

Adición del glutatión reducido al diluyente de semen de borrego durante la conservación (5°C)

Alfredo Trejo Córdova¹, Sergio Ramírez Ordoñez²,
Víctor Manuel Meza-Villalvazo³, Ismael Abad Benítez⁴

Departamento de Biología de la Reproducción.
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México

Addition of reduced glutathione to diluent of lamb semen during storage (5 °C)

Abstract. The objectives were: first, determine a recommended concentration of GSH to be used during cooling of sheep semen to 5°C; and second, evaluate the effects of GSH on the acrosome integrity and sperm capacitation. Experiment 1, 12 ejaculates from two Pelibuey rams were used. Each ejaculate was divided into four aliquots corresponding to the GSH concentrations tested (0.0, 0.5, 1.0 and 5 mM). Aliquots were stored under refrigeration (5°C) for 24 h. Live sperm motility was evaluated at 0, 1, 2 and 24 h of storage and at 24 h after warming to 37°C (reactivation). Experiment 2, 22 ejaculates were evaluated by the technique of chlortetracycline sperm capacitation after 24 h storage at 5°C. At 0, 1, and 2 h of storage there were no significant differences between sperm motilities using different concentrations of GSH. At 24 h, 5 mM GSH showed the highest sperm motility (29.22%). This concentration also had the highest percentage of motility during reactivation (80.29%) and live sperm concentration, 81.44% (p <0.05). The percentage of non-capacitated and acrosome intact sperm increased to 42% when 5 mM GSH (p <0.05) was used. It is concluded that the antioxidant and protective activity of GSH during cooling is dependent on concentration and storage time.

Keywords: Antioxidant, Preservation, Semen, Sheep

Resumen. Los objetivos fueron: primero, determinar la concentración más recomendable de GSH a ser utilizada durante la refrigeración a 5 °C del semen de ovino y segundo, evaluar los efectos del GSH en la integridad acrosomal y capacitación espermática. Experimento 1. Se utilizaron 12 eyaculados de dos sementales de la raza Pelibuey. Cada eyaculado fue dividido en cuatro alícuotas correspondientes a las concentraciones de GSH evaluadas (0.0, 0.5, 1.0 y 5 mM). Las alícuotas se almacenaron en refrigeración (5°C) durante 24 h. La evaluación de la motilidad y espermatozoides vivos se realizó a las 0, 1, 2 y 24 h de almacenamiento. A las 24 h, se evaluó la motilidad espermática a 37°C (reactivación). Experimento 2, se utilizaron 22 eyaculados. A través de la técnica de clortetraciclina se evaluó la capacitación espermática después de 24 h de almacenamiento a 5 °C. A 0, 1 y 2 h de almacenamiento no hubo diferencias significativas entre motilidades espermáticas al usar las diferentes concentraciones de GSH. A las 24 h, GSH 5 mM mostró el significativamente mayor motilidad espermática (29.22%). Esta concentración también tuvo el mayor porcentaje de motilidad durante la reactivación (80.29%), y de espermatozoides vivos, (81.44%) (p<0.05). El porcentaje de espermatozoides no capacitados y con acrosoma intacto se incrementó a 42% cuando se utilizó el GSH 5 mM (p<0.05). Se concluye que la actividad antioxidante y protectora del GSH durante la refrigeración es dependiente de concentración, tiempo y almacenamiento.

Palabras clave: Antioxidante, Conservación, Ovino, Semen

Recibido: 2016-09-13 Aceptado: 2017-02-14

¹ Autor para la correspondencia: Alfredo Trejo Córdova atrejo109@hotmail.com

² Licenciatura en Zootecnia. Universidad del Papaloapan Campus Loma Bonita.

³ Instituto de Biotecnología. Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec.

⁴ Maestría en Biotecnología. UNPA campus Tuxtepec.

