

RELACIÓN ENTRE VARIABLES SUBJETIVAS E INFORMATIZADAS DEL MOVIMIENTO ESPERMÁTICO DEL MORUECO

RELATIONS AMONG THE SUBJECTIVE AND COMPUTER-ASSISTED VARIABLES OF RAM SPERM MOTILITY

Bravo, J.A.^{1*}, Montanero, J.², Calero, R.¹ y Roy, T.J.³

¹CENSYRA. Consejería de Agricultura y Desarrollo Rural. Junta de Extremadura. Badajoz. España.

*juanandres.bravo.delgado@extremadura.es

²Departamento de Matemáticas. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. Badajoz. España.

³Departamento de Medicina Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. Cáceres. España.

PALABRAS CLAVES ADICIONALES

Espermatozoide. CASA.

ADDITIONAL KEYWORDS

Spermatozoa. CASA.

RESUMEN

En este trabajo se analizan las relaciones existentes entre las variables de movilidad espermática en eyaculados de moruecos de raza Île de France a lo largo de un año, obtenidas mediante análisis subjetivo y por el sistema informatizado ISAS® (*Integrated Semen Analysis System*). Los resultados muestran una fuerte asociación entre parámetros del mismo tipo, siendo el coeficiente de correlación $r > 0,80$ ($p < 0,01$) cuando la relación se produce entre velocidad rectilínea (VSL) y velocidad media (VAP), entre el porcentaje de espermatozoides estáticos (EST) y rápidos (RAP) y entre movilidad masal (MM) y movilidad individual (MI). Las asociaciones que aparecen entre grupos de distinta clase (velocidades vs. variables expresadas en porcentaje) son moderadas o bajas en el caso de que existan; sin embargo también son elevadas las que aparecen entre el índice de linealidad (LIN) y la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) ($r = -0,866$, $p < 0,01$) y entre MI y RAP ($r = 0,799$, $p < 0,01$). A la vista de los resultados se puede decir que existe concordancia entre los parámetros determinados de manera subjetiva y los aportados por el sistema informatizado CASA, siendo MI el parámetro subjetivo que mejor explica las variables obtenidas por ISAS®.

SUMMARY

The present study examines the existing

relationships among sperm motility variables in ejaculates from Île de France rams throughout a year, obtained by means of both subjective analysis and computer-assisted system ISAS® (*Integrated Semen Analysis System*). The results show a strong association among parameters of the same kind, being the correlation coefficient $r > 0.80$ ($p < 0.01$) when the relationship occurs between linear velocity (VSL) and average path velocity (VAP), between percentage of inmovil spermatozoa (EST) and rapid spermatozoa (RAP), and between masal motility (MM) and individual motility (MI). The relationships among groups of a different kind (velocities vs. variables expressed as percentages) are moderate or low, when existent; however, those between linearity (LIN) and lateral head displacement (ALH) ($r = -0.866$, $p < 0.01$) and between MI and RAP ($r = 0.799$, $p < 0.01$) are high. In view of the results, it may be stated that there exists a concordance between the parameters subjectively established and those provided by computer-assisted system CASA, being MI the subjective parameter that best explains the variables obtained by ISAS®.

INTRODUCCIÓN

Las técnicas analíticas convencionales para la realización de un espermiograma están sujetas a un cierto grado de imprecisión.

sión. Entre otras circunstancias que determinan la inconsistencia y la escasa capacidad de predicción de la fecundidad de un morueco están la falta de objetividad y repetibilidad de las pruebas, la necesidad de técnicos experimentados, el reducido número de espermatozoides analizados por muestra y la falta de criterios universales de análisis laboratoriales. Para evitar en la medida de lo posible estos inconvenientes se introducen, a finales de los años 70, sistemas asistidos por ordenador diseñados para analizar las trayectorias de los espermatozoides móviles, denominados genéricamente CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) (Amann y Katz, 2004).

