



Universidad Nacional Del Nordeste
Facultad de Ciencias Veterinarias
Corrientes - Argentina

Trabajo Final de Graduación
-Módulo de intensificación práctica-
Opción Producción Animal

Título: Evaluación de diferentes diluyentes comerciales para la criopreservación de semen bubalino.

Tutor externo: Dr. MV. José Luis Konrad

Tutor interno: MSc. MV. Pablo Maldonado Vargas

Alumno: Buzaglo, Ana Laura

E-mail: anabuzaglo848@gmail.com

Corrientes, 2022.

INDICE

Resumen.....	2
Introducción.....	3
Materiales y métodos.....	6
Resultados.....	9
Discusión.....	11
Conclusión.....	13
Bibliografía.....	14

RESUMEN

La aplicación de IA con semen congelado-descongelado se ha informado en una escala limitada en búfalos, debido a la baja congelandiblidad y fertilidad de los espermatozoides de búfalo en comparación con los espermatozoides de vacunos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar diferentes tipos de diluyentes comerciales, y su efecto sobre la calidad del semen bubalino postdescongelado. El ensayo se realizó en el Centro Integral de Inseminación Artificial Bubalina (CIIAB), cabaña de búfalos Pedro Antonio Silva. Para esto se utilizaron 6 pajuelas criopreservadas de cada tratamiento a evaluar: Tratamiento 1 (T1) Tryladil® con yema de huevo de gallina, Tratamiento 2 (T2) Tryladil® con yema de huevo de pato, Tratamiento 3 (T3) Tryladil® con yema de huevo de codorniz, Tratamiento 4 (T4) Optidux® y Tratamiento 5 (T5) Andromed®. Las muestras se obtuvieron a través de vagina artificial, se realizó un análisis de semen fresco que incluyó un examen macroscópico; y un examen microscópico. Luego se hizo el análisis del semen descongelado incluyendo morfología espermática, concentración de por pajuela y prueba de incubación. Al realizar el análisis de las variables en cuanto a la evaluación de la morfología y concentración no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p>0,05$). En la prueba de incubación, la motilidad a la hora 0 fue menor en los tratamientos 1 (35%), 2 (35%), y 3 (45%), con respecto a los tratamientos 4 (70%) y 5 (75%), diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$). El vigor a la hora 0 no arrojó diferencias significativas, observando valores de entre 3 y 4 en los diferentes tratamientos ($p>0,05$). La motilidad microscópica a la hora 2 fue significativamente menor en los tratamientos 1 (15%), 2 (12,1%), y 3 (18,3%), con respecto a los tratamientos 4 (45%), 5 (30%) ($p<0,05$); al igual que el vigor evaluado a la hora 2 con resultado por tratamientos de: 1 (1,33), 2 (1,5), y 3 (1,67), con respecto a los tratamientos 4 (3), y 5 (2) ($p<0,05$). En conclusión, los diluyentes comerciales que no presentan agregado de proteínas de origen animal, el Optidux® y Andromed® resultaron más eficientes para la criopreservación de semen bubalino.

INTRODUCCIÓN

El búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*) es una especie distinta dentro de la familia *Bovidae*, ha sido domesticado en el subcontinente Indo-Pakistán hace unos 5.000 años (Bhat y Qureshi, 1992). Este se ha clasificado ampliamente en dos tipos, el de agua y el de los pantanos (Cockrill, 1974). El búfalo del río tiene 50 cromosomas, mientras que el búfalo de pantano tiene 48 cromosomas (Cockrill, 1981). El búfalo de los pantanos se mete en cualquier agua o barro que pueden encontrar, son explotados particularmente como animales de trabajo, pero también son utilizados por su carne. No son prácticamente nunca utilizados por su producción lechera. El búfalo de agua prefiere sumergirse en agua limpia, son de tipo lechero y producen más leche que el búfalo de los pantanos (FAO 2020). La población de búfalos aumenta continuamente y se estima en más de 170 millones de cabezas (FAO, 2020) con más del 95% en Asia, donde los búfalos desempeñan un papel destacado en la producción ganadera rural al proporcionar la fuerza de tiro, leche y carne, 2% en África, principalmente en Egipto, y 0,2% en Europa, principalmente en Italia; India tiene 56%, Pakistán 14% y China 13% de la población mundial de búfalos. La producción mundial de leche se ha duplicado en las últimas décadas y es notable que, en los últimos años, el búfalo suministró alrededor del 12% de la producción mundial de leche. India y Pakistán han producido respectivamente el 60 y el 30% de la leche de búfalo del mundo (FAO, 2004). La leche de búfalo es alta en sólidos totales, grasas, proteínas y vitaminas en comparación con la leche de vaca, también contiene menos colesterol y más tocoferol, que es un producto natural antioxidante.

