

EFFECTO DE DIFERENTES NIVELES DE PROSTAGLANDINA (DINOPROST Y CLOPROSTENOL) Y GLICOSAMINOGLICANOS (ÁCIDO HIALURÓNICO) EN LA MOTILIDAD, POSTDESCONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS

Leonardo Hernández Corredor^{1,2}

J. Páez Barbosa¹

A. Quintero Moreno³

W. Herrera Cáceres¹

J. Rubio Parada^{1,2}

¹Universidad Francisco de Paula Santander

²Servicio Nacional de Aprendizaje SENA-Regional Norte de Santander

³Unidad de Investigación en Producción Animal (UNIPA)

Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad del Zulia (LUZ)

Autores para correspondencia: lehernandez@fa.luz.edu.ve; lhernandezc@sena.edu.co

Resumen: El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de dos niveles: prostaglandina y glicosaminoglicanos en la motilidad espermática. Un total de 90 muestras fueron obtenidas de 3 machos adultos de la raza Gyr (animales del Centro de Biotecnología del Caribe CBC; SENA, Valledupar) divididas en 6 tratamientos y 5 repeticiones por tratamiento. Todos los eyaculados fueron evaluados y luego divididos en 6 alícuotas y congelados mediante un protocolo estándar empleando el diluyente comercial Andro-Med®. Después de la congelación, se evaluó motilidad espermática (mediante análisis espermático asistido por computadora CASA). El tratamiento control y el tratamiento de 0,1 µL de cloprostenol presentaron valores estadísticamente ($P \leq 0,05$) superiores para la mayoría de parámetros seminales evaluados: Motilidad ($68,71 \pm 26,3$ % y $60,80 \pm 12,9$ %, respectivamente); y progresividad ($18,75 \pm 11,3$ % y $17,01 \pm 6,9$ %, respectivamente). El tratamiento de 0,1 µL ácido hialurónico presentó los mejores valores en los parámetros de velocidad curvilínea (VCL), velocidad media (VAP) y la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH). Para los parámetros velocidad rectilínea (VSL), índice de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR), índice de oscilación (WOB), y frecuencia de batido de cabeza (BCF), no existieron diferencias estadísticas ($P \geq 0,05$). Concluyendo, los datos obtenidos en el estudio reflejan daños espermáticos debido al proceso de criopreservación de espermatozoides bovinos en el CBC.

Palabras Clave: CASA, Ácido hialurónico, Prostaglandina, Cloprostenol, Motilidad espermática.

THE EFFECT OF DIFFERENT LEVELS OF PROSTAGLANDIN (DINOPROST AND CLOPROSTENOL) AND GLYCOSAMINOGLYCANS (HYALURONIC ACID) IN POST-THAWING BOVINE SPERM MOTILITY

Abstract: The aim of this study was to evaluate the effect of two levels: prostaglandin and glycosaminoglycans in sperm motility. A total of 90 samples were obtained from three adult male Gyr breed (animals from The Biotechnological Center of Caribe, CBC, SENA, Valledupar, Colombia) divided into 6 treatments and 5 replicates per treatment. All ejaculated semen was evaluated, divided into 6 aliquots and then, frozen by means of a standard protocol using the commercial diluent, AndroMed®. After freezing, sperm motility was evaluated by means of computer-assisted sperm analysis (CASA). The control treatment and the cloprostenol treatment (0.1 mL) showed statistically higher values ($P \leq 0.05$) for most of the evaluated seminal parameters: motility ($68.71 \pm 26.3\%$ and $12.9 \pm 60.80\%$, respectively); and progressiveness ($18.75 \pm 17.01 \pm 11.3\%$ and 6.9% , respectively). Hyaluronic acid treatment (0.1 μ L) showed the best values in the parameters of curvilinear (VCL) and average path velocity (VAP), and the mean amplitude of lateral sperm head (ALH) displacement. For straight-line velocity (VSL), linearity index (LIN), straightness index (STR), wobble (WOB) and beat cross frequency (BCF), there were no statistical differences ($p \geq 0.05$). In conclusion, the data obtained in the study reflects sperm damage due to cryopreservation of bovine sperm at the CBC.

Keywords: CASA, Hyaluronic acid, Prostaglandin, Cloprostenol, Sperm motility.

