

Capítulo LXXXI

Logros y desafíos en la valoración de semen de búfalo

Carla Osorio-Meléndez
Armando Quintero-Moreno

En Venezuela, la ganadería bufalina se ha venido estableciendo como una alternativa pecuaria prometedora, que si bien todavía no compite con la ganadería bovina, la complementa. Es importante destacar que a pesar del paulatino y progresivo crecimiento del número de búfalos, así como de la tecnificación parcial de algunas fincas bufalinas, sigue siendo una especie poco explotada al compararla con los bovinos, lo que hace que se convierta en uno de los principales desafíos ganaderos para los próximos años. Esto implica lograr establecer a la especie bufalina como una ganadería doble propósito viable y de importancia para la comunidad pecuaria. Para alcanzar este fin, se hace necesaria una difusión masiva de material genético bufalino superior y la utilización de sementales élites para obtener un mejoramiento sostenido y en un periodo más corto de tiempo. Esto se podría lograr a través de la aplicación de biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial (IA) y la sincronización de la ovulación y de la IA a tiempo fijo (IATF), siendo esto un logro que apenas comienza a ser visible.

La población bufalina mundial es mayor a 170 millones de cabezas, pero existe poco desarrollo y actividad ligada a la criopreservación seminal e IA en comparación con los bovinos, siendo una de las razones, el efecto deletéreo que tiene el proceso de criopreservación seminal sobre los espermatozoides de búfalos (Vale, 2011). Se ha estado investigando en función del desarrollo de un diluyente para búfalos con el cual se pueda obtener mejores resultados en el proceso de criopreservación seminal, sin embargo, la experiencia de los autores del presente trabajo al criopreservar el semen bufalino utilizando diluyentes para congelar semen de toro ha sido satisfactoria (Osorio-Meléndez, 2013).

La selección de búfalos “buenos congeladores de su material seminal” se logra escogiendo animales potencialmente aptos para la criopreservación seminal, derivados de los resultados obtenidos luego de realizar un espermiograma completo e integrado a una evaluación física previa del animal. Para lograr este objetivo se requiere conocimientos de indicadores fisiológicos, relacionados principalmente con el aparato genital (dimensiones y morfología) y la circunferencia escrotal (CE, butoro adulto:

30-35 cm) que son esenciales para la determinación del estado reproductivo (Vale *et al.*, 2001); además, la CE se ha asociado con las mejores características físicas y morfológicas del semen (Quirino, 2002).

El espermiograma debe tener en cuenta al menos cuatro parámetros básicos: viabilidad, morfología, número de espermatozoides con motilidad progresiva y la integridad morfológica y funcional de la membrana plasmática. Una vez seleccionado el búfalo con parámetros óptimos se procede a criopreservar el semen y a repetir la evaluación post descongelación de la pajuela. En toros, los parámetros mencionados y estudiados *in vitro* han mostrado una correlación confiable y repetible con la fertilidad medida en el campo, siendo este uno de los principales desafíos trazados para la especie bufalina (Gillan *et al.*, 2008).

VALORACIÓN DE POTENCIAL REPRODUCTIVO Y CALIDAD ESPERMÁTICA

Para considerar un butoro apto como reproductor, debe cumplir tres requisitos básicos: buena libido, buen estado clínico y buena calidad espermática que propicie su potencial reproductivo. El semen del búfalo puede presentar problemas asociados con los factores climáticos o estacionales, como consecuencia a la susceptibilidad del epitelio seminífero al aumento de la temperatura ambiental (Vale, 1994; 1997; 2011).

El mejor horario para la recolección del semen bufalino es en el inicio del día (aún oscuro) o al final del atardecer, puesto que esta especie presenta un comportamiento sexual nocturno. Para la recolección se debe usar la vagina artificial no lubricada, a una temperatura entre 44-45°C (Vale, 2011). También se debe tomar en cuenta que los espermatozoides son muy sensibles a las variaciones de temperatura, por lo que es recomendable controlar las variaciones térmicas del material y soluciones a utilizar, manteniéndolo a una temperatura constante, alrededor de los 37°C. Al realizar la evaluación seminal, es importante considerar la edad, raza, estado nutricional, condición corporal, actividad sexual, método de colección, época y estado de salud del animal. Cabe mencionar que la utilización de montas falsas con desvío del pene, son recomendadas para mejorar la concentración y la calidad del eyaculado. Como resultado del análisis seminal podemos calificar a la muestra como apta o no apta para su uso en la IA (Vale, 1994; 1997; 2011). Entre las diversas pruebas disponibles se hará énfasis en las siguientes:

Volumen y color del eyaculado

Una vez colectado el semen se mide su volumen directamente en el tubo colector graduado, similar al que se usa para cuantificar el semen de toro. Existen muchas variaciones del volumen seminal de un búfalo, el cual varía dependiendo de la edad y la raza principalmente; la edad es más determinante, encontrando el mayor volumen del eyaculado entre los 4 y 12 años de edad (Pant *et al.*, 2003). Almaguer (2007), plantea que al momento de la pubertad el volumen es alrededor de 1 mL y se incrementa hasta 3 mL después de la madurez sexual. Koonjaenak & Rodríguez-Martínez (2007) encontraron un volumen entre 3 y 4 mL en la raza Nili-Ravi, no obstante, Osorio-Meléndez (2013) reporta en la raza Murrah volúmenes que oscilan entre 2 y 5 mL en

muestras de semen extraídas mediante vagina artificial, luego de hacer 2 recolecciones con intervalo de 30 min.

En referencia al color, este debe oscilar entre el blanco lechoso y el blanco cremoso, siendo importante enfrentar por pocos segundos a la luz natural o artificial, el tubo colector con el semen. El color y la densidad de la muestra está relacionada directamente con la concentración espermática (Vale, 2011).

Concentración espermática

La concentración mide el número de espermatozoides por unidad de volumen, es decir, por mL de semen, la cual ha sido correlacionada de forma positiva con la fertilidad del animal. De la misma manera, la presencia de un mayor número de espermatozoides con atributos normales en un eyaculado incrementa la posibilidad de fecundación (Pant *et al.*, 2003; Vale, 2011). La concentración espermática es una de las pruebas de análisis seminal más importante, mostrando una amplia gama de variación que va desde los 600×10^6 hasta 1200×10^6 mm³ para los búfalos. Este parámetro es muy sensible a las irregularidades estacionales, nutricionales y de manejo, así como también se encuentra correlacionado con el aspecto genético (Vale, 1994; 1997), lo cual se evidencia en la raza Murrah, en la que se describen valores medios superiores a los 1200×10^6 (Osorio-Meléndez, 2013). Es importante considerar la edad, ya que se ha señalado una menor concentración espermática en sementales bufalinos mayores que en los más jóvenes, lo cual podría ser debido a la senilidad, la cual podría considerarse como un factor determinante (Javed *et al.*, 2000).

Motilidad Masal (MM) espermática

Sólo se valora en semen recién colectado e indica la concentración y viabilidad de las células espermáticas. Según la calidad del movimiento (Cuadro 1) se propone una escala de valoración que oscila entre el 1 y 5, aunque hay otras escalas muy parecidas (0-4/0-5). En búfalos destinados a la IA se procesan solo las muestras con MM igual o superior a 3 (Osorio-Meléndez, 2013).

Cuadro 1
Clasificación de la Motilidad Masal de los espermatozoides de Búfalo

Clasificación	Escala	Características de la Motilidad Masal
Pobre	1	Ausencia de ondas
Regular	2	Se observan pocas ondas y de movimiento lento
Bueno	3	Presencia de ondas con movimiento moderado
Muy bueno	4	Presencia de varias ondas rápidas con oscurecimiento del campo
Excelente	5	Presencia de muchas ondas muy juntas y en varias direcciones, con oscurecimiento intenso del campo

Modificación realizada tomando de referencia la escala de Vale (1994, 1997).

Motilidad individual (MI) progresiva del espermatozoide

Su valoración está basada en la observación del movimiento individual de los espermatozoides con el fin de determinar el porcentaje de células móviles en el eyaculado. En el Cuadro 2, se propone una clasificación de la MI progresiva tanto para semen fresco como descongelado. Para animales destinados a la IA es conveniente que este valor sea igual o esté por encima del 70% y para semen criopreservado del 40% (Osorio-Meléndez, 2013).

