

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL



Manejo de la cadena fría del semen bovino en la inseminación artificial

Por:

Christian Emmanuel López Ordaz

MONOGRAFÍA

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México

Marzo, 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

Manejo de la cadena fría del semen bovino en la inseminación artificial

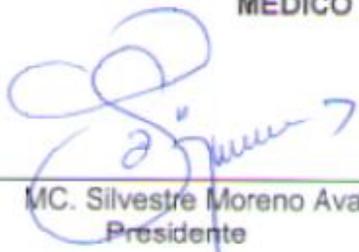
Por:

Christian Emmanuel López Ordaz

MONOGRAFÍA

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA


MC. Silvestre Moreno Avalos
Presidente

Aprobada por:


Dr. Oscar Angel Garcia
Vocal


MVZ. Manuel de Jesús Ortega Vargas
Vocal


Dra. Martha Vaney Perales Garcia
Vocal Suplente


MC. J. Guadalupe Rodríguez Martínez
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México

Marzo, 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

Manejo de la cadena fría del semen bovino en la inseminación artificial

Por:

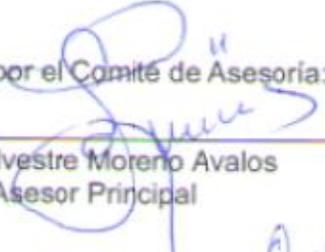
Christian Emmanuel López Ordaz

MONOGRAFÍA

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por el Comité de Asesoría:


MC. Silvestre Moreno Avalos
Asesor Principal


Dr. Juan Manuel Guillen Muñoz
Coasesor


Dr. Oscar Ángel García
Coasesor


MC. J. Guadalupe Rodríguez Martínez
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México

Marzo, 2021

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar estas líneas para agradecer a todas las personas que me han ayudado y me han apoyado a lo largo de estos años de dura andadura por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro – UL, principalmente a mis docentes que durante este tiempo contribuyeron en mi formación como EMVZ.

En primer lugar, agradecer el apoyo recibido por parte de MC. Silvestre Moreno Avalos quien fue mi asesor principal en esta monografía, por guiar la investigación y formar parte de otro objetivo alcanzado. En especial hacer mención y reconocer al Sr. Rubén Darío Gutiérrez Martínez quien compartió sus conocimientos y experiencia en el área de reproducción de ganado bovino durante mi estancia en el establo Granja Ideal, permitiendo así el desarrollo de este estudio.

También mostrar mi más sincero agradecimiento a mis compañeros de clase y amigos, que han hecho que este duro trance como es la carrera, se llevará de forma más amena, porque no solo la Universidad ha servido para formarme como MVZ, sino que en ella he encontrado muchas cosas más; me ha formado como profesionalista, ha hecho que madurara y he encontrado unos amigos, que son ya parte de mi familia.

DEDICATORIAS

Esta Monografía, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que me acompañaron en el recorrido laborioso de este trabajo y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en momentos de angustia y desesperación, primero y antes que todo, dar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Principalmente está dedicado a mis padres por estar siempre presentes, acompañándome y por todo el apoyo, que me han brindaron a lo largo de mis estudios.

A mis hermanos, mis primos y a mi novia que en todo momento confiaron en mí, igualmente por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias. A toda mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

RESUMEN

El objetivo de esta revisión es dar a conocer ciertos parámetros inherentes al proceso de criopreservación y la congelación del semen así como la importancia de conocer ciertas características de la célula que pueden incidir con la viabilidad del producto congelado para lograr la técnica adecuada. Para alcanzar este propósito, el documento se basará en el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de la célula y/o el tejido, pues este proceso es afectado por diferentes variables como permeabilidad celular, volumen osmóticamente inactivo y relación superficie/área de la célula, la cual es variable de acuerdo a la especie, tipo y estadio de la célula a congelar.

Palabras clave: Criopreservación, Macho, Bovino, Reproducción, Semen.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	ii
RESUMEN	iii
INTRODUCCIÓN	1
HISTORIA	4
ANATOMÍA DEL BOVINO	5
APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO	9
DETERMINACIÓN DE LA PUBERTAD DEL MACHO	13
EVALUACIÓN REPRODUCTIVA DEL MACHO	14
Circunferencia escrotal.....	14
Análisis del semen	15
Motilidad individual.....	17
Viabilidad	17
Estado del cromosoma	18
CRIOCONSERVACIÓN	18
Agentes crioprotectores	20
Métodos de criopreservación	21
CONSERVACIÓN DEL SEMEN.....	22
ESTRUCTURA DE LA CONSERVADORA O TANQUE DE NITRÓGENO LÍQUIDO	23
REFERENCIAS	27

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1 Regiones de la boca (INT, 2016)	5
Figura 2 Estructura de la lengua del bovino (INT, 2016)	7
Figura 3 Tabla 1. Número total de dientes en el bovino (INT, 2016).	7
Figura 4 Faringe bovina (INT, 2016)	8
Figura 5 Sistema digestivo de rumiantes (INT, 2016)	9
Figura 6 Testículos (INT, 2016)	9
Figura 7 Aparato reproductor del toro (INT, 2016).	11
Figura 8 Tabla 2. Perímetro escrotal (Spitzer, 2000).	14
Figura 9 Morfología del espermatozoide (Hidalgo, 2002).	16
Figura 10 Izquierda, espermatozoide con acrosoma intacto. Derecha, espermatozoide con acrosoma dañado (Hidalgo, et al., 2002)	18
Figura 11 Almacenamiento de semen (M. A., 2003)	23
Figura 12 Corte esquemático del termo de nitrógeno líquido (M. A., 2003).	24
Figura 13 Muestra de pajillas en contenedor de nitrógeno (Rivera, 2016).	24
Figura 14 Rango de temperatura en la boca del termo (Rivera, 2016).	26

INTRODUCCIÓN

La primera introducción en América de animales domésticos, entre ellos vacunos, la efectuó Colón en su segundo viaje en 1493. Como las expediciones españolas posteriores tocaron siempre La Española, la misma se convirtió en un centro multiplicador y distribuidor de ganado. Los animales introducidos fueron de raza andaluza o ibérica, corpulentos, de buena alzada y cabeza voluminosa, con astas desarrolladas.

Durante los siglos XVII y XVIII las vaquerías fueron la forma principal de explotación de los bovinos, y prácticamente, única explotación de nuestros campos, ya que no se efectuaba agricultura sino en escala muy reducida.

El primer toro de raza mejorada introducido en el país fue Shorthorn, traído en 1836, durante el gobierno de Rosas, por John Miller. Su nombre era Tarquino, de la variedad lechera. Al cruzarse con el ganado Criollo, inauguró una época que abarcó alrededor de 30 años. El vigor híbrido y su prepotencia de raza mejoradora fijada, creó una descendencia llamada tarquinos, que mejoraron la precocidad y la producción lechera del Criollo (Hernández, 1882).

