

**Efecto de diferentes tiempos de centrifugación  
utilizando el gradiente de Percoll 45-90% sobre la  
integridad de la membrana plasmática de  
espermatozoides bovinos**

**Kenneth David Camargo Samudio  
Alejandro Alberto Jose Pagoada Romero**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2020

ZAMORANO  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

# **Efecto de diferentes tiempos de centrifugación utilizando el gradiente de Percoll 45-90% sobre la integridad de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingenieros Agrónomos en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Kenneth David Camargo Samudio  
Alejandro Alberto José Pagoada Romero**

**Zamorano, Honduras**  
Noviembre, 2020

# **Efecto de diferentes tiempos de centrifugación utilizando el gradiente de Percoll 45-90% sobre la integridad de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos**

Presentado por:

Kenneth David Camargo Samudio  
Alejandro Alberto Jose Pagoada Romero

Aprobado:



[John Hincapie \(Nov 6, 2020 10:31 CST\)](#)

---

John Jairo Hincapié, D.Sc.  
Asesor Principal



---

Rogel Castillo, M.Sc.  
Director  
Departamento de Ciencia y  
Producción Agropecuaria



---

Rogel Castillo, M.Sc.  
Asesor



---

Luis Fernando Osorio, Ph.D.  
Vicepresidente y Decano Académico

## **Efecto de diferentes tiempos de centrifugación utilizando el gradiente de Percoll 45-90% sobre la integridad de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos**

**Kenneth David Camargo Samudio  
Alejandro Alberto José Pagoada Romero**

**Resumen.** La centrifugación de espermatozoides bovinos en el gradiente de Percoll 45-90%, es una técnica utilizada en la fertilización *in vitro*. Los objetivos del estudio fueron: determinar los porcentajes de espermatozoides con endósmosis positiva (EP) y negativa (EN), motilidad individual (MI), viabilidad (vivos y muertos) y morfología normal de cabeza y cola a diferentes tiempos de centrifugación. Para la endósmosis celular se utilizó la prueba HOST, en viabilidad, la coloración de eosina-nigrosina y en morfología, la coloración Spermac<sup>®</sup> de Minitube. Se evaluaron cuatro tratamientos con dos repeticiones: semen descongelado y centrifugado en gradiente de Percoll 45-90% durante 5, 10 y 15 minutos y semen descongelado únicamente (control). Para la prueba HOST, los porcentajes de EP para los mismos tiempos de centrifugación fueron similares con valores de 73.92, 75.19 y 73.63% respectivamente, sin embargo, estos difieren del control con 65.11% ( $P \leq 0.05$ ); los porcentajes de MI para los tiempos de centrifugación fueron 92.00, 93.00 y 91.50% siendo similares entre sí, pero estos difieren del control con 69.5% ( $P \leq 0.05$ ). La viabilidad fue de 71.32, 71.42 y 73.56% para los tiempos respectivamente y difieren del control con 56.63% ( $P \leq 0.05$ ). En la morfología de cabeza y cola normales, no hubo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) con valores superiores al 92 y 82% respectivamente. Se concluye que la centrifugación durante 5, 10 o 15 minutos cuando se realiza el gradiente de Percoll 45-90% no afectan la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides bovinos.

**Palabras clave:** Endosmosis, HOST, morfología, motilidad individual, viabilidad.

**Abstract.** Centrifugation of bovine sperm in the 45-90% Percoll gradient is a technique used in *in vitro* fertilization. The objectives of the study were: to determine the percentages of sperm with positive endosmosis (PE) and negative (NE), individual motility (IM), viability (alive and dead) and normal head and tail morphology at different centrifugation times. For cell endosmosis, the HOST test was used, in viability, the eosin-nigrosin staining and in morphology, the Minitube Spermac<sup>®</sup> staining. Four treatments were evaluated with two repetitions: thawed semen and centrifuged in 45-90% Percoll gradient for 5, 10 and 15 minutes and thawed semen only (control). For the HOST test, the percentages of PE for the same centrifugation times were similar with values of 73.92, 75.19 and 73.63% respectively, however, these differ from the control with 65.11% ( $P \leq 0.05$ ); the MI percentages for the centrifugation times were 92.00, 93.00 and 91.50%, being similar to each other, but these differ from the control with 69.5% ( $P \leq 0.05$ ). The viability was 71.32, 71.42 and 73.56% for the times respectively and they differed from the control with 56.63% ( $P \leq 0.05$ ). In normal head and tail morphology, there were no significant differences ( $P > 0.05$ ) with values higher than 92 and 82% respectively. It is concluded that centrifugation for 5, 10 or 15 minutes when performing the 45-90% Percoll gradient does not affect the integrity of the plasma membrane of bovine sperm.

**Key words:** Endosmosis, HOST, individual motility, morphology, viability.

## ÍNDICE GENERAL

Portadilla .....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen .....	iii
Índice General .....	iv
Índice de Cuadros y Figuras.....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>4</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>18</b>
<b>5. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>19</b>
<b>6. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>20</b>

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Preparación del medio 10X SP-TL para Percoll 90%.....	4
2. Preparación del Percoll 90% .....	4
3. Preparación del Percoll 45% .....	5
4. Preparación de la solución de capacitación y acondicionamiento .....	5
5. Preparación del medio de fertilización (FIV).....	6
6. Clasificación de la motilidad individual en eyaculados de bovino .....	7
7. Valores porcentuales de endósmosis positiva (EP) y endósmosis negativa (EN) en espermatozoides bovinos sometidos a diferentes tiempos de centrifugación con la técnica de Percoll.....	9
8. Valores porcentuales de la endósmosis positiva (EP) por toro y de acuerdo a los tratamientos de centrifugación.....	10
9. Valores porcentuales de motilidad individual (MI) y viabilidad de espermatozoides bovinos sometidos a diferentes tiempos de centrifugación.....	11
10. Valores porcentuales de la motilidad individual (MI) entre los toros y por tratamiento de centrifugación.....	12
11. Valores porcentuales de la viabilidad de los espermatozoides entre los toros y por tratamiento de centrifugación.....	13
12. Valores porcentuales de cabezas normales y anormales en espermatozoides bovinos sometidos a diferentes tiempos de centrifugación con la técnica de Percoll.....	13
13. Valores porcentuales de espermatozoides con cabezas normales entre toros y de acuerdo al tratamiento de centrifugación.....	15
14. Valores porcentuales de colas normales y anormales en espermatozoides bovinos sometidos a diferentes tiempos de centrifugación con la técnica de Percoll.....	15
15. Valores porcentuales de espermatozoides con colas normales entre toros y de acuerdo al tratamiento de centrifugación.....	16
16. Coeficientes de correlación .....	17
Figuras	Página
1. Espermatozoides con endósmosis positiva (EP) y endósmosis negativa (EN).....	10
2. La cabeza sin teñir representa los espermatozoides vivos, mientras que, en los muertos presentan una coloración roja .....	12
3. Cabeza anormal y cabeza normal.....	14
4. Estructura del espermatozoide: cola, pieza intermedia, cabeza, acrosoma.....	14
5. Colas normales y anormales.....	16

# 1. INTRODUCCIÓN

El sector ganadero de cualquier país aporta un gran valor a la economía, ya que en definitiva de este eslabón de la cadena depende la seguridad alimentaria del mismo. Desde tiempos antiguos el ser humano se ha preocupado por buscar mecanismos para mejorar la calidad de los animales y así aprovechar su carne y otros productos derivados. En la actualidad el mejoramiento genético juega un papel importante en esta ambiciosa tarea ya que tiene como principal papel cubrir la demanda de productos en un mercado que cada vez exige que los mismos sean de calidad.

