

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL SEMEN CRIOPRESERVADO DE DOS GENOTIPOS BOVINOS DEL BOS INDICUS

Temperature effects on cryopreserved semen from two bovine genotypes of Bos Indicus

Efeito da temperatura sobre o sêmen criopreservado de dois genótipos bovinos do Bos Indicus

Villa Duque, Norberto¹. Chaverra Benavides, Swelen². García Rojas, Darwin³. Nieto Omeara, Nathalia⁴. Ortiz Sanchez, Jorge⁵.

Recibido: 27 de Agosto de 2015
Aceptado: 17 de Noviembre de 2015

Resumen

El presente trabajo evaluó la criopreservación a -196°C , la descongelación y la aplicación del semen, en 33 ganaderías bovinas del Magdalena Medio y se estudió, *in vitro*, el efecto de los errores encontrados sobre la supervivencia e integridad de las membranas espermáticas. La recolección de información en fincas se realizó mediante formulario específico. El estudio *in vitro* se ejecutó en el laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal del Instituto Universitario de la Paz (Barrancabermeja, Colombia), y consistió en someter pajillas comerciales de 0.5 ml de toros Braman y Gyr a la técnica instrumental convencional y a tres modificaciones de la misma (errores frecuentes), en un diseño completamente al azar. En ninguna de las fincas evaluadas se aplicó correctamente la práctica de la inseminación artificial (**IA**). Los errores más frecuentes y notorios fueron: el exceso de tiempo utilizado para la extracción de la pajilla del termo de almacenamiento, la

¹ MVZ, MSc, Docente Escuela de MVZ. Grupo de investigación en producción y ciencia animal.PROCA. norberto.villa@unipaz.edu.co

² MVZ, Estudiante tesista. UNIPAZ.

³ MVZ, Esp. Docente Escuela de MVZ.UNIPAZ.

⁴ Bact. Docente Escuela de MVZ. UNIPAZ.

⁵ Estad.MSc. Docente Escuela de Ciencias. UNIPAZ

descongelación de la pajilla en la axila y la no combinación correcta entre tiempo y temperatura. No existió diferencia significativa ($P>0.01$) entre los tratamientos evaluados para la supervivencia (**S**), la integridad acrosómica (**MAN**) y la integridad estructural de la membrana plasmática (**MPN**). No obstante toman relevancia los resultados porcentuales respecto al tratamiento convencional, los cuales, fueron los únicos que estuvieron por encima de las medias establecidas como mínimas en favor de la capacidad fecundante del semen. Los valores más bajos para supervivencia, integridad y resistencia de membranas correspondieron al semen del genotipo Brahman. Los resultados evidenciaron, en el genotipo Gyr, una mayor resistencia a la injuria y a la acción deletérea por efecto de la criopreservación y por efecto de las fallas en el manejo de la temperatura en el momento de la descongelación de la pajilla.

Palabras clave: Acrosoma, inseminación, genotipo, plasmática, supervivencia

Abstract

This paper evaluated the cryopreservation effect; thawing and semen application in 33 bovine herds in the Middle Magdalena and studied, *in vitro*, the effect of the found errors on the integrity of the sperm membrane. Information on farms was performed using specific form. The *in vitro* study was carried out in the laboratory of Reproductive Animal Biotechnology of Instituto Universitario de la Paz and consisted in putting commercial straws of 0.5 ml of *Brahman* and *Gyr* bulls to the conventional technique and to three amendments thereto (errors) by a randomized design. None of the evaluated farms applied correctly the practice of artificial insemination (AI). The glaring errors were: excess time used to extract the straw, thawing in the armpit and not right combination of time and temperature. There was no significant difference ($P> 0.01$) between the evaluated treatments for survival (S), the acrosome integrity (MAN) and the structural integrity of the plasma membrane (MPN). Become significant the resulted percentages compared to conventional treatment, which were above the averages established as minimum in favor of the fertilizing capacity of semen. The lowest values for survival, integrity and resistance membrane corresponded to genotype Brahman semen. The Gyr genotype showed a greater resistance to injury and deleterious action by effect of cryopreservation and the effect of failures in the handling of the temperature at the time of defrosting of the straw.

Key words: Acrosome, insemination, genotype, plasmatic, survival

Resumo

O presente trabalho avaliou a criopreservação a -196°C , o descongelamento e a aplicação do sêmen, em 33 fazendas bovinas do Magdalena Meio e estudou-se, *in vitro*, o efeito dos erros encontrados a respeito da supervivência e integridade das membranas espermáticas. A coleta da informação em fazendas realizou-se

mediante formulário específico. O estudo *in vitro* executou-se no laboratório de Biotecnología Reprodutiva Animal do Instituto Universitario da Paz (Barrancabermeja, Colômbia), e consistiu em someter canudos comerciais de 0.5 ml de touros Braman e Gyr à técnica instrumental convencional e a três modificações da mesma (erros frequentes), em um design completamente ao acaso. Em nenhuma das fazendas avaliadas aplicou-se corretamente a prática da inseminação artificial (**IA**). Os erros mais frequentes e notórios foram: o excesso de tempo utilizado para a extração do canudo da termo de armazenamento, o descongelamento do canudo na axila e a não combinação correta entre tempo e temperatura. Não existiu diferença significativa ($P>0.01$) entre os tratamentos avaliados para a supervivência (**S**), a integridade acrossômica (**MAN**) e a integridade estrutural da membrana plasmática (**MPN**). No entanto tomam relevância os resultados percentuais a respeito do tratamento convencional, os quais, foram os únicos que estiveram por encima das medias estabelecidas como mínimas e favor da capacidade fecundante do sêmen. Os valores mais baixos para supervivência, integridade e resistência de membranas correspondem ao sêmen do genótipo Brahman. Os resultados evidenciaram, no genótipo Gyr, uma maior resistência à injúria e à ação deletéria pelo efeito da criopreservação e pelo efeito das falhas no manejo da temperatura no momento do descongelamento do canudo.

Palavras chave: Acrossôma, inseminação, genótipo, plasmática, supervivência

Introducción

La IA, biotecnología reproductiva más empleada en las empresas ganaderas, es de fácil implementación. Su consolidación se ha logrado a partir del uso de semen congelado empacado en pajillas de 0.25 y 0.5 ml y de su aplicación en el cuerpo del útero mediante una técnica instrumental (TI) específica (Foote, 2002). La utilización de esta biotecnología ha contribuido notoriamente al mejoramiento genético y al aumento de la productividad y rentabilidad de los hatos ganaderos en los cuales se ha implementado; no obstante, errores en la práctica instrumental pueden afectar de manera grave la célula espermática en detrimento de la fertilidad y la productividad de la empresa (Nur *et al*, 2006; Pace *et al*, 1981).

La evaluación de la fertilidad de un reproductor y la manera como es afectada por la manipulación del semen, ya sea en fresco o criopreservado, requiere un mayor estudio de los factores involucrados en el proceso (Barth and Waldner, 2002; Saacke, 2003). La calidad del semen de un toro puede afectarse intrínseca y extrínsecamente (Barth and Waldner, 2002). En el primer caso, según Spitzer, (2000) los factores pueden ser genéticos, nutricionales, tóxicos, de estrés y edad. En el segundo caso puede ser por fallas en la manipulación del semen, las cuales derivan de los protocolos de congelación y descongelación y no de la permanencia a temperaturas bajas, siempre y cuando sean las indicadas (Correa *et al*; 1996; Pickett *et al*; 1978).

La criopreservación de semen a -196°C detiene todos los procesos metabólicos, lo que permite su conservación de manera indefinida (Nebel, 1997). Sin embargo, tanto en la criopreservación como en la descongelación se pueden presentar errores que inducen alteraciones en las membranas celulares, los organelos y la interacción célula-célula, que a la postre afectan la capacidad fecundante del espermatozoide (Woods *et al*; 2004). El retorno a las condiciones fisiológicas que ocurre durante la descongelación, es crítico para la supervivencia celular (Mazur, 1984), y los pasos involucrados en la descongelación exigen máximo cuidado con el tiempo, la temperatura y la manipulación de la pajilla; así por ejemplo, la descongelación de pajillas por más de 30 segundos en temperaturas mayores a los 37°C redundará en mayor número de alteraciones de las membranas espermáticas (Correa *et al*; 1996; Rodríguez *et al*; 1975), y en porcentajes más altos de retorno al celo (Almquist, *et al*; 1982; Pace *et al*, 1981).

