

POSIBILIDADES DE UTILIZACION DE LAS PROSTAGLANDINAS EN LA MEJORA DE LA MOTILIDAD INDIVIDUAL (M.i.) DEL SEMEN DESCONGELADO DE MORUECO

Por L. Anel Rodríguez (1)
J. C. Domínguez Fdez. Tejerina (1)
J. C. Boixo Pérez-Holanda (2)
M. Abad Gavín (1)

INTRODUCCION

El desarrollo de la Inseminación Artificial, como método de manipulación genética en los óvidos, tal y como señalaran Corteel y Paquignon⁷ en el último Congreso Mundial de Reproducción e I.A. (Urbana Champaign 1984), está supeditado a la solución de una serie de problemas surgidos en torno a la conservación «in vitro» del material seminal, como ha ocurrido en otras especies y concretamente en la bovina, en la que su gran difusión e importancia está basada en la posibilidad de conservación a largo plazo del material seminal mediante congelación.

En este sentido debe considerarse todavía vigente la premisa indicada por Colas et al.⁶ en 1980, respecto a que la conservación del semen de morueco más allá de 24 horas, no ha salido aún de un plano meramente experimental.

Las líneas de investigación encaminadas a mejorar los índices de fertilidad que se obtienen con la aplicación de semen descongelado en la I.A. ovina han sido múltiples, encuadrándose la realizada por nosotros dentro de aquellas que investigan determinadas sustancias presentes en el esperma, y que durante los diversos procesos que conlleva la conservación seminal desaparecen o disminuyen en su concentración fisiológica, pudiendo este extremo estar relacionado con la baja o ausencia de capacidad fertilizante del semen descongelado de morueco.

Dentro de este tipo de sustancias, cabe resaltar las prostaglandinas, las cuales se encuentran implicadas en una multitud de procesos tanto fisiológicos como patológicos, y entre los que cabe destacar por su importancia los relativos a la esfera reproductiva.

Dada la multiplicidad de acción de las prostaglandinas, la bibliografía al respecto es abundante, calculándose en 2-3 los trabajos científicos, que sobre ellas, son publicados diariamente en el mundo.

(1) Departamento de Patología Animal: Sanidad Animal
(2) CENSYRA de Valdepeñas

Sin embargo, y con respecto a la posible influencia de las prostaglandinas seminales, especialmente abundantes en el esperma de hombre^{18,23,33} y de morueco^{11,16,25} sobre las características intrínsecas de los espermatozoides (metabolismo, motilidad, etc.), la bibliografía es más restringida hasta el comienzo de la década de los 70, debido a que los primeros trabajos, realizados al comienzo de los años 50, tales como los de Asplund¹, Hawkins y Labrum²⁴ y Eliasson^{12,13}, negaron que estas sustancias pudieran influir directamente sobre el fisiologismo espermático.

Hay que tener en cuenta que la alta concentración de prostaglandinas presentes en el semen, debería responder a algún objetivo concreto, bien sobre la propia fisiología espermática, acciones sobre el tracto genital femenino, mecanismo íntimo de la fecundación, etc. No obstante y hasta la fecha no se han podido descifrar con claridad muchos de los aspectos del significado biológico de la presencia de prostaglandinas en el semen, siendo numerosos los estudios en curso con vistas a esclarecer este punto.

Al comienzo de los años 70, con el perfeccionamiento de las técnicas laboratoriales y la disponibilidad de prostaglandinas, tanto naturales como sintéticas y sus análogos, comienza por parte de numerosos investigadores, una nueva etapa en el estudio de la participación de las prostaglandinas sobre determinados aspectos de la fisiología espermática que ha llevado incluso, a especular desde la posible utilización de estas sustancias en el tratamiento de ciertos problemas andrológicos como señalan Eskin et al.¹⁴, hasta su empleo en la mejora de los índices de fertilidad que se obtienen en la I.A. con semen descongelado, según apuntan Gustafsson²² y Dimov et al.¹⁰ concretamente en la especie ovina.

El presente trabajo de investigación constituye el primer paso dentro de una amplia línea que planteándose como objetivo final la mejora de la viabilidad del semen descongelado de morueco con vistas a su posterior capacidad fertilizante, estudia el efecto que la adición de prostaglandinas F_{2a}, E₁ y E₂, aisladas o en combinación, y a diferentes niveles de dosificación, ejerce sobre la M.i. del semen descongelado de morueco, parámetro este que está considerado como uno de los indicadores «a priori» de la capacidad fertilizante del material espermático.