Hoy en día, con la aparición de biotecnologías orientadas al mejoramiento genético de las razas, la técnica de inseminación artificial se ha convertido en la principal herramienta de los criadores de especies bovinas para lograr obtener resultados deseados y satisfacer la demanda del mercado. (Marizancén y Artunduaga 2017). Se destaca que esta herramienta permite a bajo costo inseminar una gran cantidad de animales, utilizando el semen de un número limitado de machos de alto valor genético.

La fertilización *in vitro* (FIV) es una biotecnología, la cual consiste en la fecundación de ovocitos provenientes de ovarios por medio de una aspiración folicular, con el espermatozoides de un macho donador, bajo condiciones controladas de laboratorio, usando un procedimiento estandarizado para cada especie animal; no obstante, para lograr buenos resultados es necesario cerciorarse que se cumplan con todas las normativas que se encuentran en dicho procedimiento, logrando así una fecundación exitosa. La FIV es una técnica que remonta a la década de 1940 donde se realizaban pruebas en erizos de mar, sin embargo, no fue hasta 1970 donde Sreenan (1970) empezaron con los primeros ensayos en la fertilización *in vitro* en bovinos, hasta que en Japón lograrían ser los primeros en fecundar un óvulo bovino en condiciones *in vitro* (Iritani y Niwa 1977), luego Brackett *et al.* (1982) generarían el primer ternero producido bajo fertilización *in vitro*.

La FIV es una técnica que por sus grandes beneficios se ha logrado establecer como una biotecnología muy utilizada por un sin número de laboratorios de reproducción bovina dispersos alrededor del mundo. Cabe destacar que es una técnica muy útil destinada para el mejoramiento genético de las diversas razas bovinas.

Según Hincapié (2019) la FIV en bovinos se desarrolla en tres etapas fundamentales: maduración de ovocitos, fecundación de ovocitos maduros y cultivo de embriones. La maduración de ovocitos conlleva una de las partes más importantes ya que es aquí donde el óvulo adquiere la competencia para que posteriormente sea apto para una fecundación. Es importante resaltar que de esta etapa dependerá que se logre un buen cultivo de embriones y una excelente producción de embriones de calidad.

Dentro de la etapa de fecundación *in vitro*, los espermatozoides son sometidos a diferentes manejos, dentro de los cuales cabe destacar el proceso de centrifugación, por lo tanto, es muy importante analizar cómo influyen los tiempos de centrifugación sobre la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides bovinos y por ende en su viabilidad y en este sentido, Duchens (1999) afirma que para poder obtener resultados efectivos es importante realizar un análisis que permita conocer la capacidad de fertilidad de un toro. Según Cardozo (2000) en su estudio

concluye que el éxito de toda producción bovina tiene sus pilares en la eficiencia reproductiva del hato, considerando que el 85% de esta eficiencia depende del aporte de los toros reproductores, resulta obvio que se debe aplicar una metodología adecuada para evaluar, monitorear y mejorar su desempeño.

Muchos expertos en el área coinciden que no todos los toros son ideales para el proceso reproductivo y es por esta razón la importancia de la realización de estudios para verificar la calidad del material seminal del animal. En este sentido, Páez y Corredor (2014) opinan que la evaluación de la aptitud reproductiva del toro es un examen que permite identificar animales subfértiles e infértiles que pueden llegar a afectar el éxito de un programa reproductivo en una explotación pecuaria, estos autores también concuerdan con otros especialistas al establecer que aproximadamente entre el 3% y el 30% de los toros utilizados no son del todo aptos para la reproducción, pues tienen una evaluación reproductiva no satisfactoria (infértil) o poco satisfactoria (subfértil).

Ahora bien, para realizar un proceso de inseminación es necesario que el semen del toro sea descongelado y expuesto a diversas técnicas para poder realizar este proceso tan importante. Urrego *et al.* (2008) concluyen que durante la fertilización *in vitro* bovina generalmente se utiliza semen de alta calidad que ha sido previamente congelado, lo que implica someter a los espermatozoides a un procedimiento de lavado y selección en los que los de mejor movilidad son separados del plasma seminal, de los muertos e inmóviles, de los diluyentes y crioprotectores y de otras estructuras por medio de técnicas como el Swim-up y el gradiente de Percoll.

Por otro lado, la prueba hipoosmótica, “Hypo-Osmotic Swelling Test” reconocida como HOST por su denominación en inglés, es una prueba seminal simple y de bajo costo, que permite evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide. Este ensayo de carácter seminal tiene su fundamento central en que la suspensión de espermatozoides en un medio hipoosmótico ocasiona un desequilibrio entre los medios intracelular y extracelular, situación que la célula trata de compensar difundiendo agua al compartimento intracelular, considerando un aumento del volumen del espermatozoide. Esta situación se evidencia por cambios morfológicos característicos, tales como dilatación y enrollamiento de la cola.

La prueba de HOST es uno de los principales requisitos para determinar el funcionamiento general de los espermatozoides valorando la integridad funcional de la membrana plasmática para verificar la función de capacitación, reacción acrosómica y fecundación. Coetzee *et al.* (1989) concluyeron que no se produjo penetración de ovocitos cuando la prueba HOST fue negativa (<50% de espermatozoides positivos para HOST). Tales datos claramente prueban la importancia y utilidad que tiene la realización de esta prueba para tener claridad en el funcionamiento general de los espermatozoides.

Entre las bondades de esta prueba es importante destacar que proporciona información adicional que no es obtenida por ensayos más estándar realizados en laboratorios. Así mismo, una anomalía en el resultado en dicha prueba se asocia con malos resultados en la FIV, por lo tanto, “se puede concluir que la prueba HOST es un complemento útil para los análisis de espermatozoides existentes y debe ser incluida como una prueba estándar por los laboratorios de andrología avanzada. Además, la prueba HOST puede ser utilizada para controlar otros procedimientos del

esperma, como: la selección, la preparación, la crío supervivencia y el efecto de las toxinas” (Jeyendran *et al.* 1992).

Monroy (2019) en su investigación concluyó que las diferencias fueron significativas ( $P \leq 0.05$ ) para los resultados de Endósmosis Positiva (EP) y Endósmosis Negativa (EN), entre semen fresco, semen congelado-descongelado y semen congelado-descongelado-recongelado, siendo el semen fresco diluido el que mayor EP presentó (82.50%), estos valores son superiores a los presentados por López y Rivera (2015), quienes presentaron valores de 77.9% en semen fresco. Estos resultados se clasifican como muy buenos al compararlos con los valores establecidos por López *et al.* (2014) quienes definen los criterios de evaluación para la prueba de HOST (desde muy malo hasta muy bueno) estimado según el porcentaje de colas hinchadas vistas en la evaluación: Muy bueno >71%, Bueno 64-71%, Regular 54-63%, Malo 46-53% y Muy malo < 45%.

