

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS PECUARIAS

**“EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES COMERCIALES PARA LA CONGELACIÓN
DE SEMEN BOVINO EN CONDICIONES DE CAMPO”**

ANDRICK GABRIEL CAMAÑO MONTEZUMA

CIP. 4-816-295

**DAVID, CHIRIQUÍ
REPÚBLICA DE PANAMÁ
2025**

**“EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES COMERCIALES PARA LA CONGELACIÓN
DE SEMEN BOVINO EN CONDICIONES DE CAMPO”**

TRABAJO DE GRADO

**SOMETIDA PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO
ZOOTECNISTA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS PECUARIAS

**PERMISO PARA SU PUBLICACIÓN, REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL DEBE
SER OBTENIDA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

APROBADO:

Prof. Dr. Reinaldo De Armas. PhD

ASESOR

Prof. Dr. Reynaldo Vargas PhD.

MIEMBRO

Prof. Neftalí Aparicio MSc.

MIEMBRO

**DAVID, CHIRIQUÍ
REPÚBLICA DE PANAMÁ**

2025

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero agradecer a Dios por brindarme salud y por cada una de las bendiciones que me regala.

Agradezco a mis padres Claudina Montezuma y Abel Camaño, por su apoyo incondicional, al igual que mis hermanos que siempre han estado conmigo en todo momento para cumplir todas mis metas.

Agradezco el apoyo brindado por mis compañeros Yuleika Monroy, Nohelys de Lisser, Alejandra Miranda, Nathaly Ríos, Ana Victoria Rosas (Q.E.P.D) y a cada uno de los que me motivaron y fueron esa pieza importante en toda la investigación.

Agradezco el apoyo brindado a la Ing. María Lao, Arq. Ethel Moreno, Arq. Noris Quiel, Dr. Carlos Solís, Ing. Richard Mudarra, Dr. Reynaldo Vargas, Ing. Neftalí Aparicio.

Finalmente quiero agradecer a todos los profesores que me brindaron sus conocimientos para formarme profesionalmente, en especial a mi asesor Reinaldo de Armas por todo el apoyo brindado durante mis estudios.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	3
INDICE DE TABLAS	8
INDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE ANEXOS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	13
I. RREVISIÓN DE LITERATURA	16
1.1. Criopreservación del semen Bovino	16
1.2. Transmisión de enfermedades a través del empleo de diluyentes de con componentes de origen animal en el semen bovino congelado.	18
1.3. Diluyentes	20
1.4. Componentes de los diluyentes	20
1.4.1. Azúcares	20
1.4.2. Sustancias buffer	21
1.4.3. Lipoproteína	21
1.4.4. Agua Destilada	22
1.4.5. Antibióticos	23
1.4.6. Agentes crioprotectores	24
1.5. Principales diluyentes comerciales utilizados para la congelación de Semen Bovino	29
1.5.1. Triladyl	29
1.5.2. Biladyl	31

1.5.3. Andromed®.....	32
1.5.4. Optidux.....	33
1.5.4.1. Liposomas.....	34
1.6. Métodos de extracción de semen en bovinos más utilizados....	35
1.6.1. Vagina artificial	35
1.6.2. Electroeyaculación.....	36
1.7. Examen para valorar la calidad de semen pre y post congelación	37
1.7.1. Características macroscópicas.....	37
1.7.2. Características microscópicas.....	40
1.8. Equipos de análisis seminal computarizados	46
1.8.1. Evaluación de semen asistida por computadora (CASA)	46
1.9. Metodologías de congelación	48
1.9.1. Dilución	48
1.9.2. Refrigeración del semen.....	49
1.9.3. Equilibración y Congelación	49
1.9.4. Almacenamiento.....	51
1.9.5. Descongelación de semen.....	51
1.10. Factores que afectan la viabilidad espermática durante el proceso de criopreservación.....	52

1.10.1. Daños en la membrana plasmática	53
1.10.2. Daños en la membrana mitocondrial	53
1.10.3. Daños en la morfología espermática.	54
II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	56
2.1. Ubicación Geográfica.....	56
2.2. Unidades Experimentales y tratamientos.	56
2.3. Colección de semen mediante electro eyaculación	57
2.4. Preparación de los diluyentes.....	57
2.5. Dilución de semen.....	58
2.6. Empaquetado en las pajuelas.	59
2.7. Refrigeración y equilibración mediante caja isotérmica.....	59
2.8. Congelación mediante caja isotérmica.	59
2.10. Análisis Seminal	60
2.10.1. Características microscópicas	60
2.11. Diseño y análisis estadístico.....	63
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
3.1. Viabilidad espermática.....	65
3.2. Motilidad total	67
3.3. Motilidad individual progresiva.....	70
3.4. Vigor	72
3.5. Morfologías	74

IV. CONCLUSIONES..... 77
V. RECOMENDACIONES 78
BIBLIOGRAFÍA..... 79
ANEXOS..... 108

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Escala de evaluación de la motilidad de los espermatozoides..... 43

Tabla 2. Escala para la evaluación del vigor de los espermatozoides. 62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación del Centro de Investigación de Biotecnología Agropecuaria (CIBA).....	56
Figura 2. Porcentajes medios de viabilidad espermática, A y B indican diferencias significativas entre diluyentes a los distintos tiempos de evaluación, siendo $p < 0.02$ a las 0 horas y $p < 0.007$ a las 2 horas post descongelación.....	65
Figura 3. Porcentajes medios de motilidad total, A y B indican que no existen diferencias estadísticas significativas entre los diluyentes a los distintos tiempos de evaluación.....	67
Figura 4. Porcentajes medios de motilidad progresiva, A y B indican que no existen diferencias estadísticas significativas entre los diluyentes a los distintos tiempos de evaluación.....	70
Figura 5. Porcentajes medios de vigor a las 0 y 2 horas no presentan diferencias estadísticas significativas entre los diluyentes A y B en los distintos tiempos de evaluación.....	73
Figura 6. Porcentajes medios de espermatozoides normales entre el diluyente A y el diluyente B indican que no existe diferencias estadísticas en los tiempos de evaluación.....	74

ÍNDICE DE ANEXOS

Figura 1. Toro reproductor con sonda introducida en el recto para realizar la colección del semen.....	100
Figura 2. Pajuelas colocadas en la caja de hielo para su refrigeración y equilibración.....	100
Figura 3. Sellado de pajuelas de 0.5 cc con alcohol polivinílico clorhídrico.....	100
Figura 4. Pajuelas colocadas para congelación a vapor sobre nitrógeno líquido en la caja de hielo seco.....	101
Figura 5. Espermatozoide muerto (A) y espermatozoide vivo (B) utilizando la tinción eosina observado en el microscopio a 400x.....	101
Figura 6. Pipeta con 20 µl de eosina siendo añadida a 10 µl de semen descongelado para su posterior observación para determinación de espermatozoides vivos y muertos.....	101

EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES COMERCIALES PARA LA CONGELACIÓN DE SEMEN BOVINO EN CONDICIONES DE CAMPO

Camaño M A. 2025. Evaluación de dos diluyentes comerciales para la congelación de semen bovino en condiciones de campo. Tesis Ing. Agrónomo Zootecnista, Panamá, FCA, 102 pág.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue comparar el efecto de dos diluyentes comerciales (basados en yema de huevo Triladyl® o liposomas sintéticos Optidux®) sobre algunas variables de calidad y funcionalidad de los espermatozoides después de la descongelación evaluadas in vitro en condiciones de campo. Se realizaron tres colectas con un intervalo de descanso de 4 días mediante electroeyaculación, utilizando un toro cruzado (F1 Simmenthal x Gyr). Se utilizó una dilución 1:3, se realizó la refrigeración y equilibración en una caja de hielo seco, con la utilización de cristales de hielo picado manteniendo la temperatura por 3 horas, la congelación en pajillas de 0.5 mL. Al semen post descongelado se le realizó evaluaciones microscópicas como motilidad total y progresiva, vigor, viabilidad, morfologías, las mismas fueron observadas a las 0 y 2 horas mediante incubación. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Chi-Cuadrado, utilizando el Software Graph Prism. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.02$) para viabilidad espermática para el diluyente Triladyl con respecto al Optidux a las 0 horas, de igual manera se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.007$) para esto mismo diluyente evaluado a las 2 horas de incubación post descongelación. Para las otras variables evaluadas no se encontraron diferencias significativas. Se concluye que de acuerdo con los resultados obtenidos que el diluyente que posee liposomas (Optidux) en su constitución brindó mejores resultados in vitro en la calidad seminal post descongelación al otro diluyente a base de yema de huevo (Triladyl), ya que el efecto de los liposomas permitió conservar eficientemente la motilidad seminal y evitó más daños morfológicos que el diluyente a base de yema de huevo.