Cuadro 2

Escala para la evaluación microscópica de la motilidad individual progresiva aplicada para el semen recién colectado y criopreservado de búfalo

Motilidad (%)	Evaluación seminal en búfalos	
	Semen recién colectado	Semen descongelado
80-100	Muy buena	Muy buena
60-80	Buena	Buena
40-60	Media	Pobre
20-40	Pobre	Mala
0-20	Mala	Mala

Modificación realizada tomando de referencia la escala de Vale (1994, 1997).

En las últimas dos décadas se ha venido utilizando el Sistema Computarizado de Análisis Seminal (CASA) para valorar la MI en el semen de muchos mamíferos; sin embargo, en búfalos, los estudios son escasos. En Venezuela solo se reporta un estudio, el cual fue hecho con semen criopreservado, obteniendo buenos resultados (Osorio-Meléndez, 2013). La investigación reporta valores de MI (progresivos + no progresivos) superior al 60% con MI (lineal + progresiva) del 30,5% y porcentaje de rápidos del 32,6%. Estos valores son similares a los obtenidos por Shiva *et al.*, (2010), el cual reporta una MI progresiva de 31,67%, no obstante, estas cifras superan el valor reportado por Sohail *et al.*, (2013), en donde el porcentaje de MI fue del 20,86%.

Vitalidad espermática

La vitalidad espermática es un parámetro que permite valorar la integridad estructural de la membrana plasmática al evaluar la capacidad que tiene un espermatozoide de excluir sustancias extracelulares como tintas o fluorocromos, presumiendo que, solamente los espermatozoides que excluyen la tinción son los que tienen la membrana intacta, y por ende, son capaces de transportarse, capacitarse y de fecundar, siempre y cuando a su vez, tenga una integridad funcional intacta (Vale, 2011). Una de las tinciones comúnmente usadas para valorar este parámetro en semen de búfalo es la Eosina-Nigrosina (Osorio-Meléndez, 2013; Singh *et al.*, 2013). La vitalidad ideal en semen recién colectado debe ser superior al 70%; por esa razón, un eyaculado de búfalo que presenta más de 30% de espermatozoides muertos, difícilmente servirá para ser procesado y congelado (Vale, 2011). En Venezuela, experimentando con semen criopreservado de butoros de raza Murrah la vitalidad medida con Eosina-nigro-

sina fue excelente (70,6%), con valores similares a los referenciados para semen fresco (Osorio-Meléndez, 2013). En otras latitudes, bajo condiciones similares se han obtenido valores de 63,7% (Singh *et al.*, 2013) y 71% (Khan & Ijaz, 2008). En función de estos trabajos se propone que la vitalidad óptima para semen descongelado podría ser igual o superior al 50% y para semen fresco podría superar el 70%. Como investigadores tenemos el desafío de proponer nuevos protocolos de tinción, que han sido utilizados en otras especies con resultados promisorios.

Morfología espermática e integridad del acrosoma

En el semen de otros mamíferos, especialmente en toros, las pruebas más utilizadas para valorar la morfología espermática son las coloraciones sencillas, tales como eosina-nigrosina, giemsa o la combinación de estas tres (Quintero-Moreno, 2003). Se debe tener un mínimo de 70% de espermatozoides normales para que su eyaculado sea considerado satisfactorio (Vale, 2011). En Venezuela, las anomalías morfológicas reportadas para búfalos de raza Murrah son de 32,4 (Osorio-Meléndez, 2013), siendo un valor ligeramente elevado. Saeed *et al.* (1990) mencionan que en búfalos la mayoría de las anomalías se encuentran en la cabeza de los espermatozoides (5,78%), mientras que las anomalías en la pieza intermedia son inferiores al 1% y las colas anormales oscilan entre 3,92 y 5,7. La aparición de gota citoplasmática no es común e inferior al 1%. Avalando estos resultados, Koonjaenak & Rodríguez-Martínez (2007) utilizando un microscopio con contraste de fase, observaron que en el semen de búfalo, las anomalías espermáticas están por debajo del 15%, encontrándose que las más comunes se encuentran en la cabeza, predominando aquellas con forma de pera, seguida de acrosomas con perilla, gota citoplasmática proximal, colas simples y dobladas.