MATERIAL

El semen congelado en forma de «pellets», utilizado en la presente experiencia, procede de 12 moruecos de raza Manchega (2-5 años), y fue recogido mediante vagina artificial termorregulada a 40° C, realizándose 2 saltos consecutivos durante 2 días a la semana (época de recogida: julio-noviembre).

La congelación del semen, previamente contrastado (Tabla I) y diluido (1:3 - 1:4) en un medio Tes-Tris-Glucosa-Citrato con un 3% de Glicerol y un 6% de yema de huevo (Graham¹⁹), se realiza en dos fases térmicas a -76°C (hielo seco) y -196°C (nitrógeno líquido), permaneciendo almacenado en nitrógeno líquido 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/pellet (0,1 cc.), diluyente que tiene idéntica composición al de congelación para el caso del grupo control y que para los diferentes grupos experimentales lleva diluidas las prostaglandinas correspondientes. Las muestras seminales una vez descongeladas, permanecen en estufa a 37°C durante 30 minutos hasta el comienzo de las pruebas laboratoriales.

Las prostaglandinas empleadas fueron la F_{2a} (sal Tris), E₁ y E₂ a dosis de 5, 10, 15 y 20 ug/pellet para el caso de la F_{2a}; 25, 50, 75 y 100 ug/pellet para la E₁ y 10, 20, 30 y 40 ug/pellet para el caso de la PGE₂.

Estas prostaglandinas eran almacenadas en congelador, en solución de acetona pura de concentración conocida. Para su empleo en las diferentes pruebas programadas, se pipetea la cantidad de solución necesaria para cada caso, evaporándose la acetona mediante una corriente de Nitrógeno e incorporándose el sedimento (PGS) al diluyente de descongelación.

METODOS

Para la determinación de la Motilidad individual (M.i.) postdescongelación, se utiliza la técnica de gota plana, consistente en depositar una gota de semen descongelado y diluido entre un porta y un cubre, realizándose la lectura con un microscopio óptico a 400 aumentos, y sobre un dispositivo de platina calentable termorregulada a 37°C.

Del contaje en cinco campos diferentes y aleatorios de la muestra, se extrae un valor numérico que expresa el porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles presentes en la misma.

Con vistas a comprobar nuestras hipótesis de trabajo se diseña un modelo experimental que consta de un grupo control y siete grupos experimentales numerados del 1 al 7 y que corresponden a los distintos tipos de prostaglandinas y sus mezclas empleados en cada caso. A su vez, cada grupo experimental se encuentra dividido en cuatro subgrupos correspondientes con los 4 niveles de dosificación empleados para cada prostaglandina o mezcla de prostaglandinas. La codificación de grupos y subgrupos en base al tipo de prostaglandina y nivel de dosificación empleado queda patente en la Tabla II.

El grupo control lo componen 12 muestras seminales (una de cada morueco) y cada grupo experimental 48 muestras seminales, 12 correspondientes a cada subgrupo y dentro de estos una de cada morueco.

El estudio estadístico de los resultados se realiza utilizando la 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 Snedecor³². 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 detalladamente entre qué medias concretas, comparadas dos a dos, existían diferencias con carácter estadísticamente significativo.

RESULTADOS Y DISCUSION

De los resultados obtenidos al suplementar con prostaglandinas el semen descongelado de morueco (Tabla III) se deduce, en primer lugar, que la prostaglandina F_{2a} determina un marcado efecto estimulante sobre la motilidad espermática, altamente significativo con respecto a la M.i. observada en el grupo control ($p < 0,01$), a dosis de 5 ug (Ia), 10 ug (Ib) y 15 ug (Ic) por pellet descongelado (Fig. 1)

Es de resaltar igualmente que a dosis de 15 ug/pellet, la prostaglandina F_{2a} genera un notable incremento de la M.i. con respecto al resto de las prostaglandinas testadas, individualmente o en combinación, y a todos sus niveles, siendo altamente significativo ($p < 0,01$) en relación a 18 del total de subgrupos experimentales (los subgrupos Ia, Ib, IIc, IVb, VIb, VIc, VID, VIIc y VIId no presentan diferencias significativas en relación al Ic).

