



RECIENA

Revista Científica Agropecuaria

VALORACIÓN ESPERMÁTICA DE SEMEN BOVINO CRIOPRESERVADO CON TRES CURVAS DE TEMPERATURA

SPERMATIC ASSESSMENT OF CRYOPRESERVED BOVINE SEMEN WITH THREE TEMPERATURE CURVES

Artículo Original

Castro-Carrasco, Walter Cristhian ^{*1}; Hernández-Cevallos, Edgar Washington ²

Recibido: 06/09/2022 · Aceptado: 21/10/2022

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo, valorar la calidad espermática de semen bovino crio preservado con tres curvas de temperatura en la Hacienda La Victoria del cantón Bucay, se aplicó un diseño completamente al azar con tres tratamientos correspondientes a las curvas de congelación y 5 repeticiones por cada tratamiento, se obtuvo un total de 15 pajuelas evaluadas, para el trabajo de campo se realizó la colecta de semen con ayuda de un electroeyaculador, para medir variables precongelación espermática como son: edad y peso del toro, volumen, color, olor y pH del eyaculado y las morfoanomalías y medir las variables postcongelación que son: motilidad masal, motilidad individual progresiva, concentración espermática, viabilidad espermática y la integridad de la cromatina del espermatozoides. Para las variables como volumen de eyaculado y pH del eyaculado se utilizó la estadística descriptiva (media y desviación estándar). Para el resto de las variables se realizó un análisis de la varianza de ADEVA separación de medias a través de la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0.01$. Los resultados obtenidos determinaron que la viabilidad espermática, como la motilidad individual progresiva se obtienen al utilizar una curva de temperatura en el agua de criopreservación de 3,8°C, mientras que la mayor motilidad masal y a menor cantidad de espermatozoides con morfoanomalías se obtuvo al aplicar una temperatura más elevada de 4.2°C. En cuanto al costo de la tecnología aplicada se observó que la inversión total del experimento fue de 147,63 USD. Se concluye que la evaluación de la calidad del semen bovino permite identificar y eliminar aquellos animales que puedan presentar problemas de infertilidad y seleccionar los mejores bovinos para los programas reproductivos. Se recomienda realizar futuras investigaciones, sobre criopreservación.

Palabras clave: Calidad espermática, Criopreservación, Pajillas, Electroeyaculador, Precongelación espermática, Morfoanomalías, Semen bovino, Postcongelación.

ABSTRACT

The objective of this research was to assess the sperm quality of preserved cryo bovine semen with three temperature curves in the Hacienda La Victoria of the Bucay canton, a completely random design was applied with three treatments corresponding to the freezing curves and 5 repetitions for each treatment, a total of 15 straws evaluated was obtained, for the field work the collection of semen was carried out with the help of an electroejaculator, to measure pre-sperm pre-freezing variables such as: age and weight of the bull, volume, color, odor and pH of the ejaculate and morphoanomalities and measure the postfreezing variables that are: masal motility, progressive individual motility, sperm concentration, sperm viability and the integrity of sperm chromatin. For variables such as ejaculate volume and ejaculate pH, descriptive statistics (mean and standard deviation) were used. For the rest of the variables, an analysis of the variance of ADEVA separation of means was carried out through the Tukey test with a significance level of $p < 0.01$. The results obtained determined that sperm viability, such as progressive individual motility are obtained by using a temperature curve in cryopreservation water of 3.8°C, while the greater mass motility and the lower number of spermatozoa with morphoanomalities was obtained by applying a higher temperature of 4.2°C. Regarding the cost of the applied technology, it was observed that the total investment of the experiment was 147.63 USD. It is concluded that the evaluation of the quality of bovine semen allows to identify and eliminate those animals that may present infertility problems and to select the best cattle for reproductive programs. It is recommended to carry out future research on cryopreservation.

Keywords: Spermatic quality, Cryopreservation, Pajillas, Electroeyaculador, Spermatic freeze, morphoanomalities, Bovine semen, post-freezing.

¹ Investigador independiente, Palora, Ecuador.

