

**TEMA: “EVALUACIÓN DE LA CRIOCONSERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES COLECTADOS IN VIVO Y POST MORTEM EN BOVINOS (*Bos Taurus*) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”.**

María Elena Carua Aguilar Jacqueline Rocio Guerrero Tipantuña<sup>1</sup>,  
Mvz. Cristian Neptalí Arcos Alvarez<sup>2</sup>

1. Egresadas de la carrera de Medicina Veterinaria .Universidad Técnica de Cotopaxi
2. Docente Universidad Técnica de Cotopaxi

## **RESUMEN**

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria en la Universidad Técnica de Cotopaxi.

El objetivo principal del presente estudio fue evaluar la crioconservación de espermatozoides de dos reproductores bovinos, utilizando dos técnicas de extracción: vagina artificial (**in vivo**) y extracción directa del epidídimo (**post mortem**), para determinar las características macroscópicas y microscópicas viables de los espermatozoides antes de la congelación y post descongelación.

El protocolo para la crioconservación fue a base del diluyente **Andromed**: consistió en preparar la solución 1 en 4; donde 1 ml de diluyente Andromed fue mezclado con 4 ml de agua bidestilada a una

temperatura de 37°C y se mezcló con la mitad de la muestras colectadas, para la valoración de la características espermáticas se utilizando un Microscopio biológico estándar MBL2000 y luego se procedió a la crioconservación en nitrógeno líquido y posteriormente a la evaluación de las características espermáticas post descongelación.

Se utilizó dos Tratamientos: Espermatozoides in vivo con diluyente Andromed (**T1**) y Espermatozoides post mortem con diluyente Andromed (**T2**). En la evaluación de las características macroscópicas y microscópicas antes de la congelación, se determinó que **T1** brinda un 80% y **T2** un 60% de estabilidad de las muestras. Y en la evaluación post descongelación **T1** con un 80% y **T2** con un 50 % de las características microscópicas del material seminal, considerando que T1 mostro

mejores características en los resultados post descongelación.

### **ABSTRACT**

The present research was done at the Biotechnology Reproduction Laboratory of Veterinary Career at the Technical University of Cotopaxi.

The main objective of this research study was to evaluate the bovine's sperm cryopreservation using two extraction techniques: artificial vagina (live) and direct extraction of the epididymis (post mortem), to find the doable macroscopic and microscopic characteristics before freezing and after unfreezing.

The cryopreservation protocol was done using the Andromed diluent: This was to prepare a one-in four solution, where 1ml. of Andromed diluent was mixed into 4 ml. of twice-distilled water at 37 ° C, then it was mixed into the half of the samples. It was used a standard biological microscope MBL2000 for the sperm valuation characteristics. Then the cryopreservation into liquid nitrogen was done, and finally the sperm characteristics evaluation after freezing was done using the same biological microscope.

Two treatments was used: Sperm in live with the Andromed diluent (**T1**) and post- mortem sperm with the same diluent (**T2**).It was determined in the macroscopic and microscopic before freezing evaluation characteristics that **T1** provides 80% and **T2** 60% sample stability. Moreover, T1 provides 80% and **T2** 50% in the after unfreezing evaluation taking into account that T1 showed better results characteristics after unfreezing.

### **INTRODUCCIÓN**

En la especie bovina, como en otras especies, la baja fertilidad del semen congelado es atribuida a cambios ultraestructurales, bioquímicos y funcionales que sufre una proporción significativa de las células espermáticas y que conducen a un transporte insuficiente y pérdida de viabilidad de los espermatozoides en el tracto reproductor de la hembra, por consiguiente es crucial mantener la integridad de la membrana para obtener espermatozoides que permanezcan potencialmente funcionales después de ser crioconservados (25).

La crioconservación es un proceso reversible que puede ser frenado o incluso anulado si los espermatozoides

entran en contacto con sustancias estabilizadoras. Esta técnica es particularmente útil en casos donde la colecta de semen es difícil, como sucede en los animales salvajes, campo en el cual tiene mayor aplicación.

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 los toros jóvenes pueden suministrar de 1 a 3 centímetros cúbicos de semen, mientras que los adultos pueden eyacular de 10 a 15 cm<sup>3</sup>.(9)

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 contrario en cuanto a los fallos en la selección de estos toros 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. Un requisito indispensable para el

## **2.6 Manejo del ensayo**

### **Selección del toro semental**

La raza empleada en este estudio fue la Holstein, que se caracteriza por tener un pelaje de color blanco y negro así también rojo alazán con blanco, con poco desarrollo muscular y una alta producción de semen.