La morfometría de la cabeza espermática se puede apreciar mediante análisis computarizado realizando previa tinción con protocolos sencillos (Hemacolor, Diff Quick® o Blue Stain) captando imágenes, grabándolas en vídeo, siendo digitalizadas y archivando en soporte magnético para su posterior análisis morfométrico (Van Der Horst & Maree, 2009; Osorio-Meléndez, 2013). La longitud (8,08 μm), ancho (4,29 μm), área (29,22 μm^2) y perímetro (22,25 μm) de la cabeza del espermatozoide fueron descritas hace muy poco (Osorio-Meléndez, 2013). En estudios realizados en toros se ha comparado la variación en el tamaño de las cabezas de los espermatozoides entre el semen fresco y criopreservado de un mismo eyaculado, comprobándose que en el semen congelado las cabezas fueron significativamente más pequeñas (Rubio-Guillen *et al.*, 2007). Debido a este hecho, el análisis de la valoración de la morfometría espermática en semen de búfalo recién colectado *vs* descongelado representa un desafío importante para demostrar que este hecho se repite en esta especie. Del mismo modo, se podría determinar la presencia de subpoblaciones espermáticas, basándose en el estudio realizado previamente con semen de bovino (Rubio-Guillen, 2007).

La integridad del acrosoma del espermatozoide de búfalo se puede evaluar con múltiples tinciones propuestas para tal fin por la comunidad científica internacional para espermatozoides de mamíferos, la gran mayoría muy laboriosas. En nuestro caso utilizamos la novedosa tinción BlueStain® (Van der Horst & Maree, 2009) o en su defecto Eosina-nigrosina (Osorio *et al.*, 2011). Esta última se utiliza rutinariamente para cuantificar la vitalidad espermática, sin embargo, nuestra experiencia ha sido satisfac-

toria en la valoración de la integridad del acrosoma en toros (Rubio-Guillén *et al.*, 2007) y en búfalos, donde se estableció una correlación con BlueStain® (datos no publicados). El valor referencial para la especie es inferior al 10% para semen recién colectado (Vale, 1994, 1997), mientras que para el semen criopreservado todavía no se ha establecido un valor patrón; no obstante, se podría extrapolar el valor referido en toros (≤ 30) (Catena & Cabodevila, 1999). La experiencia de Osorio-Meléndez (2013) en semen descongelado arroja valores que están en el orden del 12%.

Fragmentación del ADN

La fragmentación del ADN espermático, tal y como indica su nombre, se refiere a roturas o lesiones en el material genético del espermatozoide. A mayor número de lesiones, menor será la integridad del material genético y las probabilidades de que se produzca una gestación a término. Estas técnicas se han empleado muy poco para valorar el semen de búfalo y hasta ahora son pocas las investigaciones realizadas sobre el tema (Badr *et al.*, 2010; Osorio *et al.*, 2011; Pawar & Kaul, 2011). En el trabajo de Badr *et al.* (2010) en semen criopreservado los valores porcentuales observados fueron muy favorables (1,83-3,16). En Venezuela, Osorio *et al.* (2011) utilizando la tinción de Azul de Toluidina en semen fresco de búfalo, los valores fueron más elevados (7,52%). La tinción de Azul de toluidina es una buena alternativa para valorar este parámetro, ya que es económica y tiene buenos antecedentes en investigaciones con semen humano donde la han comparado con la prueba de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD) obteniéndose una excelente correlación. Pawar & Kaul (2011) utilizando SCD en semen de búfalo reportaron resultados promisorios al describir una asociación importante de esta técnica con la viabilidad (0,687, $P < 0,05$) y con la fragmentación del ADN cuantificada mediante la tinción de Naranja de Acridina (0,87, $P < 0,05$). Es vista de los hallazgos obtenidos por estos investigadores, se concluye que valores de Fragmentación del ADN espermático inferior al 8% no comprometen el potencial reproductivo del búfalo.