² Carrera de Zootecnia, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador

* Correspondencia cristhiancastro@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-7618-8148

1. INTRODUCCIÓN

Comprender el estado reproductivo de los sementales de cada ganadería es el punto básico de la fertilidad para el hato (1). Consecuentemente, la evaluación objetiva de los reproductores y la posterior selección de los mismos es uno de los pilares básicos para lograr los objetivos de cualquier programa genético, (2).

La criopreservación se refiere al mantenimiento de la vida en función a conservar la calidad genética de semen en bajas temperatura, la criobiología describe a comprender los efectos de las bajas temperaturas en las líneas celulares, ya que el tiempo biológico es el resultado de ciertas reacciones bioquímicas y el frío prolonga el tiempo del conocimiento al retrasar estas reacciones.

Además, involucra suspensión del semen en diluyentes con crioprotectores, esta técnica permite su almacenamiento de manera indefinida en nitrógeno líquido permitiendo la creación de un banco de genes, para posterior tener una mejor facilidad en el manejo, (1).

Esta investigación tiene por objetivo evaluar la calidad espermática de semen bovino crio preservado con tres curvas de temperatura en la Hacienda La Victoria, la importancia de esta indagación es conservar la genética de un reproductor de alta aptitud genotípica para mejorar y almacenar sus espermatozoides por un largo tiempo, guardando así su descendencia por varios años, en la presente averiguación se tomara en cuenta las curvas de congelación a la que se conserve el semen, de acuerdo a las condiciones meteorológicas en donde se encuentra el hato ganadero, consiguiendo así tener una eficiencia del semen en el momento de realizar una inseminación artificial (3).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Para el análisis del laboratorio se utilizaron los siguientes equipos: brete, microscopio, tanque de nitrógeno, placa calefactora, computadora, electro eyaculador y contador digital de célula luna F1. Mientras que para el trabajo de campo se utilizaron los siguientes materiales: papel aluminio, guantes ginecológicos, guantes látex, botas, toallas desechables, cinta métrica, libreta, esferográfico.

2.2 Métodos

En la presente investigación se aplicó un diseño completamente al azar con tres tratamientos correspondientes a las curvas de congelación (3.8°C, 4.0°C y 4.2°C) y 5 repeticiones por cada tratamiento, obteniendo un total de 15 pajillas evaluadas. Las variables evaluadas en la pre congelación fueron las siguientes: volumen, color, olor y pH; las variables analizadas en la etapa de postcongelación fueron: Concentración espermática, motilidad masal,

motilidad individual progresiva, viabilidades espermáticas, daño en el paquete de ADN del espermatozoide (cromatina), morfoanomalías.

Para las variables como volumen de eyaculado y pH del eyaculado se utilizó la estadística descriptiva para lo cual se realizó el cálculo de la media y desviación estándar. Para el resto de las variables se realizó un análisis de la varianza (ADEVA), para determinar la significancia ($p < 0.01$ y $p < 0.05$).

3. RESULTADOS

Valoración espermática de semen bovino pre congelación de los toros de la Hacienda La Victoria del cantón Bucay

Volumen (ml)

Con respecto al volumen del semen bovino antes de la congelación se observa que las medias fueron de 13 ml, estableciéndose un valor máximo de 14 ml, en tanto, que el valor mínimo determinado fue de 12 ml, con una desviación estándar de 1, como se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Valoración espermática de semen bovino pre congelación de los toros de la Hacienda La Victoria del cantón Bucay

Estadísticas Descriptivas	Volumen	pH	Morfoanomalías (%)	Olor	Color
Media	13	7	33,33	Neutro	Blanco Lechoso
Error típico	0,4	0,4			
Mediana	13	7			
Moda	14	6			
Desviación estándar	1	1			
Varianza de la muestra	1	1			
Rango	2	2			
Mínimo	12	6			
Máximo	14	8			

Los resultados anteriores muestran que el volumen seminal obtenido en la presente investigación presento un valor elevado, teniendo en cuenta que la medida del volumen del eyaculado se efectúa por lectura directa de la graduación que hay en el tubo de recolección del semen. El volumen medio por eyaculado está entre 2 y 12 ml, pero puede ser muy variable.