Introducción

La metodología más utilizada cuando se desea conservar semen en forma líquida por periodos no mayores de 24 h es mediante la refrigeración a 5 °C, proceso con el cual se obtiene una reducción en la motilidad y actividad metabólica. Esta reducción en la motilidad puede restablecerse a niveles casi normales cuando los daños producidos por el choque térmico son mínimos (Vivanco, 1998). Cuando el semen es conservado a temperaturas cercanas a los 0 °C, se debe tener en cuenta que los espermatozoides se someten a un choque térmico, lo cual puede causar cambios irreversibles en la célula espermática (Salamon y Maxwell, 2000), como son deshidratación, distorsión de la membrana, formación de cristales intracelulares y estrés oxidativo. Uno de estos cambios que ocurren durante la criopreservación está relacionado con la inducción de la capacitación espermática. En cuanto al estrés oxidativo, es causado por un incremento en la producción de especies oxígeno reactivas o ROS (por sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species) (Fraczek y Kurpisz, 2005). Sin embargo, los espermatozoides

están equipados con sistemas antioxidantes para contrarrestar los efectos tóxicos de las ROS (Hicks *et al.* 2006). Membrillo *et al.* (2003) indicaron que el glutatión reducido (GSH) es un agente antioxidante que está presente en el ambiente que rodea al espermatozoide. Los resultados del uso de GSH como antioxidante y crioprotector son variados en cuanto a la concentración utilizada. Por ejemplo, en el ciervo rojo se ha utilizado concentraciones de 1 y 5 mM de GSH durante la congelación de semen (Anel-López *et al.* 2012). Gadea *et al.* (2011) obtuvieron resultados similares para la criopreservación de semen humano. Por su parte, Munsí *et al.* (2007) señalaron que una concentración de 0.5 mM mejora la motilidad espermática cuando los eyaculados de toro son almacenados a 5°C. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar la concentración óptima a ser utilizada durante la refrigeración a 5°C del semen de ovino y cuantificar los cambios relacionados con la capacitación espermática cuando el semen es refrigerado, así como su efecto en la motilidad y en el número de espermatozoides vivos.

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron dos sementales de la raza Pelibuey con una edad de 2.5 años de edad y una condición corporal de 3.0 - 3.5, alimentados con pastos mulato (*Brachiaria híbrido*), insurgente (*Brachiaria brizantha*) y llanero (*Andropogon gayanus Kunth*); y agua a libre acceso.

Experimento 1. Evaluación de diferentes concentraciones de GSH

Obtención de eyaculados. Se obtuvieron 12 eyaculados, dos por seoana, utilizando vagina artificial en presencia de una hembra en celo. Una vez obtenidos los eyaculados se trasladaron inmediatamente al laboratorio para ser evaluados y procesados. Se procesaron únicamente aquellas muestras con un volumen mayor a 0.8 mL, una motilidad en masa igual o mayor a 4 (en una escala de 0 a 5), una concentración mayor de $2,5 \times 10^9$ por mL y un porcentaje de espermatozoides vivos mayor del 90 % (Naim *et al.* 2009).

Preparación de diluyente. Se prepararon 50 mL de la solución base del diluyente de la siguiente manera: se añadió leche descremada (6.0 g), glicerol (100 µL) y citrato de sodio (0.43 g), se mantuvo esta solución en refrigeración a 5°C por un tiempo no mayor de dos días. Esta solución base fue mezclada en una proporción 1:1 con agua de coco para formar el

diluyente (1 mL de solución base y 1 mL de agua de coco).

Tratamientos. En tubos cónicos se colocaron 2 mL del diluyente y se suplementaron con las siguientes concentraciones 0.0, 0.5, 1.0 y 5.0 mM de GSH (Sigma, G-4251).

Dilución. Cada eyaculado fue dividido en cuatro alícuotas, cada alícuota fue diluida hasta alcanzar una concentración final de 400×10^6 espermatozoides por mL utilizando cada uno de los diluyentes suplementados con GSH. Para realizar el enfriamiento de los eyaculados se siguió la técnica propuesta por Naim *et al.* (2009), utilizando agua fría para disminuir la temperatura de las muestras. El tiempo total del enfriamiento (de 37°C hasta 5°C) fue aproximadamente 1.5 h. Luego las muestras fueron almacenadas en refrigeración (5°C). Los porcentajes de motilidad progresiva y espermatozoides vivos fueron evaluados a los siguientes periodos: 0 (recién diluido), 1, 2 y 24 h de refrigeración. A las 24 h también se realizó la evaluación de la motilidad progresiva a una temperatura de 37 °C (reactivación de la motilidad), para lo cual 5 µL de muestra fueron diluidos en 100 µL de TCM-199 (Sigma, M-2025).

