

Colorantes Diff-Quik y Eosina-Nigrosina en la evaluación morfológica de espermatozoides antes y después de la criopreservación del semen del toro Holstein

Diff-Quik and Eosin-Nigrosin dyes in the morphological evaluation of sperm before and after cryopreservation of Holstein bull semen

Percy Mallma-Marca¹, Mery Quintanilla-Dueñas², Ulises Sandro Quispe-Gutiérrez³

¹ Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Perú – percymallmamamarca@gmail.com

² Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Perú – meryquintanilla@gmail.com

³ Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Perú – usquispe@unamba.edu.pe

Resumen. El objetivo del estudio fue evaluar las anormalidades morfológicas espermáticas utilizando colorantes Diff-Quik (DQ) y Eosina-Nigrosina (EN), antes y después de la criopreservación del semen del toro. Se formaron cuatro grupos de tratamientos (T), T1: Tinción DQ antes de congelación; T2: Tinción EN antes de congelación, T3: Tinción DQ después de congelación; T4: Tinción EN después de congelación del semen. Las muestras de semen se colectaron de un toro Holstein de 2 años de edad, utilizando vagina artificial, dos veces por semana hasta 10 colecciones. Se evaluó el semen fresco y post congelado. Se realizó el análisis de varianza. Antes y después de la congelación de semen bovino, las anomalías morfológicas de la cabeza y mayor parte del cuello y la cola del espermatozoide utilizando coloración DQ o EN se observan similarmente ($P > 0.05$). Se identificó mayor ($P \leq 0.05$) defecto de gota citoplasmática proximal y cola doblada en espermatozoides coloreados con EN que DQ en semen fresco y congelado del toro. Se concluye, que se observa mayores anormalidades de gota citoplasmática proximal y cola doblada de espermatozoides con la coloración EN que con DQ, mientras en la identificación de las demás anomalías no hay diferencia, antes y después de la criopreservación de semen del toro Holstein.

Palabras clave: Tinción, Anormalidad, Espermatozoo.

Abstract. The objective of this study was to evaluate sperm morphological abnormalities using Diff-Quik (DQ) and Eosin-Nigrosin (EN) dyes before and after cryopreservation of bull semen. Four treatment (T) groups were formed T1: DQ staining before freezing; T2: EN staining before freezing, T3: DQ staining after freeze-thaw; T4: EN staining after semen freeze-thaw. Semen samples were collected from a 2-year-old Holstein bull, using an artificial vagina, twice a week for up to 10 collections. Fresh and after freeze-thaw semen was evaluated. Analysis of variance was calculated. Before and after freezing bovine semen, morphological abnormalities of the head and most of the neck and tail of the sperm using DQ or EN staining are similarly observed ($P > 0.05$). A greater ($P \leq 0.05$) defect of proximal cytoplasmic gout and bent tail was identified in spermatozoa stained with EN than DQ in fresh and frozen bull semen. In conclusion, greater abnormalities of proximal cytoplasmic gout and bent tail of sperm are observed with EN staining than with DQ, while in the identification of the other anomalies there is no difference, before and after cryopreservation of semen from the Holstein bull.

Keywords: Staining, Abnormality, Sperm.

1 Introducción

El mejoramiento genético de los bovinos utiliza como herramienta a la inseminación artificial, esta tecnología requiere buen manejo de semen, entre ellas la evaluación de las anormalidades espermáticas es importante debido a que tiene relación con la fertilidad. Las anomalías del espermatozoide se correlacionan negativamente con la fertilidad [1]. Semen con mayor a 20% de alteraciones espermáticas es considerado de baja calidad, es por ello la evaluación morfológica del espermatozoide, es uno de tres parámetros más importantes a ser evaluados junto a la motilidad y concentración [2]. La evaluación de la morfología espermática permite identificar anormalidades de la cabeza, pieza intermedia y cola, pudiendo ser anomalías primarias originadas en la espermatogénesis o secundarias originadas en el tránsito espermático por el epidídimo [3]. Se requieren exámenes sistemáticos y frecuentes de la morfología de los espermatozoides en toros