En el macho bovino, la pubertad aparece entre los 7 y 12 meses de edad. Se asocia con el desarrollo testicular, y desde el punto de vista endocrino es expresión de los cambios en los pulsos de secreción de LH así como del impacto de esta gonadotropina sobre la gónada masculina donde inicialmente ocurre producción de estrógenos, cambiando el perfil secretor hacia la androstenediona y la testosterona cerca de los 7 meses de edad. A partir de este momento, las pruebas empleadas para evaluar la calidad seminal dan como resultado la observación del incremento de la motilidad y concentración espermática, así como del porcentaje de espermatozoides normales. Por otra parte, se ha informado que en el toro la máxima eficiencia productiva se observa hacia los 4 años donde es mayor la producción de semen, declinando hacia los 7 años de edad. Los factores que afectan la presentación de la pubertad son similares a los mencionados anteriormente cuando se abordó este tópico en la hembra (Pérez, 2016).

La importancia del toro en un sistema de producción pecuaria está dada por el potencial genético de producción (carne/leche) que transmita y por su fertilidad. El mejoramiento genético en producción aportado por el toro se ve reflejado en el 87% de sus hijas después de tres generaciones. Y desde el punto de vista de fertilidad está dado por el incremento de las tasas de natalidad del hato.

La evaluación del toro se debe hacer al inicio y durante su vida reproductiva, con el fin de identificar individuos de gran fertilidad.

La evaluación de la fertilidad del toro está dada por los valores mínimos de las variables circunferencia escrotal, motilidad, y morfología espermática que debe alcanzar un toro para ser aceptado como reproductor (Cardozo *et al.*, 2002).

A pesar de que los espermatozoides fueron los primeros tipos de células crio preservadas, 27 intentos de mejoramiento para su criopreservación son objeto de investigación, principalmente por la pobre sobrevivencia de estas células en pacientes con infertilidad y problemas oncológicos. No hubo avances significativos hasta el descubrimiento de las propiedades crioprotectoras del glicerol en espermatozoides de toro, abriendo así una opción viable para campos como la reproducción asistida en humanos. El éxito relativo de la criopreservación del semen ha mostrado avances significativos en el intercambio internacional de animales genéticamente superiores.

La criopreservación de espermatozoides bovinos ha evolucionado empíricamente, usando tasas de congelamiento de hasta 100-200°C/min y medios basados en glicerol con citrato de yema de huevo (Ávila *et al.*, 2006).

Entre las biotecnologías aplicadas a la reproducción, la inseminación artificial (IA) ha demostrado ser la herramienta más exitosa para la mejora genética de los animales de importancia zootécnica, especialmente en la industria bovina. De una cuidadosa valoración de la fertilidad dependerá la utilización futura del material seminal y el grado de aprovechamiento de los eyaculados obtenidos a lo largo de su vida reproductiva, esto es, las dosis producidas por eyaculado, en función del número de espermatozoides viables y, en definitiva, su mayor o menor

rentabilidad. Este es un punto de suma importancia, debido a que un pequeño número de toros seleccionados es utilizado para inseminar una extensa población de hembras, con lo que los fallos en la selección de estos sementales tendrían como consecuencia importantes pérdidas económicas. Así, el conocimiento de la fertilidad o de la capacidad fecundante de cada toro se convierte en uno de los principales objetivos en la producción de semen bovino (Hidalgo *et al.*, 2002).

La congelación del semen bovino ha sido la técnica más antigua y que más ha influido en la difusión del empleo de la IA en la reproducción asistida. Como regla general la refrigeración del espermatozoide es un método sencillo que de manera exitosa ha permitido ampliar el tiempo de viabilidad del espermatozoide, al reducir su tasa metabólica y por lo tanto prolongar la supervivencia del semen mediante la disminución del porcentaje de sustratos empleados y la producción de toxinas.

Si bien la criopreservación garantiza la supervivencia de los espermatozoides, una elevada y variable proporción del proceso de congelación-descongelación afecta la integridad de la membrana plasmática (MP) y acrosomal (MA) tanto en lo referente a la morfología como a la funcionalidad, lo cual suele ocasionar daños irreversibles y causar muerte celular e infertilidad. Se ha demostrado como los espermatozoides de diferentes toros evaluados, resisten de manera distinta los efectos lesivos de la criopreservación, de manera indiscriminada sobre la integridad estructural y funcional MP y MA, lo que afecta la capacidad fecundante de las muestras seminales destinadas a IA (Rivera, 2016).

HISTORIA

En la edad media fueron los árabes quienes lograron fecundar una yegua al introducir en la vagina un puñado de pelos empapados en el semen. En 1779 el sacerdote católico Spallanzani logró fecundar una perra al introducir semen del macho en la vagina. El ruso Ivanoff (siglo XIX) fue quien inició la aplicación científica y en gran escala de la inseminación artificial en ovinos y equinos. En 1914, el italiano Amantea inventa la vagina artificial, con la cual se logra obtener el semen del macho en mejores condiciones. Los rusos perfeccionaron el método de la inseminación artificial a inicios del siglo XX y la aplicación en gran escala dentro de sus planes pecuarios de allí los países Europeos asimilaron los avances de los rusos. El método está difundido por casi todos los países, practicando la inseminación artificial en casi todas las especies vacunas, equina, porcina, ovina, caprina, conejos, gallinas, pavos, peces, seres humanos, etc. (M. A., 2003).

ANATOMÍA DEL BOVINO

El estudio de la anatomía y fisiología animal es de vital importancia para el conocimiento de la estructura y funcionamiento de los diferentes aparatos y sistemas del organismo animal (Konig y Liebich, 2011).

Las diferentes especies animales, a través del mecanismo evolutivo se han ido adaptando a diversas fuentes de alimento. De esta manera, se han conformado grandes diferencias anatómicas y fisiológicas de los órganos digestivos, estas diferencias revisten gran importancia porque afectan los procesos digestivos (INT, 2016).

Regiones de la boca:

- Labios
- Carrillos o mejillas
- Paladar duro
- Paladar blando
- Piso de la boca y lengua
- Dientes (Figura 1)

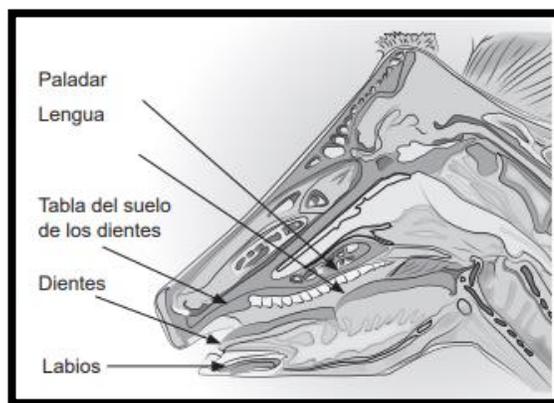


Figura 1 Regiones de la boca (INT, 2016)

Labios

Son dos pliegues músculo membranoso que circundan en el orificio de la boca, cubierto externamente por la piel y tapizado por dentro por la membrana mucosa. La función de estos sirven como órgano prensil de los alimentos, en cuanto al vacuno los labios son gruesos y desde el punto de vista comparativo, inmóviles.

Lengua

Situada en el piso de la boca entre las ramas de la mandíbula, presenta numerosas papilas entre las cuales están (Figura 2):

- Papilas filiformes: eminencias finas parecidas a hilos.
- Papilas fungiformes: parte lateral de la lengua.
- Papilas circunvaladas. Se encuentran en la parte caudal del dorso.
- Papilas foliadas: situadas rostralmente a los arcos del paladar blando.

