



## Subpopulações Espermáticas *Sperm subpopulations*

Maria Isabel Mello Martins<sup>1</sup>, Anne Kemmer de Souza, Luiz Guilherme Corsi Trautwein

Laboratório de Biotécnicas da Reprodução (REPROA), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

<sup>1</sup>Correspondência: [imartins@uel.br](mailto:imartins@uel.br)

### Resumo

A biotecnologia da reprodução é importante para melhorar a eficiência reprodutiva desenvolvendo métodos que identifiquem os melhores reprodutores. Embora a motilidade espermática seja a variável mais avaliada, é necessária a avaliação das características da cinética espermática, as quais se alteram conforme espécie, indivíduos, ejaculados e desafios a que são submetidos. Atualmente sabe-se que o ejaculado não é composto de um grupo homogêneo de espermatozoides, e sim por subpopulações espermáticas heterogêneas, as quais apresentam respostas variadas quanto aos padrões de motilidade, e a identificação dessas subpopulações pode auxiliar na escolha do reprodutor mais eficiente.

**Palavras-chave:** cinética espermática, biotécnicas sêmen, sistema CASA.

### Abstract

*Reproductive biotechnology is important for improving reproductive efficiency by developing methods that identify the best breeding. Although sperm motility is the most evaluated variable, it is necessary to evaluate the characteristics of sperm kinetics, which change according to species, individuals, ejaculates and the challenges that are submitted. It is known that ejaculate is not composed of a homogeneous group of spermatozooids, but by heterogeneous sperm subpopulations, such as varied kiosks for motility patterns, and a subpopulation identifier may aid in the selection of most efficient breeders.*

**Keyword:** sperm kinetic, semen biotechnology, CASA system.

### Introdução

As biotécnicas da reprodução são importantes ferramentas para aumentar a eficiência reprodutiva desenvolvendo métodos que identifiquem os melhores reprodutores, aumentem a fertilidade das espécies, bem como, aperfeiçoe a reprodução por meio de métodos artificiais (Farstad, 2000).

A análise computadorizada do sêmen (*Computer-assisted sperm analysis* - CASA) foi desenvolvida com o objetivo de diminuir a subjetividade da avaliação espermática, considerando a variabilidade nos padrões de movimento dos espermatozoides, dentro de um mesmo ejaculado (Mortimer, 2000). As análises realizadas pelo sistema CASA são amplamente aceitas fornecendo resultados rápidos e objetivos dos parâmetros individuais de cada célula.

Estudos que identifiquem as subpopulações espermáticas podem ser indicadores da qualidade do sêmen, considerando que espermatozoides com movimentos rápidos e lineares têm maior resistência à criopreservação e maior probabilidade de fertilizar o oócito (Mendonza et al., 2012; Ferraz et al, 2014).

A identificação das subpopulações ainda se faz relevante para selecionar os machos que possuem maior porcentagem de subpopulações superiores, resistentes a criopreservação e que se adaptem melhor às biotécnicas.

### O estudo da cinética e as subpopulações espermáticas

Os espermatozoides são células dinâmicas, com organelas desenvolvidas para o deslocamento, que apresentam diferentes padrões de movimento, visto que o batimento flagelar pode ser afetado por mudanças na fisiologia, durante a maturação, na ejaculação, no transporte no trato reprodutivo da fêmea e na fertilização (Boyers et al., 1989).

A motilidade espermática, ainda hoje, é o parâmetro mais utilizado para fornecer informações sobre qualidade do sêmen, pois demonstra a presença de movimento espermático. Contudo, mesmo sendo a primeira variável analisada, estudos tem demonstrado que é necessária a avaliação das características da cinética espermática, as quais se alteram conforme espécie, indivíduos, ejaculados e aos desafios que são submetidos. A observação apenas dos valores médios da motilidade faz com que tenham grande perda de informações por considerar o ejaculado uniforme (Amann e Graham, 1993; Martínez-Pastor et al., 2011), além de mascarar os diferentes estados bioquímicos das células, não sendo portanto uma abordagem adequada (Abaigar et al., 1999;

Mortimer, 2000; Holt; Harrison, 2002; Martínez-Pastor et al., 2011).