Con base en lo anterior, se desarrolló la presente investigación, la cual tuvo como objetivo general evaluar el efecto de diferentes tiempos de centrifugación cuando se realiza el gradiente de Percoll 45-90%, sobre la integridad de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos y como objetivos específicos:

- Determinar los porcentajes de espermatozoides con endósmosis positiva y negativa en los diferentes tiempos de centrifugación.
- Determinar el porcentaje de motilidad individual, viabilidad (vivos y muertos) y morfología normal de cabeza y cola.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano, entre septiembre de 2019 y agosto de 2020. El laboratorio se encuentra localizado en la Escuela Agrícola Panamericana a 32 km de Tegucigalpa, la capital de Honduras; se encuentra a 800 msnm, y presenta una precipitación anual y temperatura promedio de 1,100 mm y 24 °C respectivamente.

### Preparación del semen

Se utilizó semen congelado en pajuelas de 0.5 mL a -196 °C en nitrógeno líquido, provenientes de dos toros Holstein. Todo el material utilizado y que entró en contacto con el semen estuvo atemperado a 37 °C y previamente desinfectado y esterilizado con alcohol clínico al 70%.

### Preparación de las soluciones de Percoll 45% y 90%

Para la preparación de los dos gradientes de Percoll 45-90%, se utilizaron los procedimientos que se presentan en los Cuadros 1, 2 y 3.

Cuadro 1. Preparación del medio 10X SP-TL para Percoll 90%

<b>Ingrediente</b>	<b>Cantidad</b>
Agua ultra pura	100 mL
NaCl	4.675 g
KCl	0.23 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O	0.40 g
HEPES	2.38 g

Ajustar el pH a 7.3, esterilizar por filtración en 0.22 µm. Almacenar a 4 °C indefinidamente

Cuadro 2. Preparación del Percoll 90%

<b>Ingrediente</b>	<b>Cantidad</b>
Solución 10X SP-TL	4 mL
Bicarbonato de sodio	0.084 g
Lactato de Sodio	90 µL
Agitar suavemente hasta que el bicarbonato se disuelva completamente. Luego agregar:	
Percoll	36 mL
MgCl <sub>2</sub>	158 µL
CaCl <sub>2</sub>	78 µL

Mezclar suavemente, ajustar pH a 7.3-7.45. Esterilizar por filtración en 0.45 µm. No debe formarse precipitado. Almacenar por una semana a 4 °C

Colocar 3 mL de Percoll 90% en un tubo de 15 mL, y equilibrar a 38 °C, 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y humedad relativa a saturación (95%).

Cuadro 3. Preparación del Percoll 45%

<b>Ingrediente</b>	<b>Cantidad</b>
Solución de capacitación y acondicionamiento	1.5 mL
Percoll 90%	1.5 mL

Almacenar por una semana a 4 °C.

Para la preparación del medio de capacitación y acondicionamiento se utilizó el procedimiento descrito en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Preparación de la solución de capacitación y acondicionamiento.

<b>Ingrediente</b>	<b>Cantidad</b>
Solución stock Capacitación Minitube 19990/0020 <sup>®</sup>	10 mL
Suero Albúmina Bovino Fracción V	60 mg
Piruvato de sodio*	500 µL
Gentamicina**	10 µL

\*11 mg en 5 mL de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS).

\*\*50 mg en 1 mL DPBS.

El día de la maniobra, se depositaron 3 mL de Percoll 90% en un tubo cónico de 15 mL y otros 3 mL del 45% en otro tubo, ambos tubos fueron colocados con la tapa suelta en la incubadora a 38 °C, 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y humedad relativa a saturación (95%) 2 horas antes de iniciar las pruebas. Al cabo de este tiempo se tomó el Percoll 90% y se depositó muy lentamente en el fondo del tubo que contiene el Percoll 45% (proceso de sotoposición), debiéndose formar un menisco entre los dos gradientes de densidad (en el fondo el Percoll 90% y encima el 45%), retornar nuevamente a la incubadora. Se preparó los gradientes necesarios acorde con el número de muestras a investigar.

### **Descongelación del semen**

El semen se descongeló en agua a 35 °C durante 45 segundos, se secó con papel toalla, se armó la pistola de inseminación y se depositó el semen muy despacio sobre el gradiente de Percoll 45%. Se descongeló una pajuela de cada toro por cada tratamiento (en total ocho). Luego se procedió a la centrifugación.

### **Centrifugación**

Se realizaron tres centrifugaciones a diferentes tiempos, tomando como patrón lo establecido en el protocolo FIV de Hansen (2013) en la Universidad de la Florida de 1,000 g; los tiempos fueron de: 0, 5, 10 y 15 minutos. En el tiempo cero (0) no se realizaron ni centrifugación ni gradiente de Percoll ya que este fue el grupo control, por tanto, el contenido de la pajuela fue resuspendido en

un eppendorf con 500  $\mu$ L de medio FIV equilibrado previamente y luego sometido a las pruebas de HOST y tinciones. Una vez se realizó la centrifugación, se retiró el pellet del fondo con pipeta Pasteur y se resuspendió en un tubo de policarbonato de 15 mL que contenía 10 mL de medio de acondicionamiento y se llevó a la centrifuga atemperada por 10 minutos a 200 g. Transcurrido este tiempo, se tomó el pellet del fondo con una pipeta Pasteur y se resuspendió en tubo eppendorf conteniendo 500  $\mu$ L medio FIV (Cuadro 5).

Cuadro 2. Preparación del medio de fertilización (FIV)

Ingrediente	Cantidad
Solución stock Fertilización Minitube 19990/0030 <sup>®</sup>	10 mL
Suero Albúmina Bovino EFAF	60 mg
Piruvato de sodio*	100 $\mu$ L
Heparina**	200 $\mu$ L
Esterilizar por filtración a 0.22 $\mu$ m. Equilibrar a 38 °C, 20% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> y humedad relativa a saturación (95%).	

\*1 mg en 5 mL DPBS.

\*\*20mg en 10 mL DPBS.

### Preparación de la solución hipo-osmótica (solución HOST)

Se utilizó la metodología propuesta por Campi *et al.* (2007): 490 mg de citrato de sodio tribásico dihidratado + 900 mg de fructuosa en 100 mL de agua. Se comprobó en el equipo Osmomat<sup>®</sup> la osmolaridad promedio de 100 mOsmol/L.

Luego, se diluyeron 100  $\mu$ L de semen resuspendido de cada tiempo de Percoll en solución FIV en 500  $\mu$ L de solución HOST en un tubo Eppendorf de 1.5 mL e incubar a 38.5 °C/60 minutos (Bedoya *et al.* 2003; Bernardi *et al.* 2011). Al cabo de una hora se colocó una gota bien mezclada en un portaobjetos y cubierta con cubreobjetos atemperados, se observó en el microscopio de contraste de fase a 40X, contando 200 espermatozoides como mínimo por placa y se determinó el porcentaje de espermatozoides con EP y EN, siendo la EP aquellos espermatozoides que presenten hinchazón o doblez de la pieza intermedia o enrollamiento de la cola; el porcentaje de espermatozoides que presentan EP fue el número de espermatozoides reaccionados al HOST dividido por el número de espermatozoides total contados en la misma placa.

