

EFECTO DE LAS PROSTAGLANDINAS SOBRE LA PROGRESION VERTICAL Y SUPERVIVENCIA ESPERMATICAS DEL SEMEN DESCONGELADO DE MORUECO

Por L. Anel Rodríguez (1)
J. C. Domínguez Fdez.-Tejerina (1)
M. Abad Gavín (1)
P. Posadilla González (2)

INTRODUCCION

La adición de determinadas sustancias al semen descongelado de morueco con vistas a mejorar sus tasas de fertilidad en la I.A. de hembras ovinas, constituye un campo de investigación, que, en los últimos años, ha sufrido una gran expansión y que ha dado lugar, cuando menos, a una serie de resultados, no concordantes en su mayoría, pero que pueden suponer aportes válidos a la hora de paliar los escasos resultados prácticos obtenidos con la aplicación de dicho método en esta especie.

La utilización de estimulantes espermáticos plantea, a nuestro juicio, una disyuntiva de cara a su posible uso en la práctica, ya que, si bien se obtienen mejoras de la M.i. (Motilidad individual) postdescongelación, hay que tener en cuenta que también determinan otro tipo de efectos sobre diferentes aspectos de la fisiología espermática: estas modificaciones están relacionadas con la modificación de determinados procesos metabólicos, viéndose incrementados el consumo de oxígeno, la glicolisis, etc., extremos estos que determinarían una disminución en la supervivencia espermática.

Efectivamente, nosotros en una experiencia previa⁶, y utilizando sobre semen descongelado de morueco el más universal de los estimulantes espermáticos, la cafeína, comprobamos como el aumento de la M.i. postdescongelación tiene como contrapartida una disminución de la supervivencia espermática, así como de la ascensión vertical.

La posible utilización de prostaglandinas exógenas, como mejoradoras de algunos de los parámetros de los espermatozoides descongelados de morueco constituye, en la actualidad, una de las líneas de investigación de nuestra Unidad de Reproducción y Obstetricia del Departamento de Patología Animal: Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de León.

(1) Dpto. Patología Animal: Sanidad Animal
(2) Hospital «Virgen Blanca». Servicio Ginecología

Así hemos comprobado¹ como la prostaglandina F_{2a}, a dosis de 5, 10 y 15 ug/pellet, determina un incremento de la M.i. postdescongelación, que es altamente significativo con respecto al control, no detectándose ningún efecto sobre dicho parámetro cuando se emplearon PGE₁, PGE₂ y las combinaciones posibles entre las tres prostaglandinas.

Tomando como punto de partida estos resultados y considerando que las prostaglandinas, presentes fisiológicamente en el semen eyaculado de morueco, pueden ser más válidas con vista a su utilización práctica que otros tipos de sustancias, utilizadas como estimulantes espermáticos, abordamos la presente experiencia en la que, bajo las mismas condiciones experimentales de nuestro estudio sobre la M.i. postdescongelación¹, se investigan los posibles efectos que la adición de prostaglandinas pudieran tener sobre la progresión vertical y supervivencia espermáticas del semen descongelado de morueco.

MATERIAL

Para la realización de la presente experiencia, se ha empleado semen congelado en forma de «pellets», procedente de 12 moruecos de raza Manchega, cuyas edades oscilaban entre 2-5 años; dicho semen fue obtenido mediante el empleo de vagina artificial, termorregulada con agua caliente a 40°C.

El semen previamente contrastado, se diluye con tasas oscilantes entre el 1:3 y 1:4 (dependiendo de la concentración inicial y para ajustar 100 millones spz/pellet) en un medio Tes-Tris-Glucosa⁷ cuya composición queda patente en la Tabla I (1 pellet = 0,1 ml).

Posteriormente, se congela el material seminal en dos fases térmicas (-79°C y -196°C) permaneciendo almacenado en nitrógeno líquido, hasta el comienzo de las pruebas, durante un período de 18-24 meses.

La descongelación de los pellets se lleva a cabo a 40°C sobre 1 cc de diluyente de descongelación, de igual composición al de congelación para el caso del Grupo Control, lleva además diluidas, en los diferentes grupos y subgrupos experimentales, las cantidades y tipos de prostaglandinas correspondientes en cada caso.