Introducción

En la actualidad los procesos de reproducción animal hacen parte de un área muy estudiada, pero en el campo de la aplicación su efectividad es baja debido a diversos problemas a la hora de llevar a cabo la fertilización *in vivo*: en la hembra bovina se evidencian problemas como nutrición, manejo, sanidad, y niveles de hormonas, entre otros; en los técnicos inseminadores, fallas en la sincronización, detección de celos, fallas en la técnica, y en los tiempos de la inseminación, entre otros; en el semen, la concentración espermática, la viabilidad, la motilidad, la activación espermática, y las deformidades espermáticas, entre otras (González-Stagnaro, 2011).

La motilidad espermática en bovino ha sido estudiada por diferentes autores como Rodríguez-Martínez (2003), Rubio-Guillen *et al.* (2007), Quintero-Moreno y Rubio, (2010); algunos han evaluado la inclusión de an-

tioxidantes (Bucak, *et al.*, 2007; Sariözkan *et al.*, 2009, Nasiri *et al.*, 2012), medios diluyentes (Foote *et al.*, 2002; Mousa *et al.*, 2002; Büyükleblebici *et al.*, 2014), tiempos de estandarización y diferencias entre razas (Pacheco *et al.*, 2003; Dorji *et al.*, 2014), pero no se han incluido sustancias para incrementar su motilidad. A nivel *in vitro* se quiere estudiar el estado fisiológico que presentan los espermatozoides al momento de la descongelación, debido a que en el proceso de congelación seminal pierden en gran porcentaje una adecuada capacitación.

La adición de prostaglandina F₂ α (PGF₂ α) en el semen porcino ha demostrado que aumenta ligeramente parámetros reproductivos en cerdas, como la tasa de concepción y el número total de cerdos nacidos (De Ondiz, 2011). La PGF₂ α afecta estos parámetros, y aunque todavía no se ha dilucidado, es posible que incremente el

transporte de los espermatozoides después de la inseminación. Estos estudios no se han realizado en el semen bovino (Maes *et al.*, 2003).

El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano al igual que la heparina, que se usa en la capacitación *in vitro* de espermatozoides, pero los diferentes costos son altos. El uso de PGF₂α (Dinoprost, Cloprostenol) en el mundo científico está en debate por cuanto varios estudios aplican grandes cantidades de prostaglandinas que afectan la motilidad de los espermatozoides, pero ¿qué sucede cuando las dosis son más bajas?

Tratar de predecir la fertilidad de los toros *in vitro* es una manera de disminuir costos en el proceso reproductivo, por ello un aumento en la motilidad espermática prematura pudiera ser o no ser la solución. Adicionalmente, en cuanto a los problemas de daño en la calidad espermática, se debe contemplar que las fallas en la concepción son multifactoriales (Gutierrez-Añez, 2014). Pero se necesita determinar si acelerando la capacitación tendrá mejores resultados en términos de preñez; es bastante arriesgado si no se controla la totalidad de las variables ajenas a esta razón (Palma *et al.*, 2007). Aún no se ha podido demostrar una clara relación predictiva con la resistencia a la criopreservación y con el potencial reproductivo de un semental: primero, no reflejan adecuadamente la fisiología o funcionalidad de la población de los espermatozoides que permanecen viables; segundo, existen diferencias técnicas en los procedimientos empleados por los diferentes laboratorios, lo que afecta la repetición de los resultados; y tercero, la mayoría de las pruebas utilizan técnicas de evaluación visual de gran subjetividad por lo que generan una alta variabilidad entre laboratorios y entre operadores (Hernández-Corredor *et al.*, 2013).

Los parámetros espermáticos clásicos que se consideran en un análisis de calidad seminal incluyen en general la motilidad, concentración y vitalidad espermática; así como las anomalías morfológicas (Quintero-Moreno, 2003; Marco-Jiménez *et al.*, 2008; Dorado *et al.*, 2009). Las principales razones por las cuales las pruebas de evaluación seminal rutinaria no han podido demostrar una

clara relación predictiva con la resistencia a la criopreservación y con el potencial reproductivo de un semental se debe a que no se refleja adecuadamente la fisiología o funcionalidad de la población de espermatozoides que permanecen viables, y también, a que existen diferencias técnicas procedimentales, lo que afecta su repetitividad (Dorado *et al.*, 2010). Otra razón es que la mayoría de las pruebas utilizan técnicas de evaluación visual de gran subjetividad, por lo que generan una alta variabilidad entre laboratorios y operarios (Gravance y Davis, 1995; Foxcroft *et al.*, 2008).

El objetivo del presente estudio fue evaluar diferentes niveles de inclusión de prostaglandinas (Dinoprost, Cloprostenol) y glicosaminoglicanos (ácido hialurónico) en semen de bovinos postdescongelado *in vitro* a través del sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis), a través de un análisis de motilidad espermática.

