

Protocolos de criopreservación de semen bovino

Por:

Nathalia Andrea Díaz Duque

Paola Andrea López Castaño

Asesor:

Juan Carlos Echeverry López

Universidad Tecnológica de Pereira

Facultad Ciencias de la Salud

Programa Medicina Veterinaria y Zootecnia

Pereira 2018

Protocolos de criopreservación de semen bovino

Díaz-Duque NA; López-Castaño PA

Resumen

La inseminación artificial (IA) es una técnica utilizada en diferentes especies. La congelación de los espermatozoides es uno de los métodos más sencillos que ha permitido ampliar el tiempo de viabilidad de los espermatozoides, ya que puede reducir su metabolismo y por lo tanto prolongar la durabilidad del semen. La criopreservación consiste en utilizar el frío extremo para disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y poderla mantener en condiciones de "vida suspendida" durante mucho tiempo. La criopreservación garantiza que los espermatozoides puedan ser conservados. El proceso de congelación y descongelación afecta la integridad de la membrana plasmática y acrosomal por lo tanto la funcionalidad de los espermatozoides. También suele ocasionar daños irreversibles y causar muerte celular e infertilidad. El éxito de la criopreservación está supeditado a factores tales como tipo de diluyente, tasa de descongelación y empaque, variación individual del reproductor, crioprotector y tasa de enfriamiento. El objetivo fue describir los diferentes protocolos utilizados en la criopreservación del semen bovino. Para la realización de este proyecto se utilizaron bases de datos como Google Académico, Scopus y Science Direct.

Palabras clave: Espermatozoide, esperma congelado, fertilidad, inseminación artificial, reproducción

Abstract

Artificial insemination (AI) is a technique used in different species. The freezing of sperm is one of the simplest methods that has allowed to extend the time of viability of sperm, since it can reduce its metabolism and therefore prolong the durability of semen. Cryopreservation consists of using extreme cold to diminish the vital

functions of a cell or an organism and being able to maintain it in conditions of "suspended life" for a long time. Cryopreservation ensures that sperm can be conserved. The process of freezing and thawing affects the integrity of the plasma and acrosomal membrane thus the functionality of the sperm. It also usually causes irreversible damage and causes cell death and infertility. The success of cryopreservation is subject to factors such as type of diluent, thawing and packing rate, individual variation of the player, cryoprotectant and cooling rate. The objective was to describe the different protocols used in the cryopreservation of bovine semen. For the realization of this project databases like Google Scholar, Scopus and Science Direct were used.

Keywords: Sperm, frozen sperm, fertility, artificial insemination, reproduction

Introducción

A pesar de los continuos avances en el desarrollo de nuevos extensores y crioprotectores, la motilidad post-deshielo del esperma bovino permanece en torno al 50%. La criopreservación del semen implica varios pasos generales, de los cuales la dilución, la crioprotección, el enfriamiento y la congelación, el almacenamiento y la descongelación pueden afectar la estructura y la función del esperma(1). Este proceso de crioconservación perjudica la función de la célula espermática, lo que podría conducir a una reducción de la fertilidad(2).

Existe mucha información sobre los protocolos de criopreservación de semen en bases de datos, pero esta se encuentra muy dispersa ya que existen protocolos para diferentes especies y para cada especie también muchas variaciones tanto en materiales como en metodología.

Andrés Argote, distribuidor de pajillas de la empresa ABS, en Colombia dice que “se podría decir que estamos usando el 70 % del material extranjero y el 30 % del material nacional” (3).

Desde la implementación de la inseminación artificial se han utilizado diferentes diluyentes y diferentes protocolos para la conservación del semen. Desde yema de huevo hasta leche y otras alternativas. El éxito de la crío preservación depende de factores tales como calidad del semen, composición del diluyente, crío protector utilizado, protocolo de congelación, empaque, tasa de descongelado y la interacción entre los anteriores componentes(4).

Definir un protocolo específico sería de gran ayuda para mejorar la calidad del semen procesado en laboratorios de andrología bovina.

Breve reseña de la Inseminación Artificial

En la historia de la Inseminación Artificial (I.A) se menciona a Jacob en la época pastoril, como la primera persona que tuvo la inquietud de fecundar ovejas modificando el método de la monta natural. En el siglo XIV un soldado árabe vio aparear una yegua con un semental de gran valor que pertenecía a un jefe árabe enemigo y una noche recogió con una esponja el semen depositado en ella, el soldado regreso a su campamento e introdujo la esponja en una de sus yeguas, logrando fecundarla (5).