El resto de prostaglandinas, bien de forma aislada o en combinación, no presenta diferencias significativas con respecto al grupo testigo, en cuanto a sus valores de M.i., si bien se debe reseñar en relación a estos grupos experimentales, que la combinación

de prostaglandinas $F_{2a} + E_1$, en los niveles correspondientes a los subgrupos a, b y c, produce un aumento de la tasa de motilidad en relación al control, disminuyendo esta en el subgrupo d, mientras que el grupo de las prostaglandinas $F_{2a} + E_2$ sucede lo contrario, con unos valores para la M.i. inferiores al control en los subgrupos a, b y c y superiores en el correspondiente al d; la mezcla de prostaglandinas $E_1 + E_2$ por un lado, y la de $F_{2a} + E_1 + E_2$ por otro tienen un comportamiento similar entre sí, con un valor de motilidad individual inferior al control en el primer nivel de dosificación (subgrupo a), y mostrando un aumento de dicho valor con respecto al grupo testigo, para los tres niveles restantes (subgrupos b, c y d). La prostaglandina E_1 y la prostaglandina E_2 (grupos II y III), tienen un comportamiento irregular a sus cuatro niveles de dosificación por lo que se refiere a su acción sobre la motilidad espermática.

Evidentemente, el incremento de la motilidad producido por la prostaglandina F_{2a} , comprobado por nosotros en el presente trabajo, no concuerda con los resultados de los primeros trabajos realizados al efecto (ya citados con anterioridad), si bien la mayoría de estos trabajos estaban realizados en semen humano. No obstante, nosotros tampoco hemos constatado ningún efecto sobre la M.i. para las prostaglandinas E_1 y E_2 .

Nuestros resultados acerca del efecto estimulante de la prostaglandina F_{2a} sobre la motilidad de células espermáticas de morueco, está en consonancia con los obtenidos por Caballero y Palomo^{3,4} en semen humano, aunque estos autores comprueban dicho efecto estimulante también para las prostaglandinas E_1 y E_2 , extremo este que no ha podido ser comprobado para el semen de morueco en nuestra experiencia.

En 1981, Grunberger et al.²⁰ también comprueban el efecto estimulante de la PGF_{2a} (2.500 ng/ml) sobre la motilidad individual de muestras seminales hipocinéticas humanas, en las que el incremento medio hallado fue del 32,8%. En esta misma línea se encuentran los resultados de Schlegel et al.^{30,31} en sendos trabajos realizados en 1981 y 1983.

El efecto positivo sobre la motilidad espermática que produce la adición de prostaglandina F_{2a} , ha sido descrito para el semen bovino por Looney y Godke²⁶ y Guillory et al.²¹, lo que estaría igualmente de acuerdo con nuestros resultados.

En semen de morueco, Gamcik et al.¹⁵ y Daader et al.⁹ comprueban también una mejoría en la tasa de motilidad adicionando un análogo de la prostaglandina F_{2a} , si bien estos autores utilizan semen fresco o diluido en yema-citrato respectivamente.

En contraposición con nuestros resultados se encuentran los de Marley et al.²⁷, quienes utilizando semen de morueco diluido, al que añadían prostaglandinas en las mismas concentraciones encontradas en el semen fresco, no constatan diferencias significativas entre la motilidad de las muestras tratadas y la correspondiente a los controles. Estos autores que emplean una larga serie de prostaglandinas, en lo que se refiere a la PGF_{2a} lo hacen a dosis de 2,3 ug/ml, por lo que independientemente de otras diferencias metodológicas, el rango de dosis de dicha experiencia no coincide con el empleado por nosotros.

En todo caso, el efecto estimulante de la prostaglandina F_{2a} sobre la motilidad individual, parece ser de carácter dosis-dependiente. Efectivamente, Grunberger et al.²⁰ comprueban que en semen humano, concentraciones por encima de los 2.500 ng/ml no producen ningún efecto, mientras que por debajo de este umbral, dicha prostaglandina era mejorada de la motilidad de semen humano, Cohen et al.⁵ encuentran un efecto inhibitorio de la M.i. cuando añadían cantidades de esta sustancia 100 veces superiores a la concentración fisiológica.

Daader et al.⁸ en semen de toro adicionado con 100 ug de prostaglandina F_{2a} , constatan un mayor porcentaje de motilidad que en el semen suplementado con 200 ug.