El búfalo fue introducido en Argentina a comienzo del siglo XX, mediante la importación de razas Mediterránea, Murrah y Jafarabadi. En la actualidad la población bubalina es de 147.785 cabezas distribuidas en 19 de las 23 provincias argentinas que componen el territorio nacional. El 88 % de la población de búfalos se encuentra en el nordeste argentino, siendo las provincias de Corrientes y Formosa las que cuentan con las mayores densidades poblacionales. Existen actualmente 1193 productores de búfalos en todo el país. Las proyecciones de población bubalina para el año 2030 alcanzan la cifra de 430.000 cabezas. (Crudeli, 2021)

La República Argentina posee varias regiones subexplotadas desde el punto de vista ganadero debido a la falta de adaptación del ganado vacuno a sectores bajos e inundables. Por su gran capacidad de conversión de pastos naturales en carne y leche, el

búfalo representa una herramienta valiosa para la expansión ganadera de zonas marginales como el NEA (Konrad y col., 2017).

El potencial de producción del ganado puede aumentarse mediante la mejora genética utilizando la inseminación artificial (IA). Además, la calidad del semen congelado-descongelado es uno de los factores más influyentes que afectan la probabilidad de concepción (Saacke, 1984). Por lo tanto, la criopreservación exitosa del semen bivalino ayudaría a la creación de almacenamiento a largo plazo de gametos masculinos y al mantenimiento de existencias genéticas que podrían mejorar la producción de leche y carne y su valor económico asociado internacionalmente (Andrabi, 2009).

La aplicación de IA con semen congelado-descongelado se ha informado en una escala limitada en búfalos, debido a la baja congelabilidad y fertilidad de los espermatozoides de búfalo en comparación con los espermatozoides de vacunos (Andrabi et al., 2008). Esta característica puede atribuirse a factores bioquímicos específicos, como las diferencias en la composición lipídica del plasmalema y las proteínas plasmáticas seminales entre estas especies (Andrabi, 2009). Después del descubrimiento de las propiedades crioprotectoras de la yema de huevo (Phillips & Lardy, 1940), se ha utilizado tradicionalmente en diluyentes de semen para la criopreservación de casi todas las especies de ganado, incluido el búfalo. La yema de huevo protege al esperma de los daños inducidos por la criopreservación durante el enfriamiento, congelación y descongelación al interactuar directamente con la membrana plasmática de la célula (Andrabi et al., 2008).

Tradicionalmente se ha usado la yema proveniente del huevo de la gallina, pero recientemente (Andrabi et al. 2008) han investigado el uso de yema de gallina de guinea y de pato, concluyendo que esta última mejora la viabilidad post descongelación del semen de búfalo. Se sugiere que la mejora o disminución de la calidad post descongelación de espermatozoides de mamíferos con yema de huevo de diferentes especies de aves en el diluyente de congelación se atribuye a las diferencias en la composición bioquímica de las yemas (Bathgate et al. 2006). Hoy día, también están disponibles comercialmente una amplia gama de diluyentes químicamente definidos y de origen no animal, que tienden a reemplazar la inclusión de la yema de huevo, de los cuales se necesita más datos para conocer su efecto sobre la criopreservación del semen de búfalo.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar diferentes tipos de diluyentes comerciales, y su efecto sobre la calidad del semen bupalino postdescongelado.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar el examen macroscópico y microscópico del semen determinando su aptitud.
- Criopreservación de la muestra utilizando distintos diluyentes.
- Determinar concentración y morfología del semen descongelado.
- Evaluar la calidad del semen descongelado mediante la prueba de incubación y determinar su aptitud para el uso en IA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar

El trabajo se realizó en el Centro Integral de Inseminación Artificial Bubalina (CIIAB), cabaña de búfalos Pedro Antonio Silva (h), ubicado en el departamento de General Paz, provincia de Corrientes.