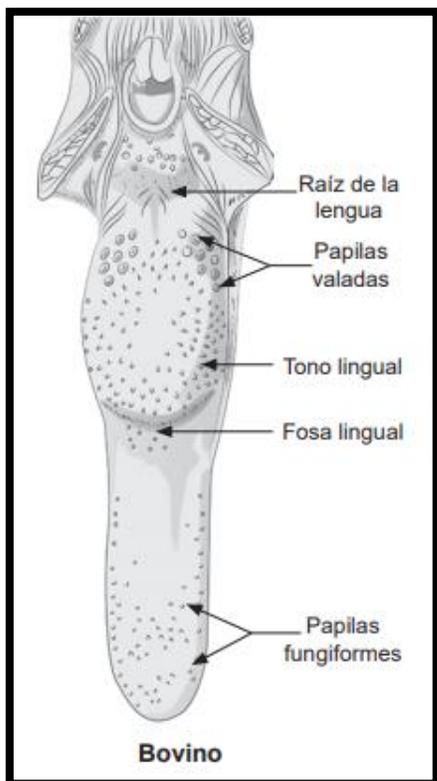


Figura 2 Estructura de la lengua del bovino (INT, 2016).

Dientes

El ganado rumiante no tiene incisivos superiores, pero la losa de dientes sustituye su función a través de las encías. (Tabla 1)

Faringe

Es una estructura que controla el pasaje de los alimentos a los demás órganos de sistemas como el estómago e intestinos. En ella se encuentra los cartílagos aritenoides, que hacen que durante la deglución se cierre la abertura laríngea. También existe la epiglotis que se cierra impidiendo que los alimentos entren al tracto respiratorio. (Figura 3)

Esófago

Es un tubo musculoso, largo de forma cilíndrica que va desde la faringe hasta el cardias o entrada del estómago, se origina en la faringe por detrás de la laringe y desciende por detrás de la tráquea hasta la tercera vértebra cervical aproximadamente, de allí se coloca de forma lateral izquierda y cuando llega a altura de la sexta vértebra cervical se ubica dorso lateralmente, luego recobra su ubicación dorsal y atraviesa así al diafragma, su función es impulsar el bolo alimenticio hacia el estómago, a través de movimientos de contracción (peristaltismo).

Tipos de dientes						
Deciduos			Permanentes			
I	C	P	I	C	P	M
0	0	3	0	0	3	3
4	0	3	4	0	3	3

Figura 3 Tabla 1. Número total de dientes en el bovino (INT, 2016).

Estómago

En el caso de los rumiantes como los bovinos, ovinos y caprinos. Este tipo de estómago se encuentra dividido en cuatro compartimentos.

El estómago de los rumiantes es muy grande y ocupa casi las 3/4 partes de la cavidad abdominal. Está ubicado en la mitad izquierda de la cavidad abdominal y se extienden hacia la cavidad derecha. El estómago de los rumiantes está compuesto y dividido en cuatro compartimentos:

1. Rumen (panza, herbario)
2. Reticulo (bonete, redecilla)
3. Omaso (librillo)
4. Abomaso (estómago verdadero, cuajar).

Intestino grueso

Es la continuación del íleon, es corto y de aspecto cerrado al final.

Mientras tanto, el ciego es también la parte más ancha del intestino. Debido a que es cerrado, es probable que se acumule el exceso de gas producido durante la anomalía de la fermentación. Posee tres partes: ciego, colon y recto.

Ciego

Tiene forma de saco, continúa anteriormente con el colon y la demarcación entre ellos está dada por la desembocadura del íleon. La extremidad ciega es redondeada y se ubica al lado derecho de la entrada de la pelvis. El ciego de los rumiantes es relativamente pequeño.

Colon

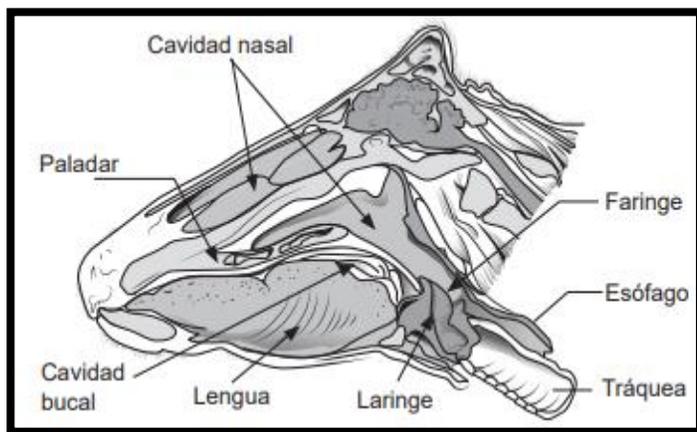


Figura 4 Faringe bovina (INT, 2016).

Su diámetro disminuye posteriormente. Se divide en asa inicial, laberinto y asa terminal. Se continúa con el recto.

Recto

Es la parte final del tubo digestivo. Se encuentra recubierto por peritoneo y termina en el ano.

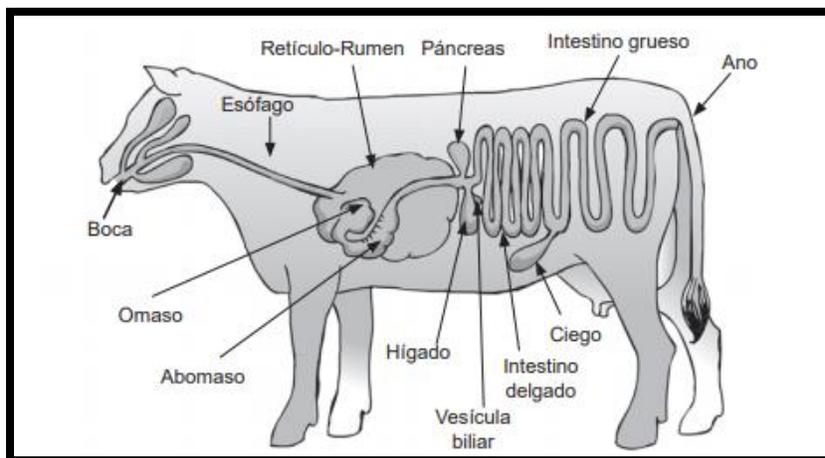


Figura 5 Sistema digestivo de rumiantes (INT, 2016).

APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO

Los machos de las distintas especies domésticas presentan aparatos reproductivos diferentes, adaptados a su morfología corporal, medio en que evolucionó y sus necesidades. Dentro de esta diversidad, hay órganos que aunque poseen forma diferente, cumplen las mismas funciones en todas las especies. (Figura 6) El aparato genital del macho consta de las siguientes partes:

- Testículos
- Conductos espermáticos
- Glándulas accesorias

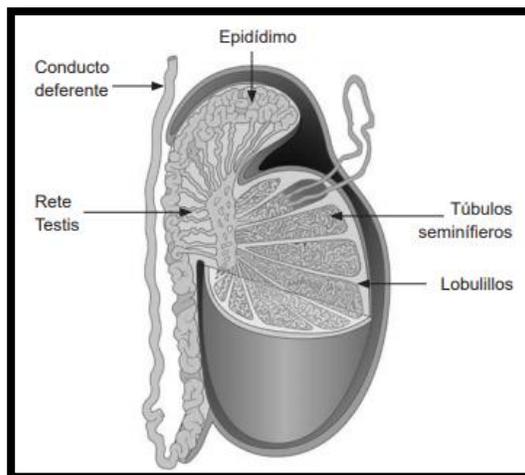


Figura 6 Testículos (INT, 2016).