Una de las dificultades del manejo de los mencionados sistemas informatizados estriba en que los usuarios deben *conocer* la importancia de la estandarización y del control de calidad. Debe existir un entrenamiento previo en el manejo del equipo, y además ese entrenamiento debe comprender la manipulación de la muestra (ESHRE, 1998; Versteegen *et al.*, 2002). En principio hay que saber que los equipos difieren ampliamente entre ellos; varía su óptica, los aumentos, el contraste, la iluminación, el software y algoritmos utilizados para reconstruir las trayectorias espermáticas, etc. A su vez, el tipo de movimiento de cada espermatozoide es diferente, de aquí que la aplicación de un mismo algoritmo a todos ellos hace sobrestimar o infravalorar la trayectoria, produciendo errores en el cálculo de los parámetros de movilidad y, consecuentemente, en los índices que dependen de éstos. Así, de la dificultad de estandarización, y por consiguiente de comparación de los resultados obtenidos mediante un sistema CASA, dan ejemplo las diversas condiciones en las que se han desarrollado los trabajos consultados en distintas especies animales y en el hombre (Davis y Katz, 1992; Tuli *et al.*, 1992; Mortimer, 1997; Farrell *et al.*, 1998; De Geyter *et al.*, 1998; Abaigar *et al.*, 1999; Sánchez-Partida *et al.*, 1999; Hirai *et al.*, 2001; Wijchman *et al.*, 2001).

Con este trabajo se pretende realizar un estudio de las relaciones entre las variables de movilidad de los espermatozoides del eyaculado del morueco de raza Île de France, utilizando tanto la analítica convencional como los actuales sistemas informatizados de análisis de imagen. Todo ello a fin de valorar la posibilidad del uso de dichos sistemas para evaluar de forma rápida y estandarizada la calidad de los eyaculados en las condiciones rutinarias de trabajo de los centros de inseminación ovina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se ha realizado en las instalaciones del Centro de Selección y Reproducción Animal (CENSYRA) dependiente de la Junta de Extremadura, situadas en el término municipal de Badajoz. La zona se localiza entre las coordenadas geográficas 38° 53' de latitud Norte y 6° 58' de longitud Oeste con una altitud de 186 m sobre el nivel del mar.

Se han utilizado nueve moruecos de raza Île de France (edad: de 4 a 9 años; peso vivo medio: 121 kg) que participan de manera habitual en un programa de inseminación artificial ovina. Los animales ingresaron en el centro de inseminación, aproximadamente a los 10-12 meses de edad, una vez efectuada la selección por la Asociación de Criadores de Ovinos Precoces de España (AECOP, 2006). A su llegada a las instalaciones fueron sometidos a un periodo de cuarentena, pasado el cual, y como describen Aguado *et al.* (1995), se familiarizaron con la sala de recogida. El comportamiento de los animales es el determinante del éxito del entrenamiento y de la duración del mismo (Álvarez-Córdoba *et al.*, 1999). Una vez adaptados a la vagina artificial se les sometió a un ritmo de extracción de una recogida semanal de dos eyaculados distanciados unos 15-30 minutos. Finalmente, para la realización de este trabajo se han tomado muestras seminales del primer eyaculado de cada animal obtenidas a lo largo del año 2006,

VARIABLES DE MOVILIDAD ESPERMÁTICA DEL MORUECO

salvo el mes de agosto por motivos de organización del personal.

El análisis de la movilidad seminal mediante la valoración subjetiva se realizó siempre antes de los 10 minutos posteriores a la recogida de semen, estimando las variables espermáticas de movilidad masal (MM), movilidad individual (MI) o proporción de espermatozoides móviles, y calidad de movimiento (CM); todo ello siguiendo los protocolos de análisis laboratorial estandarizados para la especie ovina (Colas *et al.*, 1980; Evans y Maxwell, 1987; Baril *et al.*, 1993).

El análisis informatizado se realizó utilizando el software del sistema *Integrated Semen Analysis System*, también denominado ISAS® (Proiser R+D S.L., Valencia). Una vez terminada la recogida de semen de todos los moruecos y realizada la toma de datos del análisis subjetivo de la movilidad de cada muestra seminal, el conjunto de las muestras diluidas fueron analizadas sin sobrepasar una hora desde la obtención de los eyaculados. De la dilución realizada para el análisis subjetivo de la movilidad individual se tomó una alícuota de 5 μ l que se depositó entre cubre y porta, previamente dejando reposar la muestra durante un minuto (tiempo suficiente para que desaparezca el movimiento de oleaje) (Tuli *et al.*, 1992) para posteriormente colocar la preparación sobre la platina del microscopio y proceder a la captura de las imágenes. La generación de imágenes se realizó a través de una cámara de vídeo digital Basler A302fs con un ocular fotográfico interpuesto de 3,3x conectado a un microscopio (Nikon Eclipse 50i).