Materiales y métodos

Se evaluaron 3 machos bovinos de la raza Gyr entre 6 y 8 años de edad y de fertilidad conocida, pertenecientes a la Central de Biotecnología del Caribe (CBC) en Valledupar, departamento del Cesar. Los animales fueron mantenidos bajo una dieta estándar. La colecta de semen fue realizada por medio de electroeyaculación (Electroyac 5®). Las muestras fueron mantenidas en baño maría a 37 °C hasta su valoración. Se realizó la evaluación convencional del material seminal a nivel macroscópico [volumen (mL), pH] y microscópico [motilidad masal (%) e individual (%), concentración espermática (spz/mL) y anomalías morfológicas (%)]. Las muestras clasificadas como excelentes, fueron sometidas a dilución en el medio comercial Andromed®, Dinoprost trometamina (Lutalyse®, Pfizer®); Cloprostenol sódico (Estrumate®, Merck Animal Health®, MSD) y ácido hialurónico (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA); en los siguientes protocolos para su posterior criopreservación (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de los tratamientos en la investigación

Tratamiento		Descripción
T0	Comercial	Semen completo
T1	0,1 µl Dinoprost	Semen completo más adición de 0,1 µl Dinoprost
T2	0,5 µl Dinoprost	Semen completo más adición de 0,5 µl Dinoprost
T3	0,1 µl Cloprostenol	Semen completo más adición de 0,1 µl Cloprostenol
T4	0,5 µl Cloprostenol	Semen completo más adición de 0,5 µl Cloprostenol
T5	0,1 µl ácido Hialurónico	Semen completo más adición de 0,1 µl ácido hialurónico

Las muestras de semen fueron diluidas en cada uno de los tratamientos a 37°C y equilibradas por un periodo de 2 horas. Seguidamente, fueron envasadas en pajillas (0,5 mL) con una concentración promedio de 30×10^6 espermatozoides/pajilla y de allí fueron llevadas a -110°C por 10 min para ser sumergidas en nitrógeno líquido (-196°C) para su almacenamiento. Las pajillas fueron transportadas al laboratorio de andrología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia (Venezuela) en un termo-tanque (MVE®, Millenium), donde se procedió a realizar la valoración de los parámetros C.A.S.A. (MICROPTIC®, versión 2002, Barcelona, España) y evaluadas bajo un aumento 100 X (Olympus BX40, Olympus Optical Co., Ltda.). Se evaluó un total de 5 pajillas por tratamiento, previamente colocadas a 37°C durante 5 minutos en baño maría. El análisis se realizó sobre alícuotas de semen de 5 µL en láminas Leja® (20 micras - 4 cámaras). Las imágenes fueron tomadas en un lapso de 1 segundo y la velocidad de captura de cada imagen fue de 1 cada 40 microsegundos.

Se evaluó el porcentaje de motilidad y espermatozoides progresivos (PRO, %), velocidad curvilínea (VCL, µm/s), velocidad rectilínea (VSL, µm/s), velocidad media (VAP, µm/s), índice de linealidad (LIN, promedio entre VSL/VCL), índice de rectitud (STR, promedio entre VSL/VAP), índice de oscilación (WOB, promedio entre VAP/VCL), amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH, µm/s) y frecuencia de batido de la cabeza (BCF, Hz) (Mortimer, 1997). Se estimaron los valores promedios para cada una de las variables y se

realizó un análisis de varianza. Se aplicó la comparación de medias por medio de la prueba de Duncan ($P < 0,05$) utilizando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, versión 9,1).

Resultados y discusión

En la Tabla 2. El parámetro de la motilidad donde se observa que fue afectado por los niveles de inclusión de prostaglandinas, el tratamiento T3 (0,5 µl Cloprostenol) $60,80 \pm 12,9$ % fue menor que el tratamiento control T0 (Comercial) $68,71 \pm 26,3$ % sin presentar diferencias significativas ($P \geq 0,05$). Para el parámetro de progresividad el tratamiento 0 (comercial) presentó mejor progresividad con $18,75 \pm 11,3$ %, seguido del tratamiento 0,1 µl de Cloprostenol con $17,01 \pm 6,9$ %, el tratamiento de 0,1 µl de Dinoprost fue el de más baja progresividad con $8,28 \pm 6,5$ %.