Valoración de la integridad funcional de la membrana plasmática mediante la prueba de Endosmosis (HOST)

El HOST es una prueba sencilla, práctica y confiable que se puede implementar para determinar la integridad funcional de la membrana espermática, así como para predecir el potencial reproductivo de muestras seminales de búfalos que serán utilizadas para la inseminación artificial (Quintero-Moreno *et al.*, 2013). La respuesta a esta prueba para semen recién colectado esta en el orden del 70% y 50% para semen criopreservado. En semen descongelado el HOST presenta una correlación significativa con el porcentaje de espermios rápidos (0,58; $P < 0,001$) y el porcentaje de espermios vivos al la descongelación (0,49; $P < 0,05$) (Quintero-Moreno *et al.*, 2013). En otras zonas geográficas del mundo, los hallazgos obtenidos por investigadores acreditados (Khan & Ijaz; 2008; Ijaz *et al.*, 2009; Sohail *et al.*, 2013) son similares a las investigaciones realizadas en Venezuela. Es prudente afirmar que esta prueba es una herramienta útil y económica que permite seleccionar los reproductores más aptos para el proceso de criopreservación seminal, ya que muestras seminales con buen porcentaje de espermios rápidos y bajo porcentaje de espermios estáticos a

la descongelación están altamente asociadas a una respuesta favorable al HOST (Quintero-Moreno *et al.*, 2013).

Una proposición final

Nuestro compromiso de continuar esta línea de investigación está claro, ya que es necesario generar nuevos resultados y desafíos para alcanzar las mejores opciones en relación con el uso óptimo del semen, su valoración y su conservación, adoptando tecnologías de avanzada. En esta oportunidad queremos proponer algunos valores de referencia (Cuadro 3) para que sirvan de patrón en la valoración de la calidad seminal en búfalos.

Cuadro 3
Características del eyaculado del semental bufalino

Parámetro	Valor de referencia
Color	Blanco, blanco-lechoso, con estrías oscuras-azules
Volumen (mL)	2-5 (3)
Motilidad Masal (Escala: 1-5)	≥ 3
Motilidad individual (%)	≥ 70 (semen fresco)/ ≥ 40 (semen descongelado)
Concentración (×10 ⁶)	600 a 1200
Vitalidad (%)	≥ 70 (semen fresco)/ ≥ 50 (semen descongelado)
Anormalidades Morfológicas (%)	≤ 30/ ideal ≤ 15
Acrosomas dañados (%)	≤ 10 (semen fresco)/ ≤ 30 (semen descongelado)
Fragmentación del ADN	≤ 8
Integridad funcional de la membrana plasmática (HOST, %)	≤ 70 (semen fresco)/ ≤ 50 (semen descongelado)