Palabras clave: Liposomas, congelación, yema de huevo, calidad seminal.

EVALUATION OF TWO COMMERCIAL EXTENDERS FOR FREEZING BOVINE SEMEN UNDER FIELD CONDITIONS

Camaño M.A. 2025. Evaluation of two commercial extenders for freezing bovine semen under field conditions. Thesis Ing. Agronomist Zootechnician, Panama, FCA, 102 pages.

ABSTRACT

The aim of this research was to compare the effect of two commercial extenders (Triladyl® egg yolk-based or Optidux® synthetic liposomes) on some variables of sperm quality and functionality after thawing evaluated in vitro under field conditions. Three collections were made with a 4-day rest interval by electroejaculation, using a crossbred bull (F1 Simmental x Gyr). A 1:3 dilution was used, refrigeration and equilibration were carried out in a dry ice box, with the use of crushed ice crystals, maintaining the temperature for 3 hours, and freezing in 0.5 mL straws. Post-thawed semen was subjected to microscopic evaluations such as total and progressive motility, vigor, viability, morphologies, which were observed at 0 and 2 hours by incubation. Statistical analysis was performed by the Chi-Square test, using Graph Prism Software. Significant differences ($p < 0.02$) were found for sperm viability for the Triladyl extender with respect to Optidux at 0 hours, and statistically significant differences ($p < 0.007$) were also found for the same extender evaluated at 2 hours of incubation post-thawing. No significant differences were found for the other variables evaluated. It is concluded that according to the results obtained, the extender that contains liposomes (Optidux) in its composition provided better in vitro results in post-thawing seminal quality than the other egg yolk-based extender (Triladyl), since the effect of the liposomes allowed efficient preservation of seminal motility and prevented more morphological damage than the egg yolk-based extender.

Keywords: Liposomes, freezing, egg yolk, seminal quality.

INTRODUCCIÓN

La criopreservación de espermatozoides es una biotecnología reproductiva fundamental que promueve la preservación indefinida y su unión con la inseminación artificial ha permitido la difusión de material genético de óptima calidad y potenciar los programas de mejoramiento genético, así como la preservación de especies en peligro de extinción. De manera similar, ha ayudado a reducir los costos de producción al eliminar el uso de reproductores en monta natural y también ha reducido el contagio de enfermedades de transmisión sexual (Castelo *et al.*, 2008).

Según Viñán (2017), la criopreservación causa diferentes tipos de estrés sobre la célula espermática, principalmente por el enfriamiento, así como por el estrés osmótico y oxidativo o mecánicamente por la formación de cristales de hielo elementos que afectan la fertilidad por daños en la estructura de la membrana, funciones de los organelos y el potencial de la membrana. Consecuentemente, Brass (2001), señaló que estas alteraciones están representadas por la pérdida de la motilidad con un movimiento retrogrado y circular, reducción del metabolismo, lesión del acrosoma y de la membrana plasmática.

Con el propósito de reducir el daño de los espermatozoides producto de la criopreservación en un principio se adicionaba yema de huevo o leche a los diluyentes como crioprotector (Crespilho *et al.*, 2012). En concreto, la posibilidad de sustituir la yema de huevo fresco o la leche resulta muy deseable, dada que la composición heterogénea entre las diferentes fuentes en el tiempo, junto con el potencial riesgo de contaminación bacteriana que representa un peligro inminente de transmisión y diseminación de enfermedades emergentes. Para tratar de minimizar estos efectos

existen diferentes alternativas como el uso de yema de huevo en polvo pasterizada, lectinas de origen vegetal como la lectina de soja o el uso de liposomas (Vidal *et al.*, 2012).

La alternativa más reciente como aditivo para los medios de congelación son los diluyentes basados en liposomas, estos poseen una excelente concentración y composición de fosfolípidos que garantizan la protección celular frente a las lesiones criogénicas producidas por la congelación de semen (Bergeron y Manjunath, 2006). El Optidux es un diluyente de alta calidad para semen fresco o congelación, basado en liposomas sintetizados (sin proteína animal) utilizado para remplazar el uso de la yema de huevo, permitiendo una preparación y preservación segura y de alta calidad en la dilución de semen fresco o para ser congelado (IMV-Technologies, 2014).

Con esta opción (Optidux), se evita el transporte de microorganismos patógenos, producción de metabolitos y toxinas nocivas de una explotación a otra. Permite un equilibrio seguro de 24 horas, por lo cual brinda la posibilidad de una mejor organización del trabajo, haciéndolo más flexible. Estudios reportaron que la utilización de diluyentes a base de soya en lugar de yema de huevo, para evitar la reducción de la motilidad y obtener mejores resultados postdescongelación (Roof *et al.*, 2012). Funciona significativamente mejor que la yema de huevo con un bajo número de espermatozoides por dosis. Los parámetros de motilidad son significativamente más altos, que en los diluyentes de yema de huevo Tris o lecitina de soya. Por otra parte, al reducir las posibilidades de contaminación por fuentes de origen animal y simplificar la preparación del diluyente y disminuir el tiempo del procedimiento es *per se* una ventaja, ya que este se agrega directamente al semen lo que permite que se puedan

realizar los procesos de acondicionamiento del eyaculado en la propia finca, para inseminación en fresco o para su congelación sin disminuir la vitalidad espermática (IMV-Technologies, 2014).

Por lo anteriormente planteado, han sido empleados sustitutos de la yema de huevo definidos químicamente y que no provienen de fuentes animales (El-Sisy *et al.*, 2018; Gamal *et al.*, 2016), formulados a partir de lecitina de soya y que podrían constituir alternativas potenciales para la criopreservación del semen (Akhter *et al.*, 2012).

En este contexto, el objetivo de esta investigación es comparar el efecto de dos diluyentes comerciales (basados en yema de huevo Triladyl® o liposomas Optidux®) sobre algunas variables de calidad y funcionalidad de los espermatozoides después de la descongelación evaluadas *in vitro*.

I.RREVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Criopreservación del semen Bovino

El proceso de criopreservación es el mantenimiento del metabolismo celular en un estado de inactividad, lo que permite la preservación de células y tejidos durante largos períodos de tiempo (Pérez, 2006). En este mismo aspecto, Walters *et al.*, (2009), indicaron que este proceso se ha estudiado desde hace muchos años atrás y aunque las referencias actuales de la criobiología y criopreservación de espermatozoides se remontan a los años 1600 (D.C), no fue hasta el desarrollo de la inseminación artificial (IA), a finales años 50 e inicios de los 60 del pasado siglo, cuando la industria lechera encontró los mejores métodos de almacenamiento de espermatozoides de toro a largo plazo, así que la criopreservación de semen se convirtió en un área de investigación científica muy importante.