Al respecto (4), manifiesta que el volumen de los eyaculados de toros es un parámetro que presenta una baja repetitividad, ya que este depende de la edad y condición del animal, factores ambientales y destreza del operario. El volumen de cada eyaculado disminuye con las frecuencias de recogida a lo largo de cada extracción

Un comportamiento similar se aprecia en el estudio realizado por (5), quien observa diferencias en el volumen de semen colectado ($p < 0.05$), con medias de 6.00 ml en la raza Jersey, manifestando que esta cantidad puede variar debido a diversos factores al momento de la colecta del semen como piso resbaladizo, ruidos y distracciones, además, es recomendable que la colecta se haga en una monta falsa porque aumenta la calidad del semen con respecto al volumen, concentración espermática.

Color

Para la variable de color el semen bovino evaluado antes de la congelación presentó una tonalidad blanco-lechoso, que se encuentra dentro del rango adecuado, lo cual es un indicador de que estos animales son aptos para la colecta de muestras por encontrarse en excelentes condiciones de salud ya que se considera que un semen normal debe presentar un color blanco y amarillento, siendo los colores rosado, marrón y verdoso, indicativo de signos de patología.

Los resultados de color del semen de la presente investigación son similares a los reportes de (6), quien al evaluar la viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales, observó que las colecciones seminales fueron homogéneas, de color blanco cremoso, aspecto denso, resultados muy similares a los obtenidos en el presente estudio, señalando que a través del color se puede reflejar la viabilidad espermática por ser un parámetro asociado con la calidad del mismo.

Olor

Al determinar el olor del semen bovino se observa que las muestras presentaron un olor neutro, este es característico de cada especie animal y en general no es muy intenso.

De acuerdo con la investigación realizada por (7), las características macroscópicas de olor del semen fresco colectado por toro se identificó un olor a “leche fresca de vaca” para todas las repeticiones y para todos los animales en estudio. Por lo que se concluye que las muestras colectadas son de buena calidad por no presentar olores extraños, ya que esto depende también de las glándulas anexas en el aparato reproductor del macho.

pH

Al realizar la valoración de pH del semen bovino precongelado, se aprecia que las medias determinadas fueron de 7,00; ya que el valor máximo de pH fue de 8,00; mientras que valor mínimo fue de 6,00, siendo la desviación estándar de 1,00. El pH del semen tiene un valor normal entre 6,00 y 7,00; cualquier elevación es un indicio de contaminación con orina u otras afecciones inflamatorias del aparato genital. Asimismo, que el pH es un indicador de las secreciones de los testículos y las glándulas accesorias se encuentran en condiciones normales.

Morfoanomalías (%)

Al realizar la evaluación de las morfoanomalías del semen bovino precongelación, las medias establecidas fueron de 33,33%, esta valoración es muy importante en la valoración de la fertilidad de los animales, a los fines de establecer porcentajes de espermatozoides normales y poder clasificar las anomalías ya que según Ballina (2010), existe una alta correlación entre los defectos espermáticos e infertilidad (4). Los resultados de la presente investigación son inferiores a los establecidos por Jacinto Condori (2020) quien al observar los promedios de la variable porcentaje de espermatozoides

anormales del semen fresco por toro, donde se puede evidenciar que existe una diferencia altamente significativa entre las unidades experimentales siendo el toro Nerón el que alcanzó un mayor promedio de espermatozoides anormales con medias de 37.67% (7).

Valoración espermática de semen bovino crio preservado con tres curvas de temperatura en la hacienda la victoria del cantón Bucay

Motilidad individual progresiva (%)

Al realizar la valoración espermática de motilidad individual progresiva del semen bovino crio preservado en los toros de la hacienda la victoria del cantón Bucay se reportó diferencias altamente significativas ($P < 0.01$), por efecto de la temperatura del agua para crio preservar el semen (3,8; 4,0 y 4,2°C), estableciéndose el promedio más alto para las muestras que fueron sometidas a una temperatura de 4,0 °C (T2), con valores promedio de 50%, seguida de las muestras evaluadas a una temperatura de 4,2 °C (T3), que obtuvieron una motilidad individual progresiva del 35%, mientras que el valor más bajo se presentó en las muestras tratadas a una temperatura de 3,8°C (T1), con una motilidad de 30.