A partir de los años de 1779 a 1780 iniciaron los primeros experimentos científicos en los cuales el fisiólogo italiano Lazzaro Spallanzani consigue inseminar una perra y obtiene una camada con las características físicas de ambos padres y todas las condiciones normales (6). En el siglo XIX son importantes los experimentos desarrollados en caninos por Plannis y con equinos por Hoffman y Stallgar (7).

En la universidad de Cambridge en 1890 Walter Heape, planteo la hipótesis del mejoramiento genético por medio de la biotecnología (I. A. o T.E), logrando así inseminar una coneja, obtener sus embriones, transferirlos y llevar a término su gestación (8).

Luego hubo grandes aportes para perfeccionar la inseminación entre los cuales se destacan: la creación de la vagina artificial por el investigador Italiano Amantea en el año 1914 en Italia, el uso de diluyentes (fosfato sódico) para semen en el año 1930 lo cual permitió prolongar la vida del semen durante varios días y en 1952 se logra congelar semen de toro, prolongando así la vida del espermatozoide por tiempo indeterminado (5).

La inseminación artificial fue la primera biotecnología que se utilizó para mejorar la reproducción y la genética animal, beneficiando más al ganado lechero. Gracias a la inseminación artificial se pudo desarrollar otras tecnologías como la crioconservación, la regulación del ciclo estral y la recolección, cultivo y transferencia de embriones, la clonación, congelación y crioconservación (9).

El interés en la inseminación artificial creció después del Primer Congreso de Reproducción Animal e Inseminación Artificial en Milán en 1948. Posteriormente, programas de test de toros en Colorado (1963) los cuales fueron estandarizados después (10).

Historia de la conservación del semen

Lazzaro Spallanzani en 1776, observó que semen enfriado en la nieve por 30 minutos, se volvían inactivos pero se podían reactivar nuevamente. La reducción de la temperatura se utilizó para deprimir la actividad metabólica y así prolongar la vida del espermatozoide (11).

En los comienzos del siglo XX, el investigador ruso Ivanov logro inseminar alrededor de 500 yeguas. En 1913, Ivanov descubrió un carnero muerto en la nieve, el semen en estado de congelación contenía espermatozoides vivos y con capacidad fecundante, desde entonces se inició la búsqueda de un método que permitiera mantener el esperma vivo por más tiempo (7) .

Técnicas modernas de conservación de semen

Para la conservación del semen se utilizan diluyentes que son soluciones acuosas que permiten aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias, preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado (12).

Muchos de los diluyentes utilizan la yema de huevo dentro de sus componentes. Existen varios trabajos que buscan reemplazar la yema de huevo con sustancias como la lecitina de soya. Estudios realizados han mostrado que la lecitina de soya al 1 o 1,5 % puede reemplazar la yema de huevo (13).

Actualmente, hay programas como el Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), que determinan la concentración, motilidad en masa e individual que ayudan en la preparación de semen a congelar con excelentes resultados (14).

El otro parámetro a tener en cuenta es la calidad del diluyente. Son muchos los utilizados con variables resultados y que buscan la durabilidad del semen en el tiempo con base en la congelación o criopreservación (15).

Phillips investigador Europeo en su trabajo con diluyentes a base de fosfato sódico, fosfato potásico y yema de huevo, logro mantener vivos espermatozoides por 18 horas a una temperatura de -4 y -10 °C (16).

Técnicas para la recolección de semen

Existen dos tipos de recolección de semen que se describen a continuación y su importancia radica en la calidad del semen; con vagina artificial la calidad del eyaculado es mejor, pero no siempre hay respuesta por lo que el electro eyaculador es mejor en estos casos.

Recolección de semen con electroeyaculador

El electroeyaculador está compuesto por un electrodo el cual está conectado a una batería que genera una serie de pulsos cortos, de bajo voltaje de corriente a estructuras genitales y los nervios pélvicos que están implicados en la erección peneana y una respuesta eyaculatoria. Este sistema está conformado por los siguientes componentes: caja de transporte, sonda rectal, unidad de control, cargador de batería, cable de energía, cable de conexión de la sonda, mango, cono y envase de colección. La sonda se inserta en el recto de tal manera que los electrodos se encuentran dentro de la cavidad pélvica la cual emite impulsos eléctricos a baja voltaje hasta conseguir el objetivo específico de la técnica mencionada (17).