CONCLUSIONES

Se puede resumir que a partir de la última década y debido al crecimiento progresivo de las explotaciones dedicadas al búfalo, se ha incrementado el uso de biotecnologías reproductivas que incluyen el control de la calidad espermática e interés por la criopreservación seminal con fines comerciales para implementar la IA como herramienta de mejoramiento genético masivo. Estos logros derivan en la implementación de un control reproductivo óptimo del semental que, incluyen aspectos de valoración del semen mediante técnicas modernas y precisas. Esto nos compromete a propiciar programas de investigación que generen nuevos resultados y desafíos. A corto plazo es importante establecer programas de IA e instaurar protocolos de manejo eficiente de los butoros para la extracción seminal mediante vagina artificial. Los logros obtenidos en los trabajos de investigación realizados por los autores del presente trabajo les ha permitido proponer algunos valores para que sean utilizados como referencia en la evaluación de la calidad seminal en búfalos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almaguer Y. 2007. El búfalo una opción de la ganadería. RDVET VIII (8): 1.
- Badr MR, Abd El-Malak MG, Hassan MH. 2010. Effect on Cryopreservation, oxidative stress and DNA integrity of Buffalo Spermatozoa. J Reprod & Infertility 1 (2): 50.
- Catena M, Cabodevila J. 1999. Evaluación de semen bovino congelado. Taurus 1 (3): 18.
- Gillan L, Kroetsch T, Maxwell C, Evans E. 2008. Assessment of *in vitro* sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. Anim Reprod Sci 103: 201.
- Ijaz A, Hussain A, Aleem M, Yousaf MS, Rehman H. 2009. Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*). Theriogenology 71: 1326.
- Javed M, Khan J, Kausar P. 2000. Effect of age and season on some semen parameters of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. Vet Archiv 70: 83.
- Khan M, Ijaz A. 2008. Effects of osmotic pressure on motility, plasma membrane integrity and viability in fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa. Animal 2 (4): 548.
- Koonjaenak S, Rodriguez-Martinez H. 2007. Assessment of semen quality in Swamp Buffalo AI Bulls in Thailand. Ital J Anim Sci 6 (Suppl. 2): 701.
- Osorio C, Quintero-Moreno A, Nava-Trujillo H, Rubio-Guillén J, Madrid-Bury N, González R. 2011. Determinación de la integridad de la cromatina espermática en semen fresco de búfalos utilizando la tinción con Azul de Toluidina. Mem IV Jorn Nac Invest Reproducción Animal (IV JONIRA). Maracay, Venezuela. Febrero. 2011 (Resumen): 36.
- Osorio-Meléndez C. 2013. Valoración computarizada de la integridad funcional de la membrana plasmática, motilidad y morfología espermática en semen criopreservado de búfalo. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia. 95 pp.
- Pant H, Sharma R, Patel S, Shukla H, Mittal A, Kasiraj R, Misra A, Prabhakar J. 2003. Testicular development and its relationship to semen production in Murrah buffalo bulls. Theriogenology 60: 27.
- Pawar K, Kaul G. 2011. Assessment of buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm DNA fragmentation using a sperm chromatin dispersion test. Reprod Domest Anim 46: 964-969.
- Quintero-Moreno A. 2003. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. 164 pp.
- Quintero-Moreno A, Osorio C, González D, Nava-Trujillo H, Rubio-Guillén J. 2013. Correlación entre el test de Endósmosis (HOST) y otros parámetros de calidad seminal en semen criopreservado de búfalos Murrah. Mem XV Jorn Prod Anim. Tomo 1: 395. Zaragoza, España. Mayo 2013.
- Quirino C. 2002. Observations on testicular size and sexual behaviour in crossbred buffaloes. Proc 1st Buffalo Symp of Americas. Belem, Brasil. September 2002. 40 pp.
- Rubio-Guillén J, González D, Garde J, Esteso M, Fernández-Santos M, Rodríguez-Gíl J, Madrid-Bury N, Quintero-Moreno A. 2007. Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. Reprod Domest Anim 42:354.
- Saeed A, Chaudhry R, Khan I, Khan N. 1990. Morphology of semen buffalo bulls of different age groups. In: Acharya RM (eds) Recent Advances in Buffalo Research 3: 17.

- Shiva N, Shankar R, Mohanarao G, Atreja S. 2010. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 119: 183.
- Singh P, Kumar D, Kumar P, Singh I, Yadav P. 2013. Cryopreservation and quality assessment of buffalo bull semen collected from farmer's doorstep. *Agric Res* 2: 148.
- Sohail A, Andrabi SMH, Anwar M, Ali L, Mehmood A. 2013. Assessment of buffalo bull semen quality based on sperm motility parameters, motion characteristics and in vitro fertilization rate. *Pak Vet J* 33 (1): 53.
- Vale W. 1994. Collection processing and deep freezing of buffalo semen. *Buffalo J (Suppl.)* 2: 65.
- Vale W. 1997. Sperm cryopreservation. 3th Course on Biotechnology of Reproduction in Buffaloes, Caserta, Italy. In: *Bubalus bubalis*. *J Buffalo Sci Techn (Suppl.)* 4: 129.
- Vale W. 2011. Avances biotecnológicos en reproducción de búfalos. En: *Tecnología en Marcha (Revista Especial)* 24 (5): 89.
- Vale W, Gastal D, Snel-Oliveira M, Mondadori G. 2001. Relationship of age, body weight and scrotal circumference in Murrah buffalo bulls. *Proc VI World Buffalo Congress*. Maracaibo Venezuela. Mayo 2001 (Abstract).
- Van Der Horst G, Maree L. 2009. SpermBlue: A new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis. *Biotechnic & Histochemistry* 1:1.