O desenvolvimento do sistema CASA permitiu a obtenção de informações objetivas sobre as características cinéticas dos espermatozoides presentes no ejaculado (Amann; Waberski, 2014). Na tentativa de identificar as subpopulações, vários trabalhos recentes usaram *softwares* específicos e procedimentos estatísticos multivariados para investigar melhor o ejaculado das espécies, fornecendo informações relevantes sobre as características biológicas do espermatozoide e as alterações comparando espécies (Flores et al., 2008; Vicente-Fiel et al., 2013), técnicas de colheita de sêmen (Contri et al., 2012; Vázquez et al., 2015) e mudanças nas características dessas células após a criopreservação (Núñez-Martínez et al., 2006; Martínez et al., 2006; Muiño et al., 2008; 2009; Flores et al., 2009; Dorado et al., 2011; Beirão et al., 2011; Peña et al., 2012; Ferraz et al., 2014; Gallego et al., 2017).

Diferentes populações espermáticas, com movimentações específicas, têm sido estudadas por meio da análise computadorizada do sêmen (*Computer-assisted sperm analysis - CASA*), pois este sistema permite a identificação das células espermáticas móveis e imóveis e realiza o registro individual de suas trajetórias, detectando mudanças sutis nos parâmetros, nas várias condições experimentais, aprimorando o entendimento das características de uma amostra seminal. (Kraemer et al., 1998; Ferreira, 2000).

Estudos tornaram claro que a abordagem clássica de considerar o ejaculado como população homogênea não é válido (Mortimer, 2000; Martínez et al., 2006).

O ejaculado é composto por um grupo heterogêneo de subpopulações espermáticas, as quais apresentam respostas variadas quanto aos padrões de motilidade (Quintero- Moreno et al., 2003; 2007; Martínez et al., 2006; Muiño et al., 2008a; 2009; Dorado et al., 2010; 2011a; Bravo et al., 2011; Kanuga et al., 2012; Peña et al., 2012; Maya-Soriano et al., 2015) e morfometria (Penã et al., 2005; Valle et al., 2012; Martí et al., 2012; Maroto-Morales et al., 2012; Vicente-Fiel et al., 2013).

A existência de subpopulações espermáticas tem sido reconhecida e demonstrada em ejaculados de gato (Contri et al., 2012; Souza, 2017), cão (Núñez-Martínez et al., 2006; Dorado et al., 2011b; Peña et al., 2012), garanhão (Quintero-Moreno et al., 2003), jumento (Miró et al., 2005; Flores et al., 2008), caprino (Dorado et al., 2010; Vázquez et al., 2015), carneiro (Bravo et al., 2011; Mendonza et al., 2012; Martí et al., 2012; Maroto-Morales et al., 2012; Santaloria et al., 2015), suíno (Abaigar et al., 1999; Flores et al., 2008, 2009), bovino (Muiño et al., 2009), cervo (Abaigar et al., 2001; Beracochea et al., 2014), coelho (Quintero-Moreno et al., 2007; Maya-Soriano et al., 2015) e peixes (Beirão et al., 2011; Kanuga et al., 2012; Gallego et al., 2017).

Embora a origem e a fisiologia dessas subpopulações não sejam claras, acredita-se que a diferença das células ocorra por influência genética durante a espermatogênese, e modificação da estrutura durante maturação, uma vez que há a presença de espermatozoides com idades diferentes no epidídimo (Abaigar et al., 1999; Martínez-Pastor et al., 2008). Há evidências de que a heterogeneidade do ejaculado pode ter significado funcional, assim como ter variação quanto à fertilidade do ejaculado (Thurston et al., 1999; Núñez-Martínez et al., 2006; Quintero- Moreno et al., 2007; Mendoza et al., 2012; Maya- Soriano et al., 2015; Santolaria et al., 2015; Gallego et al., 2017).