La Tabla 3 muestra los índices de motilidad espermática en donde se encontraron diferencias altamente significativas entre tratamientos para los parámetros evaluados ($P \leq 0,001$). Se evaluaron los parámetros de motilidad de espermatozoides móviles y rápidos; al aplicar la prueba de comparación de medias por el método de Duncan ($P \leq 0,05$), se observaron solo diferencias en el parámetro de ALH (amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza) en los espermatozoides rápidos, teniendo mejor índice el tratamiento 0,1 µl de Cloprostenol con $3,4 \pm 0,14$ µm/s; seguido del tratamiento 0 con $3,27 \pm 0,37$ µm/s, el tratamiento 0,5 µl de Dinoprost mostró el índice más bajo con $2,91 \pm 0,67$ µm/s.

Tabla 2. Motilidad y progresividad espermática

Tratamientos	Motilidad (Porcentaje)	Desviación estándar	Progresividad (Porcentaje)	Desviación estándar
Tratamiento 0	68,71 ^b	26,3	18,75 ^a	11,3
0,1 Dinoprost	38,92 ^a	20,5	8,28 ^a	6,5
0,5 Dinoprost	52,30 ^{ab}	34,1	13,68 ^a	11,6
0,1 Cloprostenol	60,80 ^{ab}	12,9	17,01 ^a	6,9
0,5 Cloprostenol	42,98 ^{ab}	25,1	11,10 ^a	8,2
0,1 Hialurónico	48,31 ^{ab}	21,4	11,80 ^a	6,9

Superíndices diferentes (a-b) en una columna indican diferencias significativas entre los tratamientos (P<0,05)

Tabla 3. Índices de motilidad para las muestras de semen

PARÁMETROS	T0	0,1 Dinoprost	0,5 Dinoprost	0,1 Cloprostenol	0,5 Cloprostenol	0,1 Hialurónico	
Espermatozoides móviles	VCL $\mu\text{m/s}$	47,20 ^a	37,50 ^a	40,25 ^a	51,31 ^a	41,01 ^a	47,22 ^a
	VSL $\mu\text{m/s}$	20,6 ^a	15,66 ^a	17,51 ^a	21,18 ^a	17,9 ^a	19,47 ^a
	VAP $\mu\text{m/s}$	29,9 ^a	23,36 ^a	25,7 ^a	31,78 ^a	26,05 ^a	29,12 ^a
	LIN (%)	43,75 ^a	41,85 ^a	43,2 ^a	41,24 ^a	44,02 ^a	41,47 ^a
	STR (%)	69,18 ^a	67,45 ^a	67,73 ^a	66,48 ^a	68,82 ^a	67,23 ^a
	WOB (%)	63,08 ^a	62,06 ^a	63,56 ^a	61,81 ^a	63,97 ^a	61,66 ^a
	ALH ($\mu\text{m/s}$)	2,75 ^a	2,72 ^a	2,63 ^a	2,95 ^a	2,74 ^a	2,95 ^a
	BCF (Hz)	8,7 ^a	6,4 ^a	6,81 ^a	8,58 ^a	7,74 ^a	8,16 ^a

VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad rectilínea; VAP: Velocidad media; LIN: Índice de linealidad; STR: Índice de rectitud; WOB: Índice de oscilación; ALH: Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide; BCF: Frecuencia de batido de la cabeza.

Superíndices diferentes (a-b) en una fila indican diferencias significativas entre los tratamientos (P<0,05)

Conclusión

El desarrollo de nuevas tecnologías *in vitro* como la citometría de flujo o los sistemas de análisis automatizados de espermatozoides CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) permiten el estudio de múltiples características funciona-

les y morfológicas de los espermatozoides para intentar predecir su capacidad fecundante (Quintero-Moreno *et al.*, 2011). El CASA fue propuesto por Dott y Foster (1979) y en la actualidad es usado en centros de andrología humana y veterinaria. Flowers (1997) mostró cómo el porcentaje

de espermatozoides móviles únicamente proporciona una estima cuantitativa de la fertilidad y su uso se limita cuando se alcanzan valores superiores. Broekhuijse *et al.* (2012) mostraron correlaciones negativas en algunos parámetros CASA vs fertilidad. Amann y Waberski (2014), consideran que la mayor velocidad resultante es lo mejor, pero no existe una evidencia biológica. Se ha reportado que diferentes parámetros tienen efectos opuestos sobre los índices de preñez y el número de animales nacidos, así como la velocidad curvilínea (VCL) y frecuencia de batido de cabeza (BCF) explican la variación en los índices de preñez; mientras que la velocidad media (VAP), índice de linealidad (VSL) y la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH) explican la variación en el número de crías (Kathiravan *et al.*, 2010; Silvestre *et al.*, 2011). Por lo anterior se deben tener en cuenta los resultados de la fertilidad antes de eliminar un toro o pajillas postdescongelación hasta no tener la información completa *in vivo* e *in vitro*.