Los resultados del presente estudio indicaron claramente que, es más recomendable crio preservar el semen bovino a una temperatura de 4,0°C (T2), debido a que alcanzaron el porcentaje más alto de la investigación y que fue del 50%, como se ilustra en el Gráfico 1.

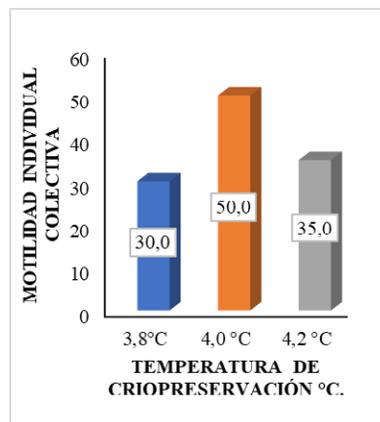


Gráfico 1. Comportamiento de la Motilidad individual progresiva del semen crio preservado

Las respuestas apreciadas en las muestras de la presente investigación son inferiores a las reportadas por Piloso Chávez (2019), quien al evaluar los promedios para motilidad (%) en el análisis y efectos de la suplementación mineral sobre la calidad seminal pre criopreservación, para la motilidad progresiva registro valores de 76,5% (8). Así como de Hernández Barriga (2019), quien al evaluar la motilidad del semen diluido de Bovinos Charolais evaluado con diferentes concentraciones de Trehalosa logró una media de $70,38 \pm 4,26$ puntos sobre 100, identificando que al incrementar las concentraciones de Trehalosa la motilidad progresiva decrece (9).

De la misma manera, Mancheno Herrera (2021), en su investigación determinó que la motilidad individual presentó diferencias estadísticas ($P \geq 0,01$), con valores de 53,50 % y 41,16 % para el semen congelado y recongelado respectivamente indicando que la reducción de la motilidad espermática puede estar asociada a la lesión mitocondrial, pues es necesaria energía tanto para la motilidad como para la fertilización (10).

Viabilidad espermática (%)

Los resultados de la viabilidad espermática del semen bovino crio preservado a diferentes temperaturas reportaron diferencias altamente significativas ($P < 0.01$), estableciéndose el porcentaje más alto y que fue del 60% en las muestras crio preservadas a 4,0°C (T2), descendiendo a 40% para el semen crio preservado a una temperatura de 4,2°C (T3), observándose los valores más bajos y que fueron del 25%, por efecto de la conservación las muestras a 3,8°C (T1), de temperatura, como se observa en el Gráfico 2.

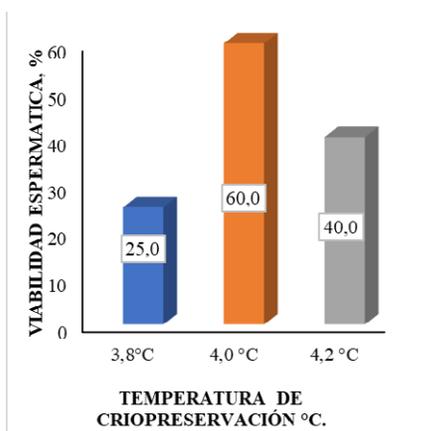


Gráfico 2. Comportamiento de la viabilidad espermática del semen bovino criopreservado

Los resultados de la presente investigación son inferiores a los publicados por Mancheno Herrera (2021), quien manifiesta que los resultados comparativos de las características microscópicas de semen bovino en los procesos pre congelación, post congelación con relación a la viabilidad espermática presentaron diferencias significativas determinando el mayor porcentaje de viabilidad en el semen congelado puesto que los valores fueron de 89,49 % y el menor valor se registró en el semen recongelado con 81,01 (10). Por su parte, Barragán (2017), quien reportó que los espermatozoides pre-congelados expusieron una supervivencia superior (88,8%), mientras que en los tejidos post-congelados existió un descenso del porcentaje de la viabilidad de células espermáticas (38,4%) .