Alteraciones similares suceden, cuando se manipulan las pajillas por fuera del cuello del termo de almacenamiento, o cuando los niveles de nitrógeno líquido son insuficientes para mantener la temperatura de -196°C (Berndtson and Pickett, 1978). Además, las bajas temperaturas están asociadas con el aumento de la rigidez de la membrana espermática, y con la reducción de la velocidad del movimiento de moléculas a través de la membrana, mediante los procesos de transporte activo, que terminan sometiendo la célula a estrés osmótico (Mendoza; *et al*; 2000; Watson, 2000) o a shock por frío, con los consecuentes cambios en la estructura del acrosoma (Brown *et al*; 1982; Nur *et al*, 2006).

Con el objetivo de detectar errores por parte de los inseminadores en la implementación de la TI con semen congelado, se observaron 33 hatos en el Magdalena Medio, se replicaron los principales en el Laboratorio y se evaluó el efecto de los mismos sobre la supervivencia y la integridad de las membranas espermáticas.

Materiales y métodos

Primera fase

En esta fase se analizaron las condiciones de criopreservación a -196°C , descongelación y aplicación del semen, en 33 ganaderías bovinas del Magdalena Medio. El análisis de las condiciones de criopreservación a -196°C , se basó en la evaluación de las condiciones de almacenamiento del termo de criopreservación, del nivel de nitrógeno líquido, y del estado de las principales partes del termo (tapa, canastillas, escalerillas, cubierta externa y regla para verificación del nivel de nitrógeno). Las condiciones de manipulación, descongelación y aplicación del semen, se registraron directamente en el momento de la actuación de cada uno de los 33 inseminadores. La recolección de la información en las fincas se realizó mediante el diligenciamiento de un formulario elaborado previamente para este fin.

Segunda fase

Una vez analizados los 33 formularios se seleccionaron los errores más relevantes, con el propósito de establecer su efecto sobre la supervivencia y la integridad de las membranas espermáticas (plasmática y acrosomal), mediante modelo experimental *in vitro*, desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal (LABRA) del Instituto Universitario de la Paz (Barrancabermeja, Santander, Colombia). El material experimental usado fueron pajillas comerciales de 0.5 ml (30×10^6 epzs), de toros Brahman y Gyr. Se probaron cuatro técnicas instrumentales, diseñadas para simular los errores detectados en finca, a saber:

TI1. Protocolo convencional: extracción de las pajillas del termo de almacenamiento en menos de 10 segundos y descongelación en agua a 37°C durante 30 segundos. Antes de vaciar la pajilla se secó con servilleta estéril y su contenido (500µl) se utilizó para el análisis *in vitro*.

TI2. Descongelación en la axila: la descongelación de las pajillas se realizó en la axila durante 30 segundos, antes de utilizar su contenido para el análisis *in vitro*.

TI3. Descongelación de la pajilla durante ocho minutos: la temperatura del agua para descongelar la pajilla fue de 37°C, pero el tiempo de descongelación se extendió durante ocho minutos antes de utilizar su contenido para el análisis *in vitro*.

TI4. Extracción incorrecta de la pajilla: la canastilla y la escalerilla con las pajillas, fueron expuestas por fuera del cuello del termo de criopreservación, durante 30 segundos, tres veces diarias, cuatro días consecutivos, antes de utilizar su contenido para el análisis *in vitro*.

En la implementación de las cuatro (3) TI, aparte del error, el desarrolló estuvo de acuerdo al protocolo convencional establecido. La descongelación de las pajillas en la TI4 se realizó según el protocolo convencional, es decir, a 37°C por 30 segundos (Nur *et al*, 2006; Pickett *et al*; 1978).

Con el fin de descartar el criopreservante, el cual imposibilita la evaluación objetiva de las variables, en los cuatro protocolos, una vez realizada la descongelación de la pajilla, se diluyó el semen en 3.5 ml de solución salina fosfato-bufferada (PBS) por sus siglas en inglés: (phosphate buffered saline), a 37°C, se centrifugó a 500 g durante 5 minutos, y se eliminó el sobrenadante. Este proceso se realizó dos veces; el sedimento se utilizó para realizar el análisis *in vitro* (Brackett and Oliphant, 1975; Risopatron *et al*; 1994).

Las variables evaluadas fueron:

Supervivencia (S): para esta evaluación se utilizó la tinción eosina-nigrosina (Mayer *et al.*, 1951), utilizando los reactivos separadamente. El conteo se realizó en el Microscopio de campo claro (magnificación 400X). El resultado se dio en porcentaje de vivos.

Integridad de la Membrana Acrosomal (MAN): la evaluación se realizó siguiendo el protocolo propuesto por (Prathalingam *et al.*, 2007; Revell and Mrode, 1994; Rubio *et al.*, 2009). Para el conteo se utilizó el microscopio de contraste de fase (magnificación 400X). El resultado se dio en porcentaje de espermatozoides con cresta apical normal (NAR, por sus siglas en inglés).

Integridad Bioquímica de la membrana Plasmática (MPN): la valoración se hizo de acuerdo con el protocolo propuesto por (Perez-LLano *et al.*, 2001). El conteo se realizó en el microscopio de contraste de fase (magnificación de 400X), para determinar los positivos. El resultado se dio en porcentaje de espermatozoides positivos.

MPN/MAN: La integridad de ambas membranas se realizó fijando los espermatozoides con glutaraldehído al 2% en una solución ORT (Osmotic Resistance Test, en dilución 1:1), utilizando un microscopio de contraste de fases (magnificación 400X). El resultado se dio en porcentaje (Díaz *et al.*, 2009).

Tratamiento de la información

Para el análisis de los resultados de la primera fase se utilizó la estadística descriptiva. Los resultados de la segunda fase se describen a través de gráficos de cajas y bigotes “*BOXPLOT*”, y a través de tablas de contingencia. Se compararon los resultados en cada genotipo respecto a los tratamientos usados, mediante la prueba no paramétrica Jonckheere-Terpstra de alternativas ordenadas para muestras independientes (tratamientos), y la prueba U de Mann-Whitney para evaluar diferencias entre los genotipos para cada uno de los tratamientos empleados. Las pruebas estadísticas se compararon al nivel de significación máxima de 0.05, usando el programa IBM SPSS Statistics 22.0.

Resultados Y Discusión

Primera fase:

En la siguiente tabla se describen los hallazgos encontrados en las 33 fincas evaluadas en estas zonas del Magdalena Medio respecto a las condiciones propuestas para el desarrollo de este trabajo: condiciones físicas del termo, almacenamiento del termo, nivel del nitrógeno líquido, extracción y descongelación del semen y características de la inseminación.

Como se indica en la Tabla 1, los resultados detallan irregularidades respecto a la estructura física y almacenamiento del termo de criopreservación. Fallas en el mantenimiento del nivel del nitrógeno líquido. Igualmente fallas en el procedimiento instrumental, desde la extracción de la pajilla del termo, hasta la puesta del semen en el cuerpo del útero de la hembra bovina. Situaciones que comprometen la viabilidad espermática y la fertilidad del hato (Catena and cabodevila, 1999).

Tabla 1. Síntesis de los hallazgos.

