-determination of sex in pigs by application of CRISPR/Cas system for genome editing. *Theriogenology*, *137*, 67–74. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2019.05.039>

- Larson, G., & Fuller, D. Q. (2014). The evolution of animal domestication. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *45*, 115–136. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ECOLSYS-110512-135813>
- Maroto-Morales, A., García-Álvarez, O., Ramón, M., Martínez-Pastor, F., Fernández-Santos, M. R., Soler, A., & 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>
- Martinez-Alborcia, M., Valverde, A., Parrilla, I., Vazquez, J. M., Martinez, E. A., & Roca, J. (2012). Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from Boar Ejaculate. *PLoS ONE*, *7*(5), Article e36550. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036550>
- Marzano, G., Chiriaco, M. S., Primiceri, E., Dell'Aquila, M. E., Ramalho-Santos, J., Zara, V., Ferramosca, A., & Maruccio, G. (2020). Sperm selection in assisted reproduction: A review of established methods and cutting-edge possibilities. *Biotechnology Advances*, *40*, Article 107498. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2019.107498>
- Milovanov, V. K., & Sokolovskaya, I. I. (1947). *Stockbreeding and the artificial insemination of livestock*. Hutchinson's Scientific and Technical Publications.
- Moore, J. A. (1999). *Science as a way of knowing: the foundations of modern Biology*. Harvard University Press.
- Morrell, J. M., & Rodriguez-Martinez, H. (2011). Practical Applications of Sperm Selection Techniques as a Tool for Improving Reproductive Efficiency. *Veterinary Medicine International*, *2011*, Article 894767. <https://doi.org/10.4061/2011/894767>
- Nadri, T., Towhidi, A., Zeinoaldini, S., Martínez-Pastor, F., Mousavi, M., Noei, R., Tar, M., & Mohammadi Sangcheshmeh, A. (2019). Lecithin nanoparticles enhance the cryosurvival of caprine sperm. *Theriogenology*, *133*, 38–44. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2019.04.024>
- Neculai-Valeanu, A. -S., & Ariton, A. M. (2021). Game-changing approaches in sperm sex-sorting: microfluidics and nanotechnology. *Animals*, *11*(4), Article 1182. <https://doi.org/10.3390/ANI11041182>
- Nosrati, R., Vollmer, M., Eamer, L., San Gabriel, M. C., Zeidan, K., Zini, A., & Sinton, D. (2014). Rapid selection of sperm with high DNA integrity. *Lab on a Chip*, *14*(6), 1142–1150. <https://doi.org/10.1039/C3LC51254A>
- Olden, J. D. (2006). Biotic homogenization: a new research agenda for conservation biogeography. *Journal of Biogeography*, *33*(12), 2027–2039. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2699.2006.01572.X>
- Ombelet, W., & Robays, J. Van. (2015). Artificial insemination history: hurdles and milestones. *Facts, Views & Vision in ObGyn*, *7*(2), 137–143. <https://fvvo.eu/assets/534/08-Ombelet%20et%20al.pdf>
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet*, *340*(8810), 17–18. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)92425-F](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)92425-F)
- Patil, S., Kumar, P., Singh, G., Bala, R., Jerome, A., Patil, C. S., Kumar, D., Singh, S., & Sharma, R. K. (2020). 'Semen dilution effect' on sperm variables and conception rate in buffalo. *Animal Reproduction Science*, *214*, Article 106304. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106304>
- Pedrosa, S., Uzun, M., Arranz, J. -J., Gutiérrez-Gil, B., San Primitivo, F., & Bayón, Y. (2005). Evidence of three maternal lineages in near eastern sheep supporting multiple domestication events. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *272*(1577), 2211–2217. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2005.3204>
- Pérez-Cerezales, S., Laguna-Barraza, R., Chacón De Castro, A., Sánchez-Calabuig, M. J., Cano-Oliva, E., de Castro-Pita, F. J., Montoro-Buils, L., Pericuesta, E., Fernández-González, R., & Gutiérrez-Adán, A.