- Órgano copulador

Testículos

Son los principales órganos de la reproducción en los machos y se localizan en la región inguinal, son de forma oval. Los testículos del toro miden entre 10-16 cm de longitud, 4-9 cm de ancho y 5-8 cm de grosor; sin embargo, el tamaño depende de la edad, raza, especie y desarrollo corporal del animal.

Son dos glándulas de secreción mixta, formadas por túbulos seminíferos donde ocurre la espermatogénesis (producción de espermatozoides), entre los que se encuentra células intersticiales que producen la hormona sexual masculina (testosterona). La posición de los testículos en el escroto y la dirección de su eje longitudinal en relación con el cuerpo, varía con las especies. (Figura 5)

Escroto

Tejido que cubre y protege a los testículos en aquellas especies donde se encuentran expuestos. El escroto es una estructura termorreguladora que mantiene una temperatura 4 a 7 °C menor que la corporal, permitiendo una temperatura adecuada para la espermatogénesis. Cuando el animal es expuesto a bajas temperaturas el escroto se recoge, acercando los testículos al cuerpo y viceversa.

Conductos espermáticos

Epidídimo: se localiza sobre el margen dorsal del testículo. Anatómicamente, consta de tres partes: cabeza, cuerpo y cola; ésta última parte se continúa con el conducto deferente. El epidídimo tiene como función transportar, concentrar, madurar y almacenar los espermatozoides para en el momento de la eyaculación pasar a los conductos deferentes y ser expulsados. Si no hay eyaculación los espermias son absorbidos por las células de la cola del epidídimo.

Conducto deferente: es un tubo que emerge del extremo de la cola del epidídimo, pasa por la región pélvica donde se une a la uretra en su origen. Su función es

transportar los espermatozoides desde el epidídimo a la uretra al momento de la eyaculación. Junto con los vasos y nervios que se dirigen al testículo constituyen el cordón espermático.

Vesícula seminal: son órganos pares localizados en la cavidad pélvica, tienen forma alargada, lobulada y están formadas por grandes lobulillos. Pueden ser palpadas por vía rectal (bovino). La secreción de estas glándulas constituye cerca de la mitad del eyaculado.

Uretra: canal que conduce la orina fuera de la vejiga, también conduce los espermatozoides. Comienza en el orificio uretral interno y termina en el orificio uretral externo, situado en el vértice del pene. La porción preprostática sólo transporta orina; el resto llevará orina durante la micción o semen durante la eyaculación.

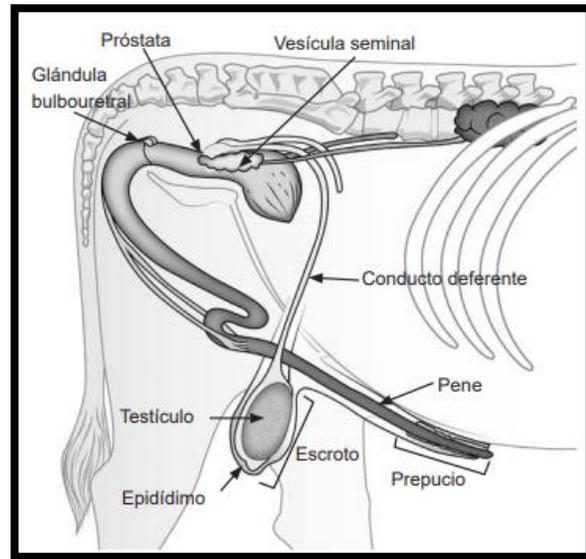


Figura 7 Aparato reproductor del toro (INT, 2016).

Próstata: se le conoce dos porciones

- Cuerpo
- Porción diseminada

El cuerpo de la próstata es una pequeña protuberancia trasversal en forma de anillo que rodea la uretra en su parte superior. En algunos animales es difícil detectar a la palpación ya que puede ser muy pequeña o no existir. La porción diseminada de la próstata se encuentra distribuida en toda la longitud de la uretra bajo una capa muscular, por lo que no es detectable por medio de la palpación.

Su función es ayudar al control urinario mediante la presión directa contra la pared de la uretra que rodea. Produce líquido prostático que forma parte del semen, esta sustancia proporciona un medio adecuado para la supervivencia de los espermatozoides.

Glándulas accesorias

Se agrupan alrededor de la uretra pélvica. Estas glándulas secretan buena parte del líquido seminal, indispensable para transportar a los espermatozoides, medio de su nutrición y amortiguador contra el exceso de acidez del aparato genital femenino.

Órgano copulador

Pene: es un órgano que tiene doble función: la expulsión de la orina y la del depósito de semen en el aparato genital de la hembra. En el pene de los mamíferos se encuentran tres cuerpos cavernosos, los cuales rodean a la uretra.

- Cuerpo esponjoso del pene
- Cuerpo cavernoso del pene
- Cuerpo esponjoso del glande

Estos cuerpos cavernosos tienen la propiedad de llenarse de sangre y producir la erección, en el caso del pene de los rumiantes se observa el pene fibro-elástico los cuerpos cavernosos son menos desarrollados.

En estas últimas especies (rumiantes) se encuentra una flexura característica (Flexura sigmoidea o "S" peneana), la cual se distiende por la relajación de los músculos retractores del pene durante la erección y vuelve a su posición de descanso por la concentración de estos músculos.

El bovino tiene un glande en forma de punta de lanza, el de ovino y caprino se asemeja al del bovino pero presenta una prolongación uretral de 4 a 5 cm; el cerdo no tiene una estructura que se diferencie del cuerpo del pene; el glande en sí es una continuación que termina en forma del tirabuzón (CG, 1995).

Prepucio

Es una estructura desarrollada a partir de la piel. Su función es proteger el pene.

Edad en meses	Circunferencia escrotal (cm)
Menor o igual a 15	30
16 – 18	31
19 – 21	32
22 – 24	33
25 o más	34

En los rumiantes se le considera constituido por dos porciones: porción peneana y porción prepeneana (INT, 2016).

DETERMINACIÓN DE LA PUBERTAD DEL MACHO

La pubertad se define como el inicio de la vida reproductiva del toro y es de vital importancia porque determina el momento en que el macho reproductor tiene la mejor edad para colectar semen cuando se utilice la inseminación artificial. Puede definirse también la pubertad como el tiempo durante el cual los órganos sexuales del toro están funcionalmente desarrollados, el instinto sexual es prominente y la reproducción es posible (Troconiz, et al., 1998).

En los machos se han relacionado varios criterios para definir la pubertad, así; circunferencia escrotal de unos 28 cm, elevación de los niveles séricos de testosterona y separación de la mucosa prepucial del pene. Sin embargo, el hecho más deficiente es la presencia de espermatozoides en le eyaculado. Tomándose como parámetro de pubertad una concentración espermática de 50×10^8 y una motilidad mínima de 10%. La pubertad en el macho recibe la influencia de varios factores como la raza, el plano nutricional y factores ambientales. Las razas *Bos*

Indicus llegan a la pubertad a mayores edades que las razas *Bos Taurus* europeas (Nolan, et al., 1990).