ITEM	CON FALLAS (%)	SIN FALLAS (%)
CONDICIONES DEL TERMO	3	97
ALMACENAMIENTO DEL TERMO	85	15
NIVEL DE NITRÓGENO	18	82
EXTRACCIÓN Y DESCONGELACIÓN DEL SEMEN	95	5
CARACTERÍSTICAS DE LA INSEMINACIÓN	90	10

Algunos de los termos observados, estaban almacenados en sitios con mala ventilación y estaban expuestos a la acción directa del sol. Otros, no solamente estaban expuestos a la luz solar, sino también, almacenado en sitios mal ventilados. Además, se encontraron en zonas donde la temperatura ambiente promedio fue de 32°-34°C, situación que según la comisión de urgencias médicas de Madrid (**URM**) en sus recomendaciones para el uso del nitrógeno líquido, puede ocasionar, desde una evaporación exagerada de este, hasta un comprometimiento de la seguridad personal de quien los manipula. De acuerdo con Aga Fano el nitrógeno líquido no es tóxico, pero puede causar asfixia al desplazar el oxígeno del aire; además la exposición a un ambiente deficiente de oxígeno (< 19.5%) puede causar mareo, náuseas, vómito, depresión, salivación excesiva, disminución de la agudeza mental, pérdida de conocimiento y muerte.

En algunas fincas los termos se encontraron con irregularidades en la tapa y en la parte externa, situación que podría ocasionar pérdida de nitrógeno o como lo afirman Grub and Wattiaux, (2006) o provocar un estallamiento del mismo por un cierre hermético o por un bloqueo de la tapa. Las investigaciones de Berndtson and Pickett, (1978); Pickett *et al.*, (1978) explican la necesidad de mantener los niveles de nitrógeno líquido en los termos de conservación de semen bovino, en un nivel mínimo que permita mantener la temperatura al interior de ellos en -196°C, aunque estos se construyan de diferentes dimensiones y Pace *et al.*, (1981) agrega, que más importante que el nivel del nitrógeno, es el hecho de que este produzca los suficientes vapores para mantener la temperatura alrededor de los -196°C y no corra riesgo el proceso de criopreservación.

El promedio del tiempo utilizado para la extracción de la pajilla en las 33 fincas observadas estuvo por encima del mínimo permitido (10-15 segundos) y la manipulación de la misma por fuera del cuello del termo fue observada en varias de ellas. Situación, que de acuerdo con Grub and Wattiaux, (2006); Looper, (2000) producen cambios de temperatura en la pajilla que conllevan daños de sus organelos y malos resultados en la fertilidad del hato; el daño depende del grado y duración del calentamiento: hay más daño cuanto más aumenta la temperatura y más veces se realiza este calentamiento; el daño no se puede ver externamente, ni se arregla si se almacena la pajilla otra vez correctamente.

De los Inseminadores que descongelaron la pajilla en agua caliente, algunos lo hicieron durante tiempos diferentes. Inseminar con pajillas descongeladas por encima de 37° C durante más de 30 segundos, según las investigaciones de Correa *et al.*, (1996); Pace *et al.*, (1981); Pickett *et al.*, (1978); Zekariya *et al.*, 2006) mostraron los índices más altos de retorno al celo después de la inseminación.

Casi el 50% de los Inseminadores observados, utilizaron para la descongelación de las pajillas con semen, recipientes sin tapa, situación que de acuerdo con Angell *et al.*, (2009); Tortolero *et al.*, (2005), al quedar expuestas a la acción de los rayos ultravioleta, podrían ocasionarle daños al semen, que irían desde la producción de especies reactivas de oxígeno (**ROS**), hasta la fragmentación del ADN. Si a este último proceder se le agrega el hecho de que varios de los Inseminadores observados, no secan la pajilla antes de montarla en el inyector, como lo afirman Hafez, (2002); Schroeder, (1999), las posibilidades de ocasionar infecciones al interior del tracto reproductivo de la hembra bovina aumentan.

En las observaciones se reportaron inseminadores que descongelaron la pajilla en la axila, hecho inusual en la implementación correcta de este protocolo; utilizar este método de descongelación sometería a la pajilla con semen a una variación de temperatura que podría conducir a daño de las membranas espermáticas o a una excesiva producción de radicales libres (**RL**), con el consecuente daño de la célula (Tortolero *et al.*, 2005).

Cada pajilla debe ser utilizada en los primeros cinco minutos después de su descongelamiento, ya que las células espermáticas descongeladas no solo son susceptibles a la temperatura, sino que también consumen sus reservas rápidamente (Grub and Wattiaux, 2006). Varios de los Inseminadores observados, en las 33 fincas visitadas, se demoraron más de 5 minutos en el proceso de sacar la pajilla, montarla en el inyector (pistola) y ponerla en el tracto reproductivo de la hembra bovina dispuesta para inseminar. Situación que compromete la membrana espermática, al ser sometida a estrés, ocasionando cambios lipídicos en la misma de difícil reversión (Drobnis *et al.*, 1993; Watson, 2000). Al existir pérdida de lípidos, la membrana plasmática se afecta por pérdida de su capacidad de expansión durante la rehidratación al volver a condiciones isotónicas (Seidel, 2006).

Segunda fase:

Las cuatro técnicas instrumentales, diseñadas para simular los errores detectados en finca evidenciaron los siguientes resultados relacionados en la tabla 2.

Se usó la prueba estadística Jonckheere-Terpstra para comparar el efecto de los tratamientos, entre toros Brahmán y Gyr.

Tabla 2. Distribución de los tratamientos según genotipos evaluados.

		Genotipo				Total	
		Brahman		Gyr			
		N°	%	N°	%	N°	%
Tratamiento	Convencional	3	25,0%	3	25,0%	6	25,0%
	Descongelación en la axila durante 30 seg.	3	25,0%	3	25,0%	6	25,0%
	Descongelación por 8 min.	3	25,0%	3	25,0%	6	25,0%
	Por fuera del cuello del termo	3	25,0%	3	25,0%	6	25,0%
Total		12	100,0%	12	100,0%	24	100,0%

Según los resultados de la tabla 3, no hay evidencia suficiente en la muestra para afirmar que exista diferencia significativa para la supervivencia entre los genotipos evaluados en la investigación, lo cual se afirma con una confianza del 95%.

Tabla 3. Comparación del porcentaje de supervivencia espermática entre los Genotipos Brahmán y Gyr.

Genotipo	Estadístico de prueba estandarizado ¹	N	p
Brahmán	-0.995	12	0.320
Gyr	0.498	12	0.618

¹ Prueba de Jonckheere-Terpstra de alternativas ordenadas para muestras independientes.

Tabla 4. Comparaciones del porcentaje de supervivencia espermática entre los Tratamientos.

Tratamientos	U de Mann-Whitney estandarizada	n	p
Convencional	1.091	6	0.400
Descongelación en la axila durante 30 seg.	1.091	6	0.400
Descongelación por 8 min.	1.964	6	0.100
Por fuera del cuello del termo	1.964	6	0.100

Los porcentajes de supervivencia entre Brahmán y Gyr no varían entre los tratamientos de descongelación empleados, en forma significativa, al nivel 0.05.

En la figura 1 se observa en términos descriptivos, que el porcentaje de supervivencia espermática difiere entre los genotipos bajo los tratamientos “Descongelamiento por 8 minutos” y “Por fuera del cuello del termo” y difieren levemente para los tratamientos restantes. Por otro, lado los mayores porcentajes de supervivencia se observan en el genotipo Gyr bajo los tratamientos “Convencional” y “Descongelación por 8 minutos” y “Por fuera del cuello del termo”.

Así no se haya presentado diferencias significativas entre los tratamientos, en esta evaluación, lo porcentual toma mayor relevancia. Cinco (5) de las seis (6) muestras superaron los porcentajes mínimos aceptables (40% en semen congelado-descongelado), según lo propuesto e investigado por (Barth et al., 2000; Catena and Cabodevila, 1999; Gómez and Migliorisi, 2009), basados en las normas mínimas exigidas por el Departamento de Medicina del Rodeo y Teriogenología de

la Universidad de Saskatchewan, Canadá y que se corresponden con las de las normas ISO 9002. Una muestra espermática del semen de Brahmán, no alcanzó este mínimo, el resultado se da cuando la pajilla se descongeló en la axila (protocolo no convencional). Los resultados, para la supervivencia, estuvieron por debajo de los obtenidos por Cabrera and Pantoja, (2012) solo por el efecto de la criopreservación, lo que podría estar sugiriendo efecto a causa de las fallas en la implementación de la Técnica Instrumental.