Previamente para el empleo de esta técnica se realiza el corte de pelo del prepucio y un lavado, se lubrica la sonda y se inserta en el recto, colocado aproximadamente sobre las vesículas seminales. Un ayudante procede a limpiar el recto y a estimular por medio de masaje transrectal en las glándulas accesorias (glándulas vesiculares y ampolla de los conductos deferentes) y, luego se introduce el electrodo adecuado (18).

Una vez colocado en este lugar se procede al estímulo hasta lograr la erección y posterior eyaculación. El líquido seminal pronto comienza a salir y el pene aparece en el orificio del prepucio. Al momento que se produce la eyaculación el poder de la maquina debe estar apagado gradualmente y la sonda retirada suavemente. El pene del toro se retrae inmediatamente y volverá a una posición normal. Es importante tener en cuenta que este proceso no debe durar no más de cinco minutos desde inserción de la sonda a la terminación de la eyaculación (19).

Vagina artificial

La vagina artificial consiste en un tubo cilíndrico de plástico rígido y resistente, de 7 centímetros de diámetro y de 35 a 40 centímetros de largo, recubierto internamente por una camisa de goma que se dobla sobre los extremos del cilindro formando una cámara que se llena con agua caliente (45 – 46°C) y aire, con el fin de proveer el estímulo adecuado de temperatura y presión, logrando así la eyaculación.

Características del diluyente

Un diluyente es un medio compuesto de varias sustancias que cumplen diferentes funciones como conservar el semen de la criopreservación, solución tampón que regula el pH, elementos nutritivos y antibióticos.

Los sistemas tampones son sustancias encargadas de equilibrar el pH del semen producto del metabolismo de los espermatozoides que liberan catabolitos tóxicos que producen ácido láctico generando disminución de la viabilidad de los otros espermatozoides. Una sustancia tampón, presente en el diluyente, sostiene un pH entre 6,9 y 7,1 (20).

Los crioprotectores son sustancias que protegen a los espermatozoides de la congelación. Existen crioprotectores intracelulares y extracelulares.

Los crioprotectores intracelulares cumplen la función de reemplazar el líquido del interior del espermatozoide por el crioprotector generando una crenación de la célula y protegiendo al espermatozoide de su ruptura por la formación de cristales en el medio extracelular. Los más conocidos son el glicerol, etilenglicol, dimetilformamida y sulfóxido de dimetilo. El más usado es el glicerol (20).

Los crioprotectores extracelulares provocan una deshidratación rápida del espermatozoide y los más comunes son sacarosa, dextrosa, glucosa y dextrano (20).

Como sustancia nutritiva se habla de la yema de huevo y leche, la cual contiene lecitina (fosfatidilcolina), que parece proteger la membrana mediante la restauración de fosfolípidos celulares perdidos por espermatozoides durante el choque térmico (20). También, complejos de colesterol pueden ser usados para reemplazar la yema de huevo (21).

Investigaciones realizadas con semen congelado, determinaron la presencia de bacterias principalmente mesófilos e inclusive coliformes (22), y por otra parte la flora bacteriana del material espermático en bovinos se han encontrado microorganismos patógenos como *Actinomyces pyogenes bovis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* (grupos A y D de *Lancefield*), *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; con mayor frecuencia bacterias saprofitas de varios géneros y especies (23). Los hallazgos no presentan peligro en el momento de la inseminación artificial debido al uso de antibióticos que se adicionan al diluyente.

Diluyentes más comunes en Colombia

AndroMed®

Es un concentrado estéril para la preparación de un diluyente libre de yema de huevo para eyaculados bovinos. Es utilizado para la congelación de semen y para la conservación de semen fresco. Cada frasco de AndroMed® contiene 200ml de concentrado para la preparación de 1.000ml de diluyente listo para su utilización. Su contenido en antibióticos corresponde al estándar de la UE: EC norma 88/407.

Está compuesto por: fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcar, antioxidantes, tampones, glicerina, antibióticos y agua de extrema pureza.

Cada 100ml del diluyente preparado contienen (unidades activas): Tilosina 5.0mg, gentamicina 25,0mg, espectinomicina 30,0mg y lincomicina 15,0mg (24).

Triladyl®

Es una concentración estéril para la preparación de un diluyente con yema de huevo para la congelación de semen bovino en un solo paso. Cada frasco de Triladyl® contiene 250g de concentrado para la preparación de 1250g de diluyente listo para su utilización. Su contenido en antibióticos es a partir de una dilución de 1:8 (1 parte de semen a 8 partes de diluyente) al estándar de la UE: EC norma 88/407.