sementales utilizados en inseminación artificial, por tanto, es importante hacer un seguimiento de estas evaluaciones durante toda su vida activa del animal [4]. El uso de la coloración para determinar las anomalías de los espermatozoides varía de acuerdo a la técnica, cuyas diferencias individuales o lecturas de las muestras, podría alterar los resultados [5]. Existe diferentes tinciones para la evaluación de la morfología de espermatozoides [6]. La tinción Eosina-Nigrosina es utilizada para colorear los espermatozoides [7]. Se ha demostrado que la mezcla preparada de reactivos tinción Diff-Quik en la evaluación morfológica de espermatozoides son valiosos para la predicción de la posibilidad de fecundación [8]. El colorante Diff-Quik muestra mayor proporción de cabezas de espermatozoides del caprino analizadas correctamente [9]. A pesar que existen estudios previos; sin embargo, todavía no está claro el uso de Diff-Quik comparado con Eosina-Nigrosina. Por tal razón, se planteó el presente estudio con el objetivo de evaluar las anomalías morfológicas espermáticas utilizando colorantes Diff-Quik y Eosina-Nigrosina, antes y después de la criopreservación del semen del toro.

2 Método

2.1 Diseño experimental

Se utilizó un toro Holstein de dos años de edad aproximadamente, clínicamente sano, con condición corporal buena, fue sometido al pastoreo a base de alfalfa suplementado con concentrado. Se formaron 4 grupos de tratamientos (T) T1: Tinción Diff-Quik antes de la congelación; T2: Tinción Eosina-Nigrosina antes de la congelación; T3: Tinción Diff-Quik después de la congelación; T4: Tinción Eosina-Nigrosina después de la congelación de semen. De cada eyaculado ($n = 10$) el semen se distribuyó aleatoriamente a cada grupo de tratamiento. La evaluación morfológica de las anomalías espermáticas se realizó antes y después de la congelación de semen.

2.2 Colección de semen

La colección de semen del toro se realizó con vagina artificial convencional, se colectó dos veces por semana hasta completar los 10 eyaculados. El eyaculado se transportó en un termo a 37 °C para su evaluación en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac (13°38'31"S 72°53'17"W).

2.3 Criopreservación de semen

Se utilizó el dilutor Tris -Yema de Huevo 20%, que contenía Tris 3.630 g, ácido cítrico 1.990 g, glucosa 0.5 g, fructosa 0.4975 g, Penicilina 100 000 UI, agua bidestilada hasta completar a 100 mL. Se dividió en dos fracciones A y B, a la fracción B se añadió glicerol 5%. A la fracción A se adicionó semen en dilución 4: 1 mantenidos a 37 °C. Luego se realizó el enfriamiento de semen durante 2 h hasta llegar a 15 °C, para luego colocar a 4 °C por 2 h alcanzando el equilibrio en refrigeración. Enseguida se unió las dos fracciones.

El empajillado se realizó en pajuelas de 0.25 mL mediante aspiración, luego se selló con alcohol polivinílico en ambiente de 5 °C. La congelación del semen se realizó mediante el método convencional, utilizando una cajita de poliestireno con nitrógeno líquido hasta el nivel de 5 cm de altura. Las pajuelas se colocaron sobre una parrilla de congelamiento a 4 cm del nivel de nitrógeno líquido por 15 min. Luego se sumergió las pajuelas al nitrógeno líquido a -196 °C. Seguidamente, las pajuelas se colocaron en globets y canes y llevados al tanque criogénico para su almacenamiento. La descongelación se realizó en un termo a 37 °C por un min, en seguida se hizo la evaluación espermática.

2.4 Coloración de espermatozoides

Previamente a las coloraciones se mezcló 5 μ L de semen con 10 μ L de cloruro de sodio al 0.9% a 37 °C en viales de 2 mL. Antes y después de la congelación de semen se utilizó los mismos procedimientos de coloración. La coloración con Diff-Quik se realizó aspirándose 5 μ L de semen para colocar en uno de los extremos de la lámina portaobjeto donde se hizo el frotis y se dejó secar al ambiente. Luego, la lámina portaobjeto se sumergió a la solución fijadora (solución transparente) durante un minuto, luego se hizo secar al ambiente durante 2 minutos. Enseguida, se colocó en la solución de tinción I (solución naranja) durante dos minutos, seguidamente se dejó secar al ambiente por 4 minutos. Acto seguido, se sumergió a la solución de tinción II (solución azul) durante 2 minutos, enseguida la lámina portaobjeto se lavó con agua destilada, finalmente se realizó el secado al ambiente durante 4 a 5 minutos hasta su evaluación.