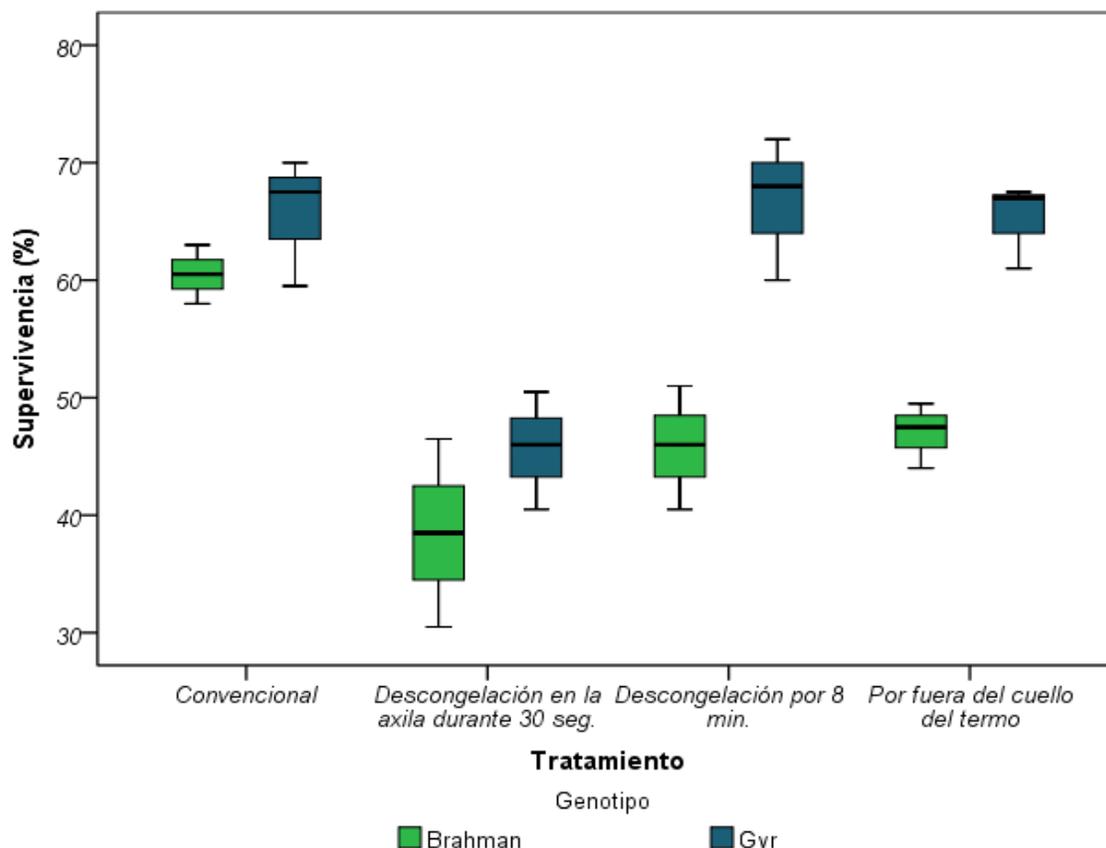


Figura 1. Distribución de la supervivencia en Brahmán y Gyr bajo cuatro diferentes metodologías de descongelación.

Inseminar con semen descongelado con porcentajes por debajo de los mínimos de supervivencia exigidos, comprometería la fertilidad y la productividad del hato en general, si se tienen en cuenta todos los aspectos relacionados con el transporte del espermatozoide y la capacitación espermática a que están sometidas estas células antes de alcanzar el ámpula del oviducto y ser capaz de fecundar un óvulo (Hafez, 2002).

Según la tabla 5, se observa que no hay evidencia suficiente en la muestra, para afirmar que exista diferencia significativa para la evaluación de la Membrana Plasmática por efecto de los genotipos evaluados en la investigación, lo cual se afirma al comparar los resultados en Brahmán y en Gyr, al nivel de significación 0.05.

Tabla 5. Comparaciones del porcentaje de Membrana Plasmática (Test de HOST) entre los Genotipos Brahmán y Gyr.

Genotipo	Estadístico de prueba estandarizado ¹	n	p
Brahmán	-1.279	12	0.201
Gyr	-0.855	12	0.393

¹ Prueba de Jonckheere-Terpstra de alternativas ordenadas para muestras independientes.

Tabla 6. Comparaciones del porcentaje de Membrana Plasmática (Test de HOST) entre los Tratamientos.

Tratamientos	U de Mann-Whitney estandarizada	n	p
Convencional	1.798	6	0.100
Descongelación en la axila durante 30 seg.	1.771	6	0.100
Descongelación por 8 min.	0.218	6	1.000
Por fuera del cuello del termo	1.964	6	0.100

Las comparaciones del porcentaje de membrana plasmática entre Brahmán y Gyr, indicaron que no hay evidencia estadística suficiente en la muestra para afirmar que exista diferencia significativa entre los tratamientos implementados, utilizando HOST, lo cual se afirma al nivel 0.05.

En la figura 2, de forma descriptiva, se observa que el comportamiento del porcentaje de membrana plasmática para el genotipo Brahmán difiere entre tratamientos; por otra parte, en el genotipo Gyr el porcentaje de membrana plasmática difiere entre los tratamientos “convencional” y “por fuera del cuello del termo”. Finalmente, en términos descriptivos la respuesta para los genotipos en estudio es superior bajo el tratamiento convencional, comparado con los otros métodos de descongelación empleados.

No se encontró evidencia significativa por efecto del genotipo en la muestra en la evaluación de la membrana plasmática, utilizando el Test ORT, lo cual se afirma con una confianza del 95%.

Tabla 7. Comparaciones del porcentaje de resistencia de la Membrana Plasmática (Test ORT) entre los Genotipos en Brahmán y Gyr.

Genotipo	Estadístico de prueba estandarizado ¹	n	p
Brahmán	-1.282	12	0.200
Gyr	-1.421	12	0.155

¹Prueba de Jonckheere-Terpstra de alternativas ordenadas para muestras independientes.

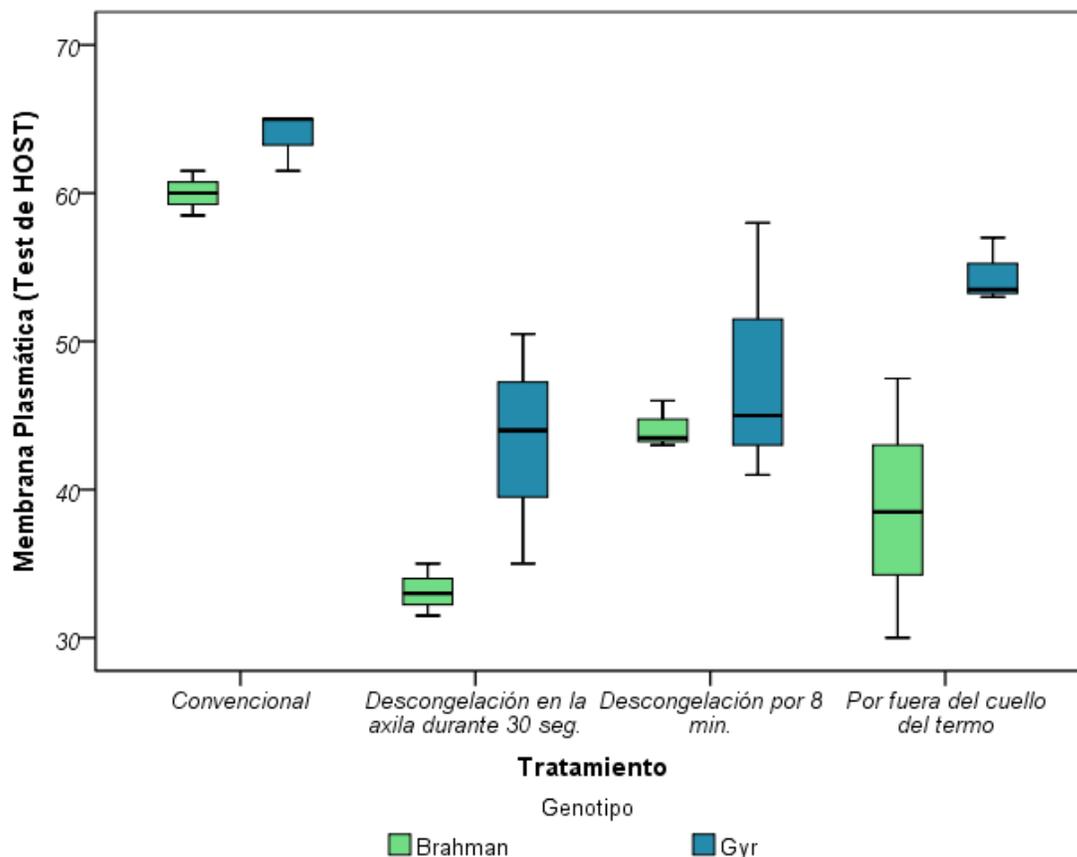


Figura 2. Distribución del porcentaje de membrana plasmática (Test de HOST) en Brahmán y Gyr bajo cuatro diferentes metodologías de descongelación.