El material seminal descongelado, y en lo que se considera como un período de equilibrio, permanece en estufa a 37°C durante 30 minutos, hasta el comienzo de las pruebas laboratoriales programadas.

En el presente trabajo se han empleado tres prostaglandinas: la F_{2a} (en forma de sal Tris) a dosis de 5, 10, 15 y 20 ug/pellet; la E₁ a dosis de 25, 50, 75 y 100 ug/pellet; y la E₂ a dosis de 10, 20, 30 y 40 ug/pellet.

Las prostaglandinas, hasta el momento de su uso, eran almacenadas en congelador (-20°C), en solución de acetona pura, de concentración conocida. Para su empleo, se dosifica la cantidad de solución que contiene los ug de prostaglandina específicos de cada caso, procediéndose a continuación a evaporar la acetona, e incorporando el sedimento resultante (PGs) al diluyente de descongelación.

METODOS

Test de Progresión Vertical (TPV)

Para la cuantificación de la ascensión espermática se realiza el test de progresión vertical¹⁰. La técnica para la determinación del TPV se realiza del modo siguiente:

Se toman 0,3 cc. de semen descongelado y rediluido y se colocan en un tubo de en-

sayo (vidrio) de 5 ml. Previamente se rellena un tubo capilar de vidrio neutro (75 mm de longitud; 1,1-1,2 mm de diámetro interno; 1,5-1,6 mm de diámetro externo) con suero glucosado isotónico, taponándose posteriormente uno de los extremos con masa plastificada. A continuación, el capilar se coloca en posición vertical en el interior del tubo de ensayo que contiene la muestra seminal, con el extremo no taponado en contacto con la superficie del semen. El conjunto permanece en estufa a 37°C durante media hora, transcurrida la cual se procede a efectuar la lectura del test, que consiste en efectuar un barrido del capilar al microscopio óptico, comenzando por el extremo que contactaba con la superficie seminal, para determinar la distancia máxima recorrida por los espermatozoides dentro del capilar. Así, se obtiene una cifra numérica expresada en mm/30 minutos/37°C que constituye el valor representativo del TPV.

Test de Supervivencia

Para la realización de este test se utiliza una muestra de 0,5 cc. de semen descongelado y rediluido, que se deposita en un tubo de ensayo (vidrio) de 5 ml y se mantiene durante el transcurso de la prueba en una incubación aerobia a 37°C.

El primer muestreo se realiza a los 30 minutos de la descongelación, anotándose la M.i. del material seminal; a partir de este momento se realizan controles seriados, a intervalos de dos horas, comprobando en cada uno de ellos el porcentaje de espermatozoides móviles de la muestra (M.i.), hasta la pérdida total de la cinesis espermática. La determinación de la M.i. se realiza por el método de la gota plana.

Para la valoración del test de supervivencia se calculan dos parámetros:

-Valor T: expresa en horas el tiempo transcurrido desde el comienzo de la prueba hasta la pérdida total de motilidad espermática (para cada muestra).

-Valor S: media aritmética de las motilidades anotadas en todos y cada uno de los controles (para cada muestra).

El modelo experimental del presente trabajo de investigación consta de un grupo control y siete grupos experimentales (I al VII) que se corresponden con las prostaglandinas o mezclas de prostaglandinas utilizadas en cada caso (Tabla II). Cada grupo experimental se divide en cuatro subgrupos (a, b, c y d) que equivalen a los cuatro niveles de dosificación empleados para cada prostaglandina. La codificación de grupos y subgrupos en base al tipo de prostaglandina y nivel de dosificación empleados queda patente en la Tabla II.

El grupo control lo componen 12 «pellets» (uno de cada morueco) y cada grupo experimental 48 «pellets», 12 correspondientes a cada subgrupo y dentro de estos uno de cada morueco.

