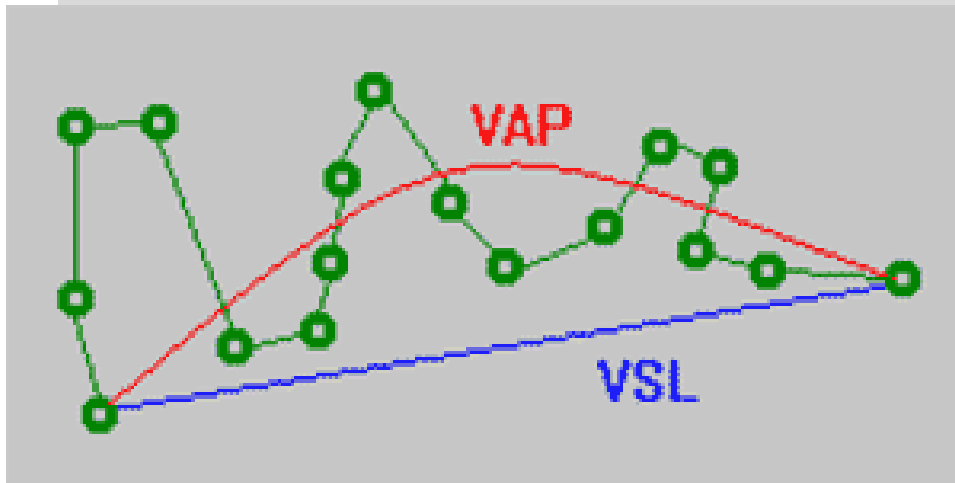


3

Análisis de semen asistido por computadora de camélidos

Hernán Cucho¹

¹Escuela Profesional de Zootecnia, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Perú
E-mail: hernan.cucho@unsaac.edu.pe



RESUMEN

Los sistemas computarizados de análisis seminal (CASA), desarrollados hace más de cuarenta años, para su uso en humanos, y luego de empleo creciente en animales, nos permiten realizar evaluaciones objetivas de la calidad espermática, de suerte que las evaluaciones de cinética de los espermatozoides, morfología, morfometría, concentración, fragmentación del ADN, entre otras, sean más precisas y se puedan analizar en menor tiempo, además nos proporcionan abundante data a ser usada en investigación básica y aplicada. La información obtenida de los sistemas CASA, nos ha permitido conocer que los eyaculados no son homogéneos, y por ende la existencia de subpoblaciones espermáticas por su cinética y morfometría, también nos han permitido el estudio de los patrones de movimiento de los espermatozoides, y ser empleada en trabajos de biología evolutiva.

Palabras clave: CASA, semen, calidad espermática

ABSTRACT

Computer-assisted semen analysis (CASA), developed more than forty years ago, for use in humans, and after increasing employment in animals, allow us to make objective evaluations of the seminal quality, so that the

kinematic evaluations of the spermatozoa, morphology, morphometry, concentration, DNA fragmentation, among others, are more accurate and can be analyzed in less time, in addition they provide abundant data to be used in basic and applied research. The information obtained from CASA systems has allowed us to know that ejaculates are not homogeneous, and therefore the existence of sperm subpopulations due to their kinematics and morphometry, also allowed us to study the patterns of movement of spermatozoa, and to be employed in works of evolutionary biology.

Keywords: CASA, semen, sperm quality

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de los primeros sistemas computarizados de análisis de semen (CASA) fue realizado por 1974 (Amann, 1979). El primer reporte empleando estos sistemas ocurrió en 1985 (Katz *et al.*, 1985). Es a partir de los años 2000, que estos sistemas se posicionan como instrumentos para el análisis seminal, primero en humanos (Mortimer, 2000), y posteriormente en animales.

En la mayoría de las especies, existe variabilidad a nivel intra e interindividual en los análisis seminales, los que se

incrementan al realizar una evaluación subjetiva en éstos, el uso de sistemas objetivos (CASA) nos permite mejorar la confiabilidad de los datos reproductivos (Valverde y Madrigal-Valverde, 2018). El objetivo de este trabajo es realizar una revisión de los usos de los sistemas de análisis computarizados de semen en animales.