El conocimiento preciso y objetivo de las velocidades cinemáticas como la calidad de movimiento de los espermatozoides contenidos en las muestras de material seminal criopreservado es el mejor indicador de su calidad (Ávila-Portillo *et al.*, 2006), ya que se ha encontrado una correlación significativa entre la motilidad y la fertilidad en bovinos (Budworth *et al.*, 1988), equinos (Buzón, 2013), humanos (Hirano *et al.*, 2001), conejos (Lavara *et al.*, 2005) y porcinos (Vyt *et al.*, 2008).

La motilidad del espermatozoide es una de las características más importantes asociada con la capacidad fecundante del semen y por muchos años ha sido reconocida como esencial para el transporte de espermatozoides y la fertilización en el tracto reproductivo femenino (Januskauskas *et al.*, 1999). Sin embargo, la evaluación visual de la motilidad después de la descongelación, muchas veces es el único parámetro utilizado para determinar la calidad del semen en bovinos, Tartaglione y Ritta (2004) demostraron que existe una correlación muy alta con la fertilidad. Este método es más económico y rápido, pero también es subjetivo e inexacto. Una evaluación más objetiva y precisa de la motilidad del espermatozoide se puede lograr utilizando una observación asistida por ordenador analizador de semen (CASA) (Dorado *et al.*, 2007), que proporciona cálculos

más precisos de la velocidad y la trayectoria de cada célula espermática (Farrell *et al.*, 1996).

En referencia a los resultados de la valoración del parámetro de motilidad por el método CASA de las muestras de material seminal criopreservadas bajo los diferentes tratamientos, Alapati *et al.* (2009) informaron que el porcentaje de espermatozoides móviles debe estar por encima de 33 %. Siendo así, el tratamiento 0 (comercial) y tratamiento 0,1 μ l de Cloprostenol presentaron valores superiores a los reportados por Rubio-Guillen *et al.* (2007) y Leite *et al.* (2010); y valores muy parecidos a los resultados descritos por Janett *et al.*, (2005), y Anzar *et al.*, (2011).

Pero también es probable que debido a las diferencias en razas de los toros, haya diferencias entre razas en el proceso de congelación seminal; en particular, las razas europeas tienen una tasa de congelación seminal superior a las razas cebú (Anchieta *et al.*, 2005), probablemente debido a un mayor tiempo de selección para rasgos reproductivos. Esto pudiera ser una explicación plausible a lo sucedido en el presente estudio.

Para el parámetro de progresividad espermática, Galli *et al.* (1991) definen que este valor debe estar por encima de 22 %; comparado con los valores reportados en el estudio de Anzar *et al.* (2011) con un 70 % de progresividad, se encuentran los valores muy por debajo de los resultados de la investigación; destacando que el estudio no fue realizado con animales *Bos indicus*, Najjar *et al.* (2013), y trabajando con 4 animales de raza Holstein, diluyeron las muestras seminales con Bioxcell® y obtuvieron 19, 31, 28 y 11 % de progresividad espermática. En el estudio los datos de progresividad son muy bajos debido a que se presentan daños en la integridad del espermatozoide en el proceso de congelación seminal y son pocas las células que resisten el proceso de criopreservación.

Sobre los índices de motilidad espermática en la investigación, se encontró que el tratamiento 0,1 μ l ácido hialurónico obtuvo los mayores valores para los parámetros VCL, VAP y ALH. Algunos estudios reportan que valores altos para VCL y ALH son indicativos de espermatozoides hiperactivados (Kathiravan *et al.*, 2010). Los valores encontrados en el estudio muestran que los espermatozoides móviles tienen daños a nivel del flagelo después del proce-

so de postdescongelación, no alcanzando los parámetros medios descritos en estudios anteriores.

Según Bravo *et al.* (2011), el índice de rectitud (STR) define los espermatozoides que son considerados progresivos cuando el valor es superior a 80 %. El daño espermático a nivel del flagelo se observa por los niveles obtenidos en el estudio.

Para el parámetro índice de linealidad (LIN), según el estudio de Cox *et al.* (2006), se determinó que existe una alta correlación con los demás parámetros de motilidad evaluados por el sistema CASA, indicando que valores mayores a 50 % en espermatozoides evaluados *in vitro* presentan una excelente migración. Adicionalmente, parámetros como LIN y ALH parecen ser indicadores de la hiperactivación de los espermatozoides (Peña y Linde-Forsberg, 2000). Sin embargo, para Quintero-Moreno (2003) un valor bajo (menor a 50 %) para el parámetro LIN está correlacionado a la hiperactivación espermática. El proceso de criopreservación puede causar una hiperactivación espermática y se evidencia en los resultados obtenidos en el estudio.