Los análisis de movilidad se realizaron a partir de capturas de 4 campos diferentes de dos preparaciones de cada muestra, utilizando un objetivo de 10x (contraste de fase negativo) hasta capturar un mínimo de 300 espermatozoides por análisis. La trayectoria de cada espermatozoide fue detectada automáticamente por el *software* del sistema y posteriormente se visualizó la graba-

ción del conjunto de las trayectorias analizadas; cuando éstas parecían erróneas se procedió a comprobar las trayectorias individuales de los espermatozoides implicados y aquellos espermatozoides que no se trataron correctamente fueron eliminados del estudio.

Los parámetros cinéticos calculados a partir de las imágenes tomadas de cada célula han sido los siguientes: VCL, velocidad curvilínea (μ m/s); VSL, velocidad rectilínea (μ m/s); VAP, velocidad media (μ m/s); LIN, índice de linealidad (VSL/VCL, %); SRT, índice de rectitud (VSL/VAP, %); WOB, índice de oscilación (VAP/VCL, %); ALH, amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μ m) y BCF, Frecuencia de cruces (Hz) (Mortimer, 1997; Álvarez Lledó, 2003). A su vez se configuró el sistema de captura que permitió obtener distintas categorías descriptivas de la movilidad mediante los parámetros relacionados a continuación:

- espermatozoides móviles: VCL > 20 μ m/s (Tuli *et al.*, 1992; Farrell *et al.*, 1998; Marco Jiménez *et al.*, 2005);
- espermatozoides considerados lentos (LEN): VCL < 45 μ m/s;
- espermatozoides considerados medios (MED): VCL entre 45 y 75 μ m/s;
- espermatozoides considerados rápidos (RAP): VCL > 75 μ m/s;
- índice de rectitud STR: igual o superior al 80%, siendo el valor utilizado para definir los espermatozoides que son considerados progresivos (PRO).

Así el porcentaje de espermatozoides estáticos (EST) viene definido por el conjunto de espermatozoides que no alcanzan las 20 μ m/s de VCL; el porcentaje de LEN, de MED y de RAP es el que incluye a los espermatozoides cuya VCL viene marcada por el punto de corte indicado anteriormente en el *set up*. El porcentaje de PRO representa a los que poseen un índice STR por lo menos igual al 80%, sean lentos medios o rápidos. Esto hace que cada eyaculado esté caracterizado por valores de movimiento conjunto (EST, LEN, etc.) y parámetros ciné-

ticos individualizados de cada espermatozoide (VCL, VAP, LIN, etc.).

Para el análisis estadístico de los resultados se ha trabajado con los datos de 384 eyaculados de 9 moruecos que han proporcionado 176 692 espermatozoides. Una vez obtenidos los valores de las variables de movilidad proporcionados por el sistema ISAS[®], junto con los datos de movilidad subjetiva (MM, MI y CM), estos se archivaron en las correspondientes tablas de Microsoft Office Excel[®] (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) para su posterior estudio mediante el programa estadístico SPSS 15.0. Dicho análisis estadístico consistió en el estudio de la correlación entre las variables espermáticas, determinando los diferentes coeficientes de correlación lineal de Pearson junto con los valores de significación correspondientes según el test de correlación, con el fin de comprobar si el grado de asociación lineal resultaba estadísticamente significativo. El coeficiente de correlación de Pearson con valores próximos a 1 indica una fuerte asociación lineal positiva, es decir a medida que aumentan los valores de una de las variables aumentan los de la otra. Los valores próximos a -1 indican lo contrario, una fuerte asociación negativa, por lo que a medida que aumentan los valores de una variable,

disminuyen los de la otra. Por último los valores próximos a 0, indican que no existe asociación lineal. A su vez se ha aplicado un análisis de componentes principales al grupo de variables subjetivas y un análisis de correlación canónica entre el grupo de variables subjetivas y el de descriptores de movilidad (Milton, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según la matriz de correlación lineal, resultado del análisis realizado a los valores medios de los parámetros cinéticos seminales proporcionados por el sistema informatizado ISAS[®] (**tabla I**), podemos constatar la consonancia entre los resultados de nuestro trabajo y los datos aportados que aparecen en la bibliografía consultada. De esta manera, el coeficiente de correlación entre las velocidades (VCL, VAP y VSL) es alto y positivo (r de 0,748 a 0,961, $p < 0,01$), al igual que la asociación entre los índices (LIN, STR y WOB) dada su formulación y origen a partir de las anteriores (r de 0,458 a 0,821, $p < 0,01$) (Budworth *et al.*, 1988; Sánchez-Partida *et al.*, 1999; Wijchman *et al.*, 2001; Álvarez Lledó, 2003). Entre BCF y ALH la correlación es directa, al incrementarse la frecuencia de batida también aumenta la amplitud del desplazamiento lateral ($r = 0,675$, $p < 0,01$); este resultado con-

Tabla I. Correlaciones estadísticas entre los parámetros cinéticos de los espermatozoides del eyaculado de moruecos Île de France proporcionados por ISAS[®]. (Statistic correlations among the ISAS[®] obtained kinematics parameters of spermatozoa in ejaculates of Île de France rams).