**Técnica** Se realizó usando un protocolo; a base de Andromed.

### **Protocolo a base de Andromed**

- Para preparar el diluyente se necesitó de 1 ml de diluyente y 4 ml de agua destilada, para que no exista ninguna alteración por el cambio de temperatura todo el proceso se lo realiza a 37°C.
- Las muestras obtenidas indistintamente tanto in vivo como post mortem fueron mezcladas con la dilución para ser transportadas hasta el laboratorio y ser evaluadas.
- En el laboratorio se evaluaron las características macroscópicas y microscópicas.

### **Recolección de semen usando vagina artificial**

La vagina artificial consta de las siguientes partes:

- Un tubo cilíndrico de caucho.
- Un revestimiento de caucho delgado.
- Un cono de caucho de pared delgada.
- Un tubo de ensayo graduado.
- Una cubierta aislante.

#### **Armado de la vagina artificial para su uso**

- Se debe colocar el revestimiento de caucho delgado dentro del tubo cilíndrico de caucho para luego sujetar los extremos por encima del cilindro.
- Llenar el espacio entre el tubo de caucho y el revestimiento de caucho con agua entre 42 y 45°C.
- Agregar aire a través de la válvula de agua para proporcionar la presión adecuada.
- Sujetar el cono junto con el tubo de ensayo graduado a un extremo del tubo de caucho.
- Colocar la camisa aislante que cubre el tubo o cono donde se recibirá el eyaculado para evitar el shock térmico.

- Lubricar de 10 a 15 cm de la entrada de la vagina artificial con gel estéril.

#### **Procedimiento para obtener la muestra de semen.**

- Se estimuló a los toros manteniéndolos cerca de una hembra y provocando que realice montas falsas.
- Cuando el macho monta, se introduce la vagina artificial en el pene desviado, lo cual se logra sujetando el pene del prepucio con la mano libre de la persona que va colectar el semen.
- Se debe observar los movimientos del macho y cuando éste lleve a cabo el empuje de la cadera hacia delante el macho ha eyaculado.
- Para que los espermatozoides tengan mayor vitalidad hasta llegar al laboratorio la muestra obtenida se mezcla con la dilución.

#### **Extracción de espermatozoides del conducto epididimario**

- Para la obtención de los espermatozoides se disecciona el

epidídimo y se coloca una cánula en el conducto deferente.

- Posteriormente se secciona el epidídimo en la zona de unión entre el cuerpo y la cola del epidídimo y se realiza un lavado retrógrado de la cola del epidídimo con la dilución a una temperatura de 37°C.
- Las muestras se agruparán homogéneamente; la única variabilidad será la fase de la criopreservación seminal con la cual se agrupara en las 4 muestras.

### **Motilidad en masa**

La evaluación de la motilidad expresada en porcentajes se determinó por observación en el microscopio óptico a un aumento de 40X, colocándose una gota gruesa semen diluido con Andromed sobre la lámina de porta objeto previamente calentado a 37°C y realizamos un leve frotis de la gota con un cubreobjetos y observamos.

### **Morfología**

Para observar su morfología colocamos una gota de cada muestra en un extremo del portaobjetos y en cada muestra colocamos una gota de tinta china y en un ángulo de 45° se deslizó suavemente a

lo largo del porta objetos para extender la gota de semen teñida. Se esperó un minuto a que se seque la muestra a temperatura ambiente para posteriormente observar la morfología espermática normal y anormal (colas enrolladas, gotas citoplasmáticas y sin colas).

### **Vivos – muertos**

Para la realización de esta prueba se colocó una gota de semen sobre un portaobjetos en cada extremo calentado a la misma temperatura del semen, y se aplicó una gota de tinción vital eosina/nigrosina, con el objeto de colorear y fijar los espermatozoides y observamos en que porcentaje encontramos espermatozoides que al morir se tinturan.

