

BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA: UNA ALTERNATIVA PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN ANIMAL

Hugo Gonzáles-Figueroa ¹
Hugo Mauricio Gonzáles Molfo

RESUMEN

La biotecnología reproductiva comprende una serie de biotécnicas que están permitiendo aumentar la eficiencia reproductiva y las tasas de mejoramiento genético de los animales contribuyendo de esta forma a desarrollar la producción del sector ganadero, conservar las especies en peligro de extinción, incrementar favorablemente la multiplicación y transporte de material genético así como, almacenar recursos genéticos únicos que puedan disponerse con relativa facilidad para su posible utilización futura.

De las biotécnicas actuales, por su importancia y aplicación, sería necesario impulsar el desarrollo de: la inseminación artificial, la recolección de ovocitos, maduración y fecundación *in vitro*, la transferencia de embriones, el sexaje y el clonado. Para conseguir objetivos concretos a mediano plazo se necesita, además, promover las ciencias básicas de estas tecnologías de manera que sean comunes en las especialidades biológicas que permitan estandarizar técnicas y protocolos adecuados para su absorción y transferencia en programas nacionales de producción animal.

Palabras Claves: *Biotecnología reproductiva, biotécnicas, producción animal*

SUMMARY

Reproductive biotechnology comprise a biotechnics set that are permitting to increase the reproductive efficiency and the rates of genetic improvement of the animals, contributing in this approach to develop the production of livestock sector, to conserve species in extinction danger, to enhance favorably multiplication and transportation of genetic material as well as, to store unique genetic resources that can be arranged with relative facility for their possible future utilization.

Of there biotechnics, by its importance and application, would be necessary to improvement: artificial insemination, oocytes harvesting, superovulation and *in vitro* fertilization, embryos transfer, sex gametes and cloned. To obtain concrete objectives to medium time limit is needed, besides, to promote the basic sciences of these technologies so that be common in the biological specialties that to set a high standard technical and adequate protocols for their absorption and transfer in national programs of animal production

Key words: *Reproductive biotechnology, biotechnics, animal production*

¹ Laboratorio de Biología del Desarrollo, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma; e-mail:hgonzales@mail.urp.edu.pe

INTRODUCCIÓN

Los rápidos avances en la biología reproductiva proporcionan nuevos y eficaces instrumentos para seguir innovando. Sin embargo existe el riesgo que la investigación y el desarrollo de estas biotecnologías no atiendan las necesidades de los países en desarrollo, a pesar de que albergan a la mayoría de la población así como a la mayor diversidad de animales que viven en el mundo. Siendo Perú un país marginal en este campo, es necesario difundir las biotecnologías que se emplean actualmente o las que probablemente se utilizarán en breve en la zootecnia, que sean idóneas para llevar a cabo la mejora necesaria de la producción animal en el país e identificar los factores que influyen en la transferencia, adaptación y adopción de las mismas.

Las biotécnicas actuales tienen importancia por sí mismas y además sirven como herramientas en la aplicación de otras con mayor innovación. Por ejemplo la inseminación artificial (IA) es indispensable para los programas de superovulación y transferencia de embriones y esta última es necesaria para la producción *in vitro* de embriones y para la clonación animal (Palma & Gottfried, 2001).

CRIOPRESERVACIÓN

La criopreservación es el proceso de congelar muestras para reducir su actividad metabólica y mantenerlas a temperaturas muy bajas durante tiempos prolongados, preservando al mismo tiempo su viabilidad. Las células se mezclan con soluciones «crioprotectoras» especiales y luego son almacenadas en nitrógeno líquido a -196°C en tanques especiales hasta el momento en que serán utilizadas. Posibilita almacenar espermatozoides, ovocitos y embriones de una amplia variedad de especies animales, domésticas y silvestres, sin que pierdan su capacidad de desarrollar y nacer vivos (Cabodevila & Teruel, 2001). El almacenamiento de semen, ovocitos y embriones en bancos de recursos genéticos permite mantener la variabilidad genética de una especie indefinidamente, lo que representa un seguro de vida para muchas especies.