La coloración con Eosina-Nigrosina se realizó uniéndolos los colorantes y el semen. Se aspiró 2 μ L de Eosina, 2 μ L de Nigrosina y 5 μ L de semen diluido, se colocó sobre la lámina portaobjeto en uno de los extremos, con ayuda de un tips se mezcló las tres soluciones, luego se realizó el frotis y se dejó secar al ambiente hasta su evaluación.

2.5 Evaluación de anomalías morfológicas del espermatozoide

Se observó 200 células espermáticas antes y después de la congelación en varios campos utilizando un microscopio óptico a 100 X. La evaluación morfológica de los espermatozoides se realizó considerando la clasificación de Barth [10], que describe en anomalías primarias y secundarias de acuerdo a las regiones de cabeza, cuello y cola de los espermatozoides.

2.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software estadístico SAS v 9.3 [11]. Se comprobó la normalidad con Shapiro-Wilk y homocedasticidad con Levene. Los datos se transformaron a valores angulares cuando fueron necesarios. Se realizó el análisis de varianza mediante procedimiento GLM con factorial 2A x 2B (factor A: tinción Diff-Quik y Eosina-Nigrosina; factor B: antes y después de la congelación). La comparación de medias se realizó con prueba de Tukey. Se consideró que hubo diferencia cuando $P \leq 0.05$.

3 Resultados

3.1 Anomalías morfológicas de la cabeza de espermatozoides

Los resultados de las anomalías morfológicas de la cabeza del espermatozoide se observan en la Tabla 1. No se encontró diferencias significativas ($P > 0.05$) utilizando colorantes Diff-Quik o Eosina-Nigrosina en la identificación de anomalías morfológicas de cabeza gigante, pequeña, piriforme, cónica y estrecha, dos cabezas, defecto de acrosoma, normales desprendidas, antes y después de la congelación de espermatozoides de toro Holstein.

Tabla 1. Porcentaje (media $\pm$ desviación estándar) de identificación de anomalías morfológicas de la cabeza de los espermatozoides de toro Holstein, antes y después de la congelación, utilizando tinciones Diff-Quik (DQ) y Eosina-Nigrosina (EN).

Anomalías	Tipo de coloración	Pre congelación	Post congelación	Valor P
Cabeza gigante	DQ	0.02 $\pm$ 0.03	0.02 $\pm$ 0.03	P > 0.05
	EN	0.00 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.03	P > 0.05
Cabeza pequeña	DQ	0.55 $\pm$ 0.05	0.50 $\pm$ 0.13	P > 0.05
	EN	0.33 $\pm$ 0.08	0.38 $\pm$ 0.13	P > 0.05
Cabeza piriforme	DQ	0.17 $\pm$ 0.12	0.03 $\pm$ 0.06	P > 0.05
	EN	0.15 $\pm$ 0.05	0.03 $\pm$ 0.06	P > 0.05
Cabeza cónica y estrecha	DQ	0.52 $\pm$ 0.12	0.35 $\pm$ 0.05	P > 0.05
	EN	0.32 $\pm$ 0.06	0.15 $\pm$ 0.10	P > 0.05
Dos cabezas	DQ	0.00 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.03	P > 0.05
	EN	0.02 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.05	P > 0.05
Defecto de acrosoma	DQ	0.03 $\pm$ 0.03	0.00 $\pm$ 0.00	P > 0.05
	EN	0.13 $\pm$ 0.06	0.13 $\pm$ 0.03	P > 0.05
Normales desprendidas	DQ	1.83 $\pm$ 0.35	1.25 $\pm$ 0.31	P > 0.05
	EN	1.77 $\pm$ 0.10	1.73 $\pm$ 1.26	P > 0.05
Total	DQ	3.12 $\pm$ 0.70	2.17 $\pm$ 0.61	P > 0.05
	EN	2.72 $\pm$ 0.38	2.49 $\pm$ 1.66	P > 0.05