- (2018). Sperm selection by thermotaxis improves ICSI outcome in mice. *Scientific Reports*, 8, Article 2902. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-21335-8>
- Puerta Suárez, J., du Plessis, S. S., & Cardona Maya, W. D. (2018). Spermatozoa: A Historical Perspective. *International Journal of Fertility & Sterility*, 12(3), 182–190. <https://doi.org/10.22074/IJFS.2018.5316>
- Ramón, M., & Martínez-Pastor, F. (2018). Implementation of novel statistical procedures and other advanced approaches to improve analysis of CASA data. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6), 860–866. <https://doi.org/10.1071/RD17479>
- Rehkämper, G., Frahm, H. D., & Cnotka, J. (2008). Mosaic evolution and adaptive brain component alteration under domestication seen on the background of evolutionary theory. *Brain, Behavior and Evolution*, 71(2), 115–126. <https://doi.org/10.1159/000111458>
- Reza Raveshi, M. R., Abdul Halim, M. S., Agnihotri, S. N., O'Bryan, M. K., Neild, A., & Nosrati, R. (2021). Curvature in the reproductive tract alters sperm–surface interactions. *Nature Communications*, 12, Article 3446. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23773-x>
- Rodríguez-Martínez, H., Saravia, F., Wallgren, M., Tienthai, P., Johannisson, A., Vázquez, J. M., Martínez, E., Roca, J., Sanz, L., & Calvete, J. J. (2005). Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*, 63(2), 514–535. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2004.09.028>
- Roldan, E. R. S., Gomendio, M., & Vitullo, A. D. (1992). The evolution of eutherian spermatozoa and underlying selective forces: female selection and sperm competition. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 67(4), 551–593. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1992.tb01193.x>
- Rossi, P. (1990). *Francis Bacon. De la magia a la ciencia*. Alianza Editorial.
- Sadeghi, S., García-Molina, A., Celma, F., Valverde, A., Fereidounfar, S., & 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>
- Sadeghi, S., Pertusa, J., Yaniz, J. L., Nuñez, J., Soler, C., & Silvestre, M. A. (2018). Effect of different oxidative stress degrees generated by hydrogen peroxide on motility and DNA fragmentation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(6), 1498–1505. <https://doi.org/10.1111/RDA.13296>
- Saint-Dizier, M., Mahé, C., Reynaud, K., Tsikis, G., Mermillod, P., & Druart, X. (2020). Sperm interactions with the female reproductive tract: A key for successful fertilization in mammals. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 516, Article 110956. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2020.110956>
- Scanes, C. G. (2018). Chapter 6 - The neolithic revolution, animal domestication, and early forms of animal agriculture. In C. G. Scanes, & S. R. Toukhsati (Eds.), *Animals and human society* (pp. 103–131). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805247-1.00006-X>
- Scherf, B. (2000). Farm animal genetic resources. In B. D. Scherf (Ed.), *World watch list for domestic animal diversity* (2nd ed.; pp. 37–646). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/10343>
- Schoeller, S. F., Holt, W. V., & Keaveny, E. E. (2020). Collective dynamics of sperm cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 375, Article 20190384. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2019.0384>
- Selvaraju, S., Parthipan, S., Somashekar, L., Binsila, B. K., Kolte, A. P., Arangasamy, A., Ravindra, J. P., & Krawetz, S. A. (2018). Current status of sperm functional genomics and its diagnostic potential of fertility

- in bovine (*Bos taurus*). *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 64(6), 484–501. <https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1444816>
- Sharma, R. S., Saxena, R., & Singh, R. (2018). Infertility & assisted reproduction: A historical & modern scientific perspective. *Indian Journal of Medical Research*, 148(Suppl. 1), S10–S14. <https://bit.ly/3Xn27Q5>
- Sicuro, B. (2021). World aquaculture diversity: origins and perspectives. *Reviews in Aquaculture*, 13(3), 1619–1634. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12537>
- Soler, C., & 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>
- Soler, C., Cooper, T. G., Valverde, A., & 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., García-Molina, A., Contell, J., Silvestre, M. A., & Sancho, M. (2015). The Trumorph® system: The new universal technique for the observation and analysis of the morphology of living sperm. *Animal Reproduction Science*, 158, 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2015.04.001>