	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH
VSL	0,748**						
VAP	0,876**	0,961**					
LIN	-0,183**	0,511**	0,292**				
STR	-0,429**	0,183**	-0,093	0,821**			
WOB	0,004	0,494**	0,377**	0,743**	0,458**		
ALH	0,381**	-0,251**	-0,080	-0,866**	-0,640**	-0,657**	
BCF	0,170*	-0,187**	-0,142**	-0,523**	-0,192**	-0,494**	0,675**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Los valores indican el coeficiente de correlación de Pearson.

VARIABLES DE MOVILIDAD ESPERMÁTICA DEL MORUECO

trasta con lo expuesto por Wijchman *et al.* (2001) quienes encuentran una relación inversa, y con las investigaciones de Álvarez Lledó (2003) para quién esta asociación es inexistente.

En general esta relación es menor o no existe cuando se da entre variables de los distintos grupos (velocidades vs. índices) y en algunos casos es de signo negativo. Hay que destacar la producida entre ALH con LIN, STR y WOB que es alta o moderada e inversa, indicando que cuanto mayor es el desplazamiento lateral de la cabeza, menos progresivos y lineales son los espermatozoides (Sánchez-Partida *et al.*, 1999; Álvarez Lledó, 2003).

Sucede lo mismo, pero en menor medida, cuando esa asociación se da con BCF; sin embargo para Budworth *et al.* (1988), la correlación con LIN es positiva ($r= 0,47$, $p<0,05$) y no es significativa según Álvarez Lledó (2003). Se podría decir que aquellos espermatozoides más rápidos, si se contempla exclusivamente VCL, son también los más vigorosos, pero no serían muy progresivos ni lineales.

Las relaciones existentes entre velocidades y las variables que se expresan en porcentajes, tanto de movilidad subjetiva (MM, MI y CM) (**tabla IV**) como las obteni-

das mediante el sistema ISAS® (PRO y RAP) (**tabla III**) son directas, moderadas o bajas (Sánchez-Partida *et al.*, 1999; Wijchman *et al.*, 2001; Álvarez Lledó, 2003). Esto sugiere que la valoración subjetiva se ve influida por la apreciación de la velocidad espermática (Davis y Katz, 1992), y confirma la asociación entre la valoración subjetiva y los porcentajes conseguidos utilizando sistemas computerizados. A la vista de dichos resultados se puede decir que hay coincidencia con lo encontrado en la bibliografía, ya que para Álvarez Lledó (2003) en semen humano, y para Tuli *et al.* (1992) en semen fresco y congelado de vacuno, porcino y caprino, existe una correlación directa y elevada entre los valores obtenidos subjetivamente y los aportados por sistemas informatizados. Similarmente, Rijsselaere *et al.* (2005) en una revisión sobre las nuevas técnicas de análisis de la calidad del semen canino también inciden en esta asociación. A su vez, la asociación entre LEN, MED y las velocidades es inversa y algo mas elevada, (desde $r= -0,348$ para LEN y VCL, a $r= -0,529$ para MED y VAP, $p<0,01$) lo que sugeriría que al aumentar el número de espermatozoides de mala calidad disminuiría la velocidad del conjunto del eyaculado. Para Sánchez-Partida *et al.* (1999) también hay una asociación negativa entre el porcentaje de espermatozoides de velocidad moderada y las velocidades (VCL, VAP y VSL). Se debe destacar que el incremento de estáticos se relaciona con una bajada de las velocidades, y que el porcentaje de progresivos lo hace de manera directa con todos los índices de linealidad (LIN, STR y WOB) y de manera inversa con ALH y BCF.

Si las variables son las aportadas por el sistema ISAS® (EST, LEN, MED, RAP y PRO) (**tabla II**), el sentido de la asociación y su intensidad es tal que al aumentar el número de espermatozoides estáticos disminuyen los rápidos y progresivos. Esto mismo sucede, pero en menor grado, cuando la relación se da entre las dos últimas cate-

Tabla II. Correlaciones estadísticas entre los parámetros de movilidad global de los espermatozoides del eyaculado de moruecos Île de France proporcionados por ISAS®. (Statistic correlations among the ISAS® obtained global motility parameters of spermatozoa in ejaculates of Île de France rams).