3.2 Anomalías morfológicas del cuello de espermatozoide

Los resultados de anomalías del cuello de espermatozoide se muestran en la Tabla 2, los defectos morfológicos del cuello de los espermatozoides: descentrado, doble, en espiral, granular se observaron similarmente ($P > 0.05$) con las tinciones de Diff-Quik o Eosina-Nigrosina durante la pre y post congelación de semen. Se observó mayor ($P \leq 0.05$) defecto de gota citoplasmática proximal en espermatozoides coloreados con Eosina-Nigrosina que Diff-Quik en pre y post congelación del semen.

Tabla 2. Porcentaje (media $\pm$ desviación estándar) de anomalías morfológicas del cuello de los espermatozoides de toro Holstein, antes y después de la congelación, utilizando tinciones Diff-Quik (DQ) y Eosina-Nigrosina (EN).

Anomalías	Tipo de coloración	Pre congelación	Post congelación	Valor P
Descentrado	DQ	0.05 $\pm$ 0.05	0.03 $\pm$ 0.03	P > 0.05
	EN	0.10 $\pm$ 0.10	0.05 $\pm$ 0.00	P > 0.05

Doble	DQ	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	P > 0.05
	EN	0.02 ± 0.03	0.05 ± 0.05	P > 0.05
Espiral	DQ	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	P > 0.05
	EN	0.02 ± 0.03	0.00 ± 0.00	P > 0.05
Granular	DQ	0.38 ± 0.23	0.40 ± 0.09	P > 0.05
	EN	0.40 ± 0.09	0.10 ± 0.09	P > 0.05
Gota citoplasmática proximal	DQ	0.18 ± 0.10 ^a	0.08 ± 0.10 ^a	P > 0.05
	EN	0.25 ± 0.09 ^b	0.30 ± 0.13 ^b	P > 0.05

^{ab} Superíndices diferentes dentro de la columna expresan diferencia ($P \leq 0.05$).

3.3 Anomalías morfológicas de la cola de espermatozoide

Los resultados de los defectos de la cola del espermatozoide se muestran en la Tabla 3. Las anomalías espermáticas de la cola corta, abaxial, dos colas, gota citoplasmática distal se observaron similarmente ($P > 0.05$) con la coloración Diff-Quik o Eosina-Nigrosina antes y post congelación de semen. Se identificó mayor porcentaje ($P > 0.05$) de anomalías de cola doblada con tinción de EN que DQ antes y después la congelación del semen de toro.

Tabla 3. Porcentaje (media $\pm$ desviación estándar) de anomalías morfológicas de la cola de los espermatozoides de toro Holstein, antes y después de la congelación, utilizando tinciones Diff-Quik (DQ) y Eosina-Nigrosina (EN).

Anomalías	Tipo de coloración	Pre congelación	Post congelación	Valor P
Corta	DQ	0.77 $\pm$ 0.08	0.63 $\pm$ 0.16	P > 0.05
	EN	1.12 $\pm$ 0.03	1.03 $\pm$ 0.25	P > 0.05
Abaxiales	DQ	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	P > 0.05
	EN	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	P > 0.05
Dos colas	DQ	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	P > 0.05
	EN	0.02 $\pm$ 0.03	0.00 $\pm$ 0.00	P > 0.05
Gota citoplasmática distal	DQ	0.23 $\pm$ 0.10	0.22 $\pm$ 0.03	P > 0.05
	EN	0.88 $\pm$ 0.32	0.37 $\pm$ 0.03	P > 0.05
Doblada	DQ	3.68 $\pm$ 0.70 ^a	3.92 $\pm$ 0.24 ^a	P > 0.05
	EN	7.12 $\pm$ 0.85 ^b	6.75 $\pm$ 0.57 ^b	P > 0.05

^{ab} Superíndices diferentes dentro de la columna expresan diferencia (P $\leq$ 0.05).