Motilidad en masa. Se evaluó mediante la observación directa de una gota de semen fresco sobre un portaobjetos atemperado a 36-37°C, sobre

una platina térmica de microscopio y se observó a 40x, con la ayuda de un microscopio óptico, evaluando la presencia de olas. Se evaluó cerca del borde de la gota, donde la profundidad de la misma es menor y es más fácil de observar. La escala que se toma es de 1 a 5, evaluando como 1 al semen que no presenta olas y 5 cuando las olas se mueven rápidamente formando remolinos.

Motilidad individual progresiva. En 5 μ L de semen diluido colocados en un portaobjeto, se observó la motilidad con un microscopio óptico a 40x y se determinó el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo lineal

Espermatozoides vivos. Para determinar el número de espermatozoides vivos: se colocaron 5 μ L de muestra, en un portaobjetos y 5 μ L de una solución de Eosina (1%) y Nigrosina (5%), se realizó una homogenización y posterior secado (platina térmica), finalmente se observó en el microscopio a 40x contando 100 espermatozoides y registrando el porcentaje de vivos y muertos.

Reactivación de la motilidad. 5 μ L de semen se adicionaron a 100 μ L de medio TCM199 (a 37 °C), se colocó en un portaobjeto 25 μ L de esta dilución y se observó la motilidad en un microscopio óptico a 40x, calculándose el porcentaje de espermatozoides con movimiento hacia adelante.

Experimento 2. Determinación de la capacitación espermática

Obtención de eyaculados. Se siguió el mismo procedimiento descrito para el Exp. 1 con 22 eyaculados.

Preparación del buffer. La solución buffer utilizada para disolver la clortetraciclina fue preparada agregando a 5 mL de agua destilada 0.0379 mg de cloruro de sodio. Posteriormente se adicionó 0.0030 mg de cisteína y finalmente 0.0157 mg de tris, luego se

mezcló todo con la ayuda de un agitador magnético. Se colocó 1 mL de la solución buffer en un tubo de ensayo cubierto con papel de aluminio, y se agregó 0.0005 mg de clortetraciclina.

Tratamientos. En dos tubos cónicos se colocaron 2 mL del diluyente, suplementados con concentraciones de 0 mM (control) y 5.0 mM de GSH (Sigma, G-4251).

Determinación de la capacitación espermática. Para determinar la capacitación espermática se colocó en un portaobjetos 5 μ L de semen diluido y se le agregó 5 μ L de clortetraciclina. Posteriormente, se dejó reposar durante 10 min, luego se evaluó la capacitación espermática mediante un microscopio de inmunofluorescencia. Se realizó un conteo de 100 espermatozoides y se clasificaron de acuerdo a un patrón fluorescencia como se indica a continuación.

Patrón A: Fluorescencia uniforme en la cabeza y acrosoma intacto, las cuales son características de espermatozoides sin capacitar.

Patrón B: La fluorescencia se concentra en la región acrosomal y existe una banda sin fluorescencia en la región post-acrosomal. Estas características son de un espermatozoide capacitado con el acrosoma intacto.

Patrón C: No presenta fluorescencia en la cabeza, excepto una delgada banda fluorescente en la región ecuatorial. Esta última es la característica de un espermatozoide que sufrió una reacción acrosomal.

Análisis estadístico. Se utilizó análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de GSH sobre los porcentajes de motilidad y viabilidad espermática. La prueba de Tukey fue utilizada para determinar diferencias significativas entre los grupos con un nivel de significancia de 0.05. Los análisis se realizaron utilizando el programa SAS (1998).

Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos de la evaluación del semen almacenado a 5 °C durante 0, 1, 2 y 24 h se muestran en la Tabla 1. Cuando se realiza la conservación de semen a través de la refrigeración (5°C) uno de los eventos que ocurren es un incremento en la producción de ROS. Una disminución en la motilidad y número de espermatozoides vivos está relacionado con el estrés oxidativo causado por el exceso de ROS (El-Sisy *et al.* 2007).