CARACTERÍSTICAS DE LOS SISTEMAS CASA

La característica de un sistema de análisis de semen es que éste comprende aspectos de soporte (hardware) y la programación asociada (software), éstos sirven para diferenciar los diversos sistemas CASA (Valverde y Madrigal-Valverde, 2018).

Para la captura de imágenes, se necesita una cámara de video, en ésta es importante la resolución y la velocidad de captura de imágenes por segundo. En relación a la microscopía en la mayor parte de especies ganaderas (vacuno, alpaca, entre otros) requieren una iluminación de contraste de fase negativo (Valverde y Madrigal-Valverde, 2018).

En su mayoría los sistemas CASA, poseen módulos para el análisis de la movilidad espermática, concentración, vitalidad y morfología, y en algunos casos de fragmentación del ADN.

PRINCIPALES EVALUACIONES EN LOS SISTEMAS CASA

Movilidad

Dependiendo de los sistemas CASA, en el módulo de movilidad, podremos configurar la especie animal de la cual queremos realizar el análisis, como vacuno, ovino, conejo, cerdo, entre las principales; al emplear una configuración específica ya se consideran límites de velocidad para considerar si un espermatozoide es rápido, medio o lento.

En algunos sistemas como el ISAS® (Proiser R+D), se pueden modificar dichos límites, configurar el tamaño de las partículas a analizar o configurar la cantidad de imágenes capturadas por segundo.

El análisis de movilidad nos permitirá conocer el porcentaje de los espermatozoides móviles, móviles progresivos y estáticos, así como también la cinética de los espermatozoides.

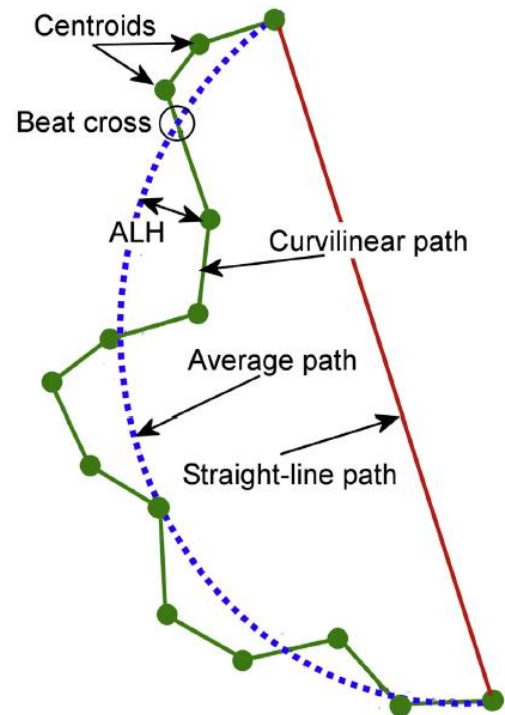


Figura 1. Ilustración de algunos de los parámetros de motilidad evaluados por los sistemas CASA (Amann y Waberski, 2014).

En la figura 1, los círculos verdes, muestran la localización más probable de los centroides en las imágenes capturadas, conectando los centroides de un espermatozoide, nos muestra la trayectoria real de éste, denominada trayectoria curvilínea; la velocidad promedio a lo largo de la trayectoria se llama velocidad curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$). La trayectoria promedio se estima y la velocidad promediada en el tiempo en dicha trayectoria se denomina velocidad de trayectoria media (VAP; $\mu\text{m/s}$), en este caso es la línea de color azul. La línea roja representa la velocidad de línea recta (VSL; $\mu\text{m/s}$), que viene a ser la velocidad a lo largo de la trayectoria entre el punto inicial y final de la trayectoria del espermatozoide (Amann y Waberski, 2014; Valverde y Madrigal-Valverde, 2018).

En cada posición del centroide hay una desviación de la trayectoria media, y se llama amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH; μm). Los puntos donde la trayectoria curvilínea, interseca la trayectoria promedio, el número de estas intersecciones se denomina, frecuencia de cruzamientos o frecuencia de batido de la cola (BCF, Hz), (Amann y Waberski, 2014). Ya que la forma de la trayectoria influye en los valores de velocidad, estos también se comparan, y se calculan tres índices, el índice de linealidad ($\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL}$), de rectitud ($\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP}$) y el índice de oscilación ($\text{WOB} = \text{VAP}/\text{VCL}$), éstas sirven para caracterizar la calidad del movimiento espermático (Mortimer, 2000).