Está compuesto por: TRIS, ácido cítrico, azúcar, tampones, glicerina, antibióticos y agua de extrema pureza.

Cada 100 ml del diluyente preparado contienen (unidades activas): Tilosina 5,7mg, Gentamicina 28,6mg, Espectinomicina 34,3mg y Lincomicina 17,2mg. Con ello 100 ml de semen diluido contienen a partir de una dilución de 1:8, la siguiente concentración antibiótica: Tilosina 5,0mg, Gentamicina 25,0mg, Espectinomicina 30,0mg y Lincomicina 15,0mg (25).

Investigación actual

El uso de los anteriores diluyentes tiene una buena aceptación, pero hay limitantes como mortalidad de los espermatozoides durante el congelado y descongelado. Debido a esta circunstancia, se sigue estudiando y buscando alternativas para mejorar la calidad del semen criopreservado. La congelación y descongelación de semen bovino sufre un daño o la muerte alrededor del 30% de los espermatozoides, reduciendo así el porcentaje de espermatozoides móviles aproximadamente en un 50% (26).

A continuación, se describirán trabajos realizados con nuevos diluyentes o cambios en los ya conocidos y sus resultados.

Antioxidantes

Un radical libre es aquella figura química que tiene en su estructura uno o más electrones no apareados (27). Los radicales libres más importantes se clasifican en:

especies reactivas de nitrógeno (NOS) y especies reactivas de oxígeno (ROS), siendo estos últimos los más comunes e importantes (28)(29).

La producción normal de radicales libres ocurre durante el metabolismo del oxígeno. Cuando existe un incremento de ATP, hay también un exceso en la producción de dichos radicales (30). Además lesiones de tipo crónico a nivel de los testículos además del estrés oxidativo normal provocan liberación de radicales libres generando un importante daño a nivel de los espermatozoides debido a la peroxidación lipídica, generando alteraciones en los espermatozoides que afectan la motilidad, actividad endogénica de antioxidantes enzimáticos, integridad de la membrana y fertilidad (30)(31).

Los antioxidantes son sustancias capaces de retardar, prevenir y detener la oxidación de los sustratos o moléculas diana(30)(32). Los antioxidantes tienen una variedad amplia que pueden ser desde moléculas complejas, como el superóxido dismutasa, la catalasa, peroxirredoxinas y moléculas sencillas como ácido úrico y glutatión (33).

Los antioxidantes se clasifican como enzimáticos y no enzimáticos(34). Los no enzimáticos funcionan dando un electrón a un radical libre con el fin de estabilizarlo y estos a su vez se ubican en el citosol, matriz mitocondrial y nuclear además en los fluidos extracelulares (35).

El Estrés Oxidativo se considera como un estado de desequilibrio que se origina en el cuerpo donde la excesiva producción de Especies Reactivas de Oxígeno abate las defensas antioxidantes, donde se desencadenan patologías como: deformidades al obstaculizar la espermatogénesis, daños en la funcionalidad del espermatozoide y finalmente la infertilidad (36).

Los principales blancos del EO son macromoléculas de la célula (lípidos, ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos). El EO provoca un daño importante en la

funcionalidad de los espermatozoides debido a la peroxidación lipídica incitada por los ROS (37). Las características que se ven afectadas son: motilidad, actividad endógena de antioxidantes enzimáticos integridad de la membrana y fertilidad (38). Por otra parte se menciona que los aumentos considerables en el estrés oxidativo se ven reflejados en el DNA espermático, transcripción de RNA y telómeros, teniendo resultados como infertilidad, mortalidad embrionaria y pérdida de la gestación (39).

- **Antioxidantes de origen vegetal**

En la actualidad se han realizado investigaciones donde confirman que las plantas herbáceas contienen un alto porcentaje de antioxidantes, que se pueden usar como extractos, emulsiones y especias (40).

Estas plantas cuentan con un alto nivel de antioxidantes naturales ya que cuenta con una gran variedad de fitoquímicos como: compuestos fenólicos, carotenoides, alcaloides, glucosinolatos, taninos compuestos azufrados, esteroides vegetales, etc. Estos compuestos se basan en la formación de iones metálicos y la reacción con los radicales libres (41).

Se conocen tres grupos de antioxidantes:

- **Antioxidantes Primarios.**

Son los que previenen la formación de nuevos radicales libres, cambiándolas en moléculas menos perjudiciales, antes de que estas puedan reaccionar, o evitando la creación de radicales libres a partir de otras moléculas. Entre estos antioxidantes tenemos a la enzima superóxido dismutasa (SOD), la enzima glutatión peroxidasa (GPx) (42).