Freitas *et al.*, (2009), indicó que la utilización de semen bovino congelado representa la principal biotecnología reproductiva para el mejoramiento genético animal. Sin embargo, este proceso inevitablemente produce un daño celular que resulta en una reducción del porcentaje de espermatozoides viables. Consecuentemente, Watson (2000), señaló que es de esperar al utilizar la inseminación artificial con semen congelado que la fertilidad obtenida sea menor, en comparación a cuando se utiliza semen fresco. De acuerdo con lo planteado por Smith y Johnson, (2018), la exposición prolongada de los espermatozoides a temperaturas no óptimas ya sea ambiente o refrigeración, puede resultar en una disminución de su viabilidad, principalmente debido al agotamiento de las reservas energéticas.

El mismo autor, señaló que el proceso de criopreservación incluye cinco etapas: dilución, adición del crioprotector, refrigeración, congelación y descongelación. Mientras que algunas fases son relativamente inocuas, otras son muy estresantes, como en el caso de la refrigeración, la congelación y la descongelación. Cada etapa del protocolo ejerce una interacción especial con la estructura, función de la membrana y metabolismo celular.

Investigaciones realizadas con semen congelado, encontraron la presencia de bacterias principalmente mesófilos e inclusive coliformes (Morales *et al.*, 2013), y por otra parte en la flora bacteriana del material espermático bovino se han encontrado microorganismos patógenos como *Actinomyces pyogenes bovis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* (grupos A y D de Lancefield), *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; con mayor frecuencia bacterias saprofitas de varios géneros y especies (Prado y Pérez, 2005). Como es lógico a mayor manipulación y en condiciones menos controladas la contaminación sería más frecuente, a pesar de esto no representan mucho peligro en el momento de la inseminación artificial, debido la presencia de antibióticos que se adicionan al diluyente.

El uso de yema de huevo o leche en los diluyentes tiene riesgos sanitarios asociados, incluida la producción de metabolitos y toxinas dañinas por el riesgo de infección, todo lo cual resulta en una reducción de la calidad del semen (Akhter *et al.*, 2008). De hecho, el riesgo de introducir enfermedades exóticas (por ejemplo, la gripe aviar o encefalopatía esponjiforme bovina), mediante el transporte de productos a base de huevo o leche, es una preocupación generalizada (Yildiz *et al.*, 2013).

Por lo tanto, en la actualidad la yema de huevo ha sido reemplazada por los liposomas sintéticos. A diferencia de los diluyentes a base de yema de huevo o leche, los liposomas sintéticos pueden producirse industrialmente e incorporarse a productos transparentes, químicamente definidos, fácilmente esterilizables y extensores listos para usar (Elhissi *et al.*, 2014). Estudios recientes demuestran la posibilidad de sustituir la yema de huevo por liposomas de origen vegetal para la congelación de semen de toro (Guillou *et al.*, 2016).

De acuerdo con De Armas (2022), el empleo del Optidux facilita la evaluación microscópica del semen al disminuir los artefactos en la muestra seminal (glóbulos de grasa procedentes de la yema de huevo o de la leche), a su vez mejora la exactitud de los registros del conteo celular con espectrofotómetros post descongelación del semen. Incluso permite someter estas muestras a evaluaciones con sistemas computarizados de análisis seminal (CASA).

1.2. Transmisión de enfermedades a través del empleo de diluyentes de con componentes de origen animal en el semen bovino congelado.

Los diluyentes a base de yema de huevo se utilizan ampliamente en la conservación de semen congelado y refrigerado (Stradaioli *et al.*, 2007). Según Bousseau *et al.*, (1998), indicaron que los mismos contienen hasta un 20% de yema de huevo, por lo que existe un alto riesgo de contaminación bacteriana o xenobiótica. Las endotoxinas producidas por estos contaminantes pueden reducir el potencial fecundante de los espermatozoides.

Como consecuencia directa, muchos países están preocupados por el riesgo de transmisión de diferentes enfermedades derivadas del uso de leche o huevos y que son las causales de aparición de enfermedades emergentes como ya hemos visto en el caso del N5H1 y de la encefalopatía espongiforme bovina. Además, la presencia de glóbulos de grasa provenientes de la yema en el diluyente puede interferir con el examen microscópico de los espermatozoides diluidos. Los huevos contienen una composición diversa y variable de estos glóbulos que dificultan el control de calidad (Bousseau *et al.*, 1998). Por lo tanto, se prefieren alternativas de diluyentes puros y libres de patógenos que no sean de origen animal.

Los estudios realizados por Althouse (2008) concluyeron que la composición del diluyente también puede proporcionar nutrición a las bacterias que se encuentren presentes. En otro estudio realizado por Meena *et al.*, (2010), se concluyó que la carga bacteriana en el diluyente tradicional a base de huevo es mayor que la de los diluyentes Biociphos que emplean extractos de soya.

Un desafío significativo del uso de yema de huevo y sus derivados es la contaminación microbiana por *Escherichia coli*. En consecuencia, el riesgo de contaminación microbiana asociada con el extensor de yema de huevo podría afectar negativamente la capacidad de fertilización del semen contaminado (Crespilho *et al.*, 2012). Sobre este mismo aspecto, Thibier y Guerin (2000), señalaron que la *E. coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Salmonella*, *Virus de la Influenza aviar*, *Campylobacter*, *Listeria* y *Mycoplasma* pueden transmitirse por la yema de huevo.

Los riesgos sanitarios asociados con el uso de yema de huevo y la relativa ineficiencia de los procedimientos de evaluación post descongelación son las principales razones para el desarrollo de sustitutos lipídicos de yema de huevo en la criopreservación de semen de mamíferos. El desarrollo y uso de extensores de semen libres de productos de origen animal y por ende la disminución del potencial de contaminación por patógenos, ayudarán aún más con el manejo y disminuirán algunas restricciones sanitarias del semen congelado (Westbury, 2001). En sentido general el riesgo de transmisión de Salmonella con el empleo de yema de huevo es motivo de especial preocupación. Este riesgo proporciona un sólido argumento para la eliminación de la yema de huevo de los procedimientos de criopreservación de semen, sin embargo, se ha demostrado, que la criopreservación de semen en soluciones que contienen solo glicerol es altamente ineficiente (Hallak *et al.*, 2000).

1.3. Diluyentes

Pérez *et al.*, (2016), señalaron que un diluyente en el contexto de la reproducción animal, particularmente en la conservación de semen, es una solución que se utiliza para diluir el semen antes de la congelación o refrigeración. Estos diluyentes suelen contener una combinación de nutrientes, electrolitos, antioxidantes y protectores osmóticos y de membrana para mantener la viabilidad y la integridad del semen durante el proceso de conservación.

1.4. Componentes de los diluyentes

1.4.1. Azúcares

Este es un compuesto importante en los diluyentes, que puede actuar tanto como fuente de energía como crioprotector extracelular por ser hidrófilo, lo que puede

contribuir a la deshidratación intracelular de los espermatozoides, entre los que podemos mencionar el caso de la glucosa, fructuosa, ribosa y trealosa según publicó Fernández (2013).

La cantidad de azúcar no debe ser menor al 0.5%, ni debe superar el 3% en la composición, ya que un exceso puede aumentar la osmolaridad (Lossada, 2013; Valdez, 2013; Yeste, 2017).

1.4.2. Sustancias buffer

Actúan dando estabilidad a la membrana, ya que permiten mantener la tonicidad total del diluyente, siendo esta importante cuando el semen es almacenado por largos periodos de tiempos. El bicarbonato y el citrato de sodio son los más simples presentando una capacidad de tamponar limitada, mientras que otros más complejos como el TES (ácido 2-tris hidroximetilmetil amina etanosulfónico), HEPES, MES y TRIS (hidroximetil aminometano), no dependen de la temperatura ni del CO₂ y regulan en una escala más amplia. El pH del diluyente debe de oscilar entre 6.8 y 7.2 (Boiso, 2001).