Daño en el paquete de ADN del espermatozoide (cromatina) (%)

En cuanto al análisis estadístico de la variable daño en el paquete de ADN del espermatozoide que contempla la integridad de la cromatina, se reportaron diferencias altamente significativas ($P < 0.01$), entre las muestras de semen bovino del sector de Bucay, sometidas a tres curvas de temperatura de criopreservación, reportándose el mayor daño en el semen sometido a una temperatura de criopreservación de 3,8°C (T1),

los cuales alcanzaron un promedio de 40.74%. Seguido de las muestras de semen crio preservado a 4,0°C (T2), ya que se encontró un promedio de 24.28%, evidenciándose el menor daño en las muestras de semen crio preservado a 4,2°C (T3); a los se le determinó un valor de 12.42%. Es decir, que a medida que se aumenta los grados de temperatura se genera un menor daño en el paquete de ADN de los espermatozoides.

Los resultados de la presente investigación fueron superiores a los reportados en el estudio realizado por Mancheno Herrera (2021) quien al analizar el daño en el ADN mediante el proceso de fluorescencia con Naranja de Acridina los ensayos presentaron diferencias significativas de esta manera el mayor daño del ADN se observó en el semen congelado con un valor 8,74 %, y el menor daño lo reportó el semen recongelado con un valor de 1,07 %, al respecto, menciona que el acrosoma tiene varias regiones que son expuestas durante el proceso de refrigeración (10).

Morfoanomalías (%)

En cuanto a la variable morfoanomalías de los espermatozoides las medias no reportaron diferencias estadísticas ($P < 0.05$), siendo el menor porcentaje de espermatozoides anormales de 18,87%, para el semen crio preservado a una temperatura de 4,2°C y de 18,87% para el semen crio preservado a una temperatura de 4,0°C, observando que las mayores morfoanomalías se presentaron en las muestras crio preservado a 3,8°C con un promedio de 21,37%. Lo que confirma que mientras más elevada sea la temperatura criopreservación menor índice de espermatozoides anormales se encuentra.

Estos resultados de anomalías espermáticas son altos al ser comparados con los reportes de Hernández Barriga (2019) donde las anomalías del espermatozoide en semen alcanzaron un promedio de 14,31 %, por lo cual expresa que, esto se deba a la manipulación del semen antes del proceso de congelación (9).

De la misma manera, son superiores a los encontrados por Mallma Marca (2019), quien identificó un porcentaje de morfoanomalías de 9,14% post congelación de semen de toro, manifestando que el intervalo de colección de semen es de importancia debido a que una alta frecuencia puede afectar la madurez de los espermatozoides (11).

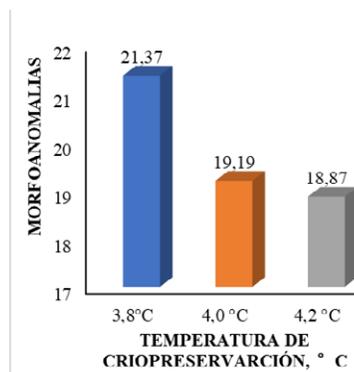


Gráfico 3. Comportamiento del porcentaje de morfoanomalías del espermatozoide

Motilidad masal (%)

Al determinar la motilidad masal del semen bovino por efecto de tres curvas de temperatura en el proceso de criopreservación no se presentaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$), sin embargo de carácter numérico se observa que las muestras de semen crio preservadas a una temperatura de 4,2°C (T3), obtuvieron la mayor motilidad que fue de 86%, valor que descendió a 83% en las muestras crio preservadas a 4,0°C (T2), alcanzando un valor similar las muestras de semen en las que se crio preservó a 3,8°C (T1), con una calificación de 82%.

Una respuesta inferior a la encontrada en la presente investigación se observa en la investigación de Pérez (1985), quien al realizar una comparación entre la media del semen crio preservado con la curva No. 1 vs. la media del semen crio preservado con la curva No. 2, determinó que el promedio de motilidad total post descongelación de la curva No. 1 fue del 80.8%, mientras que para la curva No. 2 fue de 54.6%, observándose que la motilidad total post descongelación fue superior con aplicación de la curva No. 1, demostrando que la temperatura final de congelación da mejores resultados y que las velocidades muy rápidas durante la preservación seminal disminuyen la motilidad, debido de que de la velocidad depende si las células permanecen en equilibrio con su entorno extracelular o si forman hielo intracelular (12).