De esta manera, el semen de los machos que se almacena congelado en estos bancos se puede utilizar durante muchos años después de la muerte del animal. La criopreservación de gametos permite además, reducir considerablemente el número de individuos necesarios para mantener una población viable y, por lo tanto, reducir las necesidades de espacio que se requieren para el manejo reproductivo de una especie.

Actualmente todas las biotécnicas reproductivas utilizan la criopreservación como una herramienta indispensable, la inseminación artificial la emplea desde el año de 1965, de manera que aquellos rasgos de machos con alto valor genético han podido ser transmitidos a una numerosa descendencia a través de un número muy grande de hembras inseminadas (Vishwanath 2003). La criopreservación de espermatozoides así como la preservación de la capacidad fecundante de los mismos, han sido descritas como exitosas en varias especies de animales domésticos y silvestres. No obstante estos antecedentes, se debe considerar que los espermatozoides experimentan daño durante el proceso de congelación y descongelación. Se ha descrito que semen con alto porcentaje de espermatozoides móviles, viables y morfológicamente normales, al ser sometido a técnicas corrientes de criopreservación experimentan una reducción de la motilidad espermática, fenómeno que se asocia con modificaciones en el metabolismo celular y daños en la membrana espermática, un aspecto fundamental en el uso de semen congelado/descongelado en técnicas de biotecnología reproductiva lo constituye la adecuada evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides (Sánchez et al., 2002).

Existen actualmente diversos métodos de criopreservación.

La refrigeración o preservación hipotérmica, es el más simple y permite mantener gametos y embriones a temperaturas entre 0 y 4°C durante 24 a 72 horas, siendo un paso intermedio entre la recolección de embriones en fresco (recién recolectados) y su transferencia. Al respecto, es importante resaltar que se ha logrado mantener caudas de epidídimo de

cuya a 4°C, cuya supervivencia espermática se prolongó hasta 11 días inclusive sin una pérdida de la capacidad fértil (Gonzales-Figueroa, 1988)

La congelación convencional, es un proceso físico-químico complejo, de intercambio de calor y agua entre las células y el medio externo, que culmina en un cambio de fase líquida a sólida. Los gametos y/o embriones alcanzan su equilibrio osmótico antes de comenzar el descenso de la temperatura y lo mantienen durante el enfriamiento. Esto, se lleva a cabo lentamente permitiéndole a los gametos o embriones ceder agua en respuesta al incremento gradual de la concentración de la solución extracelular. Además los gametos o embriones son congelados y descongelados de manera muy rápida, siendo necesario deshidratarlos parcialmente antes de su congelación a fin de evitar la formación de cristales de hielo que lesionan las células. La deshidratación parcial de las embriones se logra incorporando un agente crioprotector al medio de congelación (Schneider y Mazur 1984).

La vitrificación es un proceso físico de solidificación utilizado para conservar órganos, tejidos, embriones y gametos. La solución vitrificante lleva incorporado crioprotectores en alta concentración. Al ser enfriada no cristaliza, sino que se torna viscosa y pasa del estado líquido a un estado sólido no estructurado similar al vidrio, tomando de ahí su nombre. Todo el procedimiento desde el equilibrio hasta la inmersión en NL no requiere más de 10 minutos (Rall y Fahy, 1985). Esta alternativa de la criopreservación no necesita de equipos costosos de congelación, además este método elimina la formación de cristales de hielo intra y extra celular que son letales para las células, y sobre todo por que se puede utilizar directamente en terreno para programas de transferencia embrionaria. La vitrificación ha sido utilizada exitosamente como método de congelación de ovocitos y embriones de diversas especies, entre las que se pueden señalar: roedores (Kasai et al., 1990), ovinos (Schiewe et al., 1991), bovinos (Vatja et al., 1997) entre otros.

La criopreservación puede reducir los costos y ampliar el número de especies beneficiarias en programas de reproducción asistida. Esto es particularmente importante cuando se trabaja con grandes mamíferos que necesitan disponer de espacios amplios en los programas de cría en cautiverio o en los zoológicos, lo que hace que su mantenimiento sea muy costoso. Las razones enunciadas convierten a la criopreservación en una herramienta insustituible en la aplicación de la transferencia embrionaria, por ejemplo (Cabodevila & Teruel, 2001).