En nuestro trabajo, el umbral dosis/efecto lo hemos encontrado, para prostaglandina F_{2a} , en 15 ug/pellet, toda vez que a dosis superiores no se detecta el efecto estimulante sobre dicho parámetro.

Un reciente trabajo de Memon, Gustafsson, Graham y Crabo²⁸, confirma el hecho de la interrelación dosis/efecto que la adición de prostaglandina posee sobre ciertos parámetros del semen descongelado de morueco. Estos autores comprueban que, en muestras seminales descongeladas y tratadas con dosis superiores a 300 ug/ml de las prostaglandinas F_{2a} y E_1 , se produce un efecto negativo y depresor sobre la motilidad espermática postdescongelación. Sin embargo, a dosis inferiores y en lo que pudiera parecer discordante con nuestros resultados con la prostaglandina F_{2a} , Memon et al.²⁸, no comprueban el efecto estimulante sobre la motilidad con ninguna de las prostaglandinas ensayadas, si bien hay que tener en cuenta dos factores fundamentales que según nuestro criterio, diferencian básicamente nuestras experiencias; por un lado las dosis utilizadas, ya que estos autores utilizan como nivel de dosificación más bajo, para la prostaglandina F_{2a} , 30 ug/ml, mientras que nosotros empleamos una dosis máxima de 20 ug/pellet (1,1 ml), siendo la dosis efectiva más elevada de 15 ug/pellet, por lo que existe una disociación o no intersección de los rangos de dosificación empleados en ambos trabajos. Por otro lado, es imprescindible señalar que Memon et al.²⁸ añaden las prostaglandinas previamente a la congelación, y nosotros lo hacemos durante la descongelación.

Nuestro planteamiento, en cuanto al momento adecuado para efectuar la suplementación del semen con prostaglandinas, está en concordancia con un trabajo de Varnavskii³⁴, en el que comprueba una mayor tasa de fertilidad en ovejas inseminadas con semen descongelado, al que se añadían prostaglandinas F_{2a} y E_1 después de la descongelación que cuando utilizaba semen al que adicionaba prostaglandinas previamente a la congelación.

Partiendo del hecho probado de que las prostaglandinas están, de una forma u otra, íntimamente ligadas a la fertilidad, todo lo anteriormente expuesto, estaría relacionado con la drástica disminución que las prostaglandinas seminales sufren con los procesos de dilución, equilibrado y congelación, tal y como ha sido descrito por diversos autores^{2,17,29}, por lo que es factible concluir que esta disminución por vía metabólica de las prostaglandinas presentes en el semen, tiene lugar de igual forma para las de origen endógeno como para las exógenas (añadidas experimentalmente).

RESUMEN

Se estudia el efecto que la adición de prostaglandinas F_{2a} , E_1 y E_2 , solas o en combinación y a cuatro niveles de dosificación, ejerce sobre la motilidad individual postdescongelación (M.i.) del semen descongelado de morueco. Se comprueba cómo las muestras seminales adicionadas con 5, 10 y 15 ug/pellet de prostaglandina F_{2a} , presentan una M.i. que es superior y estadísticamente significativa ($p < 0,01$) en relación al valor de este parámetro en el grupo control. No se detectan variaciones en la M.i. del resto de los grupos experimentales correspondientes a las otras prostaglandinas utilizadas en la presente experiencia y sus combinaciones.