Para efectuar el estudio estadístico de los resultados, se realiza una comparación de medias con el uso de la razón de varianzas correspondiente a una distribución F, todo ello teniendo en cuenta los grados de libertad y siguiendo la metodología descrita por Snedecor¹¹. Para los casos en que el nivel de significación superaba el 5%, se calculó la mínima diferencia significativa (M. D. S.) al objeto de establecer entre qué medias concretas, comparadas dos a dos, existían diferencias con carácter estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Test de Progresión Vertical (TPV)

Los resultados obtenidos con la realización de este test quedan plasmados en la Tabla III. En una visión global de los mismos, se puede apreciar cómo la adición de prostaglandinas al semen descongelado de morueco, determina un valor de la progresión espermática vertical que es superior a la mostrada por el grupo control en 25 de

los 28 subgrupos. La excepción queda constituida por los grupos suplementados con prostaglandina E_2 a dosis de 10 y 20 ug/pellet (IIIa y IIIb) y el de 5 + 10 ug/pellet de la combinación de PG $F_{2a} + E_2$ (Va); en estos casos se produce una cierta disminución, con respecto al grupo testigo, de la distancia recorrida por los espermatozoides en el TPV.

Cuando se suplementa el semen descongelado con prostaglandina E_1 (Grupo II) a sus cuatro niveles de dosificación (25, 50, 75 y 100 ug/pellet), los valores correspondientes al TPV son superiores y altamente significativos con respecto al control ($p < 0,01$) (Fig. 1); este hecho lo hemos constatado de igual forma en todos aquellos subgrupos en los que la prostaglandina E_1 a dosis de 50 ug/pellet se combinaba con las otras dos prostaglandinas (subgrupos IVb, VIb y VIIb) (Fig. 1). Asimismo, existen diferencias significativas con respecto al control ($p < 0,01$) en el caso del subgrupo Vd (20 ug PG $F_{2a} + 40$ ug PGE₂/pellet).

Las variaciones de la progresión espermática vertical, en relación con la adición de prostaglandinas al semen, ha sido escasamente estudiada. Concretamente, y por lo que se refiere al semen de morueco, en nuestra revisión no hemos encontrado ninguna cita bibliográfica.

Hay que señalar, en referencia a la especie humana, que nuestros resultados con la PGE₁ están en la línea de los obtenidos por Caballero y Palomo^{2,3}, quienes además comprueban un aumento del valor del TPV cuando adicionan al semen humano fresco prostaglandinas F_{2a} y E_2 .

Nuestros resultados, están de igual forma, parcialmente de acuerdo con los obtenidos por Domínguez⁵ en su trabajo de tesis doctoral, quien suplementando, después de la descongelación, el semen de toro con prostaglandinas F_{2a} , E_1 y E_2 , constata que todas ellas se comportan positivamente hasta determinados niveles, ya que para el caso de las prostaglandinas F_{2a} y E_2 , este parámetro disminuye con carácter estadísticamente significativo con respecto al control, cuando se adicionan a dosis de 71,4 ug/0,5 ml de semen y 7,14 ug/0,5 ml respectivamente. Nosotros, en la presente experiencia, no hemos comprobado una correlación negativa dosis-efecto para las prostaglandinas y niveles ensayados en relación al TPV. Insistir en tal caso que la PGE₂, tal y como se ha señalado, a dos niveles de dosificación, determina una disminución del valor del TPV que no es estadísticamente significativa con respecto al control.

Test de Supervivencia

Con respecto al valor T (horas de supervivencia), primer parámetro deducido de la realización del test de supervivencia, hemos comprobado cómo la adición de las prostaglandinas testadas y a los niveles de dosificación descritos, no determina ninguna variación con carácter estadísticamente significativa en relación al valor mostrado por el grupo control (Tabla IV).

De los resultados obtenidos en este trabajo para el valor S (media de motilidades) (Tabla V), segundo de los parámetros del test de supervivencia, se deduce un incremento del mismo en 22 de los 28 subgrupos experimentales en relación al del grupo testigo.

De entre los seis subgrupos que muestran una disminución de este valor respecto del control, el no existir carácter significativo entre las diferencias observadas, y la dispersión de los subgrupos con un valor S inferior, hacen concluir la no existencia de efectos negativos sobre este parámetro en la adición de prostaglandinas al semen descongelado de morueco. Estos seis subgrupos citados son los suplementados con 50 ug de PGE₁/pellet (IIb); 20 ug PGE₂/pellet (IIIb); 20 + 100 ug PGs $F_{2a} + E_1$ /pellet (IVd); 5 + 10 ug PGs $F_{2a} + E_2$ /pellet (Va); 10 + 20 ug PGs $F_{2a} + E_2$ /pellet (Vb) y 25 + 10 ug PGs $E_1 + E_2$ /pellet (VIa) según se aprecia en la Tabla V.