Muestras

La recolección de semen se hizo por el método de vagina artificial, que consiste en tubo de goma rígido, de 40 cm de largo, que posee sobre uno de sus lados un orificio para cargar agua a una temperatura de 40° a 43°C, en su interior se introduce una camisa de látex que repliega sobre los extremos del tubo rígido; el macho realiza el salto en una hembra bubalina inmovilizada y en celo, se desvía el pene introduciéndolo en la vagina y el semen se colecta en un tubo anexado al extremo de la misma. Luego se lleva al laboratorio para su procesamiento.

Se utilizaron 6 pajuelas criopreservadas de cada tratamiento a evaluar: Tratamiento 1 (T1) Tryladil® con yema de huevo de gallina, Tratamiento 2 (T2) Tryladil® con yema de huevo de pato, Tratamiento 3 (T3) Tryladil® con yema de huevo de codorniz, Tratamiento 4 (T4) Optidux® y Tratamiento 5 (T5) Andromed®. Fueron analizadas 30 muestras en total. Estas pertenecen a un búfalo reproductor de 3 años de edad, raza Murrah RP: 18, apto sanitaria y andrológicamente.

Análisis de semen

El semen puro recién colectado fue llevado al laboratorio y colocado a baño María a 37°C, se tomó una pequeña muestra para la evaluación de todos los parámetros, mediante un examen macroscópico que incluyó volumen, color (el color normal del semen bubalino varía entre blanco lechoso a blanco cremoso, y una vez colocados contra a luz artificial, presenta rayas con color azul oscuro.), pH con tiras reactivas y aspecto que depende de la concentración de espermatozoides, pudiendo ir desde acuoso a cremoso (Vale, 1994; 1997).

Posteriormente se hizo un análisis microscópico utilizando un microscopio óptico (Motic BA310) que incluyó: a) Motilidad en masa, la cual consistió en colocar una gota gruesa de semen fresco puro, sobre un portaobjeto precalentado a 37°C y sobre platina térmica también a 37°C, evaluando a 40x la intensidad de los oleajes y remolinos formado por los espermatozoides, expresándola en porcentaje (0-100). b) Motilidad individual o vigor, a la gota de semen anterior se colocó un cubre y se evaluó en 400x la intensidad del movimiento progresivo rectilíneo de cada espermatozoide, teniendo en

cuenta la velocidad con la que éstos atraviesan el campo. La escala que se utiliza es de 0 a 5, evaluando como 0 los espermatozoides inmóviles y como 5 los que avanzan rápidamente por el campo y son difíciles de seguir visualmente. c) Concentración, fue evaluada luego de la dilución del semen 1:200 en una solución salina formolada, una vez homogeneizada la muestra, se toman aproximadamente 14 microlitros y se carga la cámara de Neubauer por capilaridad. Luego se procedió a ubicar el cuadrante de glóbulos rojos a 100 aumentos, y una vez localizado, se pasó a 400 aumentos para realizar el conteo. Se contó todos los espermatozoides que se encontraban en las 4 cuadrículas de las puntas y la central (5 en total) el valor obtenido fue dado en millones/mm³. Ese parámetro está directamente correlacionado con los aspectos genéticos, estacionales, nutricionales y de manejo. (Vale, 1994; 1997).

Proceso de congelado del semen

Para la criopreservación de semen el mismo debe resultar apto al análisis microscópico, se cargaron pajuelas de 0,5ml para con una concentración aproximada de 50×10^6 espermatozoides, para diluir el mismo se utilizaron los 5 diluyentes a evaluar: Tratamiento 1° Tryladil® con yema de huevo de gallina, Tratamiento 2° Tryladil® con yema de huevo de pato, Tratamiento 3° Tryladil® con yema de huevo de codorniz, Tratamiento 4° Optidux® y Tratamiento 5° Andromed®. Una vez cargadas y selladas las pajuelas comenzó el descenso de temperatura, de 30°C a 5°C a una tasa de enfriamiento de 0,25°C por minuto, se realizó la estabilización a 5°C durante dos horas y luego la congelación hasta -100°C a una tasa de enfriamiento de 10°C por minuto. Para realizar este proceso se utilizó una congeladora de semen (Marca NeoVet®, Brasil). Luego el semen fue colocado en nitrógeno líquido a -196°C y almacenado en termos criogénicos.