La tabla 8 muestra que no hay evidencia suficiente en la muestra, para afirmar que exista diferencia significativa para la evaluación de la Membrana Plasmática, utilizando el Test ORT, lo cual se afirma al nivel de significación 0.05.

Tabla 8. Comparaciones del porcentaje de resistencia de la Membrana Plasmática (Test ORT) entre Brahmán y Gyr en Tratamientos.

Tratamientos	U de Mann-Whitney estandarizada	n	p
Convencional	1.964	6	0.100
Descongelación en la axila durante 30 seg.	1.964	6	0.100
Descongelación por 8 min.	1.55	6	0.200
Por fuera del cuello del termo	1.964	6	0.100

Gráficamente se observa que los valores para la Membrana Plasmática (Test ORT) son ligeramente mayores en el tratamiento “Convencional” que en los demás tratamientos empleados (Descongelación en la axila por 30 segundos, descongelación por 8 minutos y por fuera del cuello del termo), al mismo tiempo se evidencia que la descongelación en la axila por 30 segundos genera una respuesta

inferior en Brahmán y ligeramente inferior en Gyr en comparación con los otros tratamientos.

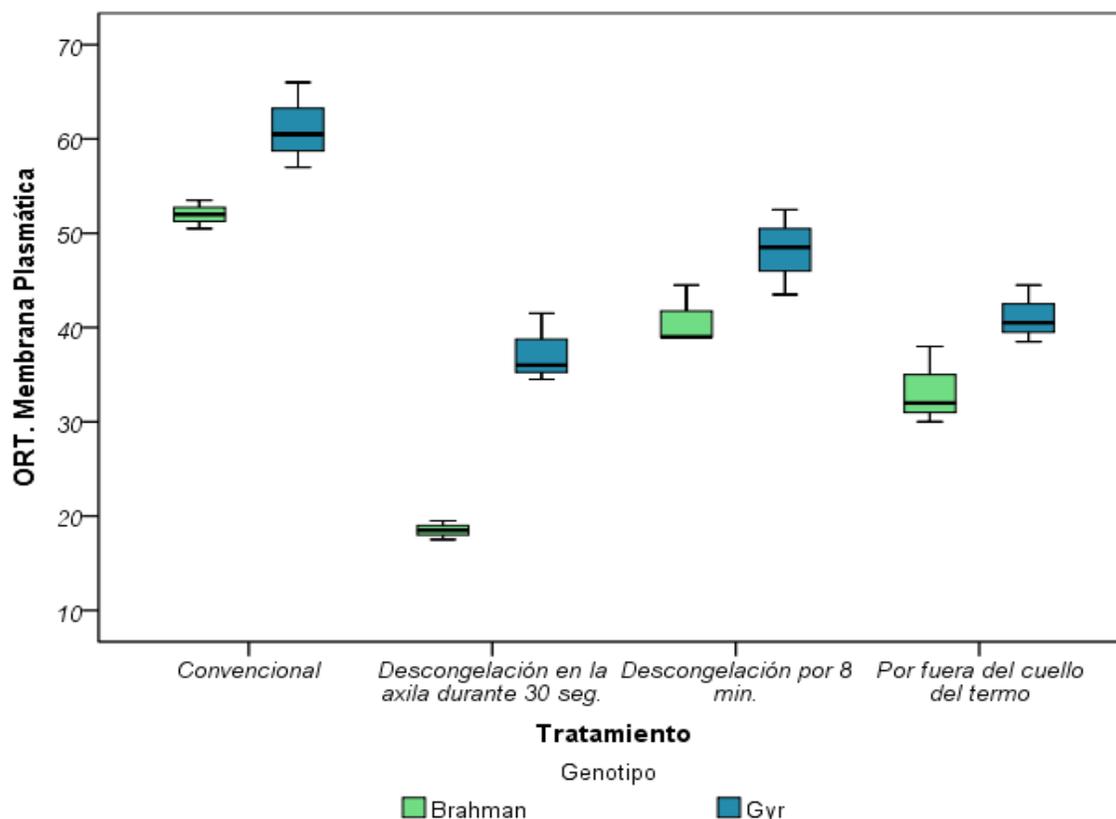


Figura 3. Distribución del porcentaje de membrana plasmática (ORT) en Brahmán y Gyr bajo cuatro diferentes metodologías de descongelación.

Los valores mínimos que pueden garantizar una fertilidad idónea para esta variable enunciados por (Barth et al., 2000; Catena and Cabodevila, 1999; Gómez and Migliorisi, 2009) son, también, del 40%. Los resultados, como se aprecia en las figuras 2 y 3, solo favorecen al protocolo convencional y comprometen los demás tratamientos, exceptuando al genotipo Gyr, cuando la pajilla se maneja por fuera del cuello de termo y por más tiempo del recomendado.

Los resultados evidencian alteraciones de la membrana plasmática, en porcentajes más elevados que los que se plantean por acción de la sola criopreservación (Barth et al; 2000). Los lípidos (colesterol y ácidos grasos) son los componentes más abundantes de la membrana plasmática (Ávila et al., 2006). Estos lípidos son los que determinan la fluidez y la resistencia de la membrana durante los procesos de criopreservación (Ávila et al., 2006). Los resultados evidencian este tipo de alteraciones, no solo producto del proceso de criopreservación, pues como lo demuestra (Rubio et al; 2009) en su investigación el proceso de criopreservación produce alteraciones de las membranas, pero los porcentajes resultantes de un

buen manejo de la criopreservación permiten conservar porcentajes idóneos a favor de la fertilidad de cualquier programa de Inseminación artificial.

En un trabajo realizado por (Bernardi *et al*; (2011) el porcentaje de espermatozoides reaccionados a HOST disminuyó significativamente cuando el tiempo utilizado para pasar la dosis del termo de nitrógeno al baño de descongelado fue de 1' o de 5' (Tabla 2). Esta misma situación se evidenció cuando la temperatura de descongelado fue de 21, 55, 75 y 95°C y cuando al mantener esta temperatura en 37°C, el tiempo de exposición fue de 15", 5' o 10' (Tabla 4). Las variaciones señaladas de estos dos parámetros fueron también significativas al demorar la inseminación provocando exposición de las dosis a temperatura ambiente (22°C y 9°C) por el término de 20' (Tabla 5). Situaciones, que si bien no fueron exactamente las mismas replicadas en este trabajo, si semejan el trabajo realizado y los errores cometidos por los inseminadores.

Es importante anotar que este trabajo referido se realizó en toros Holstein, los cuales, tal y como lo reporta Villa, (2010) en su investigación, este genotipo mostro tener un semen más resistente que los otros dos evaluados (Pardo suizo y Jersey). En otro trabajo realizado por (Barth et al; 2000), se hallaron parámetros más bajos para el genotipo Brahmán, comparados con el genotipo Holstein. Las causas pueden deberse como lo señala Parks, (2003) a que el calentamiento de los testículos provoca que los espermatozoides en la fase meiótica sean destruidos y se den alteraciones en la transformación de espermatides a espermatozoides, principalmente cambios de condensación de la cromatina nuclear, formación de la cola y desarrollo del casquete acrosómico. Lo cual lógicamente repercute en el proceso de criopreservación y desarrolla poca resistencia a una mala manipulación de la pajilla.