Concentración espermática, (spz/ml)

En el análisis de concentración espermática del semen bovino criopreservado con tres curvas de temperatura, no se presentaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$), estimándose la concentración más alta en las muestras sometidas a 3.8°C de temperatura de criopreservación con medias de 594000000 spz/ml, seguida de las medias determinadas para las muestras tratadas a una temperatura de 4°C con un promedio de 590000000 spz/ml. En último lugar se ubican los valores más bajos que fueron establecidos para las muestras evaluadas a una temperatura de 4,2°C cuya concentración alcanzó un valor de 588000000 spz/ml.

Los resultados obtenidos en la presente investigación, guardan relación con la valoración realizada por Hernández Barriga (2029), debido a que la concentración espermática por ml, alcanzó una media de $650,00 \pm 380,00 \times 10^6$ espermatozoides/ml valores que se encuentran dentro de los rangos permitidos de espermatozoides, esto se puede deber a la calidad de semen que se utilizó antes de la congelación, tomando en cuenta que es suficiente cinco millones de espermatozoides por pajuela para que sea viable (9).

De igual manera, Benítez-González (2018), al determinar la calidad del semen post refrigeración a distintos tiempos de evaluación, reportó una concentración espermática de 56,2 a 69×10^9 espz/ml, los resultados evidenciaron que no hay diferencia estadística significativa entre métodos de recolección espermática sobre concentración espermática (13).

4. CONCLUSIÓN

- Los resultados obtenidos en la valoración espermática del semen antes de la congelación mostraron un color blanco lechoso, en el caso del olor del semen fresco se identificó en general un olor neutro, mientras que para el volumen los valores fueron de 13 ml. Y finalmente el semen presentó un pH de 7, por lo cual se considera que estos animales son aptos para la colecta de muestras.

- De acuerdo con el análisis realizado se obtuvo resultados óptimos de motilidad individual progresiva y viabilidad espermática en las muestras de semen enfriado a una temperatura de 4,0°C, presentando diferencias significativas entre las muestras evaluadas, Además permite identificar y eliminar aquellos animales que puedan presentar problemas de infertilidad y seleccionar los mejores bovinos para los programas reproductivos.

- En relación al daño en el paquete de ADN se obtuvo los mejores resultados numéricamente en el semen sometido a mayor temperatura del agua, es decir a 4,2°C, y en la concentración espermática se reportó que la temperatura optima es de 3,8°C, indicando que, esta curva de temperatura cumple con los parámetros esperados para crio preservar el semen bovino

- Por otra parte, tanto las morfoanomalías como la motilidad masal, los resultados no presentaron diferencias significativas, mostrando que al crio preservar el semen bovino a una temperatura de 4,2°C se alcanza un menor índice de morfoanomalías, así como a dicha temperatura los espermatozoides presentaron mayor movilidad.

- En el presente estudio se observó que los costos totales de la crio preservación de semen según los rubros utilizados constituyen un total de 147,63 USD, siendo esta información será de gran importancia para la toma de decisiones dentro de la unidad de producción pecuaria.

5. RECOMENDACIONES

- Tener en cuenta las curvas de temperaturas especificadas en los diferentes procedimientos para crio preservar el semen bovino debido a que si se producen buenos resultados finales.

- Emplear nuevas tecnologías buscando el mejoramiento de los sistemas de producción bovina, así como también la expansión de genética de buena calidad buscando mantener siempre unos pilares reproductivos óptimos.