### Coloración de eosina-nigrosina para viabilidad

Se utilizó la tinción o método de BLOM mezclando una gota de semen resuspendido + una gota de eosina 2% + una gota de nigrosina 10%, se mezcló suavemente durante 30 segundos, se colocó una gota fina y realizó un frotis en portaobjetos atemperado, observando a 20X-40X en los primeros 5 minutos. Se contaron como mínimo 200 espermatozoides, siendo los vivos aquellos que tienen la cabeza de color blanco (no teñidos) y los muertos o moribundos estará teñida de color rosa o rojo. Se considera un valor aceptable para viabilidad de  $\geq 70\%$  de espermatozoides vivos en semen fresco (Holy 1987).

### **Coloración Spermac® para morfología**

Se utilizó la coloración Spermac® de Minitube (Minitube 2016) la cual consta de tres colorantes y un fijador. Se realizó un frotis de cada muestra en placas porta objetos desengrasadas, los cuales fueron fijados durante 5 minutos, luego se lavó con agua destilada, se secó y sumergió durante 2 minutos en el colorante A, posteriormente se retiró la placa, lavó, secó y sumergió en la solución B durante 1 minuto, luego se lavó, secó y sumergió en la solución C durante 1 minuto, y nuevamente se lavó y secó en la platina a 38 °C por 5 minutos. La observación se realizó a 40X en el microscopio de contraste de fase, contando 200 espermatozoides por placa. De verde se tiñen los acrosomas y la zona ecuatorial de verde claro, mientras que en color rojo aparece el resto de la cabeza y tanto la cola como pieza intermedia presentarán un color verde oscuro. A medida que se hizo el conteo se clasificaron las anomalías en cabeza y cola. De acuerdo a Holy (1987) se considera un valor aceptable para una muestra seminal valores inferiores al 30% de anomalías.

### **Evaluación de la motilidad individual progresiva**

Para determinar este parámetro, se tomó una gota de semen resuspendido en medio FIV de cada uno de los tratamientos, se depositó en un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos, ambos a temperatura de 38.5 °C; para su evaluación se utilizó el microscopio de contraste de fase con observaciones a 20X. Se evaluaron de cada muestra seis campos ópticos. Para la valoración se utilizó la escala propuesta por Zemjanis (1987) la cual se presenta en el Cuadro 6.

Cuadro 3. Clasificación de la motilidad individual en eyaculados de bovino.

<b>Células móviles (%)</b>	<b>Valor descriptivo</b>	<b>Valor numérico</b>
80-100	Muy bueno	5
60-80	Bueno	4
40-60	Regular	3
20-40	Pobre	2
0-20	Muy pobre	1

Fuente: Zemjanis (1987).

### **Tratamientos**

Se aplicaron cuatro tratamientos:

- 1) Semen descongelado y centrifugado en gradiente de Percoll 45-90% durante 15 minutos
- 2) Semen descongelado y centrifugado en gradiente de Percoll 45-90% durante 10 minutos
- 3) Semen descongelado y centrifugado en gradiente de Percoll 45-90% durante 5 minutos
- 4) Semen descongelado (control)

Se analizaron las siguientes variables:

- Porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva (EP) y negativa (EN)
- Porcentaje de motilidad individual
- Porcentaje de viabilidad (vivos y muertos)
- Porcentaje de espermatozoides normales de cabeza y cola

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con cuatro tratamientos y dos repeticiones por tratamiento. Para el análisis de los datos se aplicó la prueba de Distribución de Frecuencias Chi-Cuadrado ( $\chi^2$ ) utilizando el programa estadístico “Statistical Analysis Systems” (SAS® 2012 versión 9.4), con un nivel de significancia exigido de  $P \leq 0.05$ .

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Endósmosis positiva y endósmosis negativa

Según López y Rivera (2015) la prueba de endósmosis celular (HOST) para semen fresco y poscongelado consiste en someter a los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, lo cual causa una entrada de agua al interior de la célula (cola) quedando hinchada y enroscada (Endósmosis Positiva EP). Para que esta respuesta se produzca la membrana plasmática debe estar íntegra. Los espermatozoides con daños o alteraciones físicas no experimentarán cambios en la forma del flagelo (Endósmosis Negativa EN). Rubio y Quintero (2008) indican en su investigación, que si se presenta un HOST con EP alto este está relacionado al porcentaje de espermatozoides con alta fertilidad *in vivo* e *in vitro* tanto del semen fresco como para el semen descongelado.

La Prueba HOST para este trabajo de investigación presentó diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los tratamientos (Cuadro 7) (Figura 1), siendo para la EP los tratamientos con tiempos de centrifugación, en la técnica de Percoll, de 15, 10 y 5 minutos los que presentaron los mejores resultados superando al control en 8.81, 10.8 y 8.52% respectivamente. Estos resultados en los tiempos de centrifugación se encuentran clasificados como muy bueno/excelente de acuerdo a López *et al.* (2014) quienes concluyen que un valor de EP superior a 71% se considera muy bueno/excelente, sin embargo, pese a que el control fue el que obtuvo el menor resultado, su valor es clasificado como bueno por estos mismos autores.

Cuadro 4. Valores porcentuales de endósmosis positiva (EP) y endósmosis negativa (EN) en espermatozoides bovinos sometidos a diferentes tiempos de centrifugación con la técnica de Percoll.

Tratamiento	Endósmosis Positiva		Endósmosis negativa	
	n	%	n	%
15 minutos centrifugación	1395	73.92 <sup>a</sup>	495	26.08 <sup>a</sup>
10 minutos centrifugación	1368	75.19 <sup>a</sup>	413	24.81 <sup>a</sup>
5 minutos centrifugación	1258	73.63 <sup>a</sup>	453	26.37 <sup>a</sup>
Control	1156	65.11 <sup>b</sup>	623	34.89 <sup>b</sup>
Probabilidad	0.0010		0.0010	
Coefficiente de variación	4.89		8.92	

n= número de espermatozoides contados

ab= valores en columnas con distinta letra, difieren estadísticamente entre sí ( $P \leq 0.05$ )

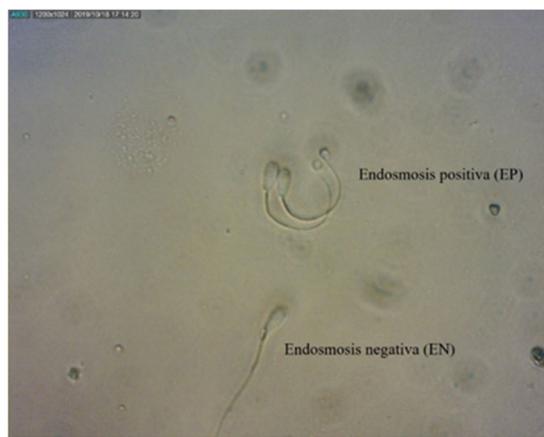


Figura 1. Espermatozoides con endósmosis positiva (EP) y endósmosis negativa (EN)

No hubo efecto del toro ( $P > 0.05$ ) en los valores de EP de acuerdo a los tratamientos (Cuadro 8), estando todos los toros con una clasificación entre bueno y muy bueno de acuerdo a López *et al.* (2014). Al no existir variabilidad entre los resultados de los toros, los resultados se atribuyen al efecto de los tratamientos.