No se encontró evidencia suficiente para afirmar que existen diferencias significativas en los resultados del porcentaje de NAR por efecto de los genotipos de estudio (Brahman y Gyr).

Tabla 9. Comparaciones de Membrana Acrosomal Normal (NAR) entre los genotipos Brahman y Gyr.

Genotipo	Estadístico de prueba estandarizado ¹	n	p
Brahman	-0.426	12	0.670
Gyr	-0.928	12	0.354

¹ Prueba de Jonckheere-Terpstra de alternativas ordenadas para muestras independientes.

No se observaron diferencias significativas entre Brahman y Gyr respecto a los tratamientos empleados: convencional, descongelación en la axila durante 30 segundos, descongelación por 8 minutos y por fuera del cuello del termo, lo cual se afirma con una confianza del 95%.

Tabla 10. Comparaciones de Membrana Acrosomal Normal (NAR) entre tratamientos para los genotipos Brahman y Gyr.

Tratamientos	U de Mann-Whitney estandarizada	N	p
Convencional	0.655	6	0.700
Descongelación en la axila durante 30 seg.	1.964	6	0.100
Descongelación por 8 min.	1.771	6	0.100
Por fuera del cuello del termo	1.993	6	0.100

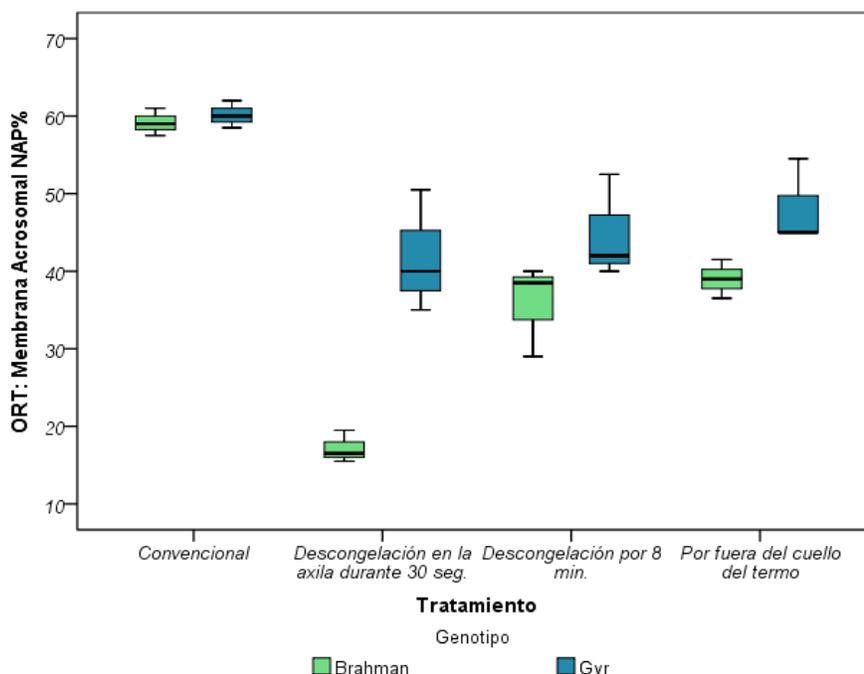


Figura 4. Distribución del porcentaje de membrana Acrosomal Normal (NAR) en Brahman y Gyr bajo cuatro diferentes metodologías de descongelación.

La figura 4 permite evidenciar que el tratamiento convencional mostró un porcentaje de NAR superior a los demás tratamientos en cada uno de los genotipos. Por otro lado se observa que el comportamiento de la variable NAR es diferente entre los genotipos dentro de los tratamientos “Descongelamiento en la axila durante 30 segundos”, “Descongelamiento por 8 min” y “por fuera del cuello del termo”, Finalmente se observa que los valores más bajos de NAR se presentan para el genotipo Brahman en el tratamiento de “descongelación en la axila durante 30 segundos”

Tabla 11. Comparaciones del porcentaje de Membrana plasmática Normal/Membrana Acrosomal Normal (MPN/MAN) entre los genotipos Brahman y Gyr.

Genotipo	Estadístico de prueba estandarizado ¹	N	p
Brahman	-1.279	12	0.201
Gyr	-1.139	12	0.255

¹ Prueba de Jonckheere-Terpstra de alternativas ordenadas para muestras independientes.

No hay evidencia suficiente en la muestra para afirmar que exista diferencia significativa entre los genotipos para MPN/MAN, lo cual se afirma con una confianza del 95%.

Al comparar los resultados del porcentaje de MPN/MAN entre Brahman y Gyr, bajo la influencia del tratamiento convencional, no se encontró evidencia suficiente para señalar diferencias entre genotipos, al nivel 0.05. Los tratamientos de descongelación en la axila por 30 segundos, descongelación por 8 minutos y fuera del cuello del termo tampoco mostraron diferencias entre Brahman y Gyr respecto al porcentaje de MPN/MAN, lo cual se afirma con una confianza del 95% (tabla 12).

Tabla 12. Comparaciones del porcentaje de MPN/MAN entre los Tratamientos.

Tratamientos	U de Mann-Whitney estandarizada	N	p
Convencional	1.993	6	0.100
Descongelación en la axila durante 30 seg.	1.964	6	0.100
Descongelación por 8 min.	-0.674	6	0.700
Por fuera del cuello del termo	1.964	6	0.100

La figura 5 se puede observar que los valores para MPN/MAN son mayores para el genotipo Gyr con respecto al genotipo Brahman en los tratamientos “Convencional”, “Descongelación en la axila por 30 segundo” y “Por fuera del cuello del termo”. De igual forma se puede observar que el tratamiento “Convencional”, con respecto a los demás tratamientos, presenta los mayores valores para MPN/MAN en cada uno de los genotipos. Finalmente el menor valor para MPN/MAN está presente en el genotipo Brahman en el tratamiento “Descongelación en la axila durante 30 segundos”.

Los resultados permitieron evidenciar que solamente el semen descongelado sometido al protocolo convencional estuvo por encima de los mínimos propuestos en las investigaciones de Barth et al., 2000; Catena and Cabodevila, 1999; Gómez and Migliorisi, 2009). En los demás tratamientos se evidenciaron resultados por debajo de estos mínimos propuestos para la evaluación de la Membrana Acrosomal (50%). Este hecho pudiera afectar notablemente la tasa de fertilidad, ya que el proceso de capacitación acrosomal representa un requisito definitivo para la fertilización y sólo los espermatozoides debidamente capacitados pueden realizar la reacción acrosomal de manera sincronizada con la fase de penetración del oocito, tienen la habilidad de pasar a través de la zona pelúcida y de fusionarse con el óvulo para formar un embrión (Januskauskas et al; 2000).

Son pocos o de escasa publicación los trabajos semejantes al presentado. No obstante los resultados obtenidos en investigaciones que evaluaron solo el efecto de la criopreservación sobre las variables trabajadas, pueden servir de referencia. Ejemplo, son los resultados obtenidos en las investigaciones de (Rubio-Guillen et al; 2007), en las cuales evaluó el efecto de la criopreservación sobre ambas membranas (plasmática y acrosomal) evidenciando resultados más altos

porcentualmente, que los obtenidos en este trabajo, lo que estaría sugiriendo un daño agregado por las fallas en la manipulación de las pajillas al momento de implementar la Técnica Instrumental en la Inseminación Artificial. Estos resultados, en la evaluación de la MP y de la MA son muy relevantes debido a que el ORT ha demostrado tener una correlación alta y positiva con la capacidad fecundante del espermatozoide (Quintero, 2003).