Os resultados das subpopulações são característicos de cada espécie, entretanto a maioria dos autores encontrou pequeno número de subpopulações, demonstrando semelhança dos grupos formados e alta interação entre os parâmetros. Os números de subpopulações mais estabelecidas foram três (Flores et al., 2009; Beirão et al., 2011; Kanuga et al., 2012; Beracochea et al., 2014; Vazquez et al., 2015; Santolaria et al., 2015; Gallego et al., 2017; Souza, 2017), e quatro (Flores et al., 2008; Muiño et al., 2008a,b, 2009; Dorado et al., 2011a; Peña et al., 2012; Ferraz et al., 2014; Maya-Soriano et al., 2015). Após a caracterização dos padrões de subpopulação, o uso de conjuntos de dados validados, como um guia para classificar novos conjuntos, seria preferível que repetir o processo de agrupamento.

Uma vez realizada a identificação das subpopulações é possível caracterizar os grupos de acordo com suas variáveis cinéticas. Por exemplo, uma subpopulação com alta velocidade e linearidade pode ser definida como “rápido e linear”, enquanto outro grupo com valores inferiores pode ser definido como “lento e não linear” (Martínez-Pastor et al., 2011). Muiño et al. (2008) identificaram, segundo as características da cinética espermática, quatro subpopulações em bovinos e as denominaram intermediários, hiperativados, piores e melhores. Ao definir as subpopulações, a análise se torna mais informativa e simplificada, pois ao invés de interpretar os inúmeros parâmetros que o sistema CASA fornece da cinética espermática, é possível analisar apenas a frequências dessas subpopulações na amostra.

A redução da motilidade, por exemplo, pode estabelecer uma dinâmica entre as subpopulações, marcada pela diminuição da frequência da subpopulação “rápida e linear” e aumento da subpopulação “lenta e não linear”. Com isso, a variação na frequência das subpopulações pode estar relacionada às alterações fisiológicas das células espermáticas e estar associadas à variação individual do macho, a fertilidade e a resposta à criopreservação (Quintero-Moreno et al., 2003; Martínez-Pastor et al., 2005; Nunez-Martinez et al., 2006).

Estudos que identifiquem as subpopulações espermáticas podem ser indicadores da qualidade dos espermatozoides, já que células com movimentos rápidos e lineares têm maior resistência à criopreservação e maior probabilidade de vencer as barreiras do trato reprodutivo feminino, para que ocorra a fertilização do oócito (Mendonza et al., 2012; Ferraz et al., 2014). Curry (2000) afirmou que a maior heterogeneidade de



espermatozoides dentro do ejaculado, garantiria maior potencial de fertilização. Com isso, é possível propor que alguns indivíduos, mesmo com valores de motilidade semelhantes, possam apresentar fertilidade distinta por causa da heterogeneidade do ejaculado (Holt; Van Look, 2004) ou que, subpopulações com movimentos específicos possam ter maior sucesso no processo de fertilização (de Paz et al., 2011; Ramón et al., 2013; Yáñez et al., 2015; Santaloria et al., 2015).

O objetivo final de analisar as subpopulações é poder ser testada e aplicada para entender melhor a biologia do espermatozoide. As populações espermáticas tem o papel de serem cada vez mais caracterizadas, identificando padrões com significados biológicos consistentes, assim como, relacionar as subpopulações específicas com fatores como criopreservação, capacitação e fertilização. A identificação das subpopulações ainda se faz relevante para selecionar os machos que possuam maior porcentagem de subpopulações superiores e que se desenvolvam melhor na criopreservação espermática, que possuam maior potencial de fertilização. Entretanto, é necessário clarificar o significado das subpopulações e testar se correspondem a uma realidade funcional ou fisiológica, e futuramente, as subpopulações superiores poderão ser classificadas de forma automatizadas e selecionadas para a utilização de procedimentos mais caros como a FIV e a ICSI, garantindo melhores resultados.