### **Concentración**

Se determinó mediante la cámara de Neubauer. Se realizó una dilución de 1:4 (Semen – agua bidestilada- Andromed), se absorbió semen con la micropipeta hasta la marca de 0,5 y luego fue colocado en cada extremo de la cámara de Neubauer (dentro del cubre objeto de la cámara), para luego proceder con el conteo de los cinco cuadrantes pequeños escogidos al azar. Se sacó un promedio de espermatozoides entre los dos cuadrantes

de la cámara. A la cantidad sumada de los cinco cuadrantes promedio de espermatozoides contados se les multiplicó por el factor 1000 para obtener una concentración por cm<sup>3</sup>.

Luego de haber realizado la evaluación de las diferentes muestras con el disolución se procedió al llenado y sellado de las pajillas.

### **Llenado y sellado de pajillas**

Este proceso se realizó de cada muestra obtenida, se llenó pajillas de 0.25 ml y se selló con los respectivos tapones.

### **Congelación**

#### **Método manual**

También este método es conocido como método rápido o a vapor de nitrógeno Este es de los métodos más utilizados debido a las ventajas que tiene.

- Puede utilizar cualquier tipo de pajillas.
- Se logra congelar un mayor número de pajillas al mismo tiempo (50pajillas).
- El tiempo de congelamiento es reducido (20 minutos).

A la nevera de unicel se le agregó 5cm de nitrógeno líquido, esperamos hasta que se estabilice el vapor a -8 °C guiadas por la Termocupla, se introdujo una parrilla de metal donde se colocaron las pajillas de

0.25 con las pinzas arriba del nivel de nitrógeno líquido durante 20 minutos. Cada descenso de 2cm se lo realizo una vez estabilizada la temperatura, al finalizar la congelación las pajilla fueron introducidas al nitrógeno liquido restante durante 10 minutos, poco después estas pajillas se colocaron en el termo a una temperatura -196° C para la crioconservación.

### **Post descongelación**

Este proceso se realiza después de ser almacenadas las pajillas para evaluar post descongelación la viabilidad y motilidad de los espermatozoides en cada tratamiento y así determinar la influencia de cada técnica para extracción de espermatozoides in vivo y post mortem de los mismos toros.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Descripción de los resultados con los dos tratamientos de la investigación

### **Cuadro 1. Características macroscópicas del Tratamiento 1 (in vivo)**

Categorías	Tratamiento 1			
	Toro 1	Criterio	Toro 2	Criterio
Volumen/ml	5	I	3	II
Apariencia	Cremosa	I	Cremosa	I
pH	6.8	I	6.8	I

Fuente: Directa  
Elaborado por. CARUA, María;  
GUERRERO, Jacqueline

En cuanto a las características macroscópicas del Tratamiento 1, la categoría de **volumen espermático** que se obtuvo del toro 1 fue de 5ml dando un calificativo de muy bueno a diferencia del toro 2 en un calificativo de bueno con 3ml de espermatozoides. La **apariciencia** y **pH** en el tratamiento no se encontró diferencia en su evaluación. Según Cuadro 1.

**Cuadro 2. Características macroscópicas del Tratamiento 2 (post-mortem)**

Categorías	Tratamiento 2			
	Toro 1	Criterio	Toro 2	Criterio
Volumen/ml	3	II	2	II
Apariencia	Lechosa	II	Lechosa	II
pH	6.8	I	6.8	I

Fuente: Directa  
Elaborado por. CARUA, María;  
GUERRERO, Jacqueline

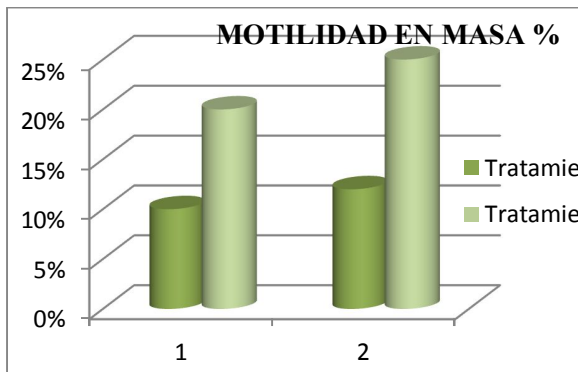
Las características macroscópicas de la investigación del Tratamiento 2 (**T2**), el se puede identificar que el **Volumen espermático** tiene una diferencia numérica **toro1** 3ml y **toro2** 2 ml de espermatozoides, considerando que los espermatozoides extraídos directamente del epidídimo por su naturaleza podemos decir que el volumen es bajo, dando un calificativo de bueno en las dos extracciones.