La prostaglandina F_{2a} (Grupo I) a dosis de 5, 10 y 15 ug/pellet descongelado, produce un aumento de valor S con respecto al control, que es altamente significativo ($p < 0,01$) (Fig.2). Estos resultados están en perfecta concordancia con los obtenidos por nosotros¹ para la M.i. en muestras seminales suplementadas con prostaglandina F_{2a} , ya que el parámetro S del test de supervivencia es la media de las diferentes motilidades anotadas durante el transcurso de la prueba.

Asimismo, en la presente investigación se comprueba un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,01$) entre el grupo control y los subgrupos IVb y Vd suplementados con 10 + 50 ug PGs $F_{2a} + E_1$ /pellet y con 20 + 40 ug PGs $F_{2a} + E_2$ /pellet respectivamente (Fig. 2).

Los resultados que hemos obtenido para el valor T, se encuentran en la misma línea de los publicados por la mayoría de los autores. En este sentido, Gustafsson et al.⁸ detectan que la adición de prostaglandinas, previa a la congelación del semen de morueco, en concentraciones superiores a las fisiológicas, tres veces para la E_1 y veinte veces para la F_{2a} , no ejerce efecto negativo sobre la supervivencia espermática. A conclusiones similares han llegado Marley et al.⁹ en semen fresco de morueco, tras la incubación del mismo tanto a 39°C durante 4 horas como a 5°C durante 48 horas, utilizando cantidades de prostaglandinas cinco veces superiores a las concentraciones fisiológicas. Varnavskii¹² en una amplia experiencia que combina pruebas «in vitro» y de campo (I.A.) constata que la adición de prostaglandinas F_{2a} y E_1 al semen congelado de morueco no determina cambios en la tasa de supervivencia espermática.

Sin embargo nuestros resultados son contrapuestos a los que comunican Daader et al.⁴, toda vez que estos autores describen una mejoría en la supervivencia del semen diluido en yema de huevo-citrato-buffer al que se adicionaba prostaglandina F_{2a} (12,5 ug), tanto en la incubación a 37°C durante 225 minutos, como tras su conservación a 5°C durante 5 días.

RESUMEN

En la presente experiencia se estudia el efecto que la adición de prostaglandinas F_{2a} , E_1 y E_2 tiene sobre la progresión vertical y la supervivencia espermáticas del semen descongelado de morueco.

En relación a la progresión vertical, cuantificada mediante la realización de un test de progresión vertical (TPV) en suero glucosado isosmótico, se comprueba cómo la adición de prostaglandina E_1 a los cuatro niveles de dosificación empleados (25, 50, 75 y 100 ug/pellet) así como en combinación con las otras prostaglandinas testadas (F_{2a} y E_2) a dosis de 50 ug/pellet (E_1) determina un incremento del valor del TPV que es estadísticamente significativo ($p < 0,01$) con respecto al grupo control. Este incremento del TPV se constata igualmente en las muestras adicionales con una mezcla de F_{2a} (20 ug/pellet) y E_2 (40 ug/pellet).

Por lo que se refiere a la supervivencia espermática, no hemos detectado variaciones con respecto al grupo control en el tiempo total de supervivencia (Valor T) de las muestras suplementadas con prostaglandinas. Lo que sí se comprueba es un aumento significativo de la M.i. media del test de supervivencia (Valor S) en las muestras a las que se añadía prostaglandina F_{2a} a dosis de 5, 10 y 15 ug/pellet, así como en las combinaciones de $F_{2a} + E_1$ (10 + 50 ug/pellet) y $F_{2a} + E_2$ (20 + 40 ug/pellet).