Tabla 1: Parámetros de movimientos espermático medido con sistema CASA en cinco machos y durante estación reproductiva de alpaca (Meza et al., 2018).

| Animal | VCL ($\mu\text{m/s}$) | VSL ($\mu\text{m/s}$) | VAP ($\mu\text{m/s}$) | LIN (%) | STR (%) | WOB (%) | ALH (μm) | BCF (Hz) |
|--------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|
| 1 | 63.0 ^d ±32.5 | 16.3 ^e ±11.9 | 32.0 ^d ±17.7 | 27.9 ^b ±16.3 | 51.4 ^{bc} ±22.1 | 52.4 ^c ±14.3 | 3.26 ^d ±1.4 | 4.43 ^c ±2.8 |
| 2 | 61.3 ^c ±31.7 | 15.4 ^c ±10.9 | 30.6 ^b ±16.6 | 27.9 ^b ±16.7 | 51.7 ^c ± 22.4 | 52.0 ^a ±14.7 | 3.21 ^c ±1.4 | 4.29 ^b ±2.8 |
| 3 | 60.2 ^b ±29.2 | 16.1 ^d ±11.0 | 31.1 ^c ±16.4 | 28.5 ^c ±15.6 | 52.4 ^d ±21.0 | 53.0 ^d ±13.6 | 3.18 ^b ±1.3 | 4.78 ^d ±2.8 |
| 4 | 63.6 ^e ±33.5 | 15.3 ^b ±11.3 | 31.9 ^d ±18.2 | 26.5 ^a ±16.6 | 48.8 ^a ±22.2 | 52.2 ^{ab} ±14.8 | 3.33 ^e ±1.5 | 4.15 ^a ±2.5 |
| 5 | 58.7 ^a ±32.4 | 14.8 ^a ±11.1 | 29.4 ^a ±17.4 | 27.7 ^b ±16.9 | 51.1 ^b ±22.2 | 52.3 ^{bc} ±15.1 | 3.09 ^a ±1.4 | 4.32 ^b ±2.9 |
| Total | 61.4±31.9 | 15.8±11.2 | 31.0±17.3 | 27.7±16.4 | 51.1±22.0 | 52.4±14.5 | 3.21±1.4 | 4.39±2.8 |
| CV% | 51.95 | 70.88 | 55.81 | 59.21 | 43.0 | 27.7 | 43.6 | 63.8 |

En los análisis de movilidad, existen dos factores que influyen en sus resultados, el tipo de cámara de análisis, y la velocidad con que son tomados los fotogramas (Bompart et al., 2018)

El uso combinado de los sistemas CASA y la estadística multivariada, ha permitido la determinación de subpoblaciones espermáticas por su cinética (Valverde y Madrigal-Valverde, 2018), se han realizado estudios en diferentes especies animales, como mono titi, conejo, equino, cerdo, toros, caprinos, ovinos, entre otros (Abaigar et al., 1999; Quintero Moreno, 2003; Muiño et al., 2008; Dorado et al., 2010; Bravo et al., 2011), los que han demostrado que los eyaculados no se comportan como una población uniforme.

Con las trayectorias de los espermatozoides, se puede determinar los patrones de movimiento espermático al ser sometidos estos, a procesos de incubación, capacitación o hiperactivación, estudios que se realizaron en conejos (Lezcano, 1998), ratones (Goodson et al., 2011), macacos Rhesus (Baumber y Meyers, 2006), alpacas (Calderón, 2015).

Concentración

Los sistemas CASA, generalmente poseen un módulo para evaluar la concentración, y para este fin se utilizan cámaras usadas en el análisis de movilidad, o cámaras de Neubauer, Makler o Spermtrack®, las cuales pueden ser configuradas en el equipo. Las ventajas y desventajas de su empleo han sido reportadas por Soler et al., (2012); Sorensen et al., (2013).

Morfología y morfometría

Los análisis de la morfología del espermatozoide, es una prueba de control, que muestra el estado funcional de los testículos, epidídimo y glándulas sexuales de los reproductores (Valverde y Madrigal-Valverde, 2018). Las

primeras evaluaciones de la morfología de un espermatozoide, el humano, fue realizado en 1954 por MacLeod y Gold, en este trabajo clasificaron las células como normales y no funcionales, aunque sus criterios fueron subjetivos (Soler y Cooper, 2016).