Para los índices de ALH y BCF se encontraron niveles bajos comparados con los reportes de Caiza de la Cueva *et al.*, (1997), Quintero-Moreno (2003), Kathiravan *et al.*, (2008), Leite *et al.*, (2010). Los desplazamientos de la cabeza y la frecuencia de batido en el estudio mostraron datos muy bajos respecto a los promedios (12 $\mu\text{m/s}$ y 25 Hz, respectivamente), por lo que se concluye que en los procesos de congelación existieron daños estructurales que afectaron a los espermatozoides.

Los espermatozoides rápidos los presentó el tratamiento 0 (comercial) y 0,1 μl de Cloprostenol, mientras que los tratamientos con el Dinoprost (forma natural de PGF₂ α) no evidenciaron daños a nivel de la motilidad para la investigación, pues presentó los mayores niveles de espermios estáticos. Esta disminución puede ser explicada por la estimulación de producción de GMP cíclico mediada por las PGF₂ α .

Los datos obtenidos reflejan daños espermáticos debido al proceso de criopreservación, los daños de las membranas espermáticas se evidencian en cada uno de los parámetros evaluados. Se pueden evaluar nuevos niveles de ácido hialurónico, así como evaluar niveles de

AINES para observar cómo actúa en la motilidad espermática postdescongelación.

Agradecimiento

Al CBC (Centro de Biotecnología del Caribe) del SENA, por el préstamo de las instalaciones para el desarrollo de la primera fase de la investigación, así como a los especialistas Jesús Leyva y César Cifuentes.

Referencias

- Anchieta, M.; Filho, V.; Colosimo, E.; Sampaio, I.; y Andrade, V. (2005). Semen discarded and freezing ability of Zebu and European bulls from a Brazilian artificial insemination centre. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 57, pp. 196-204.
- Alapati, R.; Stout, M.; Saenz, J.; Gentry, G. T.; Godke, R. A.; y Devireddy, R. V. (2009). Comparaison of the permeability properties and post-thaw motility of ejaculated and epididymal bovine spermatozoa. *Cryobiology*, 59 (2), pp. 164-170.
- Amann, R.; y Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential Developments. *Theriogenology*, 81, pp. 5-17.
- Anzar, M.; Kroetsch, T.G.; y Boswall, A. (2011). Cryopreservation of bull semen shipped overnight and its effect on post-thaw sperm motility, plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and normal acrosomes. *Animal Reproduction Science*, 126 (1-2), pp. 23-31. doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.04.018
- Ávila-Portillo, L.; Madero, J.; López, C.; León, M.; Acosta, L.; y Gómez, C. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* [revista en la Internet]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003474342006000400008&lng=es.
- Bucak, M.; Ateşşahin, A.; Varişli, O.; Yüce, A.; Tekin, N.; Akçay, A. (2007). The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process, 67 (5), pp. 1060-7.
- Büyükleblebici, S.; Tuncer, P.; Bucak, M.; Eken, A.; Sariözkan,