En cuanto a la característica **apariciencia** en **T2** se marca como lechoso, habiendo una variación con el **T1** que fue de

aparición cremosa, esto es debido a las técnicas utilizadas para la extracción de los espermatozoides.

El pH 6.8 de los tratamientos no varía mostrando así un cierto grado del semen de los dos toros. Según Cuadro 1 y Cuadro 2.

**Grafico 1. MOTILIDAD EN MASA DENTRO DE LAS PRUEBAS MICROSCOPICAS DEL T1 Y T2**

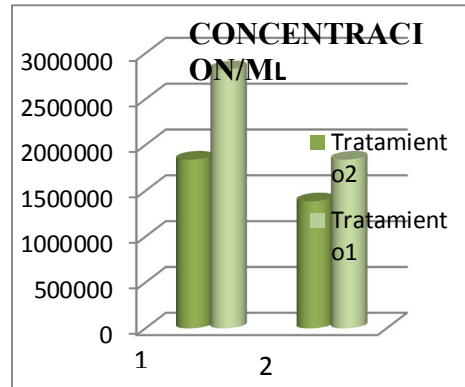


**Fuente:** Directa  
**Elaborado por.** CARUA, María;  
GUERRERO, Jacqueline

La motilidad masal obtenida es de 85% como promedio del T2 y el 86 %, determinando así que las muestras se mantienen en un criterio regular. Según Grafico 2.

constante de montas de los toros en el camal. Según Tabla 8

**Grafico 2. CONCENTRACION/ML DENTRO DE LAS PRUEBAS MICROSCOPICAS DEL T1 Y T2**

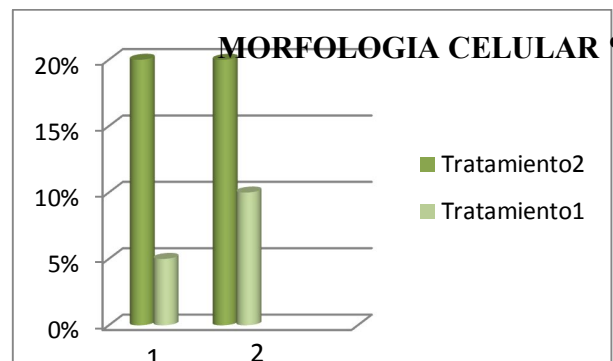


**Fuente:** Directa

**Elaborado por.** CARUA, María;  
GUERRERO, Jacqueline

En el grafico podemos identificar que el T1 en la concentración de los espermatozoides por ml es superior en número en comparación al T2. Según Grafico 3.

**Grafico 3. MORFOLOGIA CELULAR DENTRO DE LAS PRUEBAS MICROSCOPICAS DEL T1 Y T2**

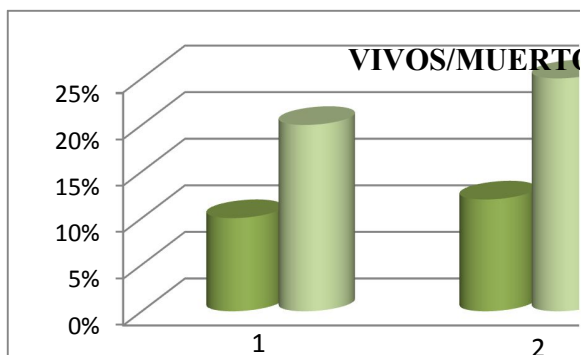


**Fuente:** Directa



**Elaborado por.** CARUA, María;  
GUERRERO, Jacqueline  
En el Grafico 4 se puede observar los porcentajes de morfología siendo evidente que el T2 lidera con un 20% de las anomalías que percute a un semen de mala calidad de semen.