En los últimos años se ha desarrollado una técnica para poder observar las células espermáticas sin la necesidad de teñirlas y poder determinar su morfología, empleando el Trumorph® (Soler et al., 2015, 2016), la muestra luego es evaluada usando una iluminación de contraste de fase negativo.

El uso habitual de los sistemas CASA, en la evaluación de la morfología y morfometría de los espermatozoides, empezó por los años 2000 (Soler et al., 2000). La evaluación de la morfometría de un espermatozoide nos permite detectar alteraciones en la espermiogénesis y en la maduración epididimaria (Hidalgo et al., 2006), lo que permitiría una eficiente selección de reproductores.

Para evaluar un espermatozoide es necesario fijarlo y teñirlo, para distinguir sus diferentes componentes, cabeza, pieza intermedia, cola, acrosoma (Valverde y Madrigal-Valverde, 2018), para ello se puede usar hematoxilina de Harris, Diff Quik®, Hemacolor®, estas tinciones tienen influencia en la identificación de las diferentes áreas de las células espermáticas (Maroto-Morales et al., 2016).

Los módulos de morfometría de los sistema CASA, nos determinan características de tamaño de la cabeza (longitud, anchura, perímetro y área), de forma (elipticidad, elongación, regularidad y rugosidad), también nos dan información de la proporción de acrosoma en relación a la cabeza; sistemas como el ISAS®, proporcionan información de la pieza intermedia (área y anchura), la distancia de inserción de la pieza intermedia en la cabeza y su ángulo en que están insertados (Soler et al, 2005) (figura 2).

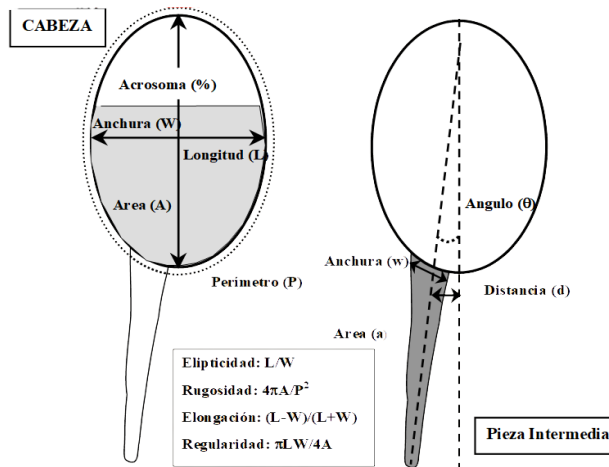


Figura 2. Parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide (Soler *et al.*, 2005).

En la figura 2, se muestran los parámetros de tamaño de la cabeza del espermatozoide: anchura (W ; μm), longitud (L ; μm), perímetro (P ; μm), área (A ; μm^2), el porcentaje de acrosoma, los parámetros de forma: elipticidad, rugosidad, elongación y regularidad, que son adimensionales. Los parámetros de la pieza intermedia del espermatozoide: distancia (d ; μm), anchura (w ; μm), área (a ; μm^2) y ángulo de inserción (θ ; $^\circ$). La figura 3, muestra las imágenes teñidas y luego digitalizadas de los espermatozoides de alpaca por un sistema CASA.