- S.; Taşdemir, U.; y Endirlik, B. (2014). Cryopreservation of bull sperm: effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. *Anim Reprod Sci.*, 150 (3-4), pp. 77-83.
- Buzón A. (2013). Análisis cinético y morfométrico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer. Tesis Doctoral. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba, p. 172.
- Bravo, J.; Montanero, J.; Calero, R.; y Roy, T. (2011). Relación entre variables subjetivas e informatizadas del movimiento espermático del morueco. *Arch. Zootec*, 60 (232), pp. 1087-1094.
- Budworth, R.; Amann, R.; y Chapman, R. (1988). Relationships between computerized measurements of motion of frozenthawed bull spermatozoa and fertility. *J. Androl*, 9, pp. 41-54.
- Caiza de la Cueva, F.; Rigau, T.; Bonet, S.; Miro, J.; Briz, M.; y Rodríguez, J. (1997). Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: effects of ouabain. *Theriogenology*, 47, pp. 765-784.
- Cox, F.; Alfaro, V.; Montenegro, V.; y Rodríguez-Martínez, H. (2006). Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus, *Theriogenology*, 66, pp. 860-867
- De Ondiz, A. (2011). Caracterización de las glicosidasas en el espermatozoide y su papel en la fecundación, con especial énfasis en la especie porcina. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. España, p. 248.
- Dorji, V.; Pattarajinda, T.; y Vongprolub, A. (2014). Cryopreservation of semen of mithun and siri Bulls. *P. Bangl. J. Vet. Med.*, 12 (2), pp. 147-153.
- Dorado, J.; Rodríguez, I.; e Hidalgo, M. (2007). Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two freezing extender base on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology*, 68, pp. 168-177.
- Dorado, J.; Hidalgo, M.; Muñoz, A.; y Rodríguez, I. (2009). Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. *Animal Reproduction Science*, 112, pp. 150-157.
- Dorado J.; Hidalgo M.; Muñoz A.; y Rodríguez I. (2010). The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. *Animal Reproduction Science*, 121, pp. 115-123.
- Fahey, J.; Mee, J. Murphy; y J. O'Callaghan D. (2002). Effects of calcium salts of fatty acids and calcium salt of methionine hydroxy analogue on plasma prostaglandin F2_ metabolite and milk fatty acid profiles in late lactation Holstein-Friesian cows. *Theriogenology*, 58, pp. 1471-1482
- Farrell, P.; Foote, R.; McArdle, M.; Trouern-Trend, V.; y Tardif, A. (1996). Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analyses (CASA). *J Androl*, v.17, pp. 293-300.
- Flowers, W. (1997). Management of boars for efficient semen production. *Journal Reprod Fertil*, 52, pp. 67-68.
- Foote, R.; Brockett, C.; y Kaproth, M. (2002). Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal reproduction science*, 71 (1-2), pp. 13-23.
- Foxcroft, G.; Dyck, M.; Ruiz-Sanchez, A.; Novak, S.; y Dixon W. (2008). Identifying useable semen. *Theriogenology*, 70 (8), pp. 1324-36.
- Galli, A.; Basetti, M.; Bulduzzi, D.; Martnonna, M.; Bornaghi, V.; y Maffii M. (1991). Frozen bovine semen quality and bovine cervical mucuspenetration test. *Theriogenolgy*, 34 (4), pp. 837-844.
- Gravance, C.; y Davis, R. (1995). Automated Sperm Morphometry Analysis (ASMA) in the Rabbit. *Journal Andrology*, 16, pp. 88-93.
- González-Stagnaro C. (2011). Buenas Prácticas Ganaderas (BPG) en el manejo de la reproducción en rebaños Doble Propósito. En: *Innovación & Tecnología en la Ganadería Doble Propósito 2011*. C. González-Stagnaro, N. Madrid-Bury, E. Soto-Belloso E. (eds). Fundación GIRARZ. Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo-Venezuela. Cap. LXIX, pp. 684-698.