Cuadro 5. Valores porcentuales de la endósmosis positiva (EP) por toro y de acuerdo a los tratamientos de centrifugación.

Tratamiento	% Endósmosis positiva		Probabilidad	CV%
	Toro 1	Toro 2		
15 minutos centrifugación	73.67	74.16	0.84	2.66
10 minutos centrifugación	74.94	75.45	0.83	4.42
5 minutos centrifugación	72.58	74.68	0.51	7.33
Control	63.52	66.71	0.30	3.64

CV%: Coeficiente de Variación

### Motilidad individual (MI)

La motilidad individual progresiva es la característica de viabilidad donde el espermatozoide normal presenta un movimiento lineal, progresivo (hacia adelante) y rápido mientras rota sobre su eje longitudinal (Saacke *et al.* 1988), por ello la motilidad es sólo uno de los muchos requisitos que ha de reunir un espermatozoide para ser capaz de fecundar a un ovocito, sin embargo, ha sido y todavía es el parámetro más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis de semen refrigerado o congelado. Los diferentes tipos de movimientos indican la viabilidad del espermatozoide, por consiguiente, los espermatozoides con un movimiento rectilíneo son considerados los más fértiles al momento de fecundar un óvulo y los que tienen movimiento circular, retroactivo y pendular son considerados menos fértiles por obvias razones (Muiño *et al.* 2006).

Las diferencias fueron significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los tratamientos (Cuadro 9), siendo el tratamiento control el que presentó la menor MI, siendo superado por los tratamientos de 15, 10 y

5 minutos de centrifugación en 22.5, 23.5 y 22% respectivamente. Estos resultados se atribuyen a que la técnica de los gradientes de Percoll tiene como principal objetivo separar los espermatozoides vivos de los muertos, anormales, restos celulares, detritos, diluyentes y crioprotectores, por tanto, las muestras procesadas bajo esta técnica presentarán en su mayoría espermatozoides vivos mientras que las muestras control tendrán en su contenido espermatozoides vivos, muertos, restos celulares y detritos entre otros. De acuerdo a Zemjanis (1987) el semen centrifugado durante 15, 10 y 5 minutos se clasifica con una MI “muy buena”.

### Viabilidad

La viabilidad hace referencia al número de espermatozoides vivos y muertos, por lo que se relaciona directamente con la fertilidad y con la motilidad tanto masal como individual, además este análisis permite medir la integridad de la membrana, por lo tanto, al momento de observar los espermatozoides en el microscopio cualquier disrupción en la membrana plasmática del espermatozoide es asociada como pérdida de la viabilidad espermática (De Leeuw *et al.* 1991). Según Morrel *et al.* (2013) la centrifugación es uno de los procesos que afecta la viabilidad de los espermatozoides y de acuerdo a Neira *et al.* (2007) la centrifugación puede generar diversas alteraciones. El aumento en el tiempo de centrifugación o en la fuerza gravitacional, puede disminuir la movilidad de los espermatozoides e incluso su calidad en general, debido a las fuerzas mecánicas asociadas (Restrepo *et al.* 2013).

Las diferencias fueron significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los tratamientos (Cuadro 9), siendo el tratamiento control el que presentó menor porcentaje de espermatozoides vivos y mayor porcentaje de espermatozoides muertos, no obstante las diferencias entre los tiempos de centrifugado 5, 10 y 15 minutos no presentaron diferencias significativas; las diferencias entre el control y los tratamientos se atribuye a que los tratamientos fueron expuestos a la técnica de Percoll 45-90%, la cual separa los espermatozoides muertos, restos celulares y otros detritos de los espermatozoides vivos, incrementando por lo tanto el porcentaje de espermatozoides vivos en las muestras con tratamiento; estos resultados difieren de Urrego *et al.* (2008) quienes demuestran que los espermatozoides con centrifugación y sin centrifugación no presentan diferencias significativas con respecto a su viabilidad.

Cuadro 6. Valores porcentuales de Motilidad Individual (MI) y viabilidad de espermatozoides bovinos sometidos a diferentes tiempos de centrifugación.

Tratamiento	% MI	Espermatozoides vivos		Espermatozoides muertos	
		n	%	n	%
15 minutos centrifugación	92.00 <sup>a</sup>	1590	71.32 <sup>a</sup>	638	28.68 <sup>a</sup>
10 minutos centrifugación	93.00 <sup>a</sup>	1720	71.42 <sup>a</sup>	685	28.58 <sup>a</sup>
5 minutos centrifugación	91.50 <sup>a</sup>	1793	73.56 <sup>a</sup>	643	26.44 <sup>a</sup>
Control	69.5 <sup>b</sup>	1505	56.63 <sup>b</sup>	1138	43.02 <sup>b</sup>
Probabilidad	<0.0001		<0.0001		<0.0001
Coeficiente de Variación	4.04		3.61		5.91

n= número de espermatozoides contados

ab= valores en columnas con distinta letra, difieren estadísticamente entre sí ( $P \leq 0.05$ )



Figura 2. La cabeza sin teñir representa los espermatozoides vivos, mientras que, en los muertos presentan una coloración roja.

Al evaluar la MI entre los toros y de acuerdo al tratamiento, no se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ), lo que significa que no hubo efecto toro, es decir que el comportamiento de un toro hubiese afectado los resultados del otro (Cuadro 10), por lo tanto, los resultados obtenidos en esta investigación se deben al tratamiento y no a un efecto del toro. Así mismo la clasificación del semen procesado a 15, 10 y 5 minutos de centrifugación se clasifica como muy bueno y el control como bueno acorde a lo recomendado por Zemjanis (1987); por otra parte Rosas (1997) concluye que una muy buena motilidad individual poscongelado debería ser  $\geq 45\%$ , estando todas las MI de los toros y tratamientos por encima de dicho valor.

Cuadro 7. Valores porcentuales de la motilidad individual (MI) entre los toros y por tratamiento de centrifugación

Tratamiento	% MI		Probabilidad	CV%
	Toro 1	Toro 2		
15 minutos centrifugación	92.00	92.00	1.00	4.09
10 minutos centrifugación	93.00	93.00	1.00	4.03
5 minutos centrifugación	91.00	92.00	0.54	3.76
Control	70.00	60.00	0.73	4.28

CV%: Coeficiente de Variación.

Igualmente, en los valores porcentuales de espermatozoides vivos tampoco hubo diferencias ( $P > 0.05$ ) entre los toros y de acuerdo al tratamiento (Cuadro 11). Estos resultados son mejores que los valores recomendados por Bedoya *et al.* (2003) quienes concluyen que la criopreservación causa la muerte y/o daños severos de hasta un 60% aproximado de las células espermáticas. Por otra parte los resultados entre los toros fue similar, lo que implica que no hubo un efecto del toro sobre los resultados y que éstos se deben a los tratamientos.