Embora existam resultados promissores com as subpopulações, muitos aspectos devem ser estudados em detalhes, como por exemplo, as características das análises do sistema CASA, formas de *cluster*, otimização de algoritmos, métodos de seleção das variáveis. Devem ser definidas as estruturas de agrupamento de espermatozoides de diferentes espécies, em condições fisiológicas ou não, para selecionar um conjunto de protocolos estatísticos robustos e validados para processar os dados (Martinez-Pastor et al., 2011).

Como perspectivas futuras, novos estudos devem ser elaborados no sentido de caracterizar melhor as amostras espermáticas e considerar diferentes abordagens quanto à espécie, origem, forma de colheita, diluentes, armazenamento/criopreservação e de que forma será utilizado, pois as subpopulações podem ter diferentes significados em cada um destes contextos, e será necessário o entendimento mais aprofundado desses mecanismos.

#### Referências

- Abaigar T, Holt W, Harrison R, Del Barrio G.** Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol Reprod*, v.60, p.32-41, 1999.
- Abaigar T, Cano M, Pickard AR, Holt WV.** Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize ejaculate quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhorr*): effects of body weight, electroejaculation technique and short-term semen storage. *Reproduction*, v.122, p.265-273, 2001.
- Amann RP, Graham JK.** Spermatozoal function. In: McKinnon, A., Voss, J. (Eds.), *Equine Reproduction*, Lea and Febinger, Philadelphia, p.716-721, 1993.
- Amann RP, Waberski D.** Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, v.81, p.5-17, 2014.
- Beirão J, Cabrita E, Pérez-Cerezales S, Martínez-Páramo S, Herráez MP.** Effect of cryopreservation on fish sperm subpopulations. *Cryobiology*, v.62, p.22-31, 2011.
- Beracochea F, Gil J, Sestelo A, Garde JJ, Santiago-Moreno J, Fumagalli F, Ungerfeld R.** Sperm characterization and identification of sperm sub-populations in ejaculates from pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Anim Reprod Sci*, v.149, p.224-230, 2014.
- Boyers AP, Hunter AG, Seal US, Binczik GA, Reindl NJ, Tilson RL.** In-vitro induction of capacitation of fresh and frozen spermatozoa of the Siberian tiger (*Panthera tigris*). *J Reprod Fertil*, v.86, p.599-607, 1989.
- Bravo JA, Montanero J, Calero R, Roy TJ.** Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams. *Anim Reprod Sci*, v.129, p.22-29, 2011.
- Contri A, Zambelli D, Faustini M, Cunto M, Gloria A, Carluccio A.** Artificial neural networks for the definition of kinetic subpopulations in electroejaculated and epididymal spermatozoa in the domestic cat. *Reproduction*, v.144, p.339-347, 2012.
- Curry MR.** Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod*, v.5, p.46-52, 2000.
- Dorado J, Molina I, Muñoz-Serrano A, Hidalgo M.** Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Florida goats. *Theriogenology*, v.74, p.795-804, 2010.
- Dorado J, Gálvez JM, Murabito MR, Muñoz-Serrano A, Hidalgo M.** Identification of sperm subpopulations in canine ejaculates: Effects of cold storage and egg yolk concentration. *Anim Reprod Sci*, v.127, p.106-113, 2011a.
- Dorado J, Alcaráz L, Duarte N, Portero JM, Acha D, Hidalgo M.** Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm® gradient. *Anim Reprod Sci*, v.125, p.211-218, 2011b.
- Farstad W.** Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim Reprod Sci*, v.60-61, p.375-387, 2000.