- **Antioxidantes secundarios**

Estos pueden detener los radicales libres, evitando las reacciones en cadena. Entre los que están: la vitamina C, vitamina E, albúmina, betacaroteno y bilirrubina(42).

- **Antioxidantes terciarios**

Estos antioxidantes restauran las biomoléculas afectadas por los radicales libres. Entre ellos se encuentran las enzimas reparadoras de ADN y metionina sulfóxido reductasa (42).

Los siguientes antioxidantes están siendo investigados como parte del diluyente.

- **Cisteína**

Este aminoácido es uno de los pocos que está conformado por azufre y es un muy buen antioxidante que también protege al organismo de los efectos de la contaminación (43) .

La cisteína tiene aptitudes antioxidantes ya que es un precursor de aminoácidos del glutatión, manteniendo niveles intracelulares elevados del mismo que protege las células de los daños mediados por ROS, estrés oxidativo (44). El uso de L-cisteína en el diluyente para la criopreservación de los espermatozoides de bovino es que ayuda a prolongar y puede aumentar la calidad post-descongelación (motilidad, membrana plasmática, integridad, viabilidad e integridad acrosomal) de espermatozoides de bovino (45).

- **Cafeína**

La cafeína es un compuesto del grupo de las metilxantinas, derivadas de los inhibidores de fosfodiesterasas (46). Además, la cafeína puede tener un efecto directo sobre el metabolismo celular; se cree que tal efecto depende de la concentración de iones de calcio (47). Este compuesto aumenta la glucólisis en el espermatozoide afectando de una manera positiva la motilidad (48).

- **Vitamina C**

El Ácido Ascórbico (AA) o Vitamina C es una lactona de seis carbonos que se caracteriza por ser una molécula soluble en agua y por ser más estable en medios ácidos. Se clasifica como un agente reductor, catalizador en reacciones de óxido-reducción y en la donación de electrones (49). El AA está presente en los testículos, en el cual, mediante sus características antioxidantes, lo protege contra el estrés oxidativo favoreciendo así la espermatogénesis (50). El consumo de AA beneficia el incremento de espermatozoides con motilidad progresiva, mayor concentración de células espermáticas en el eyaculado y un aumento en el nivel plasmático de testosterona (51). El AA puede desempeñar una función muy importante en las células espermáticas brindándoles protección contra el estrés oxidativo, ya que mantiene la integridad del material genético (52). La adición de AA al diluyente de criopreservación de semen bovino ayuda a mejorar características de motilidad, integridad del acrosoma y funcionalidad de la membrana plasmática posdescongelado (53).

Diluyentes no convencionales

En la actualidad en el mercado existen varios diluyentes comerciales, sin embargo su alto valor les impide a los pequeños productores adquirirlo con facilidad, lo que pone como primera opción los dilutores de origen animal y vegetal. Por este motivo se están realizando búsquedas de nuevas tecnologías para evaluar el efecto de uso de dilutores en la viabilidad espermática de ganado bovino.

Agua de coco

El agua de coco contiene una gran cantidad de sales minerales como cobre, zinc, hierro, ácido fólico y fósforo. El agua de coco se ha utilizado principalmente en semen fresco. Estudios han demostrado mejor calidad del semen con agua de coco, sobre semen con diluyente comercial (Andromed) y leche desnatada (54).

Aloe vera

El Aloe vera posee muchas propiedades y es muy utilizado en muchas áreas por sus diferentes propiedades. Una de sus propiedades es la de ser surfactante (55).

Una sustancia surfactante es cualquier sustancia que reduce la tensión entre dos superficies. Se han realizado estudios con surfactantes comerciales en la criopreservación del semen con excelentes resultados en la disminución de la mortalidad espermática. Aunque no es claro su modo de acción, se cree que los surfactantes aumentan la permeabilidad espermática volviendo más porosa la membrana y evitando su destrucción. Se hizo una investigación adicionando Aloe vera al diluyente con el semen en diferentes concentraciones, sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron utilizando el diluyente comercial sin Aloe vera. Las menores concentraciones del extracto de la planta, tuvieron resultado similar al diluyente comercial. Cuando se subió la concentración, la calidad del semen criopreservado, disminuyó notablemente. Se deben realizar más trabajos con Aloe vera (55).