TABLA I
Composición del medio test (minesota) empleado en la dilución del semen

| | |
|---|-----------|
| Tris (hydroxi-methyl)-Amino metano (TRIS) (Merck 8382) (P.m.= 121,14) | 11,6 g |
| Acido N-Tris (hidroxi-metil)-metil-2-Amino etano-sulfónico. (TES) (Sigma T-1375) (P.m.= 229,2) | 48,3 g |
| Glucosa monohidratada (Merck 8342) (P.m.= 198,17) | 2,0 g |
| Yema de huevo | 6 % (v/v) |
| Glicerol (D = 1,26) (Merck 4093) | 4 % (v/v) |

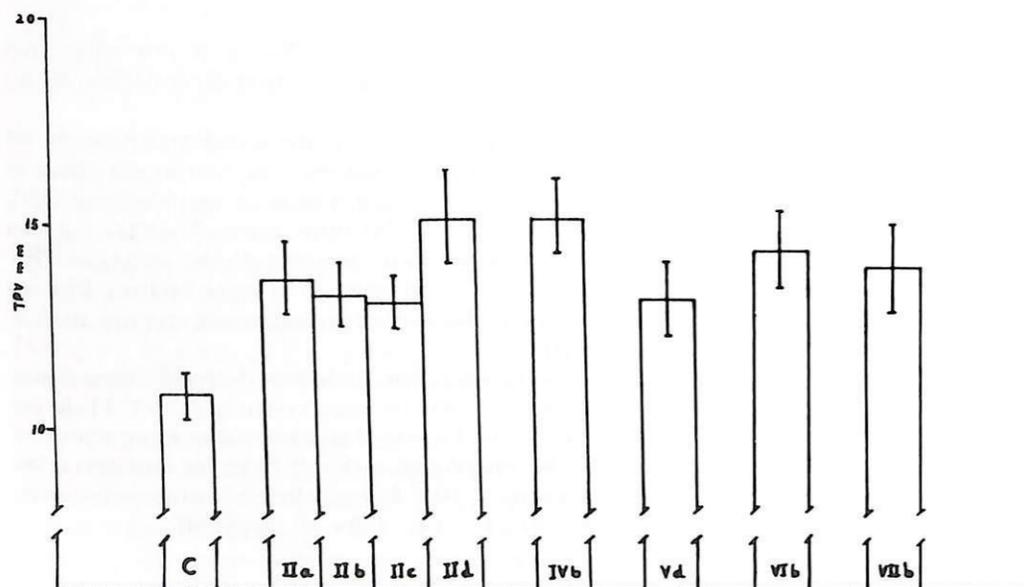


Fig. 1.- Representación gráfica de los subgrupos en los que se produce un incremento significativo ($p < 0,01$) del TPV con respecto al control