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

La inseminación (IA) artificial o la introducción del semen en el tracto genital de una hembra, a través de algún instrumento, es la mas antigua de la mayoría de biotécnicas actuales que se usan en la reproducción asistida de animales y humanos (Chupin & Thibier, 1995). Es interesante resaltar tanto las observaciones de Spallanzani en 1784, relacionadas a la influencia de la temperatura en la congelación de espermatozoides, así como las realizadas por Ivanoff en 1922, sobre métodos para colectar semen e inseminar yeguas, vacas, ovejas y cerdas. Colectaba el semen introduciendo una esponja en la vagina de la yegua antes del apareo natural, y esta esponja impregnada con semen la utilizaba para inseminar otras hembras. Mucho del trabajo de Ivanoff fue tomado por Milovanov, él primer diseñador de una vagina artificial, en 1938, y de otros artículos parecidos a los que se utilizan hoy en día (Verberckmoes et al, 2004). La primera inseminación artificial con fines comerciales fue llevada a cabo en 1936 por Sorenson (Foote 2002). En un primer momento, la inseminación artificial en animales de granja se introdujo por razones sanitarias. Otra gran ventaja de la inseminación artificial en estos animales es la dispersión rápida de genes inmejorables y la capacidad de optimizar la calidad genética del ganado, la reducción de un número considerable de genes letales y además el empleo de dosis mínimas de semen sin disminuir la tasa de fecundidad (Watson 1990). La introducción de la IA en porcinos, en la industria de

aves caseras y en conejos, tuvo como resultado una mejora rápida de la calidad de la carcasa, y permitió la expansión y la especialización de establecimientos de crianza (Singleton, 2001).

Actualmente, la IA se realiza en casi todos los animales de granja: vacas, yeguas, ovejas, cabras, cerdas, conejas, pollos, pavos entre otros. Sin embargo, las mejoras tecnológicas de esta biotécnica provienen mayoritariamente del éxito obtenido en la producción de vacas lecheras (Vishwanath 2003). Durante la última década, el uso de la IA en la producción de ganado porcino ha aumentado considerablemente de 5% en 1990 hasta aproximadamente 60-70% en el año 2000, sin embargo en relación al ganado vacuno, raramente se utiliza semen congelado (Singleton, 2001).

En este contexto, la inseminación artificial disminuye y/o elimina enfermedades sexuales, permite el uso intensivo de machos con un alto valor genético, el transporte rápido del semen a diferentes lugares y también aumenta la eficiencia de estimación del valor genético.

A escala mundial se realizan anualmente más de 100 millones de inseminaciones artificiales en vacunos, 40 millones en cerdos, 3,3 millones en ovejas y 0,5 millones en cabras. Son muy pocos los países en desarrollo donde se practica la inseminación artificial en una escala que repercute considerablemente en la producción ganadera (Ruane & Zimmermann, 2003). En el Perú sólo entre el 3 y 4% de las vacas en producción son inseminadas artificialmente, siendo los mayores demandantes los productores de las principales cuencas lecheras del país que manejan ganadería intensiva y semi extensiva. Existe interés por consolidar una Red Nacional de Postas de Inseminación Artificial, autogestionarias y sostenibles, bajo un esquema empresarial, que permita brindar el servicio con mayor efectividad. Independiente del sector público, cada posta cuenta con el apoyo efectivo de las Municipalidades, Asociaciones de Productores Ganaderos, Direcciones Regionales Agrarias y Empresas Privadas. El Ministerio de Agricultura y el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura en el Perú (IICA) entregaron

en el mes de enero del año en curso equipos (1 moto, 2 tanques criogénicos, 1 maletín de inseminación y 3 teléfonos celulares) iniciando una primera etapa de reactivación de 20 postas, ubicadas en los departamentos de Puno, Cusco, Ica, Moquegua, Tacna y Lima. En otros países la técnica de Inseminación Artificial es una metodología adoptada por muchos ganaderos, quienes encuentran en ella el medio más barato y factible para el mejoramiento de sus hatos ganaderos.