***Rhus trilobata* (zumaque de tres hojas, zumaque aromático de tres hojas, arbusto turón)**

Es una planta arbustiva que puede medir hasta 2 metros de altura, flores pequeñas amarillas y sus frutos son de color rojo con un diámetro menor a 1 cm. Se considera endémica del estado de chihuahua, México (56).

Se ha demostrado que la planta RT posee propiedades citotóxicas, antineoplásicas, proapoptóticas en las líneas celulares de cáncer (CaCo-2 y SKOU-3) y antiinflamatorias; debido a su alto contenido de polifenoles atribuyéndole una alta actividad antioxidante (57).

Se dice que el extracto de RT tiene una elevada captación del radical superóxido (O_2^-) muy similar a la del ácido gálico (58) y se reporta un efecto positivo en la

maduración nuclear y desarrollo embrionario bovino con la adición de RT al medio de maduración *in vitro* (59).

Bibliografía

1. Sathe S, Shipley CF. Cryopreservation of Semen. In: Bovine Reproduction. 2014. p. 662–70.
2. Celeghini ECC, de Arruda RP, de Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PHM. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim Reprod Sci.* 2008;104(2–4):119–31.
3. Todo lo que debe saber sobre las pajillas de toros en Colombia | Contexto Ganadero [Internet]. Available from: <http://www.contextoganadero.com/reportaje/todo-lo-que-debe-saber-sobre-las-pajillas-de-toros-en-colombia>
4. Layek SS, Mohanty TK, Kumaresan A, Parks JE. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Anim Reprod Sci.* 2016;172:1–9.
5. Huertas, José Ignacio HJV. Manual práctico y moderno de inseminación artificial. 1991.
6. Foote RH. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J Anim Sci* [Internet]. 2002;80(E-Suppl_2):1–10. Available from: http://jas.fass.org/cgi/content/abstract/80/E-Suppl_2/1%5Cnhttp://jas.fass.org/cgi/content/short/80/E-Suppl_2/1
7. Jimenez Antonio D. Técnicas de inseminación artificial aplicadas en bovinos. Universidad Autónoma Agraria; 2010.
8. Palma GA. Biotecnología de la Reproducción Ciencia, Tecnología y Sociedad. 2015;(September).
9. Foote RH. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J Anim Sci* [Internet]. 2002;80(E-Suppl_2):1–10. Available from: http://jas.fass.org/cgi/content/abstract/80/E-Suppl_2/1%5Cnhttp://jas.fass.org/cgi/content/short/80/E-Suppl_2/1
10. Chenoweth PJ, McPherson FJ. Bull breeding soundness, semen evaluation and cattle productivity. *Anim Reprod Sci.* 2016 Mar;
11. Ramón C. Evaluación De Dos Agentes Crioprotectores No Permeables Y Un Diluyente Comercial (Triladyl) En La Congelación De Semen Bovino.

2013.

12. Alejandro R, Granados C, Carreño AS. Estudios andrológicos básicos como apoyo para el examen de toros criollos - Studies basic Andrological as support for the consideration of Creole bulls. 2013;
13. El-Sisy GA, El-Nattat WS, El-Sheshtawy RI, Abo El-Maaty AM. Substitution of egg yolk with different concentrations of soybean lecithin in tris-based extender during bulls' semen preservability. *Asian Pacific J Reprod.* 2016;5:514–8.
14. Malama E, Zeron Y, Janett F, Siuda M, Roth Z, Bollwein H. Use of computer-assisted sperm analysis and flow cytometry to detect seasonal variations of bovine semen quality. *Theriogenology.* 2017 Jan;87:79–90.
15. Murphy EM, Murphy C, O'Meara C, Dunne G, Eivers B, Lonergan P, et al. A comparison of semen diluents on the in vitro and in vivo fertility of liquid bull semen. *J Dairy Sci.* 2016 Nov;
16. Pacheco Curie JI, Pérez Durand GM, Calle Charaja L, García Vera W. Efecto del lugar y la hora de inseminación artificial sobre la fertilidad en Alpacas (Effect of the place and the hour of artificial insemination on the fertility in Alpacas) [Internet]. Vol. 10. 2009. p. 1695–7504. Available from: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet%5Cnhttp://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080809.html>
17. Román, Arieta, Ronnie de Jesús, Fernández Figueroa, José Antonio, Menchaca Peña J. Métodos de extracción de semen bovino. *Rev Electron Vet.* 2014;15(5):30–7.
18. Palmer CW, Amundson SD, Brito LFC, Waldner CL, Barth AD. Use of oxytocin and cloprostenol to facilitate semen collection by electroejaculation or transrectal massage in bulls. *Anim Reprod Sci.* 2004;80(3–4):213–23.
19. Mejía Gutiérrez JE. Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electroeyaculador en el ganado criollo. 2014.
20. Curbelo Curbelo M, Rodríguez Rodríguez Z. Revelamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en Uruguay. Universidad de la República; 2013.
21. Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2016;169:2–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.004>
22. Siever Morales C. , Próspero Cabrera V. , César Pantoja A. DGI y NSC. Evaluación de Carga Bacteriana en Pajillas de Semen. 2016;(February).
23. Enrique A. Silveira Prado y Roberto Machado Pérez . Flora bacteriana del semen de toro antes y después de la congelación (Bacterial flora of bull