**Grafico 4. VIVOS/MUERTOS DENTRO DE LAS PRUEBAS MICROSCOPICAS DEL T1 Y T2**



**Fuente:** Directa  
**Elaborado por.** CARUA, María;  
GUERRERO, Jacqueline

Para obtener los resultados de los espermatozoides vivos/ muertos, fueron evaluados con Eosina/Nigrosina, ya al utilizar la técnica de extracción con vagina artificial para el T1 marca menores porcentajes de vivos/muertos, mientras que en el T2 estos valores incrementan por las condiciones ambientales y el tiempo de transporte de llegada al laboratorio. Según Grafico 5

**Cuadro 3. Características microscópicas post descongelamiento del T1**

CATEGORIA	TRATAMIENTO 1 ( <i>in vivo</i> )			
	Toro 1	Criterio	Toro 2	Criterio
Morfología celular	10%	II	12%	II
Vivos /muertos	10%	I	12%	II

**Fuente:** Directa  
**Elaborado por.** CARUA, María;  
GUERRERO, Jacqueline

La evaluación de las características microscópicas post descongelación del T1 in vivo se obtuvo resultados regulares en la **morfología celular** con porcentajes del 10% en el toro1 y el 12% del toro 2 resultados significativos en el tratamiento 1 post descongelación.

En cuanto a la **vitalidad espermática**, los espermatozoides vivos y muertos del toro1 con un 10% y el toro2 con 12%, mostrándonos así los resultados obtenidos

mediante la técnica de vagina artificial, mostrándonos así la calidad de las pajillas crioconservadas en el termo de nitrógeno líquido que se encuentra en el Laboratorio de la Universidad. Según Cuadro 5

**Cuadro 4. Características microscópicas post descongelamiento del T2**

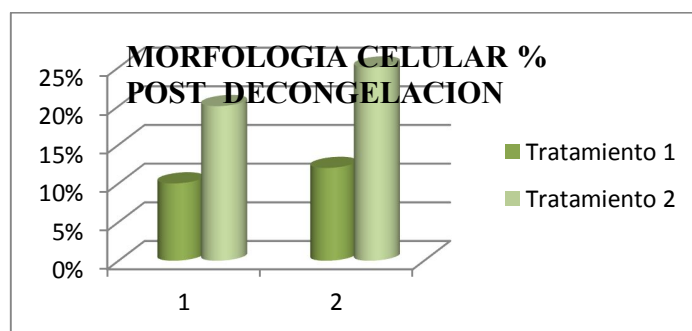
CATEGORIA	TRATAMIENTO 2 (post mortem)			
	Toro 1	Criterio	Toro 2	Criterio
Morfología celular	20 %	III	25 %	III
Vivos muertos	15 %	II	25 %	III

Fuente: Directa  
Elaborado por. CARUA, María;  
GUERRERO, Jacqueline

La evaluación de las características microscópicas post descongelación del T2 post mortem se obtuvo resultados malos a regulares en la **morfología y vitalidad espermática** evidenciando así

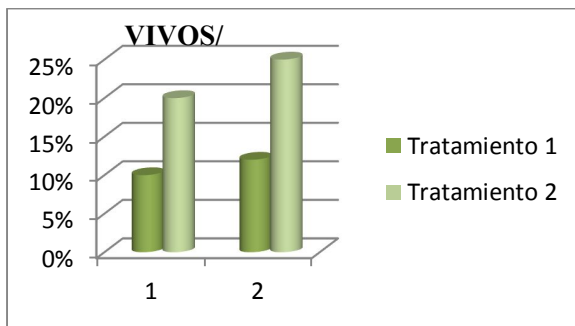
la mala calidad de las pajillas para una Inseminación Artificial. Según Cuadro 6

**Grafico 5. MORFOLOGIA CELULAR DENTRO DE LAS PRUEBAS MICROSCOPICAS POST CONGELACION DEL T1 Y T2**



Fuente: Directa  
Elaborado por. CARUA, María;  
GUERRERO, Jacqueline  
Según el Grafico 6 de la **morfología celular** en las pruebas microscópicas post descongelación nos muestra que el tratamiento T2, presenta mayor anomalía con el 20 y 25 % tomando un calificativo de espermatozoides de mala calidad que fueron extraídos del conducto epididimario del Toro 1 y Toro 2 post mortem, dando como resultado negativo en cuanto a la evaluación post descongelamiento de las muestras.

**Grafico 6. MUERTOS/VIVOS DENTRO DE LAS PRUEBAS MICROSCOPICAS POST DESCOGELACION DEL T1 Y T2**



**Fuente:** Directa  
**Elaborado por.** CARUA, María;  
 GUERRERO, Jacqueline

El porcentaje de espermatozoides vivos de los dos tratamientos tienen diferencia, pero no se encuentran dentro de los parámetros aceptables de fertilidad según Hafez (2000), donde señala que valores sobre el 75% de espermatozoides vivos permiten estimar un eyaculado de buena calidad. Por lo tanto se determina que los dos tratamientos 1 (T1) y el tratamiento 2 (T2) post descongelación brindan malas características de fertilidad al ser descongeladas las pajillas. Según Grafico 7.