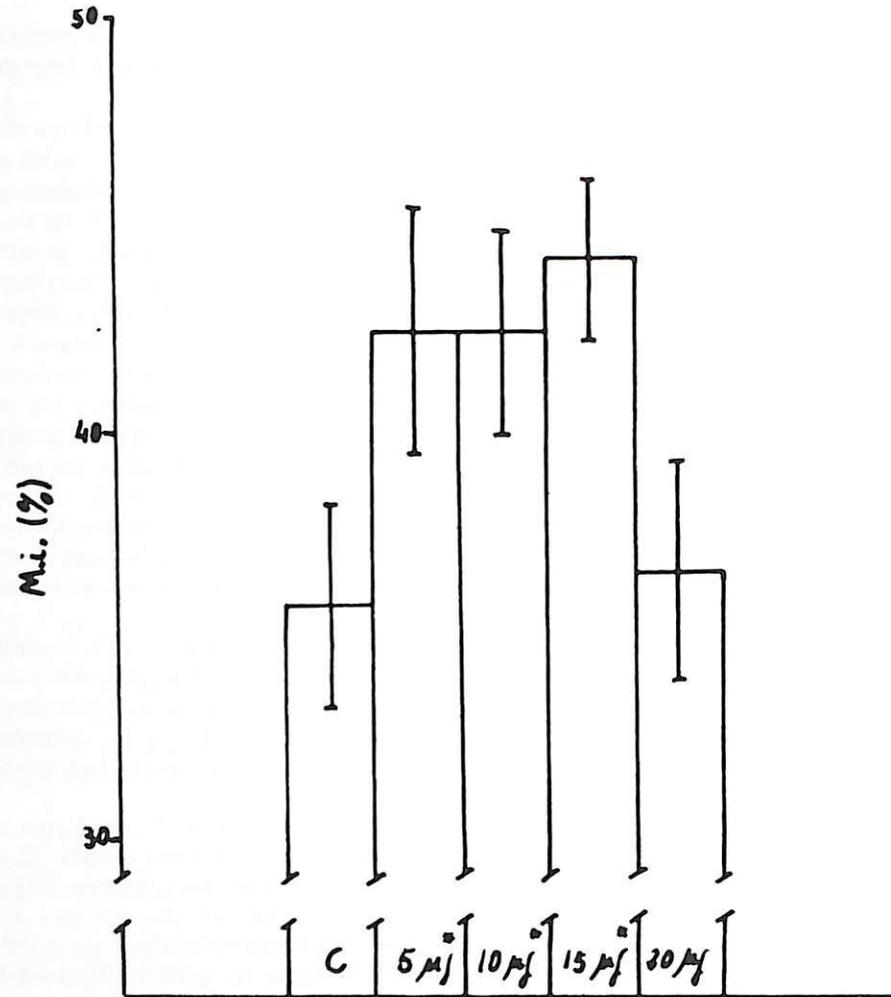


Fig. 1.- Histograma de la M.i. (%) del grupo I. (Prostaglandina F_{2a})

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

TABLA I
Características mínimas exigidas a los eyaculados para proceder a su congelación

Volumen	Motilidad Masal	M.i.	Concentración	Formas anormales
≥ 0,7	≥ +++	≥ 70	3000 x 10 ⁶ spz/cc	≥ 25%

TABLA II
Codificación de grupos y subgrupos

GRUPO CONTROL		
GRUPO I (F _{2a})	Subgrupo Ia	5 ug/pellet
	Subgrupo Ib	10 ug/pellet
	Subgrupo Ic	15 ug/pellet
	Subgrupo Id	20 ug/pellet
GRUPO II (E ₁)	Subgrupo IIa	25 ug/pellet
	Subgrupo IIb	50 ug/pellet
	Subgrupo IIc	75 ug/pellet
	Subgrupo IIId	100 ug/pellet
GRUPO III (E ₂)	Subgrupo IIIa	10 ug/pellet
	Subgrupo IIIb	20 ug/pellet
	Subgrupo IIIc	30 ug/pellet
	Subgrupo IIId	40 ug/pellet
GRUPO IV (F _{2a} + E ₁)	Subgrupo IVa	5 ug + 25 ug/pellet
	Subgrupo IVb	10 ug + 50 ug/pellet
	Subgrupo IVc	15 ug + 75 ug/pellet
	Subgrupo IVd	20 ug + 100 ug/pellet
GRUPO V (F _{2a} + E ₂)	Subgrupo Va	5 ug + 10 ug/pellet
	Subgrupo Vb	10 ug + 20 ug/pellet
	Subgrupo Vc	15 ug + 30 ug/pellet
	Subgrupo Vd	20 ug + 40 ug/pellet
GRUPO VI (E ₁ + E ₂)	Subgrupo VIa	25 ug + 10 ug/pellet
	Subgrupo VIb	50 ug + 20 ug/pellet
	Subgrupo VIc	75 ug + 30 ug/pellet
	Subgrupo VIId	100 ug + 40 ug/pellet
GRUPO VII (F _{2a} + E ₁ + E ₂)	Subgrupo VIIa	5 ug + 25 ug + 10 ug/pellet
	Subgrupo VIIb	10 ug + 50 ug + 20 ug/pellet
	Subgrupo VIIC	15 ug + 75 ug + 30 ug/pellet
	Subgrupo VIId	20 ug + 100 ug + 40 ug/pellet