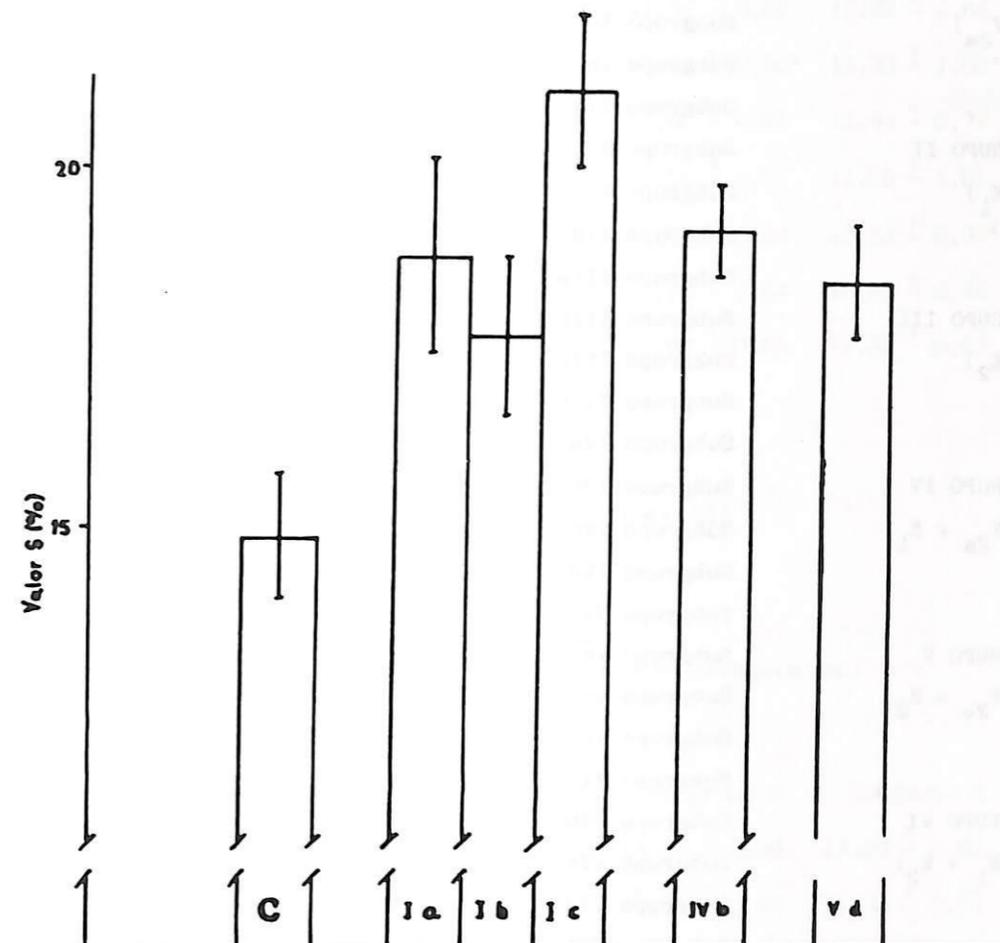


Fig. 2.- Representación gráfica de los subgrupos en los que se produce un incremento significativo ($p < 0,01$) del valor «S» del test de supervivencia con respecto al control.

TABLA II
Codificación de grupos y subgrupos (μg de PGs/pellet)

| | | |
|---------------------------------------|---------------|---|
| GRUPO CONTROL | | |
| GRUPO I (F_{2a}) | Subgrupo Ia | 5 μg /pellet |
| | Subgrupo Ib | 10 μg /pellet |
| | Subgrupo Ic | 15 μg /pellet |
| | Subgrupo Id | 20 μg /pellet |
| GRUPO II (E_1) | Subgrupo IIa | 25 μg /pellet |
| | Subgrupo IIb | 50 μg /pellet |
| | Subgrupo IIc | 75 μg /pellet |
| | Subgrupo IId | 100 μg /pellet |
| GRUPO III (E_2) | Subgrupo IIIa | 10 μg /pellet |
| | Subgrupo IIIb | 20 μg /pellet |
| | Subgrupo IIIc | 30 μg /pellet |
| | Subgrupo IIId | 40 μg /pellet |
| GRUPO IV ($F_{2a} + E_1$) | Subgrupo IVa | 5 μg + 25 μg /pellet |
| | Subgrupo IVb | 10 μg + 50 μg /pellet |
| | Subgrupo IVc | 15 μg + 75 μg /pellet |
| | Subgrupo IVd | 20 μg + 100 μg /pellet |
| GRUPO V ($F_{2a} + E_2$) | Subgrupo Va | 5 μg + 10 μg /pellet |
| | Subgrupo Vb | 10 μg + 20 μg /pellet |
| | Subgrupo Vc | 15 μg + 30 μg /pellet |
| | Subgrupo Vd | 20 μg + 40 μg /pellet |
| GRUPO VI ($E_1 + E_2$) | Subgrupo VIa | 25 μg + 10 μg /pellet |
| | Subgrupo VIb | 50 μg + 20 μg /pellet |
| | Subgrupo VIc | 75 μg + 30 μg /pellet |
| | Subgrupo VIId | 100 μg + 40 μg /pellet |
| GRUPO VII ($F_{2a} + E_1 + E_2$) | Subgrupo VIIa | 5 μg + 25 μg + 10 μg /pellet |
| | Subgrupo VIIb | 10 μg + 50 μg + 20 μg /pellet |
| | Subgrupo VIIc | 15 μg + 75 μg + 30 μg /pellet |
| | Subgrupo VIId | 20 μg + 100 μg + 40 μg /pellet |