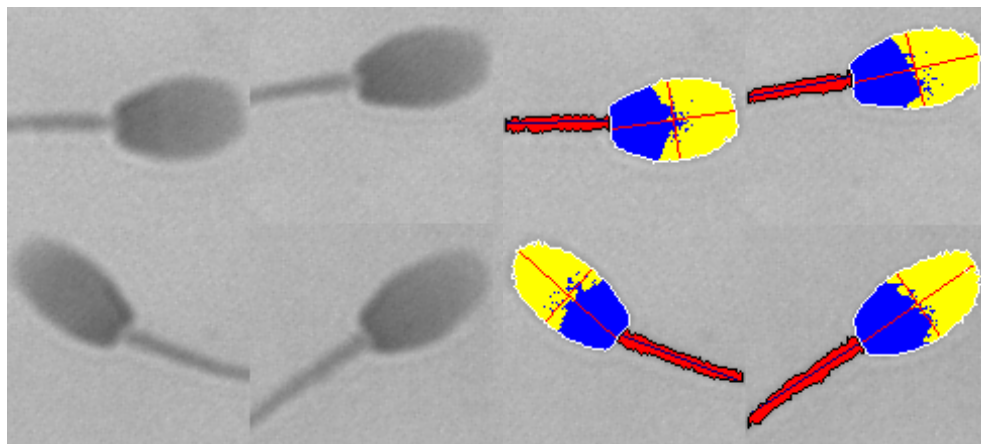


Figura 3. Espermatozoides de alpaca teñidos con Hemacolor. Izquierda imágenes capturadas en el microscopio, derecha imágenes digitalizadas con un sistema ISAS®.

Uno de los avances en la evaluación de la morfometría de los espermatozoides, ha sido el uso combinado de microscopía de fluorescencia y el análisis de las imágenes. El uso de tinciones fluorescentes mejora el contraste entre el espermatozoide y el fondo, lo que permite una selección más precisa de éstos (Yániz *et al.*, 2016b).

Al evaluar la morfometría de los espermatozoides, se considera a éstos como una población homogénea, con una distribución normal, lo cual es erróneo, ya que también muestran subpoblaciones espermáticas (Valle *et al.*, 2012); se reportan estudios en especies domésticas como bovinos y ovinos (Rubio-Guillen *et al.*, 2007; Marti *et al.*, 2011; Maroto-Morales *et al.*, 2012) y en especies silvestres como ciervos rojos o pumas (Esteso *et al.*, 2009; Cucho *et al.*, 2016).

La morfometría de espermatozoide también puede ser empleada en estudios de biología evolutiva (Yániz *et al.*,

2016a), como lo reportaron Sanchez *et al.*, (2012) y Soler *et al.*, (2017)

Fragmentación del ADN espermático

La integridad del ADN del espermatozoide es un parámetro indicador de la calidad seminal y la fecundidad. Algunos estudios indican que el daño en éste está asociado con anomalías en los parámetros seminales convencionales, la integridad del ADN y la cromatina espermática son esenciales para la correcta transmisión de la información genética a las generaciones futuras (Kodama *et al.*, 1997; Irvine *et al.*, 2000).

La fragmentación del ADN se basa en la producción de un halo periférico de dispersión del material genético en los espermatozoides que lo tengan fragmentado después de un tratamiento de lisis (Valverde y Madrigal-Valverde, 2018) (figura 4).

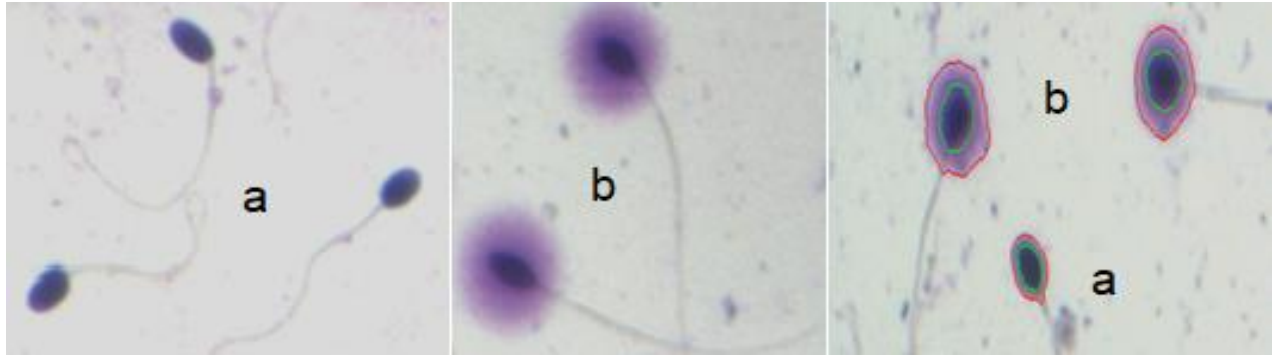


Figura 4. Imágenes de espermatozoides de alpaca fragmentados con Halomax® camel, evaluados en un ISAS® (Huanca, 2015)

En la figura 4, se muestran espermatozoides de alpacas, después de fragmentarlos, los espermatozoides sin halo (a) están intactos, y los espermatozoides con halo (b) se hallan fragmentados. La técnica de la SCD (Sperm chromatin dispersion) fue desarrollada para espermatozoides de humanos (Fernández *et al.*, 2003), y luego ha sido usado en toros, verracos, llamas, alpacas y otras especies animales. Los módulos de fragmentación del ADN de los sistemas CASA, nos permite una valoración rápida de esta variable, y con el uso de kits comerciales su empleo es sencillo.