Cuadro 8. Valores porcentuales de la viabilidad de los espermatozoides entre los toros y por tratamiento de centrifugación.

Tratamiento	% Espermatozoides vivos		Probabilidad	CV%
	Toro 1	Toro 2		
15 minutos centrifugación	70.22	72.42	0.28	4.44
10 minutos centrifugación	72.95	69.90	0.12	3.88
5 minutos centrifugación	73.20	73.92	0.71	3.20
Control	57.33	56.63	0.75	2.14

CV%: Coeficiente de Variación.

### Morfología normal de cabeza y cola

El espermatozoide es una célula flagelada libre, altamente especializada que no crece ni se divide, su morfología es semejante en todas las especies de animales domésticos. Tiene tres partes fundamentales: cabeza, cuello y cola (Albarrán 1992). La cabeza de los espermatozoides contiene dos partes principales: el acrosoma, que es definido como el revestimiento interno de la cabeza del espermatozoide y posee la vital función de perforar la membrana del óvulo y así poder penetrarlo (Hidalgo *et al.* 2005), cabe señalar que cubre los dos tercios anteriores de la cabeza y el núcleo donde permanecen condensados los 30 cromosomas, es decir, la mitad de la información genética del futuro embrión. Esta parte es la única que entra al óvulo y, por ello, es la más importante y su función es fusionarse con el núcleo del óvulo para completar la dotación genética del nuevo ser.

En cuanto a la morfología de la cabeza, las diferencias encontradas no fueron significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos (Cuadro 12) (Figuras 3 y 4). Estos resultados demuestran que la técnica de centrifugación con Percoll desde 5 hasta 15 minutos no afecta la integridad de la cabeza del espermatozoide, cabe señalar que estos resultados difieren de Urrego *et al.* (2008) quienes reportan que, en espermatozoides bovinos, la centrifugación a 700 g por 10, 30 o 45 minutos con gradiente de Percoll, afecta al ADN y cuando se realiza por 45 minutos reduce la integridad de la membrana plasmática. Las diferencias entre los resultados de esta investigación y Urrego *et al.* (2008) se atribuyen al tiempo de centrifugación ya que estos últimos autores utilizaron 45 minutos.

Cuadro 9. Valores porcentuales de cabezas normales y anormales en espermatozoides bovinos sometidos a diferentes tiempos de centrifugación con la técnica de Percoll.

Tratamiento	Cabezas normales		Cabezas anormales	
	n	%	n	%
15 minutos centrifugación	1891	93.50	132	6.50
10 minutos centrifugación	1779	94.23	107	5.77
5 minutos centrifugación	1960	93.35	140	6.65
Control	1920	94.60	110	5.40
Probabilidad		0.09		0.09
Coeficiente de variación		3.72		20.26

n= número de espermatozoides contados

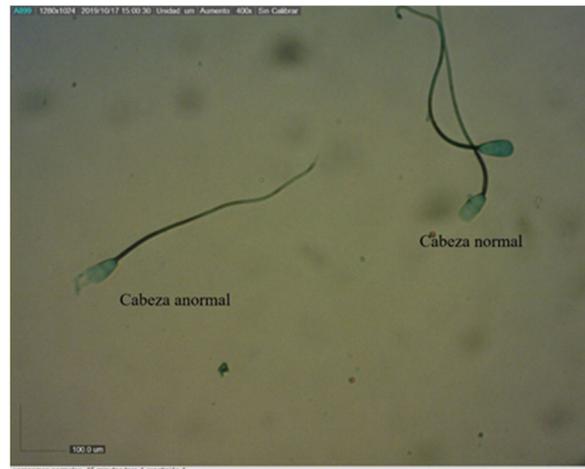


Figura 3. Cabeza anormal y cabeza normal

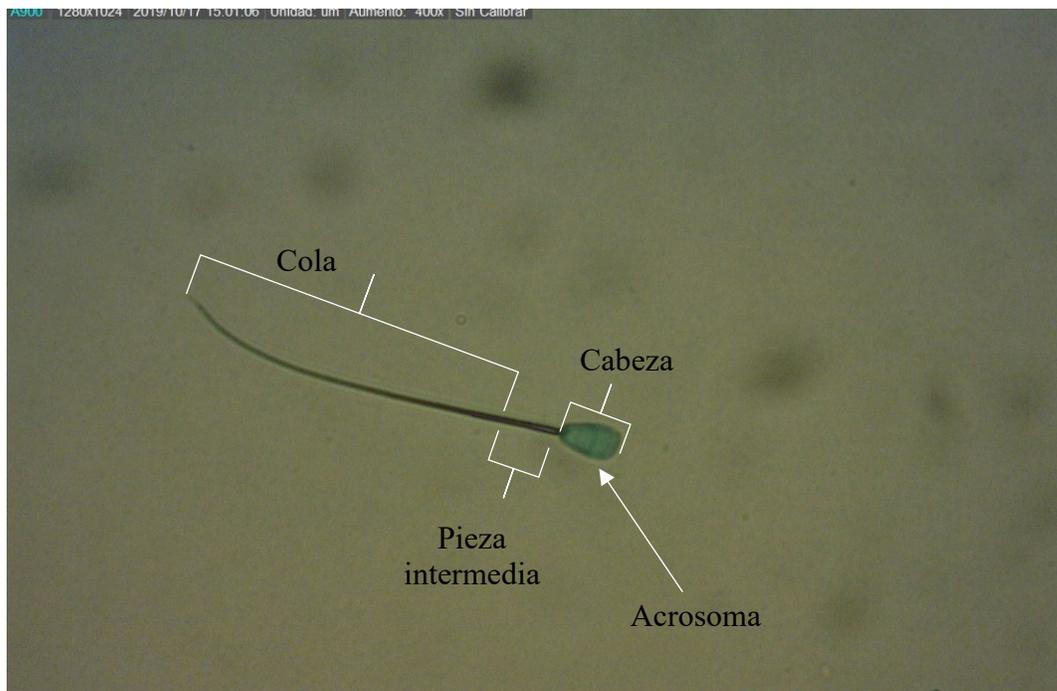


Figura 4. Estructura del espermatozoide: cola, pieza intermedia, cabeza, acrosoma

En los tratamientos control, 5 y 15 minutos de centrifugación no hubo diferencias ( $P > 0.05$ ), sin embargo, en el tratamiento de centrifugación a 10 minutos si hubo diferencias ( $P \leq 0.05$ ), las que se atribuyen a factores ajenos al estudio, ya que si el tiempo de centrifugación fuera el factor que afectó los resultados, esta diferencia se hubiese mantenido y posiblemente incrementado al pasar a un mayor tiempo de centrifugación como lo son 15 minutos (Cuadro 13). Sin embargo, todos los toros presentaron un porcentaje de cabezas normales superior al 92%, lo que de acuerdo a Holy (1987) se clasifican como excelentes.