Figura 8 Tabla 2. Perímetro escrotal (Spitzer, 2000).

EVALUACIÓN REPRODUCTIVA DEL MACHO

La evaluación reproductiva del toro incluye aspectos como el desarrollo testicular y su relación con la manifestación del deseo sexual, la capacidad de monta y la calidad del semen eyaculado (Cardozo *et al.*, 2002).

La circunferencia escrotal es un indicador eficiente y repetible para predecir la habilidad futura del toro en la producción de espermatozoides, de tal manera que los toros con adecuado desarrollo escrotal para su edad, poseen una alta probabilidad de ser buenos reproductores que aquéllos con circunferencia escrotal pequeña (Chennoweth *et al.*, 1975).

Circunferencia escrotal

La circunferencia escrotal (CE) es uno de los componentes básicos del examen de la fertilidad potencial del toro y la característica individual más importante para mejorar la eficiencia reproductiva de los hatos.

Los valores de la circunferencia escrotal están correlacionados de manera estrecha con la producción de espermatozoides por el testículo, motivo por el cual se constituyen en un gran indicador de la fertilidad del toro. Los testículos muy pequeños implican un deficiente desarrollo del tejido productor de espermatozoides. Para que los valores mencionados resulten válidos es necesario asegurar que los testículos sean normales, ya que las condiciones patológicas podrían hacer variar su tamaño (Coijlter *et al.*, 1987).

Es posible encontrar variaciones en el tamaño de los testículos en animales normales; por lo general, los toros de razas lecheras tienen testículos más grandes que los de razas de carne. La circunferencia escrotal es un indicador eficiente y repetible para predecir la habilidad futura del toro en la producción de espermatozoides, de tal manera que los toros con adecuado desarrollo escrotal

para su edad, poseen una alta probabilidad de ser buenos reproductores que aquéllos con circunferencia escrotal pequeña (Higdon *et al.*, 2000).

Hoy en día se acepta a nivel mundial el perímetro escrotal como un indicador de gran valor en la evaluación reproductiva de los toros (Spitzer, 2000). (Tabla 2)

Análisis del semen

Características macroscópicas: Las características macroscópicas a evaluar en semen de bovinos son; volumen, color, olor, aspecto, densidad macroscópica.

Volumen

El volumen del eyaculado se expresa en mililitros (mL), y su lectura se hace por medio de un tubo recolector graduado. Normalmente dicho valor, para el eyaculado de toros, es de aproximadamente 2 mL en animales jóvenes y en animales adultos \geq a 4 mL, llegando hasta 12 mL. (Bearden, *et al.*, 1982).

Color

Esta característica se evalúa por medio de la visualización en el laboratorio. El color del eyaculado depende del contenido de riboflavina, siendo normalmente desde blanquecino marfil hasta amarillento. Una coloración rojiza, indica la mezcla con sangre fresca; si el color es pardo, indica la presencia de sangre más vieja (hemolizada), denominándose ambos tipos como hemospermia. Una coloración gris indica contaminación. Los eyaculados sin espermatozoides tienen una coloración amarillo-verdosa y son de apariencia acuosa. El pus en el eyaculado se reconoce frecuentemente por la presencia de flóculos, denominándose piospermia (AST, 1992).

Olor

Las muestras de semen recolectadas higiénicamente, de toros sanos y fértiles, tienen un débil olor sui géneris.

Aspecto

El aspecto depende del número de espermatozoides/mm³, de los componentes de secreción de las glándulas accesorias y de eventuales agregados como: sangre, pus, células epiteliales y contaminación externa (Ballester *et al.*, 2007).

Densidad

Esta evaluación debe ser verificada en la evaluación microscópica, en la cual se calcula con gran precisión la concentración espermática, mediante el uso de la cámara de Neubauer o cualquier método de cuantificación de concentración, como el espectrofotómetro.

En el caso de los bovinos, la densidad macroscópica se clasifica en:

- Azoospermico: ausencia de espermatozoides en el eyaculado.
- Oligozoospermico: ≤ 200 millones espermatozoides/mL.
- Ralo: 200–500 millones espermatozoides/mL.
- Semi-denso: 500–800 millones espermatozoides/mL.
- Denso: 800–1.500 millones espermatozoides/mL.
- Densísimo: ≥ 1.500 millones espermatozoides/mL (Amann *et al.*, 1980).

Características microscópicas

El análisis morfológico de los espermatozoides es uno de los principales componentes de la evaluación de las características de una muestra seminal. La valoración de la morfología del espermatozoide se basa en la relación directa que haya entre la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, el tipo de defecto morfológico y su relación con la fertilidad in vivo de los toros.

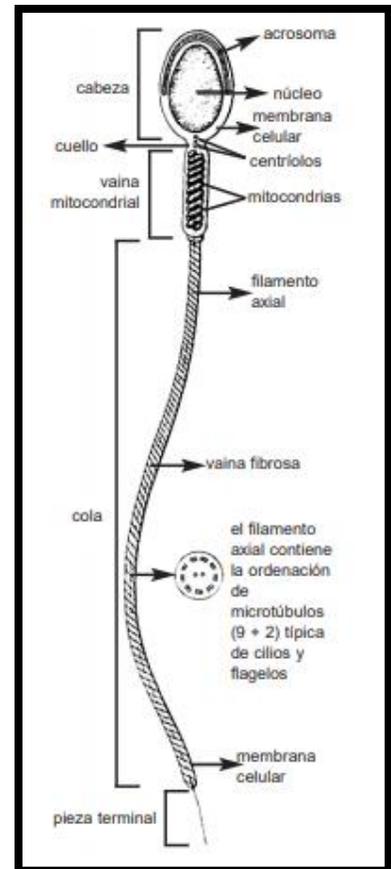


Figura 9 Morfología del espermatozoide (Hidalgo, 2002).

Atendiendo a una clasificación estrictamente morfológica, las anomalías que puedan generarse se clasifican en anomalías en la cabeza, en el tracto intermedio y en la cola. Según el órgano donde pueden haberse generado diferenciamos las anomalías primarias y secundarias.

Motilidad

La motilidad es uno de los parámetros más importantes de la analítica seminal. Hasta hace pocos años el estudio de la motilidad espermática se hacía exclusivamente mediante métodos semicuantitativos. Estos métodos evalúan el porcentaje de espermatozoides móviles, así como el tipo de movimiento que presentaba la media de una población espermática (Hidalgo *et al.*, 2002).

Las características microscópicas a evaluar en el semen de bovinos son: motilidad masal, motilidad individual, viabilidad.

Motilidad masal

Por movimiento de masa se entiende, el movimiento en onda de todos los espermatozoides, observado en los eyaculados densos.

Motilidad individual

La motilidad individual de una muestra de semen se expresa como el porcentaje de células móviles bajo un campo microscópico (Agüero, 2012).

Viabilidad

La rotura de la membrana plasmática está claramente asociada con la pérdida de viabilidad celular, pero una membrana plasmática intacta no siempre indica que la célula sea viable. El procesado del semen, incluida su criopreservación, es “estresante” para el espermatozoide y afecta, primeramente, a sus membranas. Los daños que pueden producirse en éstas pueden ser modificaciones en su organización, permeabilidad y composición lipídica. Las membranas espermáticas que pueden verse afectadas por la criopreservación incluyen la membrana plasmática, la membrana externa del acrosoma y las membranas mitocondriales.