4 Discusiones Conclusiones

Los resultados encontrados en el presente estudio sobre identificación de anomalías de la cabeza del espermatozoide, antes de la congelación, 3.12 $\pm$ 0.70% con tinción Diff-Quik, 2.72 $\pm$ 0.38% con Eosina-Nigrosina, son respaldados por Menon et al. [12], quienes al usar tinción Eosina-Nigrosina sobre espermatozoides en semen fresco de toros encontraron 4.86 $\pm$ 5.71, mientras en otros estudios encontraron 6.1 $\pm$ 2.8% [13]; 8.3 $\pm$ 6.8% [14]. Mientras a la post congelación del espermatozoide se observó 2.17 $\pm$ 0.61% con coloración Diff-Quik, 2.49 $\pm$ 1.66% con tinción Eosina-Nigrosina, similares a los reportes de Söderquist et al. [15], quienes encontraron 3.8 $\pm$ 2.1% en espermatozoides de toros post congelados. Las diferencias podrían deberse a la frecuencia de colección de semen, edad del animal, técnica de coloración. La mayor frecuencia de colección de semen puede afectar la madurez de los espermatozoides, así como la alimentación, edad del animal, la técnica de tinción, entre otros factores, pueden afectar la calidad del espermatozoide [7] [16]. En toros, existe varios factores que pueden influir la calidad del semen, el criopreservado puede verse más afectado que el semen fresco [17].

Los resultados del presente experimento para anomalías morfológicas del cuello de espermatozoide, antes de la congelación, con tinción Diff-Quik fueron 0.61 $\pm$ 0.38%, con Eosina-Nigrosina 0.79 $\pm$ 0.34%. Estos resultados son inferiores a 1.1 $\pm$ 0.9% [13] (95); 2.6 $\pm$ 0.6% [16]; 11.7 $\pm$ 6.1% [14]. En equinos, Murcia et al. [5] reportan 5.4 $\pm$ 7.7% con Eosina-Nigrosina, 5.7 $\pm$ 8.1% teñidos con Diff-Quik. Por otro lado, a la post congelación, con tinción Diff-Quik fue 0.51 $\pm$ 0.22%, mientras con tinción Eosina-Nigrosina 0.50 $\pm$ 0.27%. Estos resultados son similares al reporte de Söderquist et al. [15] quienes encontraron 1.0 $\pm$ 0.8% de defectos de cuello de espermatozoides de toros post congelación coloreados con Eosina-Nigrosina. Varios factores afectan la calidad de semen, es decir la morfología espermática, la frecuencia de colección de semen, la edad, genética, alimentación animal, entre otros [1]. Las anomalías de la pieza media son más frecuentes, principalmente la flexión distal pudiendo deberse a los efectos de la congelación y descongelación de los espermatozoides [4]. Por otro lado, el grado o intensidad de la tinción de cada colorante sobre las estructuras espermáticas probablemente también afecten.

Los defectos en la cola de los espermatozoides antes de la congelación, en el presente estudio se encontró con Eosina-Nigrosina 9.14 $\pm$ 1.23%, Diff-Quik 4.68 $\pm$ 0.88%. Siendo diferentes a 4.7 $\pm$ 2.3% [14], 1.01 $\pm$ 1.5% [12] al usar coloración Eosina-Nigrosina; mientras con tinción Diff-Quik reportaron similarmente a los obtenidos en el presente estudio, 2.2 $\pm$ 3.7% en equinos [5]. Los resultados a la post congelación de semen en el presente estudio fueron 8.15 $\pm$ 0.85% con Eosina-Nigrosina, 4.77 $\pm$ 0.43% con Diff-Quik. La edad, la raza y los efectos estacionales, influyen en las características de los espermatozoides y deben tenerse en cuenta al evaluar a los toros para determinar los rasgos morfológicos de los

espermatozoides [13]. El tipo de colorante podría afectar la morfología del espermatozoide, uno de los inconvenientes que presenta el uso de la Eosina-Nigrosina es que, al ser un colorante hipotónico añadido a la muestra no fijada químicamente, puede introducir morfologías artefactos en los espermatozoides, especialmente defectos en la cola [18]. Pueden existir variaciones de identificación de los defectos de espermatozoides, dependiendo del sistema de clasificación, técnica de extensión y tinción de la muestra, incluido la experiencia del técnico de laboratorio.