El Tris es ampliamente utilizado como uno de los ingredientes principales en los diluyentes para la congelación de semen bovino debido a su estabilidad osmótica, capacidad tampón y baja toxicidad en altas concentraciones y junto a la yema de huevo ha demostrado combinaciones exitosas, conocido como EYT (Carpio, 2015).

1.4.3. Lipoproteína

Pérez (2005), señaló que la yema de huevo es un componente común en los diluyentes para congelar el semen de los animales, cuya función es proteger a los

espermatozoides del choque térmico, que es un efecto de transición de fase en la bicapa lipídica, y brinda protección durante el congelado y descongelado. La leche y la yema de huevo son ingredientes de los diluyentes más utilizados como protectores térmicos y fuentes de nutrientes, porque los componentes lipoproteicos de la leche también son capaces de proteger contra el frío, incluso si no hay yema de huevo.

La lecitina de soya es un complejo de fosfolípidos compuesto por fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol, del cual el FC es el principal componente de la lecitina, representando el 98% (Torres y Duran, 2015).

Fiume (2001), señala que la inclusión de la lecitina de soya en los diluyentes de criopreservación al parecer no tiene efecto citotóxico en las células espermáticas, ni consecuencias desfavorables en la motilidad de los espermatozoides.

1.4.4. Agua Destilada

Actúa como solvente para los componentes del diluyente. Debe ser destilada (o bidestilada), para eliminar la presencia de metales pesados en solución, los que son dañinos para el espermatozoide (Viotti, 2011), que sugerentemente, haya sido envasada recientemente, ya que diversos estudios comentan que el agua con varios días de embotellada ya sea de garrafón de vidrio o de plástico, afecta la calidad de los espermatozoides congelados (Ochoa y Ortega, 2008).

A su vez mediante la destilación se eliminan las impurezas, contaminantes y los iones, ya que minimizan el riesgo de introducir, sales minerales y microorganismos, consecuentemente garantizan que las soluciones sean consistentes, ya que es crucial en experimentos y procedimientos donde la precisión es fundamental se cuente con

una composición definida en las soluciones. La conductividad del agua destilada y desionizada es casi nula, al perder en el proceso muchos iones que son los responsables de esta, habitualmente cloruros, calcio, magnesio y fluoruros, ya que los mismos pueden participar en reacciones no deseadas, afectando la validez de los resultados (Pérez y Merino, 2015)

1.4.5. Antibióticos

Morrell y Wallgren (2014), señalaron que la adición de antibióticos en el diluyente es de gran utilidad, para reducir la contaminación de microorganismos que se puedan adquirir durante la recolección y procesamiento del semen.

Las fuentes de contaminación han sido clasificadas en relación con el animal, entre las que incluyen en primera instancia la materia fecal, líquido preputial, la piel o el pelo, mientras que en segunda están las no relacionada con el animal, como el agua, drenajes, sistemas de ventilación entre otros (Althouse *et al.*, 2008).

También los componentes de origen animal empleados en la preparación de los diluyentes (leche o huevos), pueden ser fuentes potenciales de contaminación, por lo cual la adición de antibióticos y antimicóticos resulta de gran importancia. Para la selección de estos resulta necesario evaluar su citotoxicidad para los espermatozoides entre los de mayor elección se encuentran estreptomicina, penicilina, lincomicina, gentamicina y espectinomicina. La adicción de penicilina y estreptomicina fue en principio la combinación más utilizada, sin embargo, algunas bacterias demostraron resistencia a estos antibióticos según Yániz *et al.*, (2010).

Jasko *et al.*, (1993), mostraron un efecto negativo en la motilidad de los espermatozoides cuando se utilizaron concentraciones de gentamicina de >1 mg/mL en espermatozoides equinos.

Estudios realizados por Anel-López *et al.*, (2021), evidenciaron que al utilizar gentamicina en concentraciones de 1mg/mL, hubo una disminución significativa en la fertilidad y la capacidad fecundante. Con esta misma concentración, Aurich y Spergser (2007), habían señalado que la motilidad de los espermatozoides evaluados *in vivo* se redujo significativamente y la inhibición bacteriana no fue tan alta como se esperaba. Por estas razones se debe ser cuidadoso en la dosificación de los antibióticos que se aplican a los diluyentes seminales.

1.4.6. Agentes crioprotectores

Son sustancias que posibilitan la reducción o sustitución del agua intracelular mediante procesos de deshidratación celular, lo que facilita la disminución de cristales de hielo intracelular y previene el daño causado por la alteración del estado del agua por debajo de los 0°C. Los crioprotectores pueden ser clasificados en permeables y no permeables. Los compuestos permeables pueden presentar un efecto tóxico al atravesar la membrana espermática (modificación de la permeabilidad), provocando una interrupción del potencial de membrana mitocondrial, dañan las proteínas de superficie, alteran la composición proteica (fosforilación) impactando la función espermática, disminuyendo la motilidad y viabilidad (Yotov *et al.*, 2019).

La función de los crioprotectores es la de proteger a los espermatozoides de futuras lesiones producidas por la congelación, actuando en la reducción de la cantidad de hielo presente a cualquier temperatura durante la congelación, moderando los cambios en la concentración de solutos (Carpio, 2015). Normalmente se ha utilizado el glicerol, este es algo tóxico y los espermatozoides muertos son fuentes de aminoácido oxidasa que es a su vez es dañina para las células (Viotti, 2011).

1.4.6.1. Crioprotectores intracelulares o permeables

Estos crioprotectores pueden penetrar la membrana de las células y son relativamente no tóxicos a concentraciones de hasta 1 molar (M). Su mecanismo de acción se debe a su capacidad para reducir la concentración de electrolitos y la presión osmótica a bajas temperaturas. En particular, estos agentes, al insertarse en la bicapa fosfolipídica, tienen un impacto en la viscosidad del citoplasma, las velocidades de difusión y las características de la membrana celular. El glicerol, el etilenglicol, el etanol, el propilenglicol, el dimetilacetamida, el dimetilsulfóxido (DMSO) así como otros, pertenecen a este grupo (Yeste, 2016).

Los más importantes se describen a continuación:

1.4.6.1.1. Glicerol

Es un alcohol que fue descrito por Polge hace más de 70 años y también tiene múltiples funciones, siendo el crioprotector más empleado en bovinos. Se agrega generalmente al diluyente en concentraciones volumen/volumen del 3 al 7 %, comprobando que su adición durante la disminución de la temperatura reduce el daño ultraestructural del espermatozoide (Ptáček *et al.*, 2019).

Sin embargo, un exceso de glicerol afecta la integridad de la membrana reduciendo la longevidad de los espermatozoides, por lo que su uso a concentraciones superiores al 10% debe ir acompañado de una disminución en las curvas de descenso de temperaturas para reducir el efecto tóxico en el espermatozoide (Raseona *et al.*, 2017).

1.4.6.1.2. Dimetilsulfóxido (DMSO)

Es un crioprotector que, al igual que otros alcoholes, deshidrata los tejidos antes de congelarlos. La principal característica de su acción crioprotectora es su capacidad para evitar la acumulación de electrolitos y otras sustancias durante la congelación. La probabilidad de formación de cristales de hielo intracelular y desestabilización de la membrana y la bicapa de los fosfolípidos disminuye cuando no hay electrolitos. Sin embargo, DMSO tiene toxicidad espermática y bajo rendimiento post congelamiento, por lo que es poco utilizado en bovinos (Bhattacharya, 2018).

1.4.6.1.3. Etilenglicol (EG)

Es un crioprotector con un alto coeficiente de permeabilidad celular, por lo que no se sobre hidratan las células durante la descongelación como ocurre con el glicerol, el DMSO o el etilenglicol a 12°C. Sin embargo, al mezclarse con un 40% de agua, el EG evita la formación de cristales y alcanza un punto de congelación de -45°C, aunque en algunos tejidos se ha demostrado su toxicidad (Kandelousi *et al.*, 2013).