CONCLUSION

El empleo de los sistemas CASA en la valoración objetiva de la calidad espermática de los animales, ha permitido que las evaluaciones de la cinética de los espermatozoides, morfología, morfometría, concentración, vitalidad, integridad acrosomal y de las membranas, la fragmentación del ADN, sean más precisas y se puedan analizar en menor tiempo, además de proporcionar abundante información a ser usada en investigación básica y aplicada.

REFERENCIAS

- Abaigar T, Holt WV, Harrison RA, 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.* 1999; 60(1): 32 – 41
- Amann RP. Computerized measurement of sperm velocity and percentage of motile sperm. In: Fawcett DW, Bedford GM, editors. *The spermatozoon*. Baltimore, MD: Urban & Schwarzenberg. 1979. P 431 – 435.
- Amann RP, Waberski D. Computer – assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potencial developments. *Theriogenology.* 2014; 81(1): 5 – 17.
- Bamber J, Meyers S. Hyperactivated motility in rhesus macaque (*Macaca mulatta*) spermatozoa. *J Androl.* 2006; 27(3): 459-468.
- Bompart D, García-Molina A, Valverde A, Caldeira C, Yániz J, Núñez de Murga M, Soler C. CASA-Mot technology: how results are affected by the frame rate and counting chamber. *Reprod Fertil Dev.* 2018; 30 (6):810-819.
- 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.* 2011; 129 (1-2): 22 – 29.
- Calderón N. Caracterización de patrones de movimiento de espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis Facultad de Agronomía y Zootecnia. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Cusco. Perú. 2015.
- Cucho H, Alarcón V, Ordóñez C, Ampuero E, Meza A, Soler C. Puma (*Puma concolor*) epididymal sperm morphometry. *Asian J Androl.* 2016; 18(6):879-881
- Dorado J, Molina I, Muñoz-Serrano A, Hidalgo M. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Florida goats. *Theriogenology.* 2010; 74(5): 795 – 804
- Esteso MC, Fernández-Santos MR, Soler AJ, Montoro V, Martínez-Pastor F, Garde JJ. Identification of sperm-head morphometric subpopulations in iberian red deer epididymal sperm samples. *Reprod Domest Anim.* 2009; 44(2):206-211.
- Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vázquez R. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl.* 2003; 24(1): 59-66
- Goodson S, Zhang Z, Tsuruta J, Wang W, O'Brien D. Classification of mouse sperm motility patterns using an automated multiclass support vector machines model. *Biol Reprod.* 2011; 84 (6): 1207-1215.
- Hidalgo M, Rodríguez I, Dorado J, Soler C. Morphometric classification of Spanish Thoroughbred stallion semen according to sperm head size measurements. *Anim Reprod Sci.* 2006; 94(1-4): 26-28.
- Huanca N. Índice de fragmentación de ADN espermático en semen de alpacas (*Vicugna pacos*) utilizando el Integrated Semen Analysis System – ISAS. Tesis Facultad