Hay varios mecanismos propuestos para explicar el descenso en la motilidad espermática asociado a un estrés oxidativo. La peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados o PUFAs (por sus

siglas en inglés *Polyunsaturated Fatty Acids*) en la membrana lipídica es uno de estos mecanismos (Aitken *et al.* 1995). Los espermatozoides son particularmente susceptibles a la lipo-peroxidación debido a la alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados en su membrana plasmática. Una consecuencia de la lipo-peroxidación es la pérdida de la fluidez en la membrana plasmática (Aitken *et al.* 1997). La pérdida de la integridad (fluidez membranar) también ayuda a incrementar la permeabilidad de la membrana y a una incapacidad para regular las concentraciones intracelulares de iones involucrados en el control del movimiento espermático.

Tabla 1. Porcentaje de motilidad espermática (\pm DE) durante la refrigeración a 5°C bajo diferentes concentraciones de GSH.

Concentración de GSH (mM)	Tiempo de refrigeración				Reactivación
	0	1	2	24	
0.0	91.61 \pm 5.48 ^a	82.22 \pm 4.08 ^a	81.11 \pm 5.16 ^a	16.44 \pm 2.74 ^c	52.43 \pm 3.51 ^d
0.5	90.56 \pm 4.18 ^a	82.22 \pm 6.32 ^a	77.22 \pm 9.28 ^a	12.00 \pm 2.79 ^d	43.71 \pm 2.65 ^c
1.0	91.67 \pm 4.08 ^a	86.33 \pm 3.01 ^a	84.44 \pm 2.00 ^a	21.44 \pm 2.04 ^b	74.29 \pm 4.01 ^b
5.0	92.78 \pm 4.32 ^a	88.00 \pm 4.02 ^a	83.89 \pm 4.46 ^a	29.22 \pm 2.04 ^a	80.29 \pm 6.10 ^a

^{a,b}Literal diferente en una columna indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Se ha propuesto que los ROS constituyen un mecanismo inductor del daño en el ADN (Sawyer *et al.* 2003) y en la activación de la apoptosis (Duru *et al.* 2000). Pueden iniciar la activación de la mitocondria para liberar el citocromo C, molécula de señalización que inicia una cascada de eventos que involucra la activación de caspasas (3 y 9), dando por resultado la apoptosis de las células.

El efecto beneficioso del GSH en la motilidad espermática durante las dos primeras horas del enfriamiento ha sido referida en especies como los cerdos cuando se utilizan concentraciones de 1 y 5 mM del antioxidante (Gadea *et al.* 2005). A las 24 h se observa una disminución significativa de la motilidad espermática en los tres tratamientos con GSH e incluso en el control (Tabla 1). Aguado *et al.* (1998) encontraron esta disminución de la motilidad en eyaculados de ovinos de la raza Manchego almacenados a 5 °C durante 24 h. Sin embargo, en el trabajo presente la concentración de 5 mM mostró una mayor motilidad en comparación con las de 1 mM y 0.5 mM.

Después de la reactivación, las muestras que fueron conservadas por 24 h en presencia de 5 mM GSH mostraron mejor motilidad espermática en comparación con las concentraciones de 1.0, 0.5 y 0.0 mM (control), lo cual indica que el efecto del GSH sobre la motilidad espermática depende de la concentración utilizada.

En cuanto al número de espermatozoides vivos, durante las dos primeras horas de almacenamiento no se observó una diferencia significativa entre las diferentes concentraciones de GSH evaluadas. (Tabla 2). A las 24 h las muestras diluidas con 5 mM GSH mantuvieron la motilidad alta, mientras que la proporción de espermatozoides vivos disminuyó de manera significativa en las otras concentraciones (Tabla 2). El porcentaje de espermatozoides vivos mejoró significativamente cuando se adicionaron 1.0 y 5.0 mM de GSH al diluyente, en comparación con los tratamientos 0.5 mM de GSH y el control. Este efecto del GSH en la viabilidad espermática durante el almacenamiento en refrigeración ha sido informado en ovinos por Bucak y Tekin (2007), y en bovinos por

Tabla 2. Porcentaje de espermatozoides vivos (\pm DE) durante la refrigeración a 5°C bajo diferentes concentraciones de GSH.