TABLA III
Test de progresión vertical (mm). Resumen de resultados (medias)

| Grupo Control | 11,00 \pm 0,59 | | | |
|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Subgrupo a | Subgrupo b | Subgrupo c | Subgrupo d |
| Grupo I | 11,50 \pm 1,48 | 12,50 \pm 0,87 | 11,42 \pm 0,66 | 12,33 \pm 0,68 |
| Grupo II | 13,83 \pm 0,86* | 13,42 \pm 0,78* | 13,25 \pm 0,60* | 15,33 \pm 1,08* |
| Grupo III | 9,08 \pm 0,62 | 9,67 \pm 0,64 | 11,50 \pm 0,75 | 11,92 \pm 0,74 |
| Grupo IV | 13,17 \pm 0,94 | 15,33 \pm 0,87* | 12,58 \pm 0,92 | 11,58 \pm 1,01 |
| Grupo V | 10,58 \pm 0,62 | 12,58 \pm 0,89 | 12,00 \pm 0,94 | 13,33 \pm 0,92* |
| Grupo VI | 11,17 \pm 0,83 | 14,42 \pm 0,87* | 12,75 \pm 0,64 | 12,83 \pm 0,46 |
| Grupo VII | 12,92 \pm 0,66 | 14,08 \pm 1,00* | 12,83 \pm 0,68 | 12,33 \pm 0,67 |

M.D.S. 2,25

* Significativo con respecto al control ($p < 0,01$)

TABLA IV
Test de supervivencia. Valor T (h). Resumen de resultados (medias)

| Grupo Control | 13,00 \pm 1,03 | | | |
|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Subgrupo a | Subgrupo b | Subgrupo c | Subgrupo d |
| Grupo I | 12,50 \pm 0,89 | 13,00 \pm 0,87 | 13,17 \pm 0,94 | 11,83 \pm 0,97 |
| Grupo II | 13,00 \pm 0,90 | 13,67 \pm 0,95 | 11,83 \pm 0,94 | 11,83 \pm 0,83 |
| Grupo III | 12,17 \pm 0,83 | 13,00 \pm 1,14 | 11,67 \pm 0,81 | 13,67 \pm 0,95 |
| Grupo IV | 13,67 \pm 0,85 | 14,00 \pm 1,05 | 12,67 \pm 0,86 | 12,17 \pm 0,90 |
| Grupo V | 12,17 \pm 0,94 | 12,33 \pm 1,04 | 13,17 \pm 1,06 | 13,83 \pm 0,83 |
| Grupo VI | 12,50 \pm 1,13 | 12,83 \pm 1,17 | 13,33 \pm 1,11 | 12,67 \pm 0,90 |
| Grupo VII | 12,50 \pm 0,99 | 12,50 \pm 0,82 | 12,83 \pm 1,12 | 12,67 \pm 0,83 |

TABLA V
Test de supervivencia. Valor S (%). Resumen de resultados (medias)

| Grupo Control | 14,84 ± 0,88 | | | |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | Subgrupo a | Subgrupo b | Subgrupo c | Subgrupo d |
| Grupo I | 18,75 ± 1,36* | 17,59 ± 1,11* | 21,08 ± 1,09* | 17,08 ± 0,97 |
| Grupo II | 15,06 ± 0,81 | 13,47 ± 1,00 | 17,18 ± 1,09 | 16,03 ± 1,51 |
| Grupo III | 14,88 ± 0,77 | 14,68 ± 0,96 | 15,52 ± 1,11 | 16,18 ± 0,94 |
| Grupo IV | 16,72 ± 0,78 | 19,16 ± 0,73* | 15,43 ± 0,64 | 14,10 ± 0,86 |
| Grupo V | 14,47 ± 0,79 | 14,33 ± 0,54 | 15,15 ± 0,97 | 18,40 ± 0,83* |
| Grupo VI | 14,10 ± 0,65 | 17,21 ± 1,14 | 16,07 ± 0,64 | 15,81 ± 1,05 |
| Grupo VII | 16,23 ± 0,64 | 16,88 ± 0,75 | 17,01 ± 0,54 | 16,75 ± 1,00 |

M.D.S. 2,75

* Significativo con respecto al control (p < 0,01)

EFFECT OF PROSTAGLANDINS ON VERTICAL PROGRESSION AND SPERM SURVIVAL OF THE FROZEN-THAWED RAM SEMEN

SUMMARY

The effect of addition of prostaglandins F_{2a}, E₁ and E₂ on the vertical progression of frozen-thawed ram semen and sperm survival is studied.