- Ferraz MAMM, Morató R, Yeste M, Arcarons N, Pena AI, Tamargo C, Hidalgo CO, Muiño R, Mogas T.** Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to in vitro sperm–oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. *Theriogenology*, v.81, p.1067-1072, 2014.
- Ferreira JCP.** Avaliação subjetiva e computadorizada do movimento espermático pós-descongelamento do sêmen equino. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 93p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, 2000.
- Flores E, Taberner E, Rivera MM, Peña A, Rigau T, Miró J, Rodríguez-GIL JE.** Effects of freezing/thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. *Theriogenology*, v.70, p.936-945, 2008.
- Flores E, Fernández-Novell JM, Peña A, Rodríguez-Gil JE.** The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. *Theriogenology*, p.72, v.784-797, 2009.
- Gallego V, Cavalcante SS, Fujimoto RY, Carneiro PCF, Azevedo HC, Maria AN** Fish sperm subpopulations: Changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Theriogenology*, v.87, p.16-24, 2017.
- Holt WV, Harrison RAP.** Bicarbonate stimulation of boar sperm motility via a protein kinase A-dependent pathway: between-cell and between-ejaculate differences are not due to deficiencies in protein kinase A activation. *J Androl*, v.23, p.557-565, 2002.
- Holt WV, Van Look KJW.** Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction*, v.127, p.527-535, 2004.
- Kanuga MK, Drew RE, Wilson-Leedy JG, Ingermann RL.** Subpopulation distribution of motile sperm relative to activation medium in steelhead (*Oncorhynchus mykiss*). *Theriogenology*, v.77, p.916-925, 2012.
- Kraemer M, Fillion C, Martin-Pont B, Auger J.** Factors influencing human sperm kinematic measuring by the celltrak computer-assisted sperm analysis system. *Hum Reprod*, v.13, p.611-619, 1998.
- Maroto-Morales A, Ramón M, García-Álvarez O, Solera AJ, Fernández-Santosa MR, Roldanc ERS, Gomendio M, Pérez-Guzmán MD Gardea JJ.** Morphometrically-distinct sperm subpopulations defined by a multistep statistical procedure in ram ejaculates: Intra- and interindividual variation. *Theriogenology*, v.77, p.1529-1539, 2012.
- Martí JI, Aparicio IM, Leal CLV, García-Herrerose M.** Seasonal dynamics of sperm morphometric subpopulations and its association with sperm quality parameters in ram ejaculates. *Theriogenology*, v.78, p.528-541, 2012.
- Martínez IN, Moran JM, Pena FJ.** Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. *J Androl*, v.27, p.596-603, 2006.
- Martínez-Pastor F, Diaz-Corujo A, Ane, E, Herraes P, Anel L, de Paz P.** Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. *Theriogenology*, v.64, p.958-974, 2005.
- Martínez-Pastor F, Cabrita E, Soares F, Anel L, Dinis MT.** Multivariate cluster analysis to study motility activation of *Solea senegalensis* spermatozoa: a model for marine teleosts. *Reproduction*, v.135, p.449-459, 2008.
- Martínez-Pastor F, Tizado EJ, Garde JJ, Anel L, Paz P.** Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology*, v.75, p.783-795, 2011.
- Maya-Soriano MJ, Taberner E, Sabés-Alsina M, Ramon J, Rafel O, Tusell L, Piles M, López-Béjar M.** Daily exposure to summer temperatures affects the motile subpopulation structure of epididymal sperm cells but not male fertility in an in vivo rabbit model. *Theriogenology*, v.84, p.384-389, 2015.
- Mendoza N, Casao A, Del Valle I, Serrano E, Nicolau S, Assumpção MEOA, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA, Pérez-Pé R.** Quality characteristics and fertilizing ability of ram sperm subpopulations separated by partition in an aqueous two-phase system. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, v.880, p.74-81, 2012.
- Miró J, Lobo V, Quintero-Moreno A, Medrano A, Peña A, Rigau T.** Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen. *Theriogenology*, v.63, p.1706-1716, 2005.
- Mortimer ST.** Casa – Practical aspects. *J Androl*, 21, 515-24, 2000.
- Muiño R, Tamargo C, Hidalgo CO, Peña AI.** Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: effects of cryopreservation and between-bull variation. *Anim Reprod Sci*, v.109, p.27-39, 2008a.
- Muiño R, Peña AI, Rodríguez A, Tamargo C, Hidalgo CO.** Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. *Theriogenology*, v.72, p.860-868, 2009.
- Nunez-Martínez I, Moran J, Pena F.** A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. *Reprod Domest Anim*, v.41, p.408-415, 2006.
- de Paz P, Mata-Campuzano M, Tizado EJ, Alvarez M, Alvarez-Rodríguez M, Herraes P, Anel L.** The relationship between ram sperm head morphometry and fertility depends on the procedures of acquisition and analysis used. *Theriogenology*, v.76, p.1313-1325, 2011.