## CONCLUSIONES

Con la presente investigación y en base a los resultados obtenidos de la misma se puede concluir que la crioconservación de espermatozoides colectados *in vivo* no tiene diferencia significativa en cuanto a las características macroscópicas y microscópicas en comparación

espermatozoides colectados post mortem, debido a que los animales antes del sacrificio se encuentran en condiciones de manejo e infraestructura no adecuada en el camal de Saquisilí.

Cada animal presenta características individuales por tal razón evaluar al reproductor antes de la extracción del semen, es fundamental para no desperdiciar tiempo y dinero.

Dentro de las características macroscópicas el Tratamiento 2 presenta un aumento de las características morfológicas de gota citoplasmática, por tanto el porcentaje de morfología celular aumenta, esta es uno de los mayores inconvenientes en el momento de la crioconservación y post descongelación ya que estas también incrementaron en las evaluaciones de las pajillas.

En los dos tratamientos la crioconservación de espermatozoides *in vivo* y post mortem no se pudo mantener la viabilidad espermática requerida para obtener descendencia y conservar su genética.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda la extracción de espermatozoides en animales que cumplan los requerimientos de selección,

a los cuales se le de otro tipo manejo en los camales por que su reposo junto con otros animales es perjudicial ya que estos pasan montando y la calidad espermática disminuye.

La extracción post mortem es una técnica muy reconocida en animales de alto valor genético que por circunstancias fuera de lo normal mueren y se la emplea con muy buenos resultados.

Tener presente la temperatura de la vagina artificial al momento de la colección seminal ya que esto puede afectar el eyaculado del semental.

## Referencias bibliográficas

1. FERNÁNDEZ Alberto Martín, Miguel Ángel Freire Rubio, Javier Malo Gómez. Instrumentos de laboratorio. E.U.I.T. de Telecomunicación, 1991. ISBN: 8486892341, 9788486892340
2. GALINA. C y VALENCIA. J. 2006. Colección del semen bovino. Pág. 217-219. Reproducción de Animales Domésticos, 2 ed Limusa, Noeriga editores. México D.F. ISBN: 9789681871321
3. GALINA, CARLOS. Reproducción de animales domésticos, tercera edición, editorial Limusa , 2008. Pág 70,73,75,120,122,123. ISBN: 13: 978-968-18-7132
4. GONZÁLES CARLOS. Reproducción Bovina. Venezuela primera edición, Editorial Astro Data, 2001, pág., 205-2011. ISBN 980-296-826-0
5. HAFEZ E.S.E. y Hafez B. 2002. Reproducción e Inseminación en Animales; Funciones Epidídimo. Pág.519; séptima edición. Mc Graw-Hill, Editorial Interamericana, México D.F. ISBN: 9789701037195
6. HILL W. Richard, Wyse A. Gordon. 2006. Fisiología Animal. Editorial Médica Panamericana. España. ISBN: 84-7903-990-6
7. HOLY L., 1986 Bases biológicas de la reproducción bovina. Pág. (287- 305,395-397) Diana; Editorial México; ISBN: 9681314565, 9789681314569

8. KNOBIL.E. NEIL J.D.2003. Male Reproductive Sistem, Nonhuman Mammals. pag. 49-59. Encyclopedia of reproduction vol.3. M – Pri. San Diego California. ISBN: 0-12515401-1
9. PALMA A Gustavo y BREM Gottfried 2001 Biotecnología de la reproducción. Evaluación morfológica pág. 125-129 Primera edición, traducido por Germán Kaiser. Argentina. ISBN: 987-43-3779-6
10. RUTTER BRUNO, Bases para la Evaluación de la aptitud Reproductiva del Toro. Segunda edición. Buenos Aires, Editorial Agro-Vet, 2006, págs. 113-135. ISBN 950-9763-42-X
11. SANCHEZ CARVAJAL. Crioconservación de semen bovino usando un crioconservador programable y determinación de su calidad post descongelación. 2007. Pg. 75 -86 ISSN 0121-3739.
12. WORLD Health Organización, 2005. Manual de bioseguridad en el laboratorio. Tercera edición. ISBN 92-4-354650-3
13. YEN Samuel S. C., Robert B. Jaffe, Robert L. Barbieri. Endocrinología de la reproducción: fisiología, fisiopatología y manejo clínico, Evaluación en número de espermatozoides y morfología. pág. 640-652, cuarta edición, editorial médica panamericana, Argentina. ISBN: 950-06-2538-5, 84-7903-547-1