- Soler, C., García-Molina, A., Sancho, M., Contell, J., Núñez, M., & 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., Picazo-Bueno, J. Á., Micó, V., Valverde, A., Bompard, D., Blasco, F. J., Álvarez, J. G., & García-Molina, A. (2018). Effect of counting chamber depth on the accuracy of lensless microscopy for the assessment of boar sperm motility. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6), 924–934. <https://doi.org/10.1071/RD17467>
- Soler, C., Valverde, A., Bompard, D., Fereidounfar, S., Sancho, M., Yániz, J. L., Garcia-Molina, A., & Korneenko-Zhilyaev, Y. A. (2017). New methods of semen analysis by casa. *Agricultural Biology*, 52(2), 232–241. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.2.232eng>
- Stickney, R. R. (1990). A global overview of aquaculture production. *Food Reviews International*, 6(3), 299–315. <https://doi.org/10.1080/87559129009540874>
- Teletchea, F. (2019). Animal domestication: A brief overview. In F Teletchea (Ed.), *Animal domestication*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86783>
- Tung, C. -K., Lin, C., Harvey, B., Fiore, A. G., Ardon, F., Wu, M., & Suarez, S. S. (2017). Fluid viscoelasticity promotes collective swimming of sperm. *Scientific Reports*, 7, Article 3152. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03341-4>
- Valverde, A., Areán, H., Fernández, A., Bompard, D., García-Molina, A., López-Viana, J., & Soler, C. (2019). Combined effect of type and capture area of counting chamber and diluent on Holstein bull sperm kinematics. *Andrologia*, 51(4), Article e13223. <https://doi.org/10.1111/and.13223>
- Valverde, A., Arenán, H., Sancho, M., Contell, J., Yániz, J., Fernández, A., & 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., & 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., & Madrigal-Valverde, M. (2018). Computer-assisted semen analysis systems in animal reproduction. *Agronomía Mesoamericana*, 29(2), 469–484. <https://doi.org/10.15517/ma.v29i2.30613>
- Valverde, A., & Madrigal-Valverde, M. (2019). Evaluación de cámaras de recuento sobre parámetros espermáticos de verracos analizados con un sistema CASA-Mot. *Agronomía Mesoamericana*, 30(2), 447–458. <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.34145>
- Valverde, A., Madrigal-Valverde, M., Lotz, J., Bompert, D., & Soler, C. (2019). Effect of video capture time on sperm kinematic parameters in breeding boars. *Livestock Science*, 220, 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.12.008>
- Valverde, A., Madrigal, M., Caldeira, C., Bompert, D., Núñez de Murga, J., Arnau, S., & Soler, C. (2019). Effect of frame rate capture frequency on sperm kinematic parameters and subpopulation structure definition in boars, analysed with a CASA-Mot system. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(2), 167–175. <https://doi.org/10.1111/rda.13320>
- Van Leeuwenhoek, A. (1679). Observaciones *D. Anthonii* Lewenhoeck, de natis'e semine genitali animalculis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 12(142), 1040–1046. <https://doi.org/10.1098/RSTL.1677.0068>
- Vasilescu, S. A., Khorsandi, S., Ding, L., Bazaz, S. R., Nosrati, R., Gook, D., & Warkiani, M. E. (2021). A microfluidic approach to rapid sperm recovery from heterogeneous cell suspensions. *Scientific Reports*, 11, Article 7917. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87046-9>
- Vasquez, E. S., Feugang, J. M., Willard, S. T., Ryan, P. L., & Walters, K. B. (2016). Bioluminescent magnetic nanoparticles as potential imaging agents for mammalian spermatozoa. *Journal of Nanobiotechnology*, 14, Article 20. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0168-y>
- Viquez, L., Barquero, V., Soler, C., Roldan, E. R. S., & Valverde, A. (2020). Kinematic sub-populations in bull spermatozoa: A comparison of classical and bayesian approaches. *Biology*, 9(6), Article 138. <https://doi.org/10.3390/biology9060138>
- Viquez, L., Barquero, V., & Valverde, A. (2021). Optimal conditions for the kinematic analysis in fresh semen of Brahman bulls with a CASA-Mot system. *Agronomía Mesoamericana*, 32(3), 920–938. <https://doi.org/10.15517/AM.V32I3.42768>
- Wallberg, A., Han, F., Wellhagen, G., Dahle, B., Kawata, M., Haddad, N., Simões, Z. L. P., Allsopp, M. H., Kandemir, I., De la Rúa, P., Pirk, C. W., & Webster, M. T. (2014). A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Genetics*, 46, 1081–1088. <https://doi.org/10.1038/ng.3077>
- Williams, B. (1996). *Descartes. El Proyecto de una investigación pura*. Cátedra.
- World Health Organization (Ed.). (2021). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* (6th ed.). <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>
- Yániz, J. L., Soler, C., Alquézar-Baeta, C., & Santolaria, P. (2017). Toward an integrative and predictive sperm quality analysis in *Bos taurus*. *Animal Reproduction Science*, 181, 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.03.022>