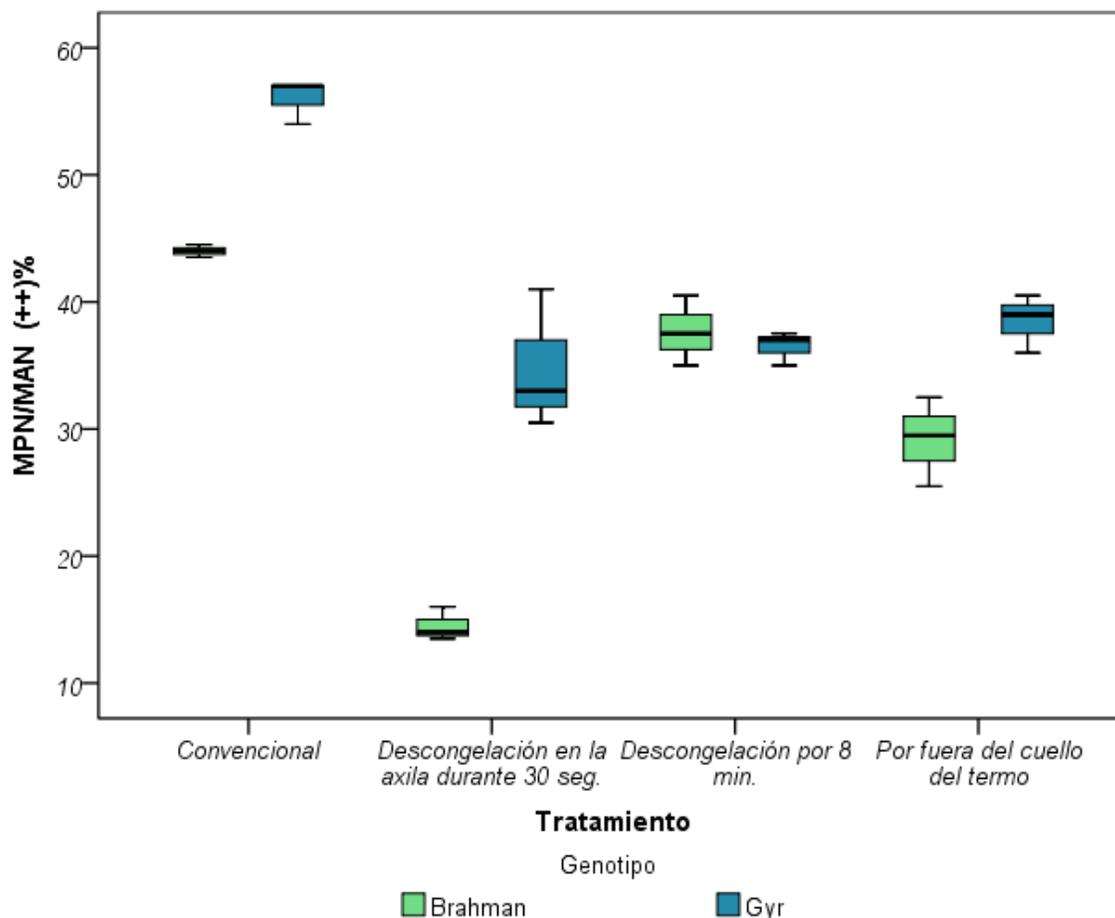


Figura 5. Distribución del porcentaje de MPN/MAN Brahman y Gyr bajo cuatro diferentes metodologías de descongelación

Errores en la manipulación de la pajilla afectan la funcionalidad espermática, la cual puede verse afectada por la injuria, causando un efecto deletéreo sobre la función del acrosoma (Estévez, et al; 2000; Prathalingam et al; 2005) y de la membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial e integridad del ADN (Bollwein et al; 2008). Los espermatozoides sometidos a injuria están sujetos a alteraciones en su estructura, como dilatación y rompimiento a nivel de la membrana, cambios de permeabilidad en la misma; hay cambios en la estructura de fosfolípidos y proteínas que traen como consecuencia una reducción en su motilidad y viabilidad (Thundathil et al; 1999; Roncoletta et al; 2006). Cambios estructurales dan conllevan prematura capacitación, afectandose la vida media de los espermatozoides y su capacidad fertilizante; diversos trabajos correlacionan la

presencia de capacitación espermática prematura en semen descongelado con su capacidad fertilizante (Thundathil et al; 1999; Maxwell et al; 1999).

En este trabajo se pudo evidenciar que las muestras seminales de los toros resisten de manera distinta el proceso de congelación- descongelación seminal, de allí que muchas veces se puede encontrar toros destinados a IA, con excelentes parámetros de calidad seminal en las muestras frescas y que sean catalogados posteriormente como malos congeladores, obteniendo diferentes fertilidades a nivel de campo (Madrid-Bury, 2004; Rubio Guillén et al, 2007).

En este trabajo, en términos generales, el genotipo Brahman mostró los menores porcentajes como respuesta a la injuria causada por los Inseminadores, tanto para la evaluación de la membrana plasmática (HOST y ORT), como para la evaluación de la membrana acrosomal (ORT). Algunos autores reportan que los toros Bos Indicus presentan siempre una menor producción y menor calidad espermáticas, sin importar bajo qué condiciones se encuentran en comparación con los Bos Taurus (Fields et al; 1982). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en el trabajo de (Villa, 2010), en el cual se evaluaron 3 genotipos del Bos Taurus bajo las mismas condiciones y variables y cuyos resultados fueron superiores a los obtenidos en la presente evaluación.

Conclusiones

Las observaciones a los 33 inseminadores permitieron evidenciar fallas en la implementación de la técnica instrumental en los programas de inseminación artificial con efectos deletéreos para la calidad seminal del semen congelado-descongelado evaluado.

En términos generales se puede concluir que no existió diferencia significativa entre los tratamientos evaluados para las variables supervivencia y funcionalidad de las membranas espermáticas (plasmática y acrosomal) por efecto de los genotipos evaluados. No obstante adquiere relevancia la evaluación descriptiva porcentual en la cual se puede apreciar efectos nefastos para la funcionalidad de la membrana plasmática y acrosomal cuando se replicaron las fallas en el Laboratorio.

Se sabe que la criopreservación, tiene como propósito garantizar la supervivencia de los espermatozoides, sin embargo, en una elevada y variable proporción de ellos suele ocasionar daños irreversibles a la membrana plasmática y acrosomal que pueden causar muerte celular e infertilidad. Los resultados de este experimento demuestran que el proceso de congelación-descongelación afecta la integridad de estas membranas, tanto a lo referente a morfología como a funcionalidad. Sin embargo, se pudo demostrar como los espermatozoides de los diferentes toros evaluados, resisten de manera distinta los efectos detrimentales de la criopreservación y las fallas en la implementación de la técnica instrumental. Así mismo, el estudio confirma que el daño criogénico puede ocurrir indistintamente

sobre la integridad estructural y funcional MP y MA, lo que pudiera afectar la capacidad fecundante de las muestras seminales destinadas a IA.

Bibliografía

AGA Fano S.A. (2005). Hoja de seguridad del material. Fábrica Nacional de Oxígeno, 6. Colombia.

Almquist, J. O. (1982). Effect of thawing time on fertility of bovine spermatozoa in french straws. 824-827. (J. D. Science, Ed.)

Angell, D. N. Efecto de la preparación espermática previo a la fertilización in vitro sobre la membrana plasmática y el adn de semen bovino sexado. CES. Medicina Veterinaria y Zootecnia, 4, 29-37.

Ávila, L. Fundamentos de criopreservación. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología , 57, 291-300.

Barth, A. C. (2002). Factors Affecting breeding soundness classification of beef bulls examined at the Westrn college of Veterinary Medicine. Canadian Veterinary Journal, 43, 43. Canadian.

Barth, A. (16 al 19 de Agosto de 2000). Curso de evaluación de toros y control de la calidad seminal. 1, 55. Córdoba, Argentina: Universidad Catolica de Argentina.

Bernardi, S. F., Allende, R., Mazzeo, R., Monti, J., & Marini, P. R. (2011). Evaluación de los cambios ocasionados en espermatozoides bovinos en el manejo de la dosis durante su manipulacion en inseminación artificial. Invet (2) , 13, 25-38.

Berndtson, W. E. (1978). Thecniques for the cryopreservation and fiel handling of bovine spermatozoa. In: N. A. o.Sciences (ed).