semen before and after freezing process). 2005;VI:1–8.

24. Andromed.pdf.
25. Mini Tüb. Manual Triladyl ®. Vol. 49. 2017. p. 0–3.
26. Chaveiro A, Machado L, Frijters A, Engel B, Woelders H. Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. 2006;65:1875–90.
27. Nuñez Selles A. Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidante: retos y oportunidades. Rev Cuba Salud Pública. 2011;37(Ldl):644–60.
28. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. Reprod Biol Endocrinol. 2005;3:1–21.
29. Chihuailaf M, Chihuailaf RH, Contreras PA, Wittwer FG. Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal Pathogenesis of oxidative stress: Consequences and evaluation in animal health. Vet México [Internet]. 2002;33(3):265–83. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42333306>
30. Valdez Torres JM. Adición de fuentes antioxidantes al diluyente de semen bovino y sus efectos posdescongelamiento. Universidad Autónoma de Chihuahua; 2018.
31. Lavranos G, Balla M, Tzortzopoulou A, Syriou V, Angelopoulou R. Investigating ROS sources in male infertility: A common end for numerous pathways. Reprod Toxicol [Internet]. 2012;34(3):298–307. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.06.007>
32. Barry H, M., John Gutteridge C. Free Radicals in Biology and Medicine. Color Hist su significado y Fabr [Internet]. 2009;288. Available from: <https://books.google.es/books?id=krRzPgAACAAJ&dq=colores+historia+de+su+significado+y+fabricacion+anne+varichon&hl=es&sa=X&ei=LbknVcyQK6bY7AaF2oG4DA&ved=0CCAQ6AEwAA>
33. Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2010;393(4):561–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.071>
34. Martín HD. “ Fisiología celular y calidad seminal durante la conservación del semen porcino refrigerado ” Fisiología celular y calidad seminal durante la conservación del semen porcino refrigerado. Universidad De Extremadura; 2013.
35. Córdova Izquierdo, Alejandro ;Córdova Jiménez, Mary Silvia;Ruiz Lang, Claudio Gustavo ;Córdova Jiménez, Cristian Alejandro;Guerra Liera, Juan Eulogio ;Rodríguez Denis, Blanca Estela ;Arancibia Salinas K. Estrés

- oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática; Oxidative stress and antioxidants in the spermatic conservation [Internet]. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 2009 [cited 2018 Jul 31]. p. 38. Available from: <http://europa.sim.ucm.es/compludoc/AA?articuloId=693555>
36. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *World J Mens Health* [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2018 Jul 31];32(1):1. Available from: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.5534/wjmh.2014.32.1.1>
 37. Agarwal A, Wang SM. Clinical Relevance of Oxidation- of Male Infertility. *Urology* [Internet]. 2017;104:84–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2017.02.016>
 38. Sariözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Ulutaş PA, Bilgen A. The influence of cysteine and taurine on microscopic–oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology* [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2018 Jul 31];58(2):134–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224008003040>
 39. Agarwal A, Bui AD. Oxidation-reduction potential as a new marker for oxidative stress : Correlation to male infertility. 2017;385–99.
 40. Embuscado ME. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. *J Funct Foods* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2018 Aug 1];18:811–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464615001127>
 41. Pandey KH, Mahalingan K, Sandeep S, Reshma L, Amritha V. Antioxidant properties of various fruits, herbs, spices and vegetables: a review. *World J Pharm Pharm Sci* [Internet]. 2014;3(2):1101–9. Available from: http://www.wjpps.com/current_issue.php
 42. Alfonso J. Estrés oxidativo y función espermática. Revisión. 2005;
 43. Barragán Barragán IF. Evaluación del efecto crioprotector de diferentes fuentes de antioxidantes en el semen bovino. *Escuela Superior Politécnica De Chimborazo*; 2017.
 44. Tuncer PB, Bucak MN, Büyükleblebici S, Sariözkan S, Yeni D, Eken A, et al. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. *Cryobiology*. 2010;61(3):303–7.
 45. Ansari MS, Rakha BA, Akhter S. Effect of L-cysteine in extender on post-thaw quality of Sahiwal bull semen. *Anim Sci Pap Reports* [Internet]. 2011 [cited 2018 Jul 31];29(3):197–203. Available from: <https://web.b.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=08604037&asa=Y&AN=65418467&h=8xZjc9ZEhaM1ueFbug9WwjknmdX2HZ6y7xaV5bZaVfJTavSp5Eavcck7D3UH6UfVy6vqYr>