SINCRONIZACIÓN E INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN

El conocimiento de los mecanismos involucrados en el control del ciclo estral (de la ovulación, de la función luteal, de la dinámica folicular, etc.) dan las bases para comprender y establecer métodos eficientes de sincronización del celo, así como también la superovulación, es decir los tratamientos que aumenten el número fisiológico de ovulaciones (Callejas, 2001)

La determinación del momento ideal para la inseminación en mamíferos de granja es muy importante. En general, el momento correcto de la inseminación en vacas es a las 12 horas después del comienzo del estro (Hunter & Greve, 1997). Sin embargo, como la detección del estro no es siempre fácil, la determinación del momento ideal de la inseminación se dificulta. Es necesario disponer de hembras receptoras en un momento muy preciso y conocido del ciclo estral cuando se procede a la transferencia de embriones recientemente colectados o producidos *in vitro* o que han sido previamente obtenidos y congelados (Van Eerdenburg et al, 1996).

Actualmente, usando el método de hisopado vaginal, estamos logrando la detección del celo en hembras de cuy. Los resultados preliminares indican que el ciclo estral en esta especie presenta tres estados visibles al microscopio: diestro (336 horas), proestro (14 horas) y estro (8horas).

RECOLECTA DE OVOCITOS Y MADURACIÓN

La recolecta de ovocitos en mamíferos, permite extraer repetidas veces

ovocitos inmaduros directamente del ovario sin consecuencias de importancia para la hembra donante y utilizar esos ovocitos en programas de maduración y fecundación *in vitro*. Al hacer un uso mucho mayor de hembras genéticamente valiosas en una edad muy temprana se puede acelerar considerablemente el progreso genético. La recolecta *in vivo* recibe el nombre de punción folicular (ovum pick up) y su uso se está incrementado sobretodo en programas de transferencia embrionaria (Palma, 2001). La recolecta de ovocitos también se puede hacer de ovarios de hembras en mataderos. Los complejos cúmulo-ovocito (COCs) son seleccionados y madurados *in vitro* en medios adecuados, para luego ser usados en programas de fecundación *in vitro*, transferencia de embriones o de clonado.

Esta ampliamente aceptado, que la maduración del ovocito *in vitro* tiene éxito cuando está rodeado del cúmulo, lo que indica que existiría alguna relación estructural y funcional entre cúmulo y ovocito. Al respecto, se ha comprobado que el piruvato, presente en un medio de maduración, juega un rol bifuncional en la maduración *in vitro* de ovocitos de cerda, como antioxidante y como sustrato necesario para el metabolismo oxidativo. (Gonzales-Figueroa & Gonzales-Molfino, 2005)

FECUNDACIÓN IN VITRO

El descubrimiento de la «capacitación espermática» en mamíferos (Austin, 1951., Chang, 1951), marcó el comienzo de una gran cantidad de estudios tendientes a comprender el complejo fenómeno de la fecundación en mamíferos y de los mecanismos que la preceden. El concepto de «capacitación», es usualmente aceptado como la fase o las fases que preceden a la reacción del acrosoma y que promueve alteraciones en los patrones de motilidad; ambos mecanismos son requeridos para que la fecundación tenga éxito (Yanagimachi, 1988). Por otro lado la sincronización de la superovulación hace posible coleccionar ovocitos maduros que interaccionen con espermatozoides en sistemas *in vitro*. Actualmente se utilizan diferentes sistemas

donde ocurre fecundación *in vitro*, de una gran variedad de especies, con un éxito relativo.

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

La transferencia de embriones en especies de mamíferos, promovido mediante la ovulación múltiple y trasplante de embriones (OMTE), permite acelerar el progreso genético gracias a una mayor intensidad de la selección de hembras, y la congelación de los embriones facilita el transporte a bajo costo de material genético entre continentes, así como la conservación de genomas diploides. La OMTE puede utilizarse para producir hembras de reposición de razas cruzadas manteniendo únicamente un pequeño número de animales de razas puras. En 1998, se practicaron en todo el mundo 440 000 trasplantes de embriones en vacunos, 17 000 en ovejas, 1 200 en cabras y 2 500 en yeguas (Ruane & Zimmermann, 2003). El éxito de este procedimiento puede ser precedido de fracasos como consecuencia de manipulaciones inadecuadas que conducen a infecciones y contracciones uterinas y, en consecuencia a la pérdida de la gestación. Para evitar los errores y efectos traumáticos por impericia se describe el procedimiento teniendo en cuenta el lugar, anestesia y material adecuados (Cabodevila, 2001). A pesar de los beneficios potenciales del trasplante de embriones, su aplicación se limita en gran medida a los países desarrollados.