Evaluación del semen descongelado

Se procedió a descongelar seis (6) pajuelas de cada tratamiento a 37° C en baño María durante un minuto. Luego se les realizaron análisis de morfología espermática, concentración y prueba de termorresistencia.

Para morfología se utilizó la técnica de tinción con eosina-nigrosina, técnica de Hanckok, el semen previamente fue diluido 1/10 en una solución salina formolada, el extendido se preparó colocando una gota de 5-6mm de tintura y una gotita de semen cerca de la misma en un portaobjeto, para luego mezclarlas, la mezcla es extendida desde un extremo hacia el otro del vidrio con la ayuda del borde de otro portaobjeto. El mismo se deja secar y se observa al microscopio bajo un objetivo de inmersión a 1000x, contando alrededor de 100 células y clasificando en normales, y los diferentes defectos

de cabeza, acrosoma y cola, clasificándolos en defectos menores y mayores (Blom, 1977).

En cuanto a la concentración se obtuvo utilizando la cámara de Neubauer (cámara cuenta glóbulos), fue evaluada luego de la dilución del semen 1:200 en una solución salina formolada, una vez homogeneizada la muestra, se tomaron aproximadamente 14 microlitros y se cargó la cámara de Neubauer por capilaridad. Luego se procedió a ubicar el cuadrante de glóbulos rojos a 100x, y una vez localizado, se pasó a 400x para realizar el conteo. Se contaron todos los espermatozoides que se encontraban en las 4 cuadrículas de las puntas y la central (5 en total) el valor obtenido fue dado en millones/mm³.

Para el test de termorresistencia o prueba de incubación, se mantuvo el semen a 37°C, y se evaluó el mismo a las 0 hs, a las 1 hs y a las 2 hs, los siguientes parámetros: a) Motilidad en masa, para la cual se colocó una gota gruesa del semen descongelado, sobre un portaobjeto precalentado a 37°C y sobre platina térmica también a 37°C, evaluando a 40x la intensidad de los oleajes y remolinos formados por los espermatozoides, expresándola en porcentaje (0-100). b) Motilidad individual o vigor, a la gota de semen anterior se le colocó un cubre y se evaluó en 400x la intensidad del movimiento progresivo rectilíneo de cada espermatozoide, teniendo en cuenta la velocidad con la que éstos atraviesan el campo. La escala que se utiliza es de 0 a 5, evaluando como 0 los espermatozoides inmóviles y como 5 los que avanzan rápidamente por el campo y son difíciles de seguir visualmente, considerándose como apto un vigor de 3 y una motilidad del 25% para la primera; y un vigor de 2 y motilidad del 15% para la segunda (Brogliatti y Bó, 2008).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron cargados en planillas de Excel. Se realizaron medidas de resumen. El análisis comparativo de las variables evaluadas, se realizó por medio de un análisis de varianza (ANOVA). Este modelo se analizó con el test de Tukey para poder comparar las medias de los tratamientos de esta investigación. Para el análisis de datos se utilizó el software InfoStat-Statistical (Di Renzo y col., 2020).

RESULTADOS

La concentración promedio de las muestras analizadas fue de $52,4 \pm 7,8$ millones de espermatozoides por dosis (pajuela de 0,5 ml). En la evaluación de la morfología, la proporción de espermatozoides normales fue de $85,2 \pm 4,2$, y el porcentaje de defectos mayores fue de $9 \pm 2,9\%$, y de defectos menores fue de $5,8 \pm 1,9\%$. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$) al evaluar concentración y morfología (tabla 1). Tanto los valores observados para concentración como de defectos están dentro de los rangos aceptables para las dosis de semen criopreservado.

Tabla 1. Valores promedios observados para concentración y porcentaje de morfología de las muestras descongeladas.