### **Citas virtuales**

14. BARACALDO M.I.1, BARTH A.D. 2 AND. BERTRAND W.3. 2007. Pasos para el congelamiento de semen bovino: desde la colección del semen hasta el almacenamiento en el tanque de nitrógeno líquido.(En línea) IVIS Reviews in Veterinary Medicine, I.V.I.S. Consultado 10.Sep.2013 Disponible en: [www.ivis.org](http://www.ivis.org).
15. COLMENARES M., 2001. Guía del aparato reproductor del macho. (En línea). Consultado 12.Jun.2013. Disponible en:URL:<http://es.scribd.com/doc/4>

- 1080611/Guia-del-Aparato-Reproductor-del-Macho Disponible en [http://www.minitube.de/DE\\_esl/Productos-y-Servicios/Bovino/Diluyentes-de-Semen/AndroMed-R-200-ml](http://www.minitube.de/DE_esl/Productos-y-Servicios/Bovino/Diluyentes-de-Semen/AndroMed-R-200-ml)
16. KRUSS A. Kruss optronic. Germany. Instrumentos de precisión (En línea) consulta 10. Agos. 2013. Disponible en: <http://www.kruess.com/laboratorio/productos/microscopios-para-laboratorios/microscopios-para-biología/>
17. LATINPEDIA.2008.Anatomía del sistema reproductor del toro (En línea) Consulta 9.Nov.2013. Disponible en <http://www.latinpedia.net/Ciencia/animal/Anatomia-del-sistema-reproductor-del-toro-ad200.htm>>Anatomía del sistema reproductor del toro</a>
18. MINITUBE .2003. Andromed Diluyente sin yema de huevo para semen Bovino. (En línea )Consultado 11.Nov.2013; Disponible en [http://www.minitube.de/var/StorageMinitube/Datenblaetter/135030200\\_AndroMed\\_es\\_121025.pdf](http://www.minitube.de/var/StorageMinitube/Datenblaetter/135030200_AndroMed_es_121025.pdf)
19. MINITUBE Internacional. Consulta 12. Sep. 2013.
20. ORDÓÑEZ.H.2005. Análisis seminal (En línea) Consulta 10.Nov.2013. Disponible en <http://www.serida.org/publicacion/esdetalle.php?id=1495>.
21. OLIVARES, R.; Urdaneta, R. 1985. Colección, Evolución y procesamiento del semen. Revista de difusión de tecnología agrícola y pesquera del FONAIAP No. 17(En línea) Consultado 11.Nov.2013. Disponible en [www.ceniap.gov.ve/bdigital/fdivul/fd17/texto/coleccion.htm](http://www.ceniap.gov.ve/bdigital/fdivul/fd17/texto/coleccion.htm)
22. PALMA A. Gustavo. Biotecnología de la Reproducción 2013. (En línea) consulta 15.Sep.2013 Disponible en: [http://www.reprobiotec.com/nitrogeno\\_liquido\\_uso.html](http://www.reprobiotec.com/nitrogeno_liquido_uso.html)
23. PEZZONE N., 2008. Anatomía del aparato reproductor del toro,( En línea) Consultado 10.Sep.2013. Disponible en:

URL:<http://www.latinpedia.net/Ciencia/animal/Anatomia-del-sistema-reproductor-del-toroad200.htm>

24. TIBISAY L., 2011. Estimación de la capacidad fecundante del semen bovino. (En línea). Consultado 20. Jul. 2013. Disponible en: URL:<http://www.dpa.com.ve/documentos/CD1/page10.html>

25. UNAD (UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA), 2005. Módulo de

Reproducción Animal. (En línea); Consultado 10. Jun. 2013. Disponible en: URL:<http://es.scribd.com/doc/23408590/Manual-de-reproduccion-animal>