SEXAJE

Las tecnologías para sexar embriones de forma rápida y fiable permiten generar únicamente ejemplares del sexo deseado en puntos específicos de un programa de mejoramiento genético, lo que reduce considerablemente el número de animales necesario y acelera el progreso genético. La separación de dos poblaciones espermáticas X/Y altamente purificadas, en base a su contenido de ADN, se ha conseguido realizar de forma reproducible mediante técnicas citométricas, sin embargo aun las tasas de separación siguen siendo

limitadas, incluso en el caso de la fecundación *in vitro*. Estas son algunas cuestiones que todavía faltan resolver para que pueda ser aplicada con la eficacia deseada (Cantarelli Pegoraro. & Vera, 2001).

CLONADO

La maduración y fecundación *in vitro* permite obtener a bajo costo los numerosos embriones que son necesarios para biotecnologías como la clonación y el transgenismo. Se pueden distinguir tres tipos diferentes de clones, según se obtengan mediante: la división limitada de un embrión (los clones son genéticamente idénticos); la introducción de una célula embrionaria en una zona enucleada (los clones pueden diferir en su herencia citoplásmica) y la introducción del núcleo de una célula somática, tras haber invertido la quiescencia del ADN, en una zona enucleada (los clones pueden diferir en su herencia citoplásmica, y probablemente se conoce ya bastante bien el fenotipo del progenitor que proporciona la célula somática). La clonación se utilizará para multiplicar animales fundadores transgénicos. Las tecnologías de la clonación ofrecen posibilidades como instrumentos de investigación y en esferas con un rendimiento potencial muy alto. La toma de muestras de tejido somático puede facilitar la recopilación y transferencia de muestras de razas de zonas remotas con fines de conservación (Alberio. & Zakhartchenko, 2001)

Para insertar estas biotécnicas en el Sistema Nacional de Innovación Tecnológica se necesitan hacer esfuerzos diversos.

En primer lugar, no es posible concebir la puesta en marcha de un avance tecnológico sin disponer de los sólidos cimientos que aportan las ciencias básicas por separado, esto significa que es necesario entender la naturaleza de la biotecnología reproductiva ligada al conocimiento de la biología reproductiva. Esta última, debe ser aprendida en los primeros ciclos de la carrera profesional de manera que en los últimos ciclos se puedan iniciar talleres, a través de los cuales los estudiantes consigan, por lo menos, las

habilidades primordiales que necesitan cada una de estas biotécnicas. Es decir la investigación básica en esta etapa de formación profesional es muy importante y no debe descuidarse porque es la única forma de iniciar la formación de recursos humanos, los que con especializaciones de post grado constituirían la «masa crítica» necesaria, capaz de absorber y adaptar la tecnología actualizada a nivel mundial.

En segundo lugar, habría que mantener la «masa crítica» en vía de formación dándole las condiciones laborales y equipos de laboratorios adecuados, constituir redes de biotecnológica reproductiva a nivel nacional, de manera que pueda ocurrir una real transferencia de la tecnología extranjera. Esto daría lugar a que, en un futuro mediato se pueda contar con tecnología nacional propia por lo menos de algunas de las biotécnicas señaladas.

Por último, es necesario difundir estas biotecnologías, en todos los ámbitos, para que se conozca la naturaleza de las mismas y sus beneficios en el progreso de la agroindustria, teniendo en cuenta que el Perú del 2025 tendrá 35 500 000 de pobladores, de los cuales 61,4% serán personas entre 15 y 64 años y 33,7% entre cero a 14 años.