- de Agronomía y Zootecnia. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Cusco. Perú. 2015.
- Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl.* 2000; 21(1):33-44.
 - Katz DF, Davis RO, Delandmeter BA, Overstreet JW. Real-time analysis of sperm motion using automatic video image digitization. *Comp Meth Prog Biomed.* 1985; 21(3): 173-182.
 - Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril.* 1997; 68(3):519-524
 - Lezcano V. Caracterización de los patrones de movimiento de espermatozoides epididimarios de conejo doméstico capacitados in vitro. Tesis Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa. México. 1998.
 - Martí JL, Aparicio IM, García-Herreros M. Sperm morphometric subpopulations are differentially distributed in rams with different maturity age in cryopreserved ejaculates. *Theriogenology.* 2011; 76(1):97-109
 - Mortimer S. CASA - Practical aspects. *J. Androl.* 2000; 21 (4): 515-524
 - Maroto-Morales A, Ramón M, García Álvarez O, Soler AJ, Fernández-Santos MR, Roldan ER, Gomendio M, Pérez-Guzmán MD, Garde JJ. Morphometrically-distinct sperm subpopulations defined by a multistep statistical procedure in ram ejaculates: intra- and interindividual variation. *Theriogenology.* 2012; 77(8):1529-1539.
 - Maroto-Morales A, García-Álvarez O, Ramón M, Martínez-Pastor F, Fernández-Santos M, Soler A, Garde. Current status and potencial of morphometric sperm analysis. *J. Asian Journal of Andrology.* 2016; 18 (6): 863-870.
 - 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.* 2008; 109 (1-4): 27-39.
 - Quintero-Moreno a, Miró J, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology.* 2003; 59(9): 1973 – 1990
 - Rubio-Guillén J, González D, Garde JJ, Esteso MC, Fernández-Santos MR, Rodríguez-Gil JE, Madrid-Bury N, Quintero-Moreno A. Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reprod Domest Anim.* 2007; 42 (4):354-357.
 - Sanchez MV, Bastir M, Roldan ERS. Geometric morphometrics of rodent sperm head shape. *PLoSOne.* 2013; 8(11): e80607. doi:10.1371/journal.pone.0080607.
 - Soler C, Fuentes MC, Sancho M, García A, Núñez de Murga M, Núñez de Murga J. Objective evaluation of the morphology of human epididymal sperm heads. *Int J Androl.* 2000; 23 (2): 77-84.
 - Soler C, Gaßner P, Nieschlag E, de Montserrat JJ, Gutiérrez R, Sancho M, Buendía P, Álvarez JG, Behre HM, Cooper TG. Utilización del Integrated Semen Analysis System (ISAS®) para el análisis morfométrico espermático humano y su significado en las técnicas de reproducción asistida. *Rev Int Androl.* 2005; 3(3): 112-119.
 - Soler C, Fuentes MC, Sancho M, García A, Núñez de Murga M, Núñez de Murga J. Efecto de la cámara de recuento utilizada sobre los parámetros espermáticos, analizados con el ISASv1®. *Rev Int Androl.* 2012; 10 (4): 132-138.
 - Soler C, García-Molina A, Contell J, Silvestre MA, Sancho M. The Trumorph® system: The universal technique for the observation and analysis of the morphology of living sperm. *Anim Reprod Sci.* 2015; 158 : 1-10
 - Soler C, Cooper TG. Foreword to Sperm morphometrics today and tomorrow special issue in Asian Journal of Andrology. *Asian J Androl.* 2016; 18(6): 815-816.
 - Soler C, García-Molina A, Sancho M, Contell J, Núñez M, Cooper TG. A new technique for analysis of human sperm morphology in unstained cells from raw. *Reprod Fertil Dev.* 2016; 28 (4):428-433.
 - Soler C, Alambiaga A, Martí MA, García-Molina A, Valverde A, Contell J, Campos M. Dog sperm head morphometry: its diversity and evolution. *Asian J Androl.* 2017; 19(2):149-153.
 - Sørensen SR, Gallego V, Butts IAE, Tomkiewicz J, Asturiano JF. Evaluation of methods to determine sperm density for the european eel, *Anguilla anguilla*. *Reprod Domest Anim;* 48 (6): 936-944.
 - 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.* 2012; 78 (5):1152 - 1165.
 - Valverde A, Madrigal-Valverde M. Sistemas de análisis computarizado de semen en la reproducción animal. *Agron. Mesoam.* 2018; 29(2):469-484.
 - Yániz JL, Soler C, Santolaria P. Computer assisted sperm morphometry in mammals: A review. *Anim Reprod Sci.* 2015; 156: 1-12.
 - Yániz JL, Vicente-Fiel S, Soler C, Recreo P, Carretero T, Bono A, Berné JM, Santolaria P. Comparison of different statistical approaches to evaluate morphometric sperm subpopulations in men. *Asian J Androl.* 2016a; 18(6): 819-823.
 - Yániz JL, Capistrós S, Vicente-Fiel S, Hidalgo CO, Santolaria P. A comparative study of the morphometry of sperm head components in cattle, sheep, and pigs with a computer-assisted fluorescence method. *Asian J Androl.* 2016b; 18 (6): 840-843.