1.4.6.2. Crioprotectores no permeables

Este tipo de crioprotectores son sustancias de alto peso molecular que se consideran efectivas a velocidades altas de congelación y ejercen su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular. Suelen usarse en

conjunto con crioprotectores permeables. Este efecto tiene como objetivo prevenir más efectivamente la formación de hielo y estabilizar las proteínas y las membranas celulares. Estos elementos no pasan a través de la membrana plasmática, lo que les impide desempeñar su función intracelularmente (Fernández *et al.*, 2009).

1.4.6.2.1. Yema de huevo

Por su capacidad para mantener la viabilidad espermática y posterior al proceso de congelación, es el crioprotector más utilizado en la congelación de semen de mamíferos. Es un crioprotector no permeable que disminuye la formación de cristales de hielo extracelular. Esto sucede porque las lipoproteínas de baja densidad (LDL), de la yema de huevo se adhieren a la membrana celular y reemplazan los fosfolípidos dañados. Puede reducir la actividad perjudicial de las proteínas en el plasma seminal de los toros. En ausencia de carbohidratos solubles, los espermatozoides reciben energía de la lecitina de la yema de huevo. Sin embargo, tiene desventajas, como la presencia de bacterias que causan contaminación en la muestra, la aglutinación de espermatozoides durante la congelación y la descongelación (capacitación prematura) y la variabilidad de su origen, que dificulta la estandarización de los diluyentes (Hezavehei *et al.*, 2018).

1.4.6.2.2. Lectina de soya

Es un fosfolípido que se extrae de la soya y que también contiene una mezcla de carbohidratos, triglicéridos, ácidos grasos, pigmentos, esteroides, glucósidos de esteroides, tocoferoles y ésteres. En muchas especies de mamíferos, incluidas ovejas, cabras, toros, gatos, perros, cerdos, jabalíes y cerdos, se utiliza con frecuencia como

sustituto de la yema de huevo como crioprotector. El estar libre de patógenos (principal problema con la yema de huevo) es su mayor ventaja (Gamal *et al.*, 2016).

La lecitina de soya funciona como un aditivo para diluyentes y reduce el flujo de salida de colesterol o fosfolípidos. La concentración ideal es del 1% del volumen del diluyente, lo que mejora la calidad de los espermatozoides después de la descongelación; sin embargo, usar concentraciones más altas puede tener efectos tóxicos (González y Pallares, 2014).

1.4.6.2.3. Trehalosa

Es un crioprotector considerado una macromolécula que además es un azúcar, este disacárido que posee una acción crioprotectora relacionada con el efecto osmótico (que favorece la deshidratación) y a su interacción con la membrana espermática, que le confiere una protección adicional contra la deshidratación. Esto da como resultado una menor cantidad de agua intracelular en los espermatozoides, por lo tanto, hay menor formación de cristales de hielo intracelulares disminuyendo el daño criogénico. La trehalosa se une a la membrana fosfolipídica donde facilita interacciones que dan como resultado una membrana más estable durante la congelación (Güngör *et al.*, 2016). La trehalosa y el glicerol no pueden unirse con el hidrógeno del grupo de cabezas fosfolipídicas de la misma manera. Además, agregar EDTA + trehalosa al diluyente mejora la criopreservación al eliminar Ca^{2+} con el disacárido, lo que ayuda a estabilizar la membrana (Yotov *et al.*, 2019).

1.4.6.2.4. Ácido alfa-lipoico

Es un crioprotector que se destaca por su acción en la mitocondria, produciendo un efecto antioxidante y teniendo la capacidad de reparar las lesiones oxidativas de la

célula. Tiene una alta afinidad por los radicales libres, la capacidad de aumentar los niveles de glutatión y la capacidad de reducir la formación de peróxidos lipídicos, lo que resulta en una función antioxidante (Underwood *et al.*, 2019).

1.4.6.2.5. Ácidos grasos

Los ácidos grasos se utilizan con frecuencia como crioprotectores, especialmente los omegas 3, 6 y 9; que han demostrado mejorar la motilidad espermática y se ha descrito que los ácidos grasos polinsaturados igualmente que los de cadena larga fluidifican la membrana plasmática, lo que permite que el espermatozoide sea más resistente a las bajas temperaturas (Moo, 2019).

1.5. Principales diluyentes comerciales utilizados para la congelación de Semen Bovino

1.5.1. Triladyl

El Triladyl es un diluyente empleado en la preservación del semen bovino con gran frecuencia. En general, este diluyente contiene una mezcla de componentes como lactosa, glicerol, yema de huevo, fructosa y una mezcla de tilosina, gentamicina, espectinomina y lincomicina como antibióticos. Este compuesto posee como buffer, principalmente el TRIS (Hidroximetil amino metano, funciona como amortiguador sintético). Estos ingredientes tienen la función de proporcionar nutrientes, protección celular y energía para los espermatozoides durante el proceso de congelación (Silva *et al.*, 2019). Además, es ideal en la congelación de semen en otros rumiantes como es el caso de ovinos, caprinos y ciervos.

Palomino *et al.*, (2001), indicaron que es sumamente importante resaltar que los diluyentes conteniendo yema de huevo son beneficiosos en la preservación de la

fertilidad de los espermatozoides, en la protección contra el shock por frío y variaciones de temperatura de conservación, por las lipoproteínas y lecitinas (fosfolípidos), contenidas en la yema de huevo.

Otros autores afirman que los diluyentes a base de yema de huevo han demostrado mejorar la viabilidad y la motilidad del semen bovino post descongelación, gracias a los lípidos y proteínas presentes en la yema que protegen las membranas celulares de los espermatozoides (Varela *et al.*, 2018). Por otro lado, Martínez *et al.*, (2018), señalaron que los diluyentes con yema de huevo han mejorado en la viabilidad y motilidad del semen bovino congelado, atribuido a los nutrientes y proteínas presentes en la yema, que protegen la integridad celular.

Protocolo para la dilución de la solución madre de Triladyl.

- 1) Desinfectar el área (alcohol etílico) antes de la preparación.
- 2) Calentar el baño maría a 37°C
- 3) Colocar los vasos de precipitación en el baño maría.
- 4) Extraer 20 ml de Triladyl en una jeringuilla estéril.
- 5) Colocar el agua destilada en el vaso de precipitación.
- 6) Extraer 60 ml de agua destilada, con ayuda de una jeringuilla estéril.
- 7) Adicionar el agua destilada y homogenizar.
- 8) Desinfectar el huevo con alcohol etílico, secar con papel.
- 9) Romper el huevo y verter sobre una superficie limpia y estéril (papel).
- 10) Con la ayuda de una jeringa estéril, extraer 20 ml de yema de huevo.
- 11) Dejar reposar por 5 minutos y colocar en los tubos de conservación.
- 12) Colocar en refrigeración a 5°C por un periodo máximo de 5 días.

1.5.2. Biladyl

Este diluyente comercial se combina con yema de huevo al igual que el Triladyl, permitiendo que los fosfolípidos y lipoproteínas presentes en ella funcionen como protector de la membrana espermática para evitar desestabilización y choque térmico. Este diluyente aporta altas tasas de supervivencia y longevidad espermática (Gadea, 2003).

Contiene TRIS, ácido cítrico, azúcar, tampones, glicerina y agua purificada. Triladyl® contiene antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina). El Biladyl® no contienen antibióticos por lo que esta mezcla se adiciona en un segundo paso.