- Gutiérrez-Añez J. C. (2014). Bases para el establecimiento de buenas prácticas ganaderas en un programa de control reproductivo. En: Buenas prácticas en ganadería Doble Propósito. Cuaderno Científico GIRARZ 14. Yenen Villasmil Ontiveros. Ediciones AstroData SA. Maracaibo, Venezuela, pp. 261-269.
- Hernández-Corredor, L.; Nivia-Osuna, A.; Hernández-Villamizar, D.; Rubio-Parada, J.; Quintero-Moreno, A. (2013). Evaluación de la motilidad espermática de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes a través del sistema CASA. *Revista Respuesta*, 2, pp 16-27.
- Hirano, Y.; Shibahara, H.; Obara, H.; Suzuki, T.; Takamizawa, S.; Yamaguchi, C.; Tsunoda, H.; y Sato, I. (2001). Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computeraided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 18, pp. 213-218.
- Janett, F.; Keo, S.; Bollwein, H.; Hässig, M.; y Thun, R. (2005). Comparison of AndroMedâ, Bioxcellâ and Triladylâ extender for cryopreservation of bull semen. *Schweiz Arch. Tierheilk*, 147, pp. 62.
- Januskauskas, A.; Gil, J.; Soderquist, L.; Haard, M.; Haard, C.; Johannisson, A.; y Rodríguez-Martinez, H. (1999). Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology* 52, pp. 41-58.
- Kathiravan, P.; Kalatharan, J.; Karthikeya, G.; Rengarajan, K.; y Kadirvel, G. (2010). Objective sperm motion analysis to assess dairy bull Fertility using computer-aided system (A review). *Reprod Domest Anim*; no. doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01603.x.
- Lavara, R.; Moce, E.; Lavara, F.; Viudes de Castro, M.; y Vicente, S. (2005). Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology*, 64, pp. 1130-1141.
- Leite, T.; Do Vale Filho, V.; De Arruda, R.; De Andrade, A.; Emerick, L.; Zaffalon, F.; Martins, J.; y De Andrade, V. (2010). Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Anim Reprod Sci*, 120, pp. 31-8.
- Maes, D.; Mateusen, B.; Rijsselaere, T.; De Vlieghe, S.; Van Soom, A.; y De Kruif, A. (2003). Motility characteristics of boar spermatozoa after addition of prostaglandin F2 α . *Theriogenology*, 60, pp. 1435-1443.
- Marco-Jiménez, F.; Vicente J.; y Viudes-de-Castro, M. (2008). Seminal plasma composition from ejaculates collected by artificial vagina and electroejaculation in Guirra ram, *Reprod. Domest. Anim.*, 43, pp. 403-408.
- Mortimer, S. (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update*, 3, pp. 403-439.
- Moussa, M.; Martinet, V.; Trimeche, A.; Tainturier, D.; y Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozenthawed bull semen. *Theriogenology*, 57, pp. 1695-1706.
- Najjar, A.; Najjar, C.; Chetoui, M.; y Ben Mrad. (2013). Evaluation of post thawed semen motility of holstein bulls by computer assisted sperm analysis (CASA). *The Experiment*, vol. 14 (2), pp. 894-896.
- Nasiri, A.; Towhidi, A.; y Zeinoaldini, S. (2012). Combined effect of DHA and tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. *Andrología*, 44, p. 550.
- Pacheco, J.; Vaccaro, L.; Mejías, H.; Pérez, A.; López, J.; y Dorta, D. (2003). Relation between Holstein bulls proofs for milk in USA and the survival and body weights up to 18 months of their F1 zebu progeny in Venezuela. *J Anim Breed Genet*, 120 (3), pp. 162-170.
- Palma, G. A.; Olivier, N.; Neumuller, C.; y Sinowatz, F. (2007). Efecto del semen sexado por medio de citometría de flujo sobre la eficiencia de la fecundación *in vitro* y la ultraestructura de blastocistos producidos *in vitro*. *Res. VII Simp Intern Reprod Anim, IRAC, Córdoba (Argentina)*, p. 205.
- Peña, A.; y Linde-Forsberg, C. (2000). Effects of Equex, one or two step dilution and two freezing thawing

- rates on post-thaw survival of dog spermatozoa, *Theriogenology*, 5, pp. 859-875.
- Quintero-Moreno, A. (2003). Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria. Tesis Doctoral, p. 164.
- Quintero-Moreno, A.; y Rubio, J. (2010). Principios básicos sobre criopreservación de semen bovino. Cuadernos Científicos GIRARZ 8. En: Selección y manejo de Reproductores Bovinos. N. Madrid-Bury. Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo, Venezuela, pp. 185-189.
- Quintero-Moreno, A.; Rubio-Guillén, J.; González-Villalobos, D.; Gutiérrez, J. C.; Madrid-Bury, N.; y López-Brea, J. (2011). Identification of cryodamage on plasma membrane Integrity in bull spermatozoa and its relationship with field fertility. *Revista Científica, FCV-LUZ*, vol. XXI, Nº 5, 403-407.
- Rodríguez-Martínez, H. (2003). Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Domest Anim.*, 38, pp. 312-318.
- Rubio-Guillén, J.; González, D.; Garde, J.; Estes, M.; Fernández-Santos, M.; Rodríguez-Gil J.; Madrid-Bury, N.; y Quintero-Moreno, A. (2007). Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reprod Domest Anim*, 42, pp. 354-357.
- Silvestre, F.; Bezerra, T.; Castelo, A.; Oliveira, R.; Lima, G.; Peixoto, G.; Bezerra, A.; y Silva, A. (2011). Objective assessment of the cryoprotective effects of dimethylformamide for freezing goat semen. *Cryobiology*, 63, pp. 263-266.
- Sariözkan, S.; Bucak, M.; Tuncer, P.; Ulutaş, P.; y Bilgen A. (2009). The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology*, 58 (2), pp. 8-134.
- Tartaglione, C.; y Ritta, M. (2004). Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 2004 Oct 1, 62 (7), pp. 1245-52.
- Vyt, P.; Maes, D.; Quinten, C.; Rijsselaere, T.; Deley, W.; Aerts, M.; De Kruif, A.; y Van Soom, A. (2008). Detailed motility examination of porcine semen and its predictive value towards reproductive performance in sows. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.*, 77. pp. 291-298.