	EST	LEN	MED	PRO
LEN	0,124*			
MED	0,245**	0,382**		
PRO	-0,740**	-0,411**	-0,316**	
RAP	-0,962**	-0,351**	-0,444**	0,790**

* $p<0,05$; ** $p<0,01$. Los valores indican el coeficiente de correlación de Pearson.

rías con LEN y MED (Sánchez-Partida *et al.*, 1999).

Por otro lado las variables subjetivas están relacionadas positivamente entre sí, reflejando una gran asociación, sobre todo entre MM y MI ($r=0,836$, $p<0,01$), además, el análisis de componentes principales revela que cualquiera de las dos puede servir para explicar casi el 80% de la variabilidad de los tres parámetros subjetivos. La correlación de ambas con CM es de índole menor ($r=0,623$ y $r=0,646$ para MM y MI respectivamente, $p<0,01$), quizás por la mayor dificultad de objetivar la valoración de ésta última.

Cuando se estudia el grado de asociación entre los parámetros de movilidad seminal obtenidos por ambos métodos de análisis, subjetivo e informatizado (**tabla IV**), se encuentra una relación directa entre MM, MI y CM con el porcentaje de PRO y RAP, sobre todo con las dos primeras, existiendo una correlación positiva altamente significativa entre MI y RAP ($r=0,799$, $p<0,01$). Si bien esta relación es inversa si se considera el porcentaje de espermatozoides

Tabla III. Correlaciones estadísticas entre los parámetros de movilidad global y cinética individual de los espermatozoides del eyaculado de moruecos Île de France proporcionados por ISAS®. (Statistic correlations among the ISAS® obtained parameters global motility and individual kinetics of spermatozoa in ejaculates of Île de France rams).

	EST	LEN	MED	PRO	RAP
VCL	-0,346**	-0,348**	-0,451**	0,104*	0,447**
VSL	-0,182**	-0,513**	-0,517**	0,271**	0,336**
VAP	-0,294**	-0,465**	-0,529**	0,301**	0,431**
LIN	0,180**	-0,330**	-0,188**	0,413**	-0,073
STR	0,400**	-0,212**	0,020	0,271**	-0,326**
WOB	0,009	-0,254**	-0,251**	0,337**	0,075
ALH	-0,174**	0,146**	0,048	-0,266**	0,123*
BCF	0,022	0,032	0,165**	-0,168**	-0,052

* $p<0,05$; ** $p<0,01$. Los valores indican el coeficiente de correlación de Pearson.

Tabla IV. Correlaciones estadísticas entre los parámetros de movilidad seminal del eyaculado de moruecos Île de France obtenidos por análisis subjetivo e informatizado ISAS®. (Statistic correlations among seminal motility parameters in ejaculates of Île de France rams obtained by subjective and ISAS® analysis).

	MM	MI	CM
EST	-0,693**	-0,773**	-0,539**
LEN	-0,351**	-0,298**	-0,319**
MED	-0,337**	-0,299**	-0,345**
PRO	0,632**	0,694**	0,601**
RAP	0,741**	0,799**	0,599**
VCL	0,390**	0,354**	0,228**
VSL	0,367**	0,324**	0,368**
VAP	0,409**	0,372**	0,364**
LIN	0,040	0,025	0,255**
STR	-0,136**	-0,162**	0,034
WOB	0,105*	0,099	0,263**
ALH	0,065	0,066	-0,157**
BCF	0,022	0,005	-0,198**

* $p<0,05$; ** $p<0,01$. Los valores indican el coeficiente de correlación de Pearson.

EST, LEN Y MED. Por otra parte, dada la complejidad de las características de movilidad de los clasificados como LEN y MED, y que su porcentaje por lo general no supera el 10%, se hace difícil la evaluación subjetiva, aunque exista cierta asociación con CM y MM; además, vistas las relaciones con los otros parámetros objetivos, se podría pensar que son dos grupos de espermatozoides con cierto grado de independencia, una representación constante de espermatozoides de calidad mediocre, al menos, de movimiento. El análisis de correlación canónica viene a apoyar la idea de que la variable MI es el parámetro de la analítica subjetiva que mejor explica en conjunto las variables espermáticas aportadas por el sistema ISAS®.