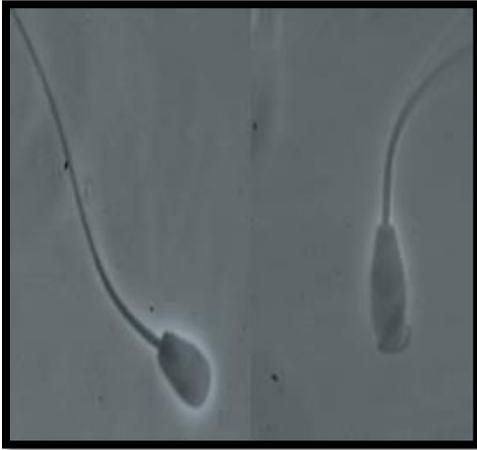


Figura 10 Izquierda, espermatozoide con acrosoma intacto. Derecha, espermatozoide con acrosoma dañado (Hidalgo, et al., 2002).

Estado del cromosoma

El acrosoma juega un papel fundamental en la fecundación y esta importancia hace que convenga realizar una valoración específica del mismo. En un espermatozoide que tenga el acrosoma en perfectas condiciones se pueden distinguir tres regiones claramente diferenciadas en la cabeza: la zona acrosomal, con un borde apical, la zona postacrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas. Las muestras seminales con alta proporción de acrosomas alterados o ausentes suelen tener una fertilidad baja (Hidalgo *et al.*, 2002).

CRIOCONSERVACIÓN

La criopreservación de los espermatozoides bovinos es una herramienta utilizada en la biotecnología reproductiva para difundir el germoplasma de animales genéticamente valiosos (Anzar y Graham, 1995).

El semen usado en la inseminación artificial es mantenido fuera del reproductor durante horas y días, como en el caso del semen fresco y hasta años en el caso del semen congelado. Estos espermatozoides tienen contacto con el medio ambiente y para que no pierdan su poder fecundativo, el semen recibe cierto tratamiento que alargan la vida de los espermatozoides y hacen posible que conserven su movimiento. Este tratamiento que prolonga la vida de los espermatozoides lo denominamos “Conservación” del semen (M. A., 2003).

Por medio de la crioconservación se busca la estabilización de las células a temperaturas criogénicas (-196 °C), donde se detiene la actividad metabólica, permitiendo su preservación por periodos de tiempo indefinidos (Cruz *et al.*, 2006). La estructura y composición de las membranas plasmáticas determinan los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación; las bajas temperaturas afectan la difusión y ósmosis a través de las membranas y cada célula maneja su propio perfil biofísico el cual interactúa con diferentes criopreservantes celulares (Ávila *et al.*, 2006).

Los lípidos (colesterol y ácidos grasos) como componentes más abundantes de la membrana plasmática, determinan la fluidez y resistencia de la membrana durante los procesos de criopreservación. El empaquetamiento y la posición de estas moléculas en las bicapas determinarán la rigidez de las membranas y por tanto el transporte de moléculas. Este transporte a través de las membranas es el punto crítico para la supervivencia celular posdescongelación (Lotan, 1981).

En las bicapas, los ácidos grasos de los fosfolípidos se posicionan en paralelo los unos a los otros mientras que el colesterol se intercala entre ellos. Este empaquetamiento de las cadenas hidrofóbicas hace que interaccionen entre ellas y se estabilicen por fuerzas de van der Waals. Cuanto más difícil sea este empaquetamiento más fluida será la membrana. Cuanto más larga es la cadena del ácido graso, más fácilmente se forman estas uniones y más rígida es la membrana, la existencia de dobles enlaces en las cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos de la membrana introduce cambios de orientación en las cadenas y hace que estas moléculas no interaccionen tan fácilmente entre sí y por tanto que la membrana sea más fluida. La presencia de moléculas de colesterol en la bicapa le proporciona rigidez a temperaturas fisiológicas por la unión de sus anillos a las cadenas de ácidos grasos (impide su libre movimiento y por tanto disminuye la fluidez) pero impide, por razones estéricas, que las cadenas de ácidos grasos se empaqueten libremente (cristalicen) al disminuir la temperatura aumentando, en ese momento, la fluidez de la membrana (Mathews *et al.*, 2003).

Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de congelación en general debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos, la transición de lípidos fluidos a sólidos se da a una temperatura de 10°C - 16°C alterando de esta manera las funciones de la membrana y dándole un alto grado de fragilidad, durante la deshidratación celular que tiene lugar en el proceso de congelación se puede presentar una pérdida de lípidos lo cual afectaría la integridad de la membrana plasmática por pérdida de su capacidad de expansión durante la rehidratación al volver a condiciones isotónica (Seidel, 2006).

Varela *et al.*,(2019) comenta que Chen et al., (2015): Bilodeau *et al.*, (2000) y Andrabi, (2009), hablan que el procedimiento de criopreservación genera diferentes tipos de estrés en los espermatozoides, entre ellos el estrés oxidativo, el cual es ocasionado por la excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), que disminuyen el perfil de las enzimas antioxidantes, debido a la alta susceptibilidad de los espermatozoides, a pesar de que cuentan con sistemas de defensa antioxidante enzimático.

Varela *et al.*,(2019) comenta que Lone et al., (2018) explica que el sistema de defensa antioxidante enzimático está compuesto por la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la reductasa, las cuales son importantes para mantener la viabilidad, la integridad de la membrana plasmática y acrosomal, la movilidad y el ADN de los espermatozoides bovinos. Las consecuencias del estrés oxidativo se pueden disminuir suplementando los diluyentes de congelación con antioxidantes (Baie et al., 2017).

Agentes crioprotectores

Los criopreservantes son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada, (punto en el cual una composición dada de A y B solidifica como un elemento puro), el descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor (García, 1984) / (Porcu *et al.*, 2001).

Crioprotectores penetrantes

Son de bajo peso molecular y permeable a través de la membrana celular. Son utilizados: el glicerol, el dimetilsulfoxido (DMSO) y propanediol (PROH).

Su acción crioprotectora se atribuye principalmente a su habilidad de prevenir acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana, su bajo peso molecular permite la entrada rápida través de la membrana celular (García, 1984).

Crioprotectores no penetrantes

Son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes. Los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano.

Estos compuestos generalmente son polímeros que forman puentes hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad de agua a una magnitud mucho mayor que la que se predeciría por su concentración mola (Hunt *et al.*, 2003).

Métodos de criopreservación

La congelación ultrarrápida fue originalmente descrita para la congelación de embriones. Implica la rápida deshidratación celular, utilizando altas concentraciones de crioprotector, usualmente DMSO y sacarosa, seguida de inmersión en nitrógeno líquido.

La vitrificación tampoco requiere la utilización de un congelador programable; se basa en la congelación rápida en una mezcla de altas concentraciones de crioprotectores, que a bajas temperaturas aumentan su viscosidad formando un sólido amorfo, sin formación de hielo (Boiso, 2001).