Protocolo de dilución del semen con el Biladyl:

- 1) Los antibióticos son adicionados cuidadosamente al semen puro en una proporción de 0.02 ml de la mezcla de antibióticos por cada ml de semen. Los antibióticos deben estar en contacto por 3 a 5 minutos con el semen puro, antes de proseguir con la dilución.
- 2) En un matraz o tubo de ensayo de 50 ml, el semen con antibióticos es lentamente diluido con un pequeño volumen de Fracción A precalentada. Dependiendo del número calculado de pajillas a procesar, el eyaculado debe luego diluirse con más Fracción A hasta completar el 50% del volumen de diluyente total a usar. La Fracción A del diluyente debe tener la misma temperatura del semen al momento de mezclarse (28 - 32°C).
- 3) Enfríe el semen diluido lentamente durante un periodo mínimo de dos horas hasta llegar a 4°C. Para realizar este paso, el recipiente con el semen

diluido debe dejarse enfriar hasta temperatura ambiente, y luego se coloca en un cuarto frío o refrigerador a 4°C. Nota: 300 ml de líquido con una temperatura de 30° a 35°C disminuyen su temperatura hasta 4°C en un período aproximado de dos horas.

4) La segunda mitad del volumen total de diluyente corresponde a la Fracción B, que contiene glicerol, la cual debe estar pre-enfriada a 4°C. El volumen de Fracción B se adiciona gradualmente al semen ya extendido con Fracción A durante un período de 30 minutos, hasta alcanzar una proporción 1:1. El volumen final de semen completamente extendido contendrá una concentración final de 7% glicerol.

5) El semen ya completamente diluido debe tener un período de equilibrio, a 4°C, por un mínimo de cuatro horas. Este tiempo puede ser usado para llenar y sellar las pajillas, y ubicarlas sobre las gradillas de congelación y conteo.

1.5.3. Andromed®

Es un concentrado estéril para la preparación de un diluyente libre de yema de huevo para eyaculados bovinos, por lo que disminuye la probabilidad contaminación por bacterias (Muiño y Peña, 2009). Es utilizado para la congelación de semen y para la conservación de semen fresco.

Cada frasco de AndroMed® contiene 200ml de concentrado para la preparación de 1.000ml de diluyente listo para su utilización. Su contenido en antibióticos corresponde al estándar de la UE: EC norma 88/407. Está compuesto por: fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcar, antioxidantes, tampones, glicerina, antibióticos y agua de

extrema pureza. Cada 100ml del diluyente preparado contienen (unidades activas): Tilosina 5.0mg, gentamicina 25,0mg, espectinomicina 30,0mg y lincomicina 15,0mg (24) (Minitube, 2012).

Es uno de los diluyentes que no contiene yema de huevo en su composición, este es un diluyente a base de lectina de soya libre de ingredientes de origen animal y es de fácil preparación ya que solo se le agrega agua destilada.

Protocolo de dilución del semen con la solución madre de Andromed

- 1) Desinfectar el área (alcohol etílico) antes de la preparación.
- 2) Calentar el baño maría a 37°C.
- 3) Colocar los vasos de precipitación en baño maría.
- 4) Medir en la probeta de 100 ml, 40 ml de agua destilada.
- 5) Colocar el agua destilada en el vaso de precipitación.
- 6) Medir en una probeta 10 ml de Andromed.
- 7) Adicionar el agua destilada y homogenizar.
- 8) Dejar reposar por 5 minutos y colocar en los tubos de conservación.
- 9) Colocar en refrigeración a 5°C por un periodo de 5 días.

1.5.4. Optidux

Este diluyente es recomendado para semen fresco y congelado donde ayuda a la motilidad en concentraciones subóptimas, está basado en liposomas sintéticos (sin proteína animal), esto reemplaza la yema de huevo, permite una preparación y preservación segura y de alta calidad de sus dosis de semen fresco y congelado (Melo, 2020). Composición: Carbohidratos, sales minerales, tampón, antioxidantes, glicerol,

fosfolípidos, agua ultrapura, antibióticos (Gentamicina, Tilosina, Lincomicina y Espectinomicina).

Algunas de las ventajas de emplear este diluyente son:

- Evita el peligro de transportar e introducir enfermedades exóticas a través de productos de origen animal (leche o huevo)
- Evita el transporte de microorganismos patógenos, la producción de metabolitos y toxinas nocivos.
- Disminuye el tiempo de preparación del eyaculado ya sea para IA o congelación.
- Disminuye la proliferación de microorganismos en el semen preservado, al disminuir el tiempo desde la preparación a su utilización.
- Permite una mejor evaluación microscópica y su uso para estudios en equipos tales como espectrofotómetros y CASA.
- Alto rendimiento con bajos números de espermatozoides por dosis.
- Disminuye la complejidad en la preparación del eyaculado sin comprometer la calidad y permite una mayor rapidez, lo cual facilita su utilización a nivel de fincas.

Este diluyente viene listo para adicionarse directamente al semen de acuerdo con las concentraciones del eyaculado obtenido y la concentración final deseada en la dosis para IA.

1.5.4.1. Liposomas

Según Hernández (2017), señalo que los liposomas son vesículas hechas del mismo material que las membranas celulares. Las membranas suelen estar formadas

por fosfolípidos, que son moléculas anfipáticas. En la naturaleza, los fosfolípidos se encuentran en membranas bicapa estables.

Torelló *et al.*, (2002), indicó que los liposomas son moléculas insolubles en agua, pero constituyen una dispersión coloidal. Las partes polares, también conocidas como cabezas, se agrupan en una forma que envuelven la fase líquida, mientras que las colas se sitúan una junto a otra, formando una bicapa. La estructura de los liposomas está determinada por su naturaleza química, la longitud y saturación de las cadenas de hidrocarburos presentes, el pH y la carga iónica. Por cambio, los fosfolípidos son los compuestos más empleados para la producción de liposomas, basándose la diferencia en el grupo fosfato. Así, es posible combinar aminoácidos (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina), aminoácidos (fosfatidilserina), alcohol (fosfatidilglicerol) y azúcar (fosfatidilinositol). Por lo general, la fosfatidilcolina (lecitina) es el fosfolípido más utilizado para la producción de liposomas porque se obtiene fácilmente de frutas y semillas de soya.

1.6. Métodos de extracción de semen en bovinos más utilizados.

1.6.1. Vagina artificial

Morillo *et al.*, (2012), indicaron que la vagina artificial consistía en la utilización de un tubo cilíndrico de plástico, de 7 cm de diámetro y largo de 35 a 40 cm, recubierto internamente por una camisa de goma que se dobla sobre los extremos del cilindro formando una cámara que se llena de agua caliente a temperatura de 45 – 46°C y aire, con el propósito de proveer el estímulo adecuado de temperatura y presión, que logra la eyaculación en el bovino.

1.6.2. Electroeyaculación

En éste método se hace uso de un electroeyaculador que no es más que un electrodo conectado a una batería que genera estimulaciones rítmicas provocadas por descargas no mayores a 20 voltios (Tello, 2017).

Los electroeyaculadores están diseñados para estimular los nervios pélvicos simpáticos y parasimpáticos con impulsos de bajo voltaje y amperaje. La técnica emplea pulsos eléctricos muy leves sobre las áreas de la próstata y vesículas seminales, de manera que inducen la erección y eyaculación (Duarte, 2008).

Un sistema de electroeyaculación está constituido por los siguientes componentes: la caja de transporte, la sonda rectal, la unidad de control, el cargador de batería, el cable de energía, el cable de conexión de la sonda, el mango, el cono y el envase de colección (Olivera y Nicolas, 2009).

Con la utilización del electroeyaculador, como método para la recolección de semen, la eyaculación es un proceso bifásico, primero ocurre la emisión y continúa con la erección y la eyaculación propiamente dicha. Cuando se produce la estimulación adecuada, esta viaja vía nervio pudendo interno hacia los centros lumbosacros de la columna vertebral, desde allí parte la respuesta vía nervios simpáticos lumbares (nervio erigente del plexus hipogástrico), lo cual estimula la contracción de la musculatura lisa que recubre la próstata, glándulas vesiculares y conductos deferentes, asegurando la progresión de la masa espermática hacia la uretra pélvica (Morillo *et al.*, 2012).