Cuadro 10. Valores porcentuales de espermatozoides con cabezas normales entre toros y de acuerdo al tratamiento de centrifugación.

Tratamiento	% Cabezas normales		Probabilidad	CV
	Toro 1	Toro 2		
15 minutos centrifugación	94.99	92.00	0.12	6.11
10 minutos centrifugación	96.34 <sup>a</sup>	92.12 <sup>b</sup>	0.0056	2.03
5 minutos centrifugación	93.49	93.20	0.85	2.41
Control	94.94	94.25	0.56	2.90

ab= valores en filas con distinta letra, difieren estadísticamente entre sí ( $P \leq 0.05$ )

La cola del espermatozoide es una estructura flagelada fina y alargada, encargada del movimiento y metabolismo. Si bien se sabe la cola del espermatozoide es la porción que se encarga de proporcionarle el movimiento que este necesita para avanzar por el tracto reproductivo de la hembra; no obstante, este movimiento se da de forma que la cola de los espermatozoides utiliza muelles elásticos interconectados para transmitir información mecánica a partes distantes de la cola, ayudándola a doblarse y nadar (Albarrán 1992).

Las diferencias no fueron significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos (Cuadro 14) (Figura 5). De acuerdo a los resultados de esta investigación, los diferentes tiempos de centrifugado (15, 10, 5 minutos) no afectan la integridad de la cola de los espermatozoides bovinos.

Cuadro 11. Valores porcentuales de colas normales y anormales en espermatozoides bovinos sometidos a diferentes tiempos de centrifugación con la técnica de Percoll

Tratamiento	Colas normales		Colas anormales	
	n	%	n	%
15 minutos centrifugación	1707	85.61	291	14.39
10 minutos centrifugación	1928	89.34	232	10.66
5 minutos centrifugación	1763	86.03	287	13.97
Control	1103	85.02	193	14.98
Probabilidad		0.77		0.77
Coefficiente de variación		7.48		24.29

n= número de espermatozoides contados

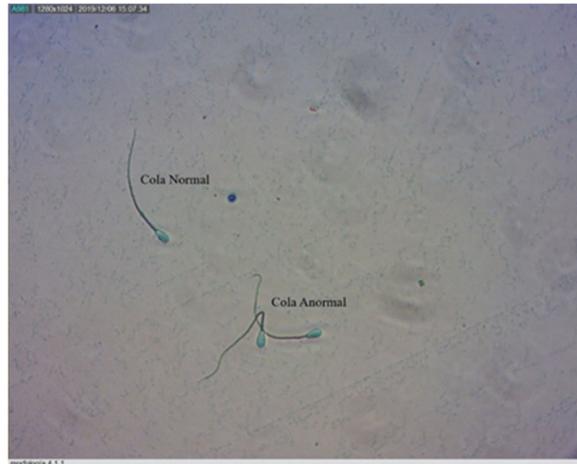


Figura 5. Colas normales y anormales

No hubo diferencias ( $P > 0.05$ ) entre los toros de acuerdo a los tratamientos, presentando valores por encima del 82% de colas normales, lo cual de acuerdo a Holy (1987) se clasifica como muy bueno, por lo tanto, se puede concluir que no hubo un efecto del toro sobre los resultados de esta investigación.

Cuadro 12. Valores porcentuales de espermatozoides con colas normales entre toros y de acuerdo al tratamiento de centrifugación.

Tratamiento	% Colas normales		Probabilidad	CV
	Toro 1	Toro 2		
15 minutos centrifugación	88.60	82.62	0.31	13.67
10 minutos centrifugación	89.86	88.82	0.74	2.95
5 minutos centrifugación	86.32	85.75	0.87	1.82
Control	85.27	84.77	0.88	5.07

### Correlaciones

En el Cuadro 16 se presentan las correlaciones de Pearson, en las cuales se encontró una correlación positiva entre MI y porcentaje de viabilidad; EP y MI; EP con viabilidad, por lo tanto, a mayor porcentaje de espermatozoides vivos y mayor MI, mayor será la EP lo que representará un semen de mejor calidad y mayor capacidad fecundante para realizar la IA o la FIV, esto implica la gran importancia que cobra una alta MI y viabilidad del semen pos congelado al momento de realizar los procesos de fecundación *in vitro*. Por otra parte, bajo las condiciones de esta investigación al correlacionar los diferentes tiempos de centrifugación con la técnica de Percoll con los parámetros seminales analizados, no se encontraron valores significativos, lo que implica que bajo las condiciones de este estudio, no hubo efectos deletéreos causados por los tiempos de centrifugación sobre los parámetros analizados.

Cuadro 13. Coeficientes de correlación.

<b>Parámetro</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Probabilidad</b>	<b>Coefficiente de correlación (r)</b>
Motilidad Individual	vivos	<0.0001	0.8264
Endósmosis Positiva	Motilidad Individual	<0.0001	0.7083
Endósmosis Positiva	vivos	<0.0001	0.6041

## 4. CONCLUSIONES

- Bajo las condiciones de este estudio los diferentes tiempos de centrifugado (5, 10 y 15 minutos) cuando se realiza el gradiente de Percoll 45-90% presentaron valores similares de endósmosis positiva (EP), por lo tanto, no afectan la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides bovinos.
- La motilidad individual, viabilidad y morfología de los espermatozoides bovinos fueron similares en los diferentes tiempos de centrifugación utilizados (5, 10 y 15 minutos) cuando se realiza el gradiente de Percoll 45-90%.
- La aplicación de cualquiera de los tiempos de centrifugación (5, 10 y 15 minutos) cuando se realiza el gradiente de Percoll 45-90% mejoran la endósmosis positiva, motilidad individual y la viabilidad en comparación con el grupo control, sin embargo, la morfología no se vio afectada.

## 5. RECOMENDACIONES

- Bajo las condiciones de este estudio, se recomienda la aplicación de tiempos de centrifugado para la técnica de Percoll 45-90% entre 5 y 15 minutos en el laboratorio de fertilización *in vitro* de Zamorano.
- Realizar estudios similares evaluando más tiempos de centrifugado.
- Realizar estudios similares evaluando toros de diferentes razas y edades.