Tratamiento	Diluyente	Concentración	Normales	Def >	Def <
1	H. de gallina	55×10^6	88	7	5
2	H. de pato	40×10^6	90	5	5
3	H. de codorniz	50×10^6	84	10	6
4	Optidux	57×10^6	81	10	9
5	Andromed	60×10^6	85	11	4

En la prueba de incubación, la motilidad a la hora 0 fue menor en los tratamientos 1 (35%), 2 (35%), y 3 (45%), con respecto a los tratamientos 4 (70%) y 5 (75%), diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). El vigor a la hora 0 no arrojó diferencias significativas, observando valores de entre 3 y 4 en los diferentes tratamientos ($p > 0,05$). La motilidad microscópica a la hora 2 fue significativamente menor en los tratamientos 1 (15%), 2 (12,1%), y 3 (18,3%), con respecto a los tratamientos 4 (45%), 5 (30%) ($p < 0,05$); al igual que el vigor evaluado a la hora 2 con resultado por tratamientos de: 1 (1,33), 2 (1,5), y 3 (1,67), con respecto a los tratamientos 4 (3), y 5 (2) ($p < 0,05$) (Tabla 2).

Tabla 2. Prueba de incubación.

Tratamiento	Diluyente	Mot 0	Vigor 0	Mot 1	Vigor 1	Mot 2	Vigor 2
1	H. de gallina	35	3	30	2,5	15	1,33
2	H. de pato	35	3	22,5	2,5	12	1,5
3	H. de codorniz	45	3	25	2,5	18,3	1,67
4	Optidux	70	4	60	3	45	3
5	Andromed	75	4	47,5	3	30	2

Para que una muestra resulte apta para su uso post descongelado debe tener un mínimo de 20% de espermatozoides motiles con un vigor de 2, después de dos horas de incubación a 37°C, por lo que sólo las muestras de los tratamientos 4 y 5 resultaron aptas para su uso en inseminación artificial.

DISCUSIÓN

Singh et al., (2000) compararon diferentes diluyentes y encontraron que el diluyente a base de Tris era mejor en comparación con Laiciphos y Biociphos según lo juzgado por la motilidad postdescongelación. Con respecto a la glicerolización, Singh et al., (2006) confirmaron que un solo paso es más adecuado para la criopreservación de espermatozoides de búfalo en términos de vigor postdescongelación.

Bathgate y col., (2006) realizaron estudios utilizando yema de huevo (EY) como componente común de los diluyentes de congelación de semen para la mayoría de las especies de ganado, incluido el búfalo (*Bubalus bubalis*). Llegaron a la conclusión que el papel principal de la EY es prevenir el daño de los espermatozoides durante los procesos de enfriamiento y congelación. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) contenidas en EY son en gran parte responsables para la protección de los espermatozoides durante la criopreservación (Pace y Graham, 1974; Watson, 1976). Se sugiere que el LDL se adhiera a la membrana del esperma y proporciona protección al esperma estabilizando la membrana. Una segunda hipótesis sugiere que los fosfolípidos presentes en las LDL protegen a los espermatozoides al formando una película protectora en la superficie del esperma o reemplazando los fosfolípidos de la membrana del esperma que se pierde o daña durante el proceso de criopreservación (Foulkes et al., 1980; Quinn et al., 1980; Graham y Foote, 1987). Un tercer mecanismo de protección sugiere que LDL se apodera de las proteínas deletéreas presentes en el plasma seminal bovino mejorando así la capacidad de congelación de los espermatozoides (Manjunath et al., 2002; Bergeron y Manjunath, 2006). Se desconoce El mecanismo exacto por el cual EY preserva los espermatozoides de toro durante el proceso de congelación-descongelación (Bathgate et al., 2006).

Tradicionalmente, la yema de huevo de gallina se ha utilizado predominantemente en los medios de congelación, probablemente debido a su fácil disponibilidad (Bathgate et al., 2006). Trimeche y col. (1997) encontraron una mejor protección de esperma congelado en un medio que contiene yema de huevo de codorniz en comparación con yema de huevo de gallina. A su vez (Clulow et al., 2004) encontró que la criopreservación de semen con yema de huevo pato, en comparación con la de codorniz, resultó en significativamente mayor movilidad hacia adelante y viabilidad después de la descongelación. En contraste con esto, en nuestro trabajo no hubo

diferencias significativas entre los tratamientos con yema de huevo de pato y codorniz en cuanto a la motilidad y vigor postdescongelación. Sin embargo Bathgate et al., (2006) describió que la yema de huevo de pato y codorniz no proporcionó más protección a los espermatozoides de jabalí contra las crio lesiones que la yema de huevo de gallina cuando se usa en el diluyente de congelación.