Concentración de GSH (mM)	Tiempo de refrigeración			
	0	1	2	24
0.0	88.11 \pm 5.67 ^a	77.22 \pm 4.92 ^a	73.33 \pm 8.80 ^a	66.56 \pm 7.07 ^c
0.5	88.56 \pm 3.43 ^a	77.22 \pm 8.15 ^a	77.22 \pm 4.92 ^a	67.78 \pm 8.46 ^c
1.0	91.56 \pm 6.01 ^a	79.67 \pm 4.08 ^a	78.44 \pm 5.85 ^a	74.22 \pm 4.92 ^b
5.0	95.11 \pm 3.02 ^a	85.44 \pm 3.76 ^a	81.67 \pm 4.18 ^a	81.44 \pm 2.88 ^a

^{a,b}Literal diferente en una columna indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

(Munsi *et al.* 2007). El mecanismo a través del cual el GSH mantiene a los espermatozoides viables durante la refrigeración implica la eliminación de los ROS responsables de la lipo-peroxidación a nivel de la membrana espermática (Gadea *et al.* 2004).

En la Figura 1, se muestran los valores promedio ($n=22$ eyaculados) de espermatozoides no capacitados y con acrosoma intacto (A), capacitados y con acrosoma intacto (B) y con reacción acrosomal (C) en semen fresco y almacenado por 24 h en presencia o ausencia de GSH.

La membrana acrosomal juega un papel fundamental en la fecundación. En el acrosoma se puede distinguir tres regiones claramente diferenciadas: la

tener una fertilidad baja (Peña y Linde-Forsberg, 2000). La reactividad de la membrana acrosomal representa un requisito absoluto para la fertilización y sólo los espermatozoides que pueden realizar la reacción acrosomal (RA) (con acrosoma intacto) de manera sincronizada con la fase de penetración del ovocito, tienen la habilidad de pasar a través de la zona pelúcida y, como consecuencia, fusionarse con el ovocito para formar un embrión (Januskauskas *et al.* 2000).

En semen fresco (0 h), el 59% de los espermatozoides presentaron capacitación y el acrosoma intacto (patrón B), mientras que el 30% de los espermatozoides no presentaron capacitación

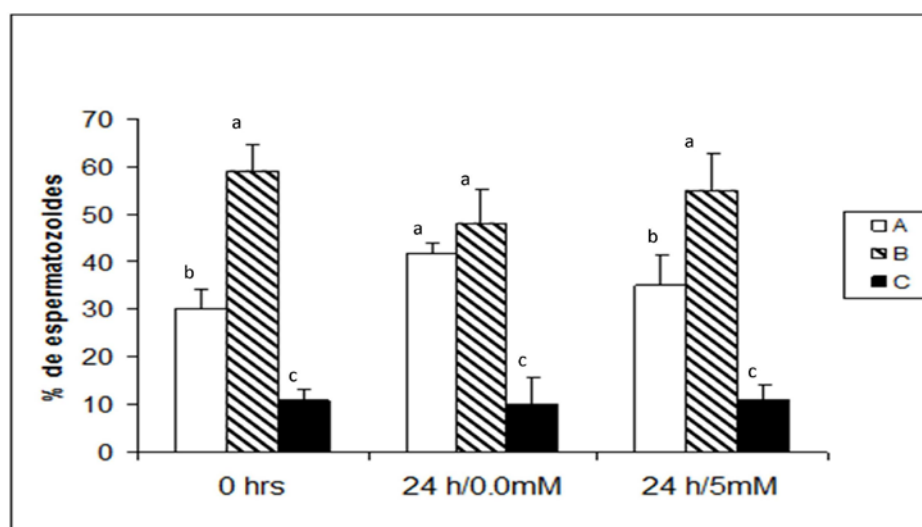


Figura 1. Patrón de tinción de la CTC en eyaculados refrigerados a 5°C durante 24 h en presencia o ausencia de GSH.

a, b, c - Literal diferente en una columna indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

zona acrosomal con su borde apical, la zona post acrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas. Estos últimos tienden a romperse durante los procesos de conservación como son la refrigeración, congelación y descongelamiento. Muestras seminales con alta proporción de alteraciones acrosomales suelen

(Patrón A), siendo esta diferencia significativa. Después de 24 h de refrigeración a 5°C, el porcentaje de espermatozoides no capacitados y con acrosoma intacto (Patrón A) se incrementó a 42% en presencia de GSH, mientras que sólo a 35% en ausencia de GSH.

Conclusiones

Se puede concluir que el uso de glutatión reducido (GSH) a una concentración de 5 mM durante la conservación de semen de ovino a 5 °C tiene un efecto positivo sobre la motilidad y número de espermatozoides vivos por 24 h de almacenamiento.