CONSERVACIÓN DEL SEMEN

En la actualidad solo se utiliza el método de conservación por congelación, debido al avance de la tecnología en cuanto a envases de semen congelado, instrumental necesario para la inseminación y los tanques criogénicos de diferentes tamaños que permiten llevar la inseminación a lugares de difícil acceso.

El semen podemos conservarlo a tres diferentes temperaturas. En temperatura ambiente o sea a 25°C, en refrigerador a 5°C por congelación en nitrógeno líquido a -196°C bajo cero.

Para que el semen colectado de un toro no sufra durante el proceso de conservación, es necesario darle ciertas sustancias energéticas y protectoras. Estas sustancias están contenidas en el dilutor.

El dilutor, es una solución de sustancias nutritivas y protectoras con el cual se mezcla el semen para:

- Aumentar el volumen del evacuado, para poder inseminar el mayor número posible de hembras.
- Mantener vivos los espermatozoides el mayor tiempo posible, esto se logra porque el dilutor contiene nutrientes, sustancias protectoras, etc.
- Para evitar que el semen diluido se propague de gérmenes de enfermedades, los dilutores contienen antibióticos (M. A., 2003).

Manejo de la conservadora del semen o tanque de hidrógeno

La conservadora o termo es la unidad criogénica indispensable para la conservación del semen destinado a la Inseminación Artificial, siendo el nitrógeno líquido la fuente de frío (-196 °C). Por lo tanto, es conveniente conocer cómo debe tratarse para su mejor funcionamiento y duración, ya que un trato inadecuado trae como consecuencia la pérdida de su capacidad conservante y por consiguiente la pérdida del material seminal.

Tipos de tanques: Existen en el mercado distintos tipos de tanques, según los usos para los que son destinados:

De trabajo: estos están caracterizados por ser de larga autonomía estática o de trabajo, pero son más frágiles, de ahí que son recomendados para inseminaciones, y no para transporte de nitrógeno y/o semen congelado. Estos tanques son



Figura 11 Almacenamiento de semen (M. A., 2003).

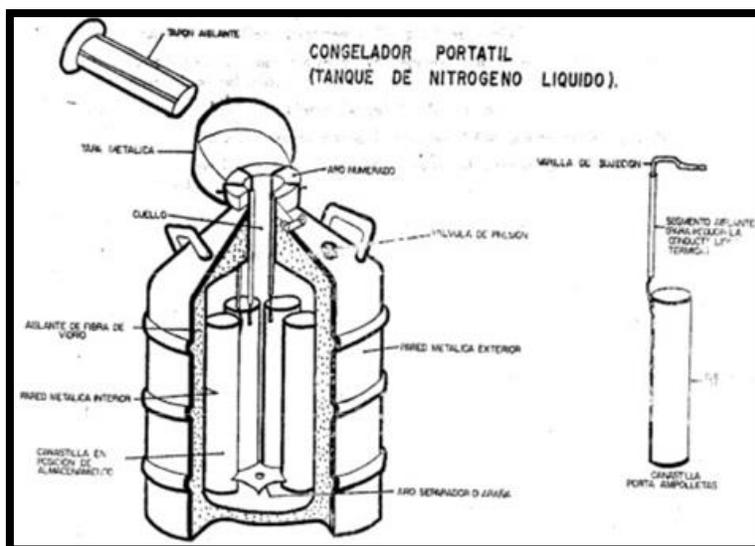
generalmente de una capacidad de 17 a 33 litros, con seis canastillas, para separar los lotes de pajillas u otra presentación de semen congelado. (Figura 9)

De transporte: hay grandes y chicos, los primeros de 50 lts. En adelante, son usados por bancos de semen o para proveer de nitrógeno líquido a varios establecimientos. Los chicos (5 a 10 litros), son para transporte de semen congelado y nitrógeno. Estos tanques si bien tienen mayor resistencia al transporte, tienen mayor consumo y menor autonomía.

Para depósito: de 30 a 40 litros en adelante, y son utilizados por bancos de semen o grandes establecimientos. Los modernos son de poco consumo (M. A., 2003).

ESTRUCTURA DE LA CONSERVADORA O TANQUE DE NITRÓGENO LÍQUIDO

Es un recipiente con doble pared (Figura 10) la interna de una aleación especial es



capaz de soportar temperaturas extremadamente frías ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), en cambio la externa es para resistir las oscilaciones térmicas ambientales. Entre las

dos paredes el único punto de contacto es el cuello, del cual está suspendido el recipiente que aloja el nitrógeno líquido (NL), y constituye el punto más frágil, por ser dicha unión una soldadura no metálica. Entre ambas paredes existe un espacio que actúa como aislante, cuyo principio es el vacío, además topes para amortiguar los sacudones.

Para evitar la conducción y escape de frío por los brazos de las canastillas, entre

Figura 12 Corte esquemático del termo de nitrógeno líquido (M. A., 2003).

el enganche del cuello y el recipiente, no hay

continuidad metálica, porque de lo contrario se aumenta el gasto de nitrógeno líquido. Las tapas de material aislante (tecnopor, corcho, plástico, etc.), cubren todo el cuello y poseen espacios para alojar los brazos de las canastillas. Estas están sujetas por un enganche en el cuello y una guía a modo de soporte, con forma de estrella en el fondo de la conservadora (M. A., 2003).



Figura 13 Muestra de pajillas en contenedor de nitrógeno (Rivera, 2016).

Recomendaciones para el manejo del semen congelado

- El tanque con las dosis de semen debe estar protegido de las altas temperaturas y ubicado en un cuarto higiénico.
- Use siempre guantes protectores de lana o algodón.
- Use anteojos protectores, para evitar lesiones en los ojos que pueda producirse, al explotar violentamente las pajillas mal selladas.
- Debe observarse frecuentemente el nivel del nitrógeno líquido. Es recomendable que el nivel esté siempre por encima de las dosis de semen.
- Ubique en su recipiente criogénico (tanque de nitrógeno líquido) la canastilla que contiene el semen a utilizarse.

- Tome al asa de la canastilla y levante solo hasta 7.5 cm. del borde del cuello.
- Ubique la varilla que contiene el semen a utilizar.
- Con una pinza adecuada tome la pajilla y rápidamente llévela al termo descongelador el cual debe contener agua a una temperatura de 38°C a 40°C (si por una equivocación ha tomado una pajilla diferente y la ha extraído para leer el nombre del toro, no la vuelva a introducir, deséchela) El descongelamiento brusco se realiza para evitar que la etapa de cristalización de los líquidos dañe a los espermatozoides, esta etapa es la siguiente:

-60°C = Cristales cúbicos -70°C = Cristales hexagonales -80°C = Cristales amorfos.

- Por ningún motivo descongele la pajilla en el bolsillo, porque se pasa muy lentamente la etapa de cristalización de los líquidos perdiéndose un 25% de fertilidad
- Dejar la pajilla sumergida en el agua por espacio de 12 a 15 segundos, si se trata de la pajilla de 0.50 c.c. o de 7 a 9 segundos si se trata de pajillas de 0.25 c.c.
- Sacar la pajilla del agua y secarla con cuidado con un paño.
- Sacudir suavemente la pajilla para permitir que la burbuja de aire se desplace al extremo cerrado en el laboratorio.
- Cortar la pajilla por el extremo cerrado en el laboratorio (burbuja de aire) de preferencia por medio de una corta pajilla o con una tijera afilada en forma horizontal.
- Las pajillas sufren más rápidamente los efectos de los cambios de temperatura por lo que deben extremar cuidado en este sentido
- Antes de comenzar los servicios se debe comprobar la aptitud del semen, ya que durante el envío desde el centro de I.A., o al efectuar alguna transferencia, las

células de espermatozoides pueden haber sufrido efectos letales encontrándose con motilidad reducida o nula (Rivera, 2016).