Vertical progression quantified by measuring the distance of sperm cell test (TPV) in a tube filled with glucosed serum isosmotic, it is proved like the addition of prostaglandin E₁ at the four dosification levels used (25, 50, 75 and 100 ug/pellet) in the same as mixed with the other prostaglandins (F_{2a} and E₂) at 50 ug/pellet doses (E₁) determines a TPV value increase, which is statistically significant (p < 0,01) in relation to the control group. This TPV increase it is also showed in the samples added with a F_{2a} (20 ug/pellet) and E₂ (40 ug/pellet) mixture.

In accordance with the sperm survivance we have not detected variations in relation to the control group in the survivance total time (T value) of the samples added with prostaglandins. What it is proved is a significant increase of the individual motility average of the survivance test (S value) in the samples in which was added prostaglandin F_{2a} at 5, 10 and 15 ug/pellet doses, in the same way as in the F_{2a} + E₁ (10 + 50 ug/pellet) and F_{2a} + E₂ (20 + 40 ug/pellet) mixtures.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ANEL, L., DOMINGUEZ, J. C., BOIXO, J. C. y ABAD, M. (1986). Posibilidades de utilización de las prostaglandinas en la mejora de la motilidad individual (M.i.) del semen descongelado de morueco. *Ann. Fac. Vet. León XXXII*, (en prensa).
- 2) CABALLERO, A. y PALOMO, A. (1973). Motilidad espermática y prostaglandina F_{2a}. *Bol. de la Soc. Ginecológica Española 4* (5), 5.
- 3) CABALLERO, A. y PALOMO, A. (1973). Motilidad espermática y prostaglandinas F_{2a}, E₁ y E₂. *Toco-Ginecología Práctica 333*: 1,335-56.
- 4) DAADER, A. H. y TAHA, A. (1984). Survival rate of ram spermatozoa supplemented with PGF_{2a}. *10th Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I. Vol III*, com. nº 362.
- 5) DOMINGUEZ, J. C. (1976). Estudio de la influencia de las prostaglandinas F_{2a}, E₁ y E₂ sobre la motilidad y supervivencia espermática del semen descongelado de toro. *Tesis Doctoral*, Facultad de Veterinaria León, España.
- 6) DOMINGUEZ, J. C., ANEL, L., BOIXO, J. C. y ABAD, M. (1985). Influencia de la cafeína sobre la motilidad, supervivencia y acrosomía espermática del semen descongelado de morueco. *Ann. Fac. Vet. León XXXI*: 233-43.
- 7) GRAHAM, E. F., CRABO, B. G. y PACE, M. M. (1978). Current status of semen preservation in the ram, boar & stallion. *J. Anim. Sci. 47* (suppl. 2): 80-118.
- 8) GUSTAFSSON, B. K., CRABO, B. G., GRAHAM, E. F. y MEMON, M. A. (1977). Effect of prostaglandins E₁ & F_{2a} on post-thaw survival and morphology of ram spermatozoa. *Proc. 14th Ann. Meet. Soc. Cryobiol.*
- 9) MARLEY, P. B., RICHARDSON, B. A., BROWN-WOODMAN, P. D. C., MARTIN, I. C. A. y WHITE, I. G. (1976). PG supplementation of diluent ram semen in A.I. preliminary studies. *Theriogenology 6*: 655.
- 10) PEREZ y PEREZ, F. (1985). *Reproducción Animal: Inseminación Artificial y Trasplante de Embriones*. Ed. Científico-Médica (2ª ed.). Barcelona.
- 11) SNEDECOR, G. W. y COCHRAN, W. G. (1978). *Métodos Estadísticos*. Edt. C.E.C.S.A. (1ª ed.). México.
- 12) VARNAVSKII, A. N. (1981). The effect of synthetic PGs in frozen ram semen on conception rate of ewes. *Zhivotnovodstvo 9*: 51-3. Abstr.