- Realizar futuras investigaciones, sobre criopreservación, con el propósito de disminuir la muerte celular e infertilidad y de esta manera garantizar la supervivencia de los espermatozoides debido a que, los espermatozoides resisten de manera diferente los efectos detrimentales de la criopreservación.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Acevedo Centeno CA. Evaluación de la aptitud reproductiva en toros de la ganadería maracaibo de la raza brahman y sus cruces [Internet]. Beef Production Efficiency. Trenkle, Allen y Willham, RL. 4321, Iowa : Science, 1977, Vol. 198. [Bucaramanga]: Universidad Cooperativa de Colombia, Agronomía, veterinaria y afines, Medicina Veterinaria y Zootecnia, Bucaramanga; 2020 [citado el 11 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://repository.ucc.edu.co/handle/20.500.12494/20473>
- [2] Miglioriorisi L, Gómez MV. Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes [Internet]. 2019. Disponible en: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_toros/49-ProtocoloEvalSemen.pdf
- [3] Páez-Barón EM, Corredor-Camargo ES. Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. Cienc y Agric [Internet]. 2014;11(2):49–59. Disponible en: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.redalyc.org/pdf/5600/560058659007.pdf>
- [4] Ballina A. Manejo Sanitario Eficiente del Ganado bovino [Internet]. Nicaragua; 2010. Disponible en: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.fao.org/3/as497s/as497s.pdf>
- [5] Maraví Carmen CA. Efecto de dos dilutores de crio preservación en las características microscópicas del espermatozoide post descongelamiento, de reproductores bovinos de las razas Simmental, Aberdeen Angus, Jersey y Brangus. [Internet]. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza - UNTRM. [Chachapoyas]: Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; 2019 [citado el 11 de octubre de 2022]. Disponible en: <http://repositorio.untrm.edu.pe/handle/20.500.14077/2415>
- [6] Cabrera P, Pantoja C. Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. Rev Investig Vet del Perú [Internet]. 2012 [citado el 11 de octubre de 2022];23(2):192–200. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172012000200009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- [7] Jacinto Condori ER. Efecto de la remoción parcial del plasma seminal antes y postcongelación sobre la viabilidad del semen bovino (*Bos taurus*) en la Estación Experimental de Choquenaira [Internet]. [Ciudad de la Paz]: Universidad Mayor de San Andrés; 2020 [citado el 11 de octubre de 2022]. Disponible en: <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/25320>
- [8] Piloso Chavez KJ, Taípe Taípe MV, Caíza de la Cueva FI, Oñate Rivera DE, Quintero Moreno, Armando Montesdeoca Párraga RR. Los minerales y su efecto en la calidad seminal bovina pre y pos criopreservado. Rev Ecuatoriana Cienc Anim [Internet]. el 25 de enero de 2019 [citado el 11 de octubre de 2022];3(1):60–70. Disponible en: <http://www.revistaecuatorianadecienciaanimal.com/index.php/RECA/article/view/111>
- [9] Hernández Barriga YC. Crio- preservación y viabilidad espermática de semen de bovinos charolais post-descongelación con diferentes concentraciones de trehalosa [Internet]. [Riobamba]: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2019 [citado el 11 de octubre de 2022]. Disponible en: <http://dSPACE.espace.edu.ec/handle/123456789/13316>
- [10] Mancheno Herrera CA. Recongelación de espermatozoides bovinos como alternativa para mejorar la calidad espermática de semen descongelado. [Internet]. [Riobamba]: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2021 [citado el 11 de octubre de 2022]. Disponible en: <http://dSPACE.espace.edu.ec/handle/123456789/14669>
- [11] Mallma Marca P. Colorantes Diff-Quik y Eosina-Nigrosina en la evaluación morfológica de espermatozoides antes y después de la criopreservación del semen del toro Holstein [Internet]. Repositorio Institucional-UNAMBA. Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac; 2019 [citado el 11 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/3059968>
- [12] Pérez y Pérez F, Pérez Gutiérrez JF, Pérez y Pérez F. Inseminación artificial y trasplante de embriones. Reprod Anim [Internet]. 1985 [citado el 11 de octubre de 2022];900. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=780136>
- [13] Benítez-González E, Chamba-Ochoa H, Sánchez-Sánchez E, Luzón-Cevallos F, Sánchez-Carrillo J, Benítez-González E, et al. Evaluación comparativa de dos métodos de recuperación espermática de epidídimos bovinos post-mortem. Abanico Vet [Internet]. 2018 [citado el 11 de octubre de 2022];8(1):59–74. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-61322018000100059&lng=es&nrm=iso&tlng=es