- Al retirar dosis para inseminación o control, nunca debe retirarse completamente la canastilla conteniendo el material fecundante. En lo posible esta no debe sobresalir de la boca del termo, de esta forma no se expondrán las dosis a cambios bruscos de temperatura.
- No se debe exponer el semen a las temperaturas elevadas de la boca del termo (Figura 12) por más de 10 a 15 segundos. Debe tenerse presente que la temperatura en el interior del termo es alrededor de 160 °C bajo cero.

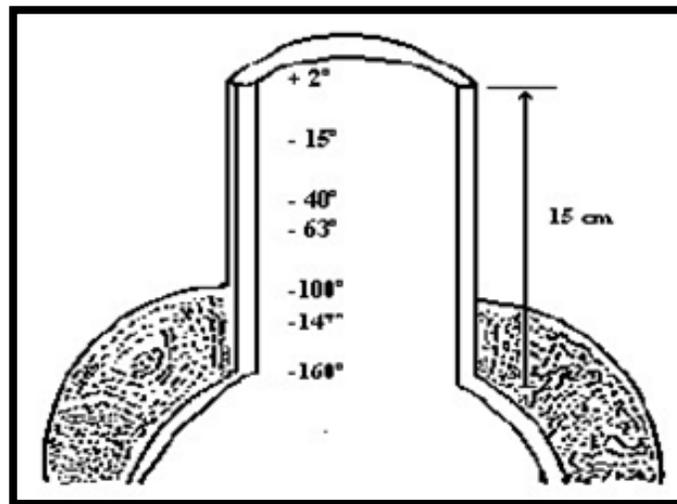


Figura 14 Rango de temperatura en la boca del termo (Rivera, 2016).

REFERENCIAS

- Agüero, G. 2012. Evaluación de las características seminales de sementales bovinos mediante el Analizador Seminal Computarizado (CASA) :1 – 81.
- Amann, R., Hammerstedt, R. 1980. Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biology of Reproduction* 23: 647 – 656.
- American Society of Theriogenology (AST). 1992. Parameters for evaluation of sperm motility. 5th edition. :78 – 92.
- Anzar M, Graham EF. 1995. Effect of filtration on post-thaw quality of bull semen. *Theriogenology* 43: 439-449.
- Ávila, P. M. L., Madero, I. J., López, C., León, F. M., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, G. L., Gómez C., Lozano, M. J., Reguero, T. M. 2006. Fundamentos de criopreservación 57 (4): 921 – 300.
- Ballester, J., Saravia, F., Håård, M. 2007. Post-thaw viability of bull Aldoses with low-sperm numbers. *Theriogenology* 68: 934 – 943.
- Bearden, J., McCallow, G., Smith, P. 1982. Sperm dilutions for appropriate routine of semen evaluation. *Theriogenology* 33: 157 – 160.
- Boiso, I. 2001. Criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 18 (4)
- Cardozo, C. J. A., Velasquez, P. J. G., Rodríguez, F. G., Prieto, M. E., Tarazona, L. G., Espitia, E. A. 2002. Evaluación reproductiva del macho bovino en condiciones tropicales : 1 – 61
- Carta ganadera. 1995. Medio ambiente y reproducción anímaf. Informe especial. Abril : 31 – 34.
- Chenoweth, P. J., Osborne, H. G. 1975. Breed differences in the reDroductive function of young beef bulls in Central Queensland. *Australian Veterinary Journal*. 51: 405 – 406.

Coijlter, G. H., Mapletoft, R. J., Kozub, G. C., Cates, W. F. 1987. Scrotal circumference of two-year-old bulls of several beef breeds. *Theriogenology* 2: 485 – 491.

García, J. V. 1984. Criopreservadores concepto y manejo. *Biol Clin Hematol* 6: 1 – 219.

Hernández, J. 1882. Origen y evolución de la producción bovina y bufalina : 1 – 18

Hidalgo, O. C. O., Tamargo, M. C., Diez, M. C. 2002. Análisis del semen bovino 2: 39 – 43.

Higdon, H. L., Spitzer, J. C., Hopkins, F. M., Bridges, W. C. 2000. Outcomes of breeding soundness evaluation of 2898 yearling bulls subjected to different classification systems. *The riogen ology* 53: 1321 – 1332.

Hunt, C. J., Armitage, S. E., Pegg, D. E. 2003. Cryopreservation or umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34(+) cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing. *Cryobiology* 46:76 – 87

Instituto Nacional Tecnológico (INT). 2016. Anatomía y Fisiología Animal. <http://www.untumbes.edu.pe/vcs/biblioteca/document/varioslibros/Anatomia%20y%20Fisiologia%20Animal.pdf>. Consultado septiembre 2020.

Konig, H., Liebich, H. 2011. Anatomía de los animales domésticos, editorial panamericana, segunda edición

Lotan, R. N. 1981. *Advanced Cell Biology*. NY: Ed van Nostrand. .

Mathews, K. M., Van Holde, K. E., Ahern, K. G. 2003. *Biochemistry*. Third edition. Addison Wesley :92 – 363.

Ministerio de agricultura (M.A.). Manual de inseminación artificial y manejo reproductivo del ganado vacuno. 2003.

<https://www.uv.mx/veracruz/fmvz/files/2019/03/maniatiart.pdf>. Consultado Septiembre 2020.

Nolan, C. J., Neuendorff, D. A., Godfrey, R. W., Harms, P. G., Welsh, J. T. H., McArthur, N. H., Randel, R. D. 1990. Influence of dietary energy intake on prepubertal development of Brahman Bulls 68: 1087 – 1096.

Pérez, E. H. 2016. Fisiología de la reproducción del macho : 1 – 12

Porcu, E., Gardner, D. K., Weissman, A., Howles, C. M., Shoham, Z. 2001. Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives : 280 – 300.

Rivera, G. M. G. 2016. Congelación de semen bovino. Revista genética bovina colombiana

Seidel, G. E. 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. Theriogenology 65: 35 – 228.

Spitzer, J. C., Chenoweth, P. J. 2000. Bull Breeding Soundness Evaluation: Current Status. In: Topics in Bull :501 – 100.

Troconiz, J., Beltrán, J., Bastidas, H., Larreal, H., Bastidas, P. 1998. Testicular development, body weight changes, puberty and semen traits of growing Guzerat An Nellore bulls. Theriogenology 35: 815 – 826.

Varela GE., Rojano BA., Restrepo BG. 2019. Efecto de las lipoproteínas de baja densidad y la trehalosa sobre la actividad enzimática antioxidante del semen bovino criopreservado. Rev Inv Vet Perú; 30(1): 256-264.

Cruz P, Medina V, Velasco Y. 2006. Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). Rev Colomb Cienc Pec 19: 153-159.