1.7. Examen para valorar la calidad de semen pre y post congelación

1.7.1. Características macroscópicas

Las características macroscópicas que se evalúan en el semen de los bovinos son: olor, color y volumen. Algunos exámenes también evalúan el aspecto y la densidad macroscópica del semen (Agüero, 2012).

1.7.1.1. Aspecto general y movimiento de masa

En la evaluación del semen, el aspecto general es crucial y abarca diversos criterios visuales, como color, transparencia, viscosidad y presencia de coágulos. Esta evaluación se realiza visualmente y proporciona información inicial sobre la calidad del semen (González *et al.*, 2018).

El movimiento de masa espermática, también conocido como motilidad total, es esencial en la evaluación del semen, ya que refleja la capacidad de los espermatozoides para desplazarse de manera coordinada. Este patrón de movimiento se analiza mediante microscopía de campo claro o técnicas de evaluación computarizada, y su calidad está directamente relacionada con la capacidad de fertilización del semen (Martínez *et al.*, 2018). Sin embargo, la ausencia de la actividad masiva no determina si un eyaculado es de baja calidad (Wysokińska, 2022).

1.7.1.2. Volumen

Sarabia (2015), menciona que el volumen del eyaculado es aportado principalmente por las vesículas seminales y la próstata, con una pequeña porción proveniente de las glándulas bulbouretrales y epididimarias. Conocer el volumen de

semen es necesario para poder calcular hasta que dilución podemos someterlo, sin afectar el grado de deshidratación necesaria para la congelación espermática.

El volumen del eyaculado se expresa en mililitros (ml), y su lectura se hace por medio de un tubo recolector graduado. Normalmente dicho valor, para el eyaculado de toros, es de aproximadamente 2 ml en animales jóvenes y en animales adultos \geq a 4 ml, llegando hasta 12 ml. Existen importantes variaciones en función del individuo, raza, régimen sexual, estación del año, método de colecta (Gómez, 2011).

Según Graham (2001), señalaron que los animales jóvenes y los de menor talla dentro de una especie, producen menor volumen de semen. La elevada frecuencia de eyaculación reduce el volumen promedio y cuando se obtienen dos eyaculados consecutivamente, el segundo suele tener menor volumen. El que éste sea reducido no es perjudicial, pero si se acompaña de concentración espermática baja, por lo que el resultado total disminuirá”.

1.7.1.3. Color del semen bovino

Se consideran normales los colores que van del blanco al amarillento, siendo patológicos, los colores rosado, amarronado y verdoso (Gómez y Migliorisi, 2007).

El color del semen bovino puede variar desde blanco lechoso hasta amarillo claro, y su evaluación visual es un componente importante en la valoración de la calidad seminal. Cambios en el color pueden indicar condiciones médicas subyacentes o alteraciones en la composición del semen, lo que resalta la importancia de este parámetro en la evaluación de la fertilidad y la salud reproductiva del ganado (González *et al.*, 2018).

Otros autores han afirmado que el color amarillo del semen bovino y caprino puede atribuirse a la presencia de riboflavina en las secreciones de las glándulas vesiculares. La cantidad de riboflavina puede variar según factores como la raza, la dieta y las características individuales del animal (Ax *et al.*, 2000).

Por otro lado, Barth *et al.*, (2003), indicaron que el semen que posee una coloración blanquecina a ligeramente amarillenta, su opacidad se basa en función de la concentración espermática. Los eyaculados muy buenos tienen apariencia densa con una concentración de 750 a 1.000 millones de espermatozoides por mililitro y los clasifican como:

1. Bueno, semen opaco, lechoso con 400 a 700 millones/ml.
2. Regular, semen con aspecto de leche aguada, 250 a 400 millones/mL.
3. Malo, semen translucido y acuoso, con menos de 250 millones/mL.

Una tonalidad gris determina contaminación; una coloración verdosa con apariencia acuosa, indica eyaculados con ausencia de espermatozoides, es decir, la existencia de procesos necrotizantes, de carácter purulento y el reconocimiento de pus se identifica por la presencia de flóculos, determinado que existe una inflamación, a lo que se denomina piospermia (Cuberlo y Rodríguez, 2013).

1.7.1.4. Olor

Las muestras de semen recogidas higiénicamente de toros sanos y fértiles tienen un olor catalogado como sui géneris, es decir, un débil olor aromático como a yema de huevo (Morillo *et al.*, 2012).

Barszcz *et al.*, (2012), señalaron que el olor del semen de toro es similar al de la leche de la vaca. El semen puede tomar un olor dependiendo del estado y condición del animal, de igual manera cuando se mezcla con orina e incluso cuando hay procesos purulentos o por la falta de limpieza del prepucio del animal.

1.7.2. Características microscópicas

Las características microscópicas que se evalúan en el semen de bovinos son: motilidad total, motilidad individual, morfología, viabilidad y concentración espermática (Agüero, 2012).

1.7.2.1. Concentración espermática

Cabrera y Pantoja (2012), indicaron que la determinación de la concentración de espermatozoides es una prueba importante de la calidad del semen, ya que es la que define el potencial de fertilidad del animal colectado. Una vez encontrada la concentración del semen y el volumen del eyaculado se podrá obtener el valor de dilución y el número de dosis para lograr grados adecuados de fertilidad. Por lo general la concentración que se obtiene en el eyaculado de toro es de 20×10^6 de espermatozoides /ml. En este caso se usa la escala descrita por Almela (2014), para concentración macroscópica en bovinos:

- Azoospermico: ausencia de espermatozoides en el eyaculado.
- Oligozoospermico: ≤ 200 millones espermatozoides/mL.
- Ralo: 200–500 millones espermatozoides/mL.
- Semidenso: 500–800 millones espermatozoides/mL.
- Denso: 800–1.500 millones espermatozoides/mL.
- Densísimo: ≥ 1.500 millones espermatozoides/mL.

Existen diversos métodos para medir la concentración espermática; algunos de estos métodos son: la espectrofotometría, la colorimetría, la citometría de flujo y el uso de cámaras de recuento celular, como las de Bürker, Neubauer o Thomas (Hidalgo, 2005). El método más utilizado es el de la cámara de Neubauer, denominado también Hemocitómetro.

1.7.2.2. Motilidad espermática

López *et al.*, (2012), demostraron que la motilidad de los espermatozoides se puede determinar con base al porcentaje de espermatozoides que se mueven gradualmente y se expresa en porcentaje (%). Para realizar el procedimiento se coloca una gota de esperma en un portaobjetos y se recubre con un cubreobjetos. La muestra es observada bajo un microscopio con un objeto de 40x. Para realizar esta valoración solo contemplamos los espermatozoides de motilidad progresiva, que son aquellos que se desplazan de un punto a otro, en línea más o menos recta. Los mismos autores, describen la movilidad como uno de los parámetros más importantes en la evaluación de una muestra de semen. Un espermatozoide inmóvil es incapaz de atravesar el moco cervical y mucho menos las envolturas del ovocito.

La motilidad espermática es uno de los parámetros utilizados para conocer la calidad seminal y su correlación con la fertilidad. Hasta nuestros días, la motilidad se ha venido evaluando de forma subjetiva mediante la observación al microscopio de los porcentajes de células móviles (Miró, 2015). Pero ya hay equipos computarizados de análisis seminal (CASA) que valoran todo tipo de movilidad espermática (vibratoria, circular, retrógrada, lenta y progresiva normal).

La valoración de la motilidad como único parámetro de calidad seminal no es suficiente para predecir la capacidad fecundante del semen, es solo uno de los requisitos que ha de cumplirse, para la correlación existente entre la motilidad de una muestra de semen y su fertilidad real, aunque esta sea baja (Veloz, 2017).

1.7.2.3. Motilidad total

Evans y Maxwell (1989) indicaron que la motilidad total (MT) consiste en observar las ondas que produce una masa espermática en movimiento y debe realizarse inmediatamente después de la obtención del eyaculado en condiciones isoterma y sin diluir el mismo. Esta evaluación proporciona información importante sobre la calidad del semen y su capacidad potencial para fertilizar.

Esta MT está directamente relacionada con la concentración espermática, el movimiento progresivo y el vigor de ese movimiento; así, a mayor cantidad de espermatozoides se formará una mayor cantidad de ondas y se expresa en una escala de clasificación subjetiva de 1 a 5 (Páez y Corredor, 2014).

Para la observación de la MT se coloca una gota del semen puro sobre un portaobjetos atemperado a 36-37°C, sobre una platina térmica de microscopio, y se lo observa a 40 aumentos (lupa), evaluando la presencia de ondas omega. Se debe evaluar cerca del borde de la gota, donde la profundidad de esta es menor y es más fácil de observar.

1.7.2.4. Motilidad individual progresiva

Según Hernández (2020), indica que los espermatozoides con motilidad individual progresiva son aquellos que se presentaban desplazamiento energético,

activo y rectilíneo en sentido de avance. El porcentaje que se indica es para mostrar el movimiento rectilíneo progresivo del total de espermatozoides presentes, el valor optimo es del 50% o más.

Para Hafez (2002), indica que esta variable evalúa el porcentaje de células móviles en semen diluido. Para la evaluación se usa una escala de 0 a 100%, considerando que motilidades >70% son excelentes, entre 50 a 70% buenas, 30 a 50% regulares y <30% malas.

Barth *et al.*, (2003), mencionaron que la motilidad individual se determina por los movimientos progresivos del espermatozoide. Escala basada en la velocidad de movimiento de las células móviles (Tabla 1).

Tabla 1. Escala de evaluación de la motilidad de los espermatozoides.

Escala	Características
0	Inmóviles o muertos
1	Girando entre sí, sin movimiento progresivo.
2	Movimientos anormales, en ocasiones progresivo.
3	Con movimiento progresivo lento y ondulatorio.
4	Con movimientos progresivo rápido.
5	Con movimiento progresivo rectilíneo muy rápido.

Fuente: (Rutter y Russo, 2006)

1.7.2.5. Vigor

El vigor espermático es un parámetro crucial en la evaluación de la calidad del semen bovino, ya que refleja la capacidad de los espermatozoides para moverse de

manera activa y con energía. Esta evaluación se realiza mediante pruebas que determinan la fuerza y la velocidad del movimiento de los espermatozoides, lo que proporciona información valiosa sobre su capacidad de fertilización (Rivera y Ramírez, 2019).

Rutter y Russo (2006), describieron al vigor como la medida del grado de intensidad de movimiento progresivo rectilíneo. Este se evalúa sobre la misma preparación utilizada para el movimiento individual. Se mide en una escala subjetiva de 0 a 5.

1.7.2.6. Morfología espermática

La morfología espermática es un parámetro crucial en la evaluación de la calidad del semen bovino, ya que la forma y estructura de los espermatozoides están estrechamente relacionadas con su capacidad de fertilización (Palacios, 2005).

Gualancañay (2012), hace referencia al estudio de la forma del espermatozoide que permite determinar las posibilidades de fertilización de la célula. Aquellos eyaculados con una gran cantidad de células anormales tendrán menos posibilidades de ser fértiles. Según Howard y Pace (1998), a medida que aumenta la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, disminuye su capacidad para fertilizar. Esta relación entre la morfología espermática y la fertilidad ha sido ampliamente estudiada y se ha encontrado que la presencia de espermatozoides con anomalías morfológicas puede afectar negativamente la capacidad de concepción del semen.

Por otro lado, Vilanova y Ballarales (2005), consideraron que un buen productor de semen no debe de presentar más del 30% de anomalías espermáticas totales en

el eyaculado recolectado. En este mismo aspecto, Perry y Patterson (2008), mencionaron que un toro debe tener por lo menos un 30 por ciento de movilidad de espermatozoides, 70 por ciento de morfología normal de los espermatozoides. Es usual que cada muestra de semen contenga algunas células espermáticas anormales.

1.7.2.7. Viabilidad espermática

Este aspecto es fundamental en la evaluación de la calidad del semen bovino, ya que permite mediante el uso de coloración selectiva de espermatozoides separar los vivos y muertos, como consecuencia de los cambios ocurridos que se producen tras la muerte celular. Esta evaluación se realiza mediante pruebas que determinan la viabilidad de los espermatozoides, como la prueba de eosina-nigrosina, que distingue entre espermatozoides vivos e inactivos o muertos (Ávalos *et al.*, 2018).

En este método, la eosina se convierte en el colorante vital, permitiendo observar los espermatozoides muertos teñidos en rosado, mientras que los espermatozoides vivos no son coloreados. Otras alternativas efectivas a la eosina son el rojo de bengala, la eritrosina, el verde cresol o el azul de bromofenol; sin embargo, en cualquier situación, se elige el azul de anilina o la nigrosina como tintes de fondo. Con el tinte eosina-nigrosina, los espermatozoides fallecidos se muestran coloreados en rojo o rosa, mientras que los espermatozoides vivos permanecen sin coloración (Vázquez y Vázquez, 2007).

Aisen *et al.*, (2002), señalaron que esta prueba permite predecir la capacidad fértil de un toro, toda vez que se ha encontrado correlaciones altas y positivas con la tasa de fertilidad *in vivo*. Los espermatozoides con alta vitalidad tienen una mayor

probabilidad de alcanzar y fecundar el óvulo, lo que mejora las tasas de concepción y la eficiencia reproductiva en el ganado bovino.

1.7.2.8. Prueba de incubación o termo resistencia.

La prueba TTR (Test de Termo Resistencia) es una evaluación importante en la valoración de la calidad del semen bovino, ya que permite la evaluación de semen fresco o postdescongelación, el procedimiento consiste en incubar las muestras de semen a 38°C durante 2 o 5 h (prueba lenta) o a 46°C durante 30 minutos (prueba rápida), después de utilizar cualquiera de las pruebas, el semen descongelado deberá tener un 15% de motilidad como valor mínimo, mientras que para semen fresco debe tener al menos un 70% para que este sea considerado de buena calidad (Peláez *et al.*, 2006; Talíni *et al.*, 2019).

Esta prueba se utiliza para determinar la capacidad de los espermatozoides para soportar cambios de temperatura y, por lo tanto, su resistencia a condiciones ambientales adversas durante el proceso de refrigeración y almacenamiento. Los espermatozoides de alta calidad y saludables deberían ser capaces de recuperar su motilidad normal después de la exposición a cambios de temperatura (Benítez *et al.*, 2009).

1.8. Equipos de análisis seminal computarizados

1.8.1. Evaluación de semen asistida por computadora (CASA)

El sistema computarizado de Análisis seminal (Computer Assited Sperm Analysis, CASA), este sistema incluye una cámara de video conectada a un microscopio de interfaz y una computadora que digitaliza imágenes del tamaño y movimiento de los espermatozoides. Las imágenes digitalizadas a lo largo del tiempo

permiten analizar la velocidad de las células y el movimiento lineal, circular y lateral. Este es un sistema conocido internacionalmente como un dispositivo rápido, preciso, consistente y científicamente validado. El dispositivo CASA permite calcular el número total de muestras de semen, el número de espermatozoides móviles y su concentración, así como todos los valores de velocidad, movimiento lateral, progresión y linealidad de la trayectoria de los espermatozoides e incluso morfología (Brogliatti, 2008).

Este sistema proporciona información precisa, objetiva y repetible de las características de las células espermáticas, como lo es el porcentaje de células móviles y la calidad de la muestra de semen, lo que permite establecer parámetros reproductivos con mayor confiabilidad de los toros reproductores.