TABLA III
Motilidad individual postdescongelación (%). Resumen de resultados (medias)

Grupo Control	35,83 ± 2,53			
	Subgrupo a	Subgrupo b	Subgrupo c	Subgrupo d
Grupo I	42,50 ± 2,72*	42,50 ± 2,42*	44,17 ± 1,93*	36,67 ± 2,64
Grupo II	37,08 ± 2,34	35,83 ± 1,83	37,92 ± 2,50	35,00 ± 3,14
Grupo III	37,08 ± 2,34	35,00 ± 2,13	35,83 ± 2,37	36,67 ± 2,16
Grupo IV	37,08 ± 2,26	40,42 ± 2,34	37,50 ± 1,44	32,08 ± 1,79
Grupo V	35,00 ± 1,85	34,58 ± 1,56	32,08 ± 1,68	37,50 ± 1,44
Grupo VI	34,17 ± 1,72	37,92 ± 1,79	40,83 ± 1,93	38,33 ± 1,67
Grupo VII	35,00 ± 2,38	36,25 ± 1,64	39,17 ± 1,61	41,67 ± 2,41

M.D.S. 6,67

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

PROSTAGLANDINS POSSIBILITIES OF USE IN THE INDIVIDUAL MOTILITY IMPROVEMENT ON THE FROZEN-THAWED RAM SEMEN

SUMMARY

It is studied the effect that the addition of prostaglandins F_{2a} , E_1 and E_2 alone or mixed and in four dosification levels, exert on the individual post-thawed motility of the frozen-thawed ram semen. It is checked like the semen samples added with 5, 10 and 15 ug/pellet of prostaglandin F_{2a} , show a individual motility which is higher and statistically significant ($p < 0,01$) in comparison with this parameter value in the control group. Variations are not noticed in the individual motility of the rest of the experimental groups corresponding to the others prostaglandins used in the present experience and its combinations.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ASPLUND, J. (1947). A quantitative determination of the content of contractive substances in human sperm & their significance for the motility & vitality of the spermatozoas. *Acta Physiol. Scand.* 13: 103.
- 2) BRUMMER, H. C. y GUILLESPIE, A. (1972). Seminal prostaglandins & fertility. *Clinical Endocrinology* 1 (4): 363-8.