CONCLUSIÓN

Teniendo en cuenta los resultados se puede concluir que el análisis subjetivo de

VARIABLES DE MOVILIDAD ESPERMÁTICA DEL MORUECO

movilidad seminal, a la vista de la asociación entre variables, es adecuado y puede reducirse en la práctica laboratorial a la valoración de MI o MM. A su vez, dada la concordancia que existe entre los pa-

rámetros determinados por los dos métodos, análisis subjetivo e informatizado, también se puede considerar adecuado el uso del sistema ISAS® y el *set up* propuesto para las condiciones de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abaigar, T., Holt, V.W., Harrison, P.A. and Barrio, G. 1999. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol. Reprod.*, 60: 32-41.
- Aguado, M.J., Garde, J., Gracia, O., Pérez-Guzmán, M.D., Montoro, V. y Vázquez, I. 1995. Entrenamiento y evaluación de la aptitud reproductiva de los moruecos para la elaboración de dosis seminales. *Ovis*, 36: 17-25.
- Álvarez-Córdoba J., Patón, D., Tovar, J. y Calero, R. 1999. Respuesta comparada al entrenamiento de moruecos de raza Merina y Merina Precoz para el uso en inseminación artificial. *Arch. Zootec.*, 48: 273-284.
- Álvarez Lledó, C. 2003. Análisis integrado de morfología y movilidad espermática humana con el uso del *sperm class analyzer*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- Amann, R.P. and Katz, D.F. 2004. Reflections on CASA after 25 years. *J. Androl.*, 25: 317-325.
- Asociación de Criadores de Ovinos Precoces. 2007. Informe anual. www.aecop.es/ (10/06/2009).
- Baril, G., Chemineau, P., Cognie, Y., Guerin, Y., Leboeuf, B., Orgeur, P. et Vallet, J-C. 1993. Manuel de formation pour l'insemination artificielle chez les ovins et les caprins. www.fao.org/docrep/009/t121f/TO121F11 (29/11/07).
- Budworth, P.R., Amann, R.P. and Chapman, P.L. 1988. Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *J. Androl.*, 9: 41-53.
- Colas, G. 1980. Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Île-de-France. I. Etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. *Reprod. Nutr. Develop.*, 20: 1789-1799.
- Davis, R. and Katz, D.F. 1992. Standardization and comparability of CASA instruments. *J. Androl.*, 13: 81-86.
- De Geyter, C.H., Geyter, M. De, Koppers, B. and Nieschlag, E. 1998. Diagnostic accuracy of computer-assisted sperm motion analysis. *Hum. Reprod.*, 13: 2512-2520.
- ESHRE Andrology Special Interest Group. 1998. Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 13: 142-145.
- Evans, G. and Maxwell, W.M.C. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Ed. Butterworths. Sidney. pp: 93-106.
- Farrell, P.B., Presicce, G. A., Brockett, C.C. and Foote R.H. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, 49: 871-879.
- Hirai, M., Boersma, A., Hoefflich, A., Wolf, E., Föll, J., Aumüller, T.R. and Braun J. 2001. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. *J. Androl.*, 22: 104-110.
- Marco-Jiménez, F., Puchades, S., Gadea, J., Vicente, J.S. and Viudes-de-Castro, M-P. 2005. Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology*, 64: 1756-1765.
- Milton, J.S. 2001. Estadística para biología y ciencias de la salud. Ed. McGraw-Hill. Madrid.
- Mortimer, S.T. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update.*, 3: 403-439.
- Sánchez-Partida, L.G., Windsor, D.P., Eppleston, J., Setchell, B.P. and Maxwell W.M.C. 1999. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. *J. Androl.*, 20: 280-288.
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Tanghe, S., Coryn, M., Maes, D. and De Kruif, A. 2005. New techniques for the assessment of canine se-

BRAVO, MONTANERO, CALERO Y ROY

- men quality: A review. *Theriogenology*, 64: 706-719.
- Tuli, R.K., Schmidt-Baulain, R. and Holtz, W. 1992. Computer-assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen-thawed semen of the bull, boar and goat. *Theriogenology*, 38: 487-490.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M. and Onclin, K. 2002. Computer assisted semen analyzer in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57: 149-179.
- Wijchman, J.G., De Wolf, B.T.H.M., Graafe, R. and Arts, E.G.J.M. 2001. Variation in semen parameters derived from computer-aided semen analysis, within donors and between donors. *J. Androl.*, 22: 773-780.