El uso de 5 mM GSH durante la refrigeración a 5°C tiene un efecto benéfico sobre la integridad del acrosoma espermático.

Literatura Citada

- Aguado, M. J., M. G. Cervigón, A. Manso, M. D. Pérez-Guzmán, J. Garde y V. Montoro. 1998. Estudio preliminar del poder fecundante del semen de ovino manchego mantenido durante 24 horas en refrigeración. *Producción Ovina y Caprina XXIII*: 521-524.
- Aitken, R. J., H. M. Fisher, N. Fulton, E. Gomez, W. Knox, B. Lewis, and S. Irvine. 1997. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitor diphenylene iodonium and quinacrine. *J. Molecular Reprod. Development* 47: 468-482.
- Aitken, R. J., M. Paterson, H. Fisher, D. W. Buckingham, and M. van Duin. 1995. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J. Cell Sci.* 108: 2017-2025.
- Anel-López, L., M. Álvarez-Rodríguez, O. García-Álvarez, M. Álvarez, A. Maroto-Morales, L. Anel de Paz, J. J. Garde, and F. Martínez-Pastor. 2012. Reduced glutathione and Trolox (Vitamin E) as extender supplements in cryopreservation of red deer epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 135:37-46.
- Bucak, M. N and N. Tekin. 2007. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Rum. Res.* 73: 103-108.
- Duru, N. K., M. Morshedi and S. Oehninger. 2000. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertility and Sterility* 74:1200 -1207.
- El-Sisy, G. A., W. S. El-Nattat, and R. I. El-Sheshtawy. 2007. Buffalo semen quality, antioxidants and peroxidation during chilling and cryopreservation. *Online J. Vet. Res.* 11: 55-61.
- Hicks, J. J., R. Y. Torres y V. M. Sierra. 2006. Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Rev. Endocrinol. Nutr.* 14: 223-226.
- Fraczek, M and Kurpisz, M. 2005. The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. *Postepy. Hig. Med. Dosw.* 59:523-534.
- Gadea, J., E. Selles, M. A. Marco, P. Coy, C. Matás, R. Romar, and S. Ruiz. 2004. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology* 62:690-701.
- Gadea, J., F. García-Vazquez, C. Matás, J. C. Gardón, S. Cánovas, and D. Gumbao. 2005. Cooling and freezing of boar spermatozoa: Supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *J. Andrology* 26:398-404.
- Gadea, J., M. Molla, E. Selles, M. A. Marco, F. A. Garcia-Vazquez, and J. C. Gardon. 2011. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology* 62:40-46.
- Januskauskas, A., A. Johansson, and L. Soderquist. 2000. Assessment of the fertilizing potential of frozen-thawed bovine sperm by calcium ionophore A23187-induced acrosome reaction *in vitro*. *Theriogenology* 53:859-875.
- Membrillo, O. A., I. A. Córdova, G. J. J. Hicks, I. M. Olivares-Corichi, T. V. M. Martínez y M. J. J. Valencia. 2003. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. *Interciencia.* 28:699-704.
- Munsi, M. N., M. M. U. Bhuiyan, S. Majumder, and M. G. S. Alam. 2007. Effects of exogenous glutathione on the quality of chilled bull semen. *Reprod. Domest. Anim.* 42:358-362.
- Naim, P., M. Cueto y A. Gibbons. 2009. Inseminación artificial a tiempo fijo con semen ovino refrigerado. *Arch. Zoot.* 58: 435-440.
- Peña, A and C. Linde-Forsberg. 2000. Effects of Equex, one or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology.* 2000 Oct 1 54(6):859-75.
- Salamon, S. and W. M. C. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 77-111.
- SAS. 1998. SAS User's Guide. SAS Institute, Cary, NC.
- Sawyer, D. E., B. G. Mercer, A. M. Wiklendt and R. J. Aitken. 2003. Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. *J. Mutat. Res.* 529(1-2):21-34.
- Vivanco, M. H. W. 1998. Inseminación artificial en ovinos. *Memorias del Seminario Internacional: Aplicaciones de Técnicas Biotecnológicas en la Reproducción de Ovinos y Caprinos.* Universidad Autónoma Chapingo, México. pp: 135-194.