Herold (2004) estudió y concluyó que los espermatozoides del epidídimo del búfalo africano se pueden congelar con éxito con AndroMed® y con Triladyl™. AndroMed® es ventajoso porque es un diluyente de semen totalmente definido y libre de cualquier producto animal, pero Triladyl™ tiende a resultar en motilidades posteriores a la descongelación más altas.

Reddy y col. (1975) informaron una correlación negativa significativa entre espermatozoides anormales y tasa de concepción en búfalo. Además, las características morfológicas de los espermatozoides son influenciado por varios factores, incluida la composición genética y la etapa fisiológica del animal, nutrición, estación, factores climáticos y enfermedad (Dowsett y Knott, 1996; Barth y Oko, 1989).

CONCLUSIONES

En el presente trabajo los diluyentes comerciales que no presentan agregado de proteínas de origen animal, el Optidux® y Andromed® resultaron más eficientes para la criopreservación de semen bubalino. Igualmente requieren más pruebas, con mayor cantidad de reproductores para confirmar esta hipótesis. Por lo tanto, hay una necesidad de definir el diluyente más adecuado para la especie, que puede resultar en la mejora de la viabilidad y fertilidad de espermatozoides de búfalo congelados-descongelados.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrabi SMH. Ansari MS. Ullah N. Anwar M. Mehmood A. Akhter S. 2008. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 104: 427–433.
- Andrabi SMH. 2009. Factors Affecting the Quality of Cryopreserved Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bull Spermatozoa. *Reprod Dom Anim.* 44: 552–569.
- Bathgate R. Maxwell WM. Evans G. 2006. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reprod Domest Anim* 41, 68–73.
- Bloom E. 1977. Sperm morphology with reference to bull infertility. First All-India Symp. Anim. Reprod. pp: 61-81.
- Crudeli, G.A.; Patiño, E.M.; Maldonado, V.P.; Konrad, J.L. Los búfalos en Argentina. *Rev. Vet.* 32: 2, 169-173, 2021.
- Di Rienzo JA. Casanoves F. Balzarini MG. Gonzalez L. Tablada M. Robledo CW. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Herold F.C. Aurichb J.E. Gerber. Epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) can be frozen successfully with AndroMed® and with Triladyl™ but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. *Theriogenology*. Volume 61, Issue 4, February 2004, Pages 715-724
- Konrad, J. Clérigo, G. Garrido, M.J. Taminelli, G. Yuponi, M. Yuponi, R. Crudeli, G. Sansinena, M. 2017. Ovum pick-up interval in buffalo (*Bubalus bubalis*) managed under wetland conditions in Argentina: Effect on follicular population, oocyte recovery, and in vitro embryo development. *Anim Reprod Sci.* 183: 39-45.
- Phillips PH. Lardy HA. 1940. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *Journal of Dairy Science*, 23(5), 399–404.
- Saacke, R.G. 1984. Semen quality: importance of and influencing factors. In: Proceedings of 10th NAAB Tech. Conf. A. I. Reprod Milwaukee, WI, USA. National Association of Animal Breeders, Columbia, USA, pp. 30–36.
- Singh P. Jindal JK. Singh S. Hooda OK. 2000. Freezability of buffalo bull semen using different extenders. *Indian J Anim Reprod* 21, 41–42.
- Singh P. Singh I. Singh S. Sharma RK. 2006. Initial stage glycerolization prevents the incidence of backward sperm motility during cryopreservation and increases buffalo semen freezability. *Indian J Anim Sci* 76, 777–779.
- Tatham B. 2000. Increasing Buffalo Production; Using Reproduction Technology. Report Rur. Indust. Res Corp. Dev., Kingston, ACT, Australia.
- Vale, William G. Reproducción en hembras bufalinas: inseminación artificial y reproducción asistidaTecnología en Marcha, Vol. 24, N.º 5, Revista Especial 2011.