- 3) CABALLERO, A. y PALOMO, A. (1973). Motilidad espermática y prostaglandina F_{2a} . *Bol. de la Soc. Ginecológica Española* 4 (5): 5.
- 4) CABALLERO, A. y PALOMO, A. (1973). Motilidad espermática y PGs F_{2a} , E_1 y E_2 . *Toko-Ginecología Práctica* 333: 1.335-56.
- 5) CHOEN, M. S., COLIN, M. J., GOLIMBU, M. y HOTCHKISS, R. S. (1977). Effects of PGs on sperm motility. *Fert. Steril.* 28: 78-85.
- 6) COLAS, G., TRYER, M., GUERIN, G. y AGUER, D. (1980). Survival & fertilizing ability of ram sperm stored in a liquid state during 24 hours. *Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I., Vol. V:* 161-4.
- 7) CORTEEL, J. M. y PAQUIGNON, M. (1984). Preservation of the male gamete. *Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I., Vol. II:* 20.
- 8) DAADER, A. H. y EL-KERABY, F. (1982). Survival rate of bull spermatozoa supplemented with estrogen, progesterone & PGF $2a$. *Proc. 6th Int. Conf. Anim. & Poultry Production, Vol. I:* 192-7.
- 9) 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. n° 362.*
- 10) DIMOV, V. y GEORGIEV, G. S. (1976). Prostaglandins & fertilizing ability of ram semen. 2. The effect of primary diene prostaglandins on conception rate. *Zhivotnov'dni Nauki* 13 (5): 50-4, Abstr.
- 11) DIMOV, V. y GEORGIEV, G. (1977). Ram semen PG concentration & its effect on fertility. *J. Anim. Sci.* 44: 1.050-4.
- 12) ELIASSON, R. (1959). Studies on prostaglandins. Occurrence formation & biological actions. *Acta Physiol. Scand.* 46 (Suppl. 158): 1-73.
- 13) ELIASSON, R., MURDOCK, R. N. y WHITE, I. G. (1968). The metabolism of human spermatozoa in the presence of PGE 1 . *Acta Physiol. Scand.* 73: 379.
- 14) ESKIN, B. A., AZARBAL, S., SEPIC, R. y SLATE, W. G. (1973). In vitro response of the spermatozoa-cervical mucus system treated with prostaglandin (F_{2a}). *Obstet. Gynecol. N.Y.* 41: 436-9.
- 15) GAMCIK, P., SCHVARC, F. y MESAROS, P. (1982). A study of the effect of PGF $2a$ on some properties of ram spermatozoa & on the passage of spermatozoa through the genital organs of sheep. *Biol. Chem. Zhivoc. Vyroby Vet.* 18 (3): 245-51. Abstr.
- 16) GEORGIEV, G. S. y DIMOV, V. (1979). PGs & fertilizing ability of ram semen. 3. Relationships between the concentration of 9-Keto PGs & conception rate. *Zhivot. Nauk.* 16 (5): 79-83, Abstr.
- 17) GEROZISSIS, K. y DRAY, F. (1981). Radioimmunoassay of PGs in the semen of fertile men. *J. Reprod. Fert.* 61: 487-90.
- 18) GEROZISSIS, K., JOUANNET, P., SOUFIR, J. C. y DRAY, F. (1982). Origin of PGs in human semen. *J. Reprod. Fert.* 65: 401-4.
- 19) 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.
- 20) GRUNBERGER, W., MAIER, U. y LUNGLMAYR, G. (1981). Effect of PGF $2a$ on sperm motility in vitro. *Reproducción* 5: 141-4.
- 21) GUILLORY, B. M., POOL, S. H., BYRD, E. W. y GODKE, R. A. (1979). Effect of various concentrations of PGF $2a$ (THAM) on bovine spermatozoa in vitro. *Theriogenology* 11: 100.
- 22) GUSTAFSSON, B., EDQUIST, S., EINARSSON, S. y LINGE, F. (1975). Fertility of deep-frozen ram semen supplemented with PGF $2a$. *Acta Vet. Scand.* 16 (3): 468-70.
- 23) HAMBERG, M. y SAMUELSSON, B. (1966). Prostaglandins in human seminal plasma. *J. Biol. Chem.* 241 (2): 257-63.
- 24) HAWKINS, D. F. y LABRUM, A. H. (1956). Function of the prostate. *Brit. Med. J.* 2: 1.236.
- 25) IVANOV, N. y DIMOV, V. (1974). The concentration of E prostaglandins in ram semen. *Zhivotnov'dni Nauki* 11 (5): 103-7. Abstr.
- 26) LOONEY, C. R. y GODKE, R. A. (1980). Influence of PGF $2a$ (THAM) & cloprostenol upon bovine spermatozoa in vitro. *Theriogenology* 13: 101.
- 27) 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.
- 28) MEMON, M. A., GUSTAFSSON, B. K., GRAHAM, E. F. y CRABO, B. G. (1984). Effects of prostaglandin supplementation on frozen-thawed ram spermatozoa. *Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I., Vol. II:* 201.
- 29) PIERCE, R. J. y DOWNEY, B. R. (1981). PGs in fresh & frozen bull semen. *Can. J. Anim. Sci.* 61: 1.086.
- 30) SCHLEGEL, W., FISCHER, B., BEIER, H. M. y SCHNEIDER, H. P. (1983). Effects on fertilization of rabbits of insemination with ejaculates treated with PG-deshydrogenase & antisera to PGE 2 & PGF $2a$. *J. Reprod. Fert.* 68: 45-50.
- 31) SCHLEGEL, W., ROTERMUND, S., FARBER, G. y NIESCHLAG, E. (1981). The influence of prostaglandins on sperm motility. *Prostaglandins* 21 (1): 87-99.
- 32) SNEDECOR, G. W. y COCHRAN, W. G. (1973). *Métodos Estadísticos*. Edt. C.E.C.S.A. (1ª ed.), México.
- 33) TAYLOR, R. L. y KELLY, R. W. (1974). 19-Hydroxylated E PGs as the major PGs of human semen. *Nature, Lond.* 250: 665-7.
- 34) VARNAVSKII, A. N. (1981). The effect of synthetic PGs in frozen ram semen on conception rate of ewes. *Zhivotnovodstvo* 9: 51-3. Abstr.