## 6. LITERATURA CITADA

- Albarrán I. 1992. Reproducción zootécnica del macho. 1<sup>ed</sup>. La Habana (Cuba): Empresa Editorial Poligráfica Félix Varela. 272 p. 959-07-0001-2.
- Bedoya N, Vásquez N, Rivera M, Correa G, Trujillo E. 2003. Evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos mediante el test hipoosmótico (HOST). Revista de la Facultad Nacional de Agronomía de Medellín. 56(2): 1983–1997. doi:10.15446/rfnam
- Bernardi SF, Allende R, Mazzeo R, Monti J, Marini PR. 2011. Evaluación de los cambios ocasionados en espermatozoides bovinos por variaciones en el manejo de las dosis durante su manipulación en inseminación artificial. IN VET. [consultado 2020 Junio 3];13(2):25–38. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179122770004>.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. Biol Reprod. 27(1):147–158. eng. doi:10.1095/biolreprod27.1.147.
- Campi S, González L, Blasi C, Suhevic J, Bonet S, Cisale H. 2007. Comparación entre distintos tiempos de lectura en el test de endósmosis. [internet]. Buenos Aires, Argentina: Laboratorio de calidad seminal y criopreservación. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. [consultado el 16 de julio de 2020]. <http://www.laboratoriollamas.com.ar/wp-content/uploads/2012/08/Semen-porcino-test-de-endosis-2.pdf>.
- Cardozo C. 2000. Evaluación reproductiva y de fertilidad de toros, y su utilización para aumentar la eficiencia reproductiva en sistemas del trópico bajo, Regional. Ciencia y Agricultura. 11(2):10–15.
- Coetsee K, Kruger TF, Menkveld R, Lombard CJ, Swanson RJ. 1989. Hypoosmotic swelling test in the prediction of male fertility. Archives of Andrology. 23(2):131–138. doi:10.3109/01485018908986835.
- De Leeuws AM, den Dass JH, Woelders H. 1991. The fix vital stain method: simultaneous determination of viability and the acrosomal status of bovine spermatozoa. Journal of Andrology. 12(2): 112-118. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1711023/>.
- Duchens M. 1999. Examen de fertilidad para selección en toros de carne. Revista TecnoVet. [consultado el 14 de Agosto de 2020]; 5(2) [http://web.uchile.cl/vignette/tecnovet/CDA/tecnovet\\_articulo/0,1409,SCID%253D9752%2526ISID%253D460,00.html](http://web.uchile.cl/vignette/tecnovet/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9752%2526ISID%253D460,00.html)
- Hansen PJ. 2013. *In vitro* production of bovine embryos: P.J Hansen Laboratory. La Florida: Dept. of Animal Science, University of Florida. 47 p; [consultado el 03 de marzo de 2020]. [https://animal.ifas.ufl.edu/hansen/ivf\\_docs/University%20of%20Florida%20Bovine%20VP%20Manual%20ver%2010.16.2013.pdf](https://animal.ifas.ufl.edu/hansen/ivf_docs/University%20of%20Florida%20Bovine%20VP%20Manual%20ver%2010.16.2013.pdf).
- Hidalgo C, Tamargo C, Díez C. 2005. Análisis del semen bovino. [internet]. España: SERIDA. [consultado el 19 de julio de 2020]. <http://www.serida.org/pdfs/1495.pdf>.

- Hincapié JJ. 2019 La fertilización *in vitro* (FIV) en bovinos: una biotecnología reproductiva innovadora al servicio del mejoramiento genético. [internet]. Honduras: Blog de Investigación Zamorano; [consultado el 04 de septiembre de 2020]. <https://www.zamorano.edu/2019/03/13/la-fertilizacion-in-vitro-fiv-en-bovinos-una-biotecnologia-reproductiva-innovadora-al-servicio-del-mejoramiento-genetico/>
- Holy L. 1987. Biología de la reproducción bovina, Introducción al proceso del examen de la fertilidad de la hembra y el macho. Trad. R. Barnet. 2 ed. La Habana (Cuba): Ed. Científico-Técnica. 344 p.
- Iritani A, Niwa K. 1977. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *Journal of Reproductive Fertilization*. 50(1): 119–121. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0500119>.
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Zaneveld LJD. 1992. The hypoosmotic swelling test: an update. *Archive of Andrology*. 29(2): 105–116. doi:10.3109/01485019208987714.
- López AP, Tarazona AM, Giraldo CA, Mesa C, Cadavid DA, Echeverry DM, Penagos F, Álvarez JC, Bedoya JV, Ortíz LF, Arias MC, Olivera M, Gómez NA, Lenis YY, Ruiz ZT. 2014. Procedimientos para la evaluación de semen utilizado en la producción de embriones bovinos. En: Olivera M, Giraldo CA, editores. *Cultivo de tejidos reproductivos y producción y manipulación de embriones bovinos*. Medellín (Colombia): Fondo Editorial Biogénesis Universidad de Antioquia Facultad de Ciencias Agrarias. 95-107.
- López N, Rivera D. 2015. Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática en espermatozoides de toro. [Tesis]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. 28 p.
- Marizancén M, Artunduaga L. 2017. Mejoramiento genético en bovinos a través de la inseminación artificial y la inseminación artificial a tiempo fijo. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 8(2): 247-259.
- Minitube. 2016. Spermastain manual. Minitube GmbH, Germany. 34 p.
- Morrel JM, Winblad C, Georgakas A, Stuhmann G, Humblot P, Johannisson A. 2013. Reactive oxygen species in stallion semen can be affected by season and colloid centrifugation. *Animal Reproduction Science*. 140(1): 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.05.006>.
- Muiño R, Fernández M, Peña A. 2006. Parámetros cinéticos en eyaculados bovinos de toros de raza frisona y rubia gallega. *Revista ITEA*. 102(1): 55–66. <http://hdl.handle.net/10532/1178>.
- Monroy C. 2019. Efecto de la recongelación sobre la integridad de la membrana plasmática, acrosoma, viabilidad y motilidad individual en espermatozoides bovinos. [Tesis]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. 36 p.
- Neira JA, Ramirez GF, Leon SA, Moreno DA. 2007. Efecto de la asociación de la L-Glutamina-Etilenglicol en criopreservación de semen equino. *Revista Medica Veterinaria*. 1(14): 93-105. <https://ciencia.lasalle.edu.co/mv/vol1/iss14/7/>.
- Páez EM, Corredor ES. 2014. Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *Ciencia y Agricultura*. 11(2): 49-59. doi:10.19053/01228420.3837.

- Restrepo G, Usuga A, Rojano BA. 2013. Técnicas de evaluación para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino. *Revista CES Medicina Veterinaria Zootecnia*. 8(1): 69-79. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=321428109006>.
- Rosas J. 1997. Determinación de la calidad biológica del semen congelado. En: *Memorias del VI curso de actualización en reproducción animal*. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Tabasco, México. 25-31 pp.
- Rubio J, Quintero A. 2008. Uso de las pruebas de resistencia osmótica para valorar la funcionalidad espermática en toros. En: *Gonzales C, Madrid N, Soto E, editores. Desarrollo Sostenible de la Ganadería de Doble Propósito*. Maracaibo (Venezuela): Astro Data S.A. 618-625.
- SAS. 2012. *SAS User Guide: Statistics (version 9.4 ed.)*. Cary NC, USA: SAS Inst. Inc.
- Sreenan J. 1970. *In vitro* maturation and attempted fertilization of cattle follicular oocytes. *Journal of Agricultural Science*. 75(3): 393-396. doi: 10.1017/S0021859600025016
- Saacke RG, Nebel RL, Karabinus DS, Bame JH, Mullins J. 1988. Sperm transport and accessory sperm evaluation. *12th Tech Conf AI Repro*. 7-14.
- Urrego R, Ríos A, Olivera M, Camargo O. 2008. Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides bovinos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 21(1): 2-10
- Zemjanis, R. 1987. *Reproducción Animal. Diagnósticos y técnicas terapéuticas*. Trad. D. Pacheco. D.F. México. Ed. LIMUSA, S.A. 253 p.