- Penã FJ, Saravia F, Garcia Herreros M, Nunez-Martinez I, Tapia JA, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H.** Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to post thaw quality. *J Androl*, v.26, p.716-723, 2005.
- Peña AI, Barrio M, Becerra JJ, Quintela LA, Herradón PG.** Motile sperm subpopulations in frozen-thawed dog semen: Changes after incubation in capacitating conditions and relationship with sperm survival after osmotic stress. *Anim Reprod Sci*, v.133, p.214-223, 2012.
- Quintero-Moreno A, Miro J, Rigau T, Rodriguez-Gil JE.** Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, v.59, p.1973-1990, 2003.
- Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodriguez-Gil J.** Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulations in rabbit semen and to predict semen fertility and litter size. *Reprod Domest Anim*, v.42, p.312-319, 2007.
- Ramón M, Soler AJ, Ortiz JA, García-Alvarez O, Maroto-Morales A, Roldán ER, Garde JJ.** Sperm population structure and malefertility: an intraspecific study of sperm design and velocity in reddeer. *Biol Reprod*, v.89, p.110, 2013.
- Santolaria P, Vicente-Fiel S, Palacín I, Fantova E, Blasco ME, Silvestre MA, Yániz JL.** Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. *Anim Reprod Sci*, v.163, p.82-88, 2015.
- Souza AK.** Efeito da refrigeração sobre a qualidade e as subpopulações esperáticas de felinos domésticos. Londrina: 2017. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina (UEL), 2017.
- Thurston LM, Watson PF, Holt WV.** Sources of variation in the morphological characteristics of sperm subpopulations assessed objectively by a novel automated sperm morphology analysis system. *J Reprod Fertil*, v.117, p.271-280, 1999.
- Valle RR, Nayudu PL, Leal CL, García-Herreros M.** Sperm head morphometry in ejaculates of adult marmosets (*Callithrix jacchus*): A model for studying sperm subpopulations and among-donor variations. *Theriogenology*, v.78, p.1152-1165, 2012.
- Vázquez AJ, Cedillo MJ, Quezada VJ, Rivas AC, Morales EC, Ayala EM, Hernández MJ, González RA, Aragón MA.** Effects of repeated electroejaculations on kinematic sperm subpopulations and quality markers of Mexican creole goats. *Anim Reprod Sci*, v.154, p.29-38, 2015.
- Vicente-Fiel S, Palacín I, Santolaria P, Yániz JL.** A comparative study of sperm morphometric subpopulations in cattle, goat, sheep and pigs using a computer-assisted fluorescence method (CASMA-F). *Anim Reprod Sci*, v.139, p.182-189, 2013.
- Yániz JL, Palacín I, Vicente-Fiel S, Sánchez-Nadal JA, Santolaria P.** Sperm population structure in high and low field fertility rams. *Anim Reprod Sci*, v.156, p.128-134, 2015.
-