Bollwein, H., Fuchs, I., & Koess, C. (2008). Interrelationship Between Plasma Membrane Integrity, Mitochondrial Membrane Potential and DNA Fragmentation in Cryopreserved Bovine Spermatozoa. Reproduction Domestic. Animal. , 2 , 43, 189-195.

Brackett, B. G. (1975). Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biology of Reproduction , 12 , 260-274.

Brouwn, J. L., L., S. P., & Hillers., a. J. (1982.). Influence of thawing time and post-thawing temperature on acrosomal maintenance and motility of bovine spermatozoa frozen in .5 ml french straws. Journal Animal Science , 54 , 938-944.

Cabrera, P., & Pantoja, A. (2012). Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros Nacionales. Inv Vet Peru. , 23 (2), 192-200.

- Catena, M., & Cabodevila, J. (1999). Evaluación del semen congelado. *Taurus* 1 , 18-31.
- Correa, J. R., M. C. Rodríguez, D., J., P., & Zavos., A. P. (1996). Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effect on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity. *Theriogenology* 46 , 413-420.
- Díaz, O., H. Mesa, G., Gómez, D. F., & Henao, J. (2009). Evaluación invitro de la viabilidad del semen porcino hasta 120 horas de almacenamiento en refrigeración. *Veterinaria y Zootecnia* , 3, 32-37.
- Drobnis, E. e. (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model. , *J Exp Zool* 19 , 432-437.
- Estevez, S., Sharma, R., Thomas, A., & Agarwal, A. (2000). Improvement in motion characteristic and acrosome status in cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing. *Human Reprod.* 15 , (10), 2173-2179.
- Fields, M. J., & Cornelisses, K. M. (1982). Aspects of the sexual development of Brahman vs Angus bulls IN Florida. *Theriogenology*, 18, 18-31.
- Foot, R. H. (2002). The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science* 80 , 1-10.
- Gomez, M. V., & Migliorisi, A. A. (2009). Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Plata: 9.
- Grub, M., & Wattiaux., M. (2006). Curso de inseminación artificial.
- Hafez, E. S. (2002). Reproducción e inseminación artificial en animales. Mexico.
- J, T., J, G., & et ál. (1999). Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed bull semen and fertility with artificial insemination. *Int J Androl* , 22 (6) , 73-366.
- Januskauskas, A., Johannisson, A., Soderquist, L., & Rodríguez-Martínez, H. (2000). Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenol.* 53: , 859-875.
- Looper, M. (2000). Proper semen handling improves conception rates of dairy cows. *Extension Dairy Specialist Guide D:* , 1-4.
- Madrid-Bury, N. (2004). Relación entre los métodos de valoración seminal in vitro y la fertilidad in vivo del semen descongelado de toros frisonos. 1-164 pp. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid, España. División de Estudios de Postgrado. Facultad de Veterinaria. Tesis Doctoral.

Maxwel, V., & Johnson, L. (1999). Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* (8), 52, 1353-62.

Mayer, D. T., Squiers, C. D., Bogart, R., & Oloufa., M. M. (1951). The technique for characterizing mammalian spermatozoa as dead or living by differential staining. *The Journal of Animal Science* 10: , 226-235.

Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology* 247, 142-145.

Mendoza, J. A., Dulin, P., & Warrent., T. (2000). The Lower Hydrolysis of ATP by the Stress Protein GroEL Is a Major Factor Responsible for the Diminished Chaperonin Activity at Low Temperature. *Criobiology* 41:, 319-323.

Nebel, R. L. (1997). Thechniques for Artificial Insemination of cattle with frozen-thawed semen. In: R. S. Youngquist (ed.) *Current therapy in large animal theriogenology* No. 1., 251-256. Saunders, USA.

Nur, Z., Kamuran, I. I., & AK., K. (2006). Effects of different temperature treatments applied to deep stored bull semen on post-thaw cold shocked spermatozoa. *Bulletin of Veterinary* (50) , Institute Pulawy, 79-83.

Pace, M. M., Sullivan, J. J., Elliott, F. I., Graham, E. F., & Coulter., G. H. (1981). Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 5 ml french straws. *Journal Animal Science* 53 , 693-701.

Parks, J., Lee, D., Huang, S., & Kaproth, M. (2003). Prospects for spermatogenesis in vitro. *Theriogenology* , 59, 73-86.

Pérez-Llano, B., Lorenzo, J. L., Yenes, P., Trejo, A., & García-Casado, P. (2001). A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology* 56 , 387-398.

Pickett, B. W., Berndtson, W. E., & Sullivan, J. J. (1978). Influence of seminal additives and packaging systems on fertility of frozen bovine spermatozoa. *Journal of Animal Science* , 47 , 12-47.

Pickett, B. W., Berndtson, W. E., & Sullivan, J. J. (1978). Influence of seminal additives and packaging systems on fertility of frozen bovine spermatozoa. *Journal of Animal Science* , 47 , 12-47.

Prathalingam, N. S., Watson, P. F., & S. G. Revell, J. B. (2007). The response of bovine spermatozoa to bicarbonate an its use to asses the influence of added oviductal epithelial proteins on cryopreservation. *Journal of Andrology* , 28 , 407-415.

Prathalingam, N., Holt, W., Revell, S., Jones, S., & Watson, P. (2005). Dilution of spermatozoa results in improved viability following a 24h storage period but

decreased acrosome integrity following cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 91 (1-2) , 11-22.

Revell, S. G., & Mrode, R. A. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science* , 36 , 77-86.

Risopatron, J., Sánchez, R., Sepulveda, N., Villagran, E., & Peña, P. (1994). Selección de espermatozoides de bovino desde semen congelado-descongelado. Comparación de dos métodos. *Archivos de Medicina Veterinaria* , 26 , 25-40.

Rodríguez, O. L., Berdtson, W. E., Ennen, B. D., & Pickett, B. W. (1975). Effect of rates of freezing, thawing and level of glycerol on the survival of bovine spermatozoa in straws. *Journal Animal Science* , 41 , 129-136.

Roncoletta, M., Morani, E. S., & et ál. (2006). Fertility associated proteins in Nelore bull sperm membranes. *Animal Reproduction Science* , 91 (1-2) , 77-87.

Rubio, L., & González, A. A. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Revista Científica* , FCV-LUZ , 19, 382-389.

Rubio-Guillén, J., González, D., González, Y., Madrid, N., & Quintero, A. (2007). ¿Puede el ORT complementar las pruebas clásicas de valoración seminal y predecir la fertilidad en toros? *Arch. Latinoam. Prod. Anim* , 15 (1) , 329.

Saacke, R. (2003). Fertilidad del toro: una opinión sobre su estado actual y perspectivas. *Taurus, Bs.As* , 5 , 18-28.

Schroeder, H. (1999). Fisiopatología reproductiva de la vaca. Universidad Nacional de Colombia , Facultad de medicina veterinaria, Santa fe de Bogotá. Santa fe de Bogotá, Colombia.

Seidel, J. G.-2. (2006). Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology* , 65 , 228-235.

Spitzer, J. (2000). Evaluación de la salud reproductiva del toro: estado actual. Recuperado el 2015, de International Veterinary Information Service: www.ivis.org

Tortolero, I., Arata, G., Osuna, J. A., Gomez, R., & Regadera, J. (2005). Estrés oxidativo y función espermática. *Venez Endocrinol Metab* , 3, 12-19.

Villa, N. (2010). Evaluación del Efecto de la Técnica Instrumental Sobre la Calidad del Semen Bovino, Congelado-Descongelado, en el Centro de Colombia. Trabajo de Maestría, Universidad de Caldas. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Manizales, Caldas, Colombia.

Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* , 60 , 481-492.

Woods, E., Benson, J., Aagca, Y., & Crister., J. (2004). Fundamental criobiology of reproductive cells and tissues. *criobiology* , 48, 146-156.

Zekariya, N. K. (2006). Effects of different temperature treatments applied to deep stored bull semen on post-thaw cold shocked spermatozoa. *Bull Vet Inst Pulawy* , 50 , 79-83.