wGJLzdo69WxVtseA%3D%3D&crI=c&resultNs=AdminWebAuth&resultLoc

46. Stephens TD, Brooks RM, Carrington JL, Cheng L, Carrington AC, Porr CA, et al. Effects of Pentoxifylline, Caffeine, and Taurine on Post-Thaw Motility and Longevity of Equine Frozen Semen. *J Equine Vet Sci* [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2018 Jul 31];33(8):615–21. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080612008374>
47. Barakat IAH, Danfour MA, Galewan FAM, Dkhil MA. Effect of various concentrations of caffeine, pentoxifylline, and kallikrein on hyperactivation of Frozen bovine semen. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
48. Fisone G, Borgkvist A, Usiello A. Caffeine as a psychomotor stimulant: Mechanism of action. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(7–8):857–72.
49. Gangwar C, Kharche SD, Ranjan R, Kumar S, Goel AK, Jindal SK, et al. Effect of vitamin C supplementation on freezability of Barbari buck semen. *Small Rumin Res* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2018 Jul 31];129:104–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448815002552>
50. Vijayprasad S, Bb G, Bb N. Effect of vitamin C on male fertility in rats subjected to forced swimming stress. *J Clin Diagn Res* [Internet]. 2014 Jul [cited 2018 Jul 31];8(7):HC05-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25177581>
51. Eskenazi B, Kidd SA, Marks AR, Slotter E, Block G, Wyrobek AJ. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. *Hum Reprod* [Internet]. 2005 Apr 1 [cited 2018 Jul 31];20(4):1006–12. Available from: <http://academic.oup.com/humrep/article/20/4/1006/701270/Antioxidant-intake-is-associated-with-semen>
52. Fraga CG, Motchnik P a., Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob R a., Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1991;88(December 1991):11003–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=53061&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
53. Hu J-H, Tian W-Q, Zhao X-L, Zan L-S, Wang H, Li Q-W, et al. The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2010 Aug 1 [cited 2018 Jul 31];121(1–2):72–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432010002599>
54. Trigos Yalta MJ. Efecto del uso de dos dilutores (Agua de coco y leche descremada) para la viabilidad espermática en semen fresco en bovinos. Universidad Nacional Toribio Rodríguez De Mendoza de Amazonas; 2017.

55. Espinosa Vargas WD. Efecto de la adición de un surfactante natural (Aloe vera) al diluyente Triladyl® para criopreservación de semen bovino en toros reproductores de Agso-Genes, Quito-Pichincha. Universidad Técnica de Cotopaxi; 2012.
56. Guerrero-Salgado F, Rodríguez-Castillo AJ, Infante-Ramírez R, González-Horta MC, Talamás-Rohana P, Sánchez-Ramírez B. Anti-inflammatory effect of *Rhus trilobata* extracts in lipopolysaccharides-stimulated J774 macrophages. *Toxicol Lett* [Internet]. 2016 Oct [cited 2018 Aug 1];259(259):S194. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427416328259>
57. Híjar-Soto LE, González-Horta C, Chávez-Flores D, Sánchez-Ramírez B. Apoptotic and cytotoxic effect of bioactive fractions of *Rhus trilobata* on colon cancer cells CaCo-2. *Toxicol Lett* [Internet]. 2016 Oct [cited 2018 Aug 1];259(259):S193–4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427416328247>
58. Valdez TJM, Grado AJA, Burrola BME, Sánchez RB, Antillon RJ. Efecto de diferentes fuentes antioxidantes sobre parámetros celulares y capacitación espermática posdescongelado en semen bovino. 2017;(August).
59. Rodríguez Borbón A. Efecto de la cafeína y la *Rhus Trilobata* sobre el desarrollo de competencia de ovocitos bovinos de maduración in vitro. 2017.