Se concluye, que se observa mayores anomalías de gota citoplasmática proximal y cola doblada de espermatozoides con la coloración Eosina-Nigrosina que con Diff-Quik, mientras las demás anomalías se identifican similarmente con dichos colorantes, antes y después de la congelación de semen del toro Holstein. La coloración Eosina-Nigrosina o Diff-Quik podría utilizarse para evaluar anomalías morfológicas de espermatozoides en bovinos.

5 Referencias

20. Al-Makhzoomi, A., Lundeheim, N., Håård, M., Rodríguez-Martínez, H.: Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. *Theriogenology* 70, 682–691 (2008).
21. Boada Sucre A.A., De Stefano H., González B., Soto H., Godoy S., Bretaña A.: Microscopia electronica de barrido de las alteraciones presentes en los espermatozoides de toros mestizos siboney. *Rev. Científica FCV-LUZ* 9, 235–242 (1999).
22. Stornelli, M. A., De la Sota, R. L., Et, A.: Atlas de reproducción de animales de producción y compañía. 1a ed. Editorial de la Universidad de la Plata, Buenos Aires, Argentina (2017).
23. Ghirardosi, M. S., Fischman, M. L., Jorge, A. E., Chan, D., Cisale, H.: Relationship between morphological abnormalities in commercial bull frozen semen doses and conception rate. *Andrologia* 50, 1–5 (2018).
24. Murcia-Robayo, R. Y., Jouanisson, E., Beauchamp, G., Diaw, M.: Effects of staining method and clinician experience on the evaluation of stallion sperm morphology. *Anim. Reprod. Sci.* 188, 165–169 (2018).
25. Menkveld R., Lacquet F.A., Kruger T.F., Lombard C.J.A., Sanchez Sarmiento C., de Villiers A.: Effects of different staining and washing procedures on the results of human sperm morphology evaluation by manual and computerised methods. *Andrologia* 29, 1–7 (1997).
26. Quintero Moreno, A., Manuel Mayorga-Torres, J., Cardona Maya, W.: El análisis seminal como herramienta para predecir el potencial reproductivo en toros. *J. Vet. Androl.* 2, 30–37 (2017).
27. Enginsu M.E., Dumoulin J.C.M., Pieters M.H.E.C., Bras M., Evers J.L.H., Geraedts J.P.M.: Evaluation of human sperm morphology using strict criteria after diff-quick staining: Correlation of morphology with fertilization in vitro. *Hum. Reprod.* 6, 854–858 (1991).
28. Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J.: Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology* 66, 996–1003 (2006).
29. Barth, A., Oko, R.: Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA (1989).
30. SAS: Base SAS® 9.3 Procedures Guide: Statistical Procedures. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA (2011)
31. Menon, A.G., Barkema, H.W., Wilde, R., Kastelic, J.P., Thundathil, J.: Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. *Can. J. Vet. Res.* 75, 241–247 (2011).
32. Söderquist, L., Janson, L., Håård, M., Einarsson, S.: Influence of season, age, breed and some other factors on the variation in sperm morphological abnormalities in Swedish dairy A.I. bulls. *Anim. Reprod. Sci.* 44, 91–98 (1996).
33. Freneau, G.E., Chenoweth, P.J., Ellis, R., Rupp, G.: Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. *Anim. Reprod. Sci.* 118, 176–181 (2010).
34. Söderquist, L., Janson, L., Larsson, K., Einarsson, S.: Sperm Morphology and Fertility in A. I. Bulls. *J. Vet. Med. Ser. A* 38, 534–543 (1991).
35. Vilakazi, D.M., Webb, E.C.: Effect of age and season on sperm morphology of Friesland bulls at an artificial insemination centre in South Africa. *South African J. Anim. Sci.* 34, 62–69 (2004).
36. Lozano, H.: Factores que afectan la calidad seminal en toros. *Rev. la Fac. Med. Vet. y Zootec.* 56, 258–272 (2009).
37. Peña Martínez, A.I.: Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83, 209–224 (2004).