LITERATURA CITADA

- ALBERIO, R. y ZAKHARTCHENKO, V. 2001. Clonación de animales de interés zootécnico. En Biotecnología de la Reproducción (ed. Palma, G.) Ed. INTA. Balcarce. Argentina. p. 353-385
- AUSTIN, CR. 1951. Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Aust J Scie Res. 4:581-596
- CABODEVILA, J. 2001. Programa de transferencia de embriones. En Biotecnología de la Reproducción (ed. Palma, G.) Ed. INTA. Balcarce. Argentina p.27-35
- CABODEVILA, J. y TERUEL, M. 2001. Criopreservación de embriones bovinos. En Biotecnología de la Reproducción (ed. Palma, G.) Ed. INTA. Balcarce. Argentina. p. 149-167
- CALLEJAS, S. 2001. Fisiología del ciclo estral. En Biotecnología de la

- Reproducción. (Ed. Palma, G.) Ed. INTA. Balcarse. Argentina. p. 37-53
- CANTARELLI Pegoraro, LM. y VERA, FM. 2001. Selección del sexo. En Biotecnología de la Reproducción (ed. Palma, G.) Ed. INTA. Balcarse. Argentina. p.317-345
- CHANG, MC. 1951. The fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the Fallopian tubes. *Nature* 168: 697-698
- CHUPIN, D. y THIBIER, M. 1995. Survey of the present status of the use of artificial insemination in developing countries. *World Anim Rev* 82, 58-68.
- FOOTE, RH. 2002. The history of artificial insemination: selected notes and notables. *Am Soc Anim Sci*, 1-10.
- GONZALES-Figueroa, H. 1988. Análisis de la capacidad fértil del esperma-tozoide de cuy en función a la estabilidad territorial de la cauda del epi-dídimo. UNMSM. Tesis doctoral p.141
- GONZALES-Figueroa, H. y GONZALES-Molfino, HM. 2005. Maturation of pig oocytes in vitro in a medium with pyruvate. *Braz J Med Biol Res*, 38 (6): 869-872.
- HUNTER, RH. y GREVE, T. 1997. Are lower fertility bulls necessarily less fertile? Proposals concerning insemination procedures. *Anim Reprod Sci* 48, 113-121.
- PALMA, G. 2001. Recolección de embriones. En Biotecnología de la Reproducción (ed. Palma G). Ed. INTA. Balcarse. Argentina. p.109-124.
- PALMA, G. y BREM, G. 2001. Biotecnología de la Reproducción. En Biotecnología de la Reproducción (ed. Palma G). Ed. INTA. Balcarse. Argentina. p. 1-14
- RALL, W F. y FAHY, GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by *vitrification* *Nature* 313: 573-575.
- RUANE, J. y ZIMMERMANN, M, 2003. Idoneidad, importancia y aplicación de opciones biotecnológicas En La ganadería de los países en desarrollo. En: Biotecnología Agrícola para Países en Desarrollo ed. FAO p 37-53
- SÁNCHEZ, A.; RUBILAR, J. y GATICA, R. 2002. Uso de la prueba hipoosmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado. *Arch. med. vet.*34 (1):131-134
- SCHNEIDER, U. y MAZUR, P. 1984. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 21: 70-79.
- SCHIEWE, M.; RALL, WF.; STUART, LD. y WILDT, DE. 1991. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and in situ dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. *Theriogenology*. 36: 279-293.
- Singleton, WL. 2001. State of the art in artificial insemination of pigs in the United States. *Theriogenology* 56, 1305-1310.
- VAN EERDENBURG, FJ.; LOEFFLER, HS.; VAN VLIET, JH.; 1996. Detection of oestrus in dairy cows: a new approach to an old problem. *Vet Q* 18, 52-54.
- VERBERCKMOES, S.; VAN SOOM, A. y DE KRUIF, A. 2004. Intra-uterine Insemination in Farm Animals and Humans. *Reprod Dom Anim* 39, 195-204
- VAJTA, G.; BOOTH, PJ.; HOLM, P.; KUWAYANA, M.; BOOTH, PJ.; GREVE, T. y CALLENSSEN, H. 1997. Successful vitrification of early bovine in vitro produced embryos with the open pulled straws (OPS) method. *Cryoletter* 18: 191-195
- Vishwanath, R. 2003. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology* 59, 571-584.
- VISHWANATH, R. y SHANNON, P. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci* 62, 23-53.
- WATSON, PF. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. In: Lamming GE (ed.), *Marshall's Physiology of Reproduction*. Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 747-869. ^
- YANAGIMACHI, R. 1988. Mammalian Fertilization. In: Knobil E, Neill J, eds. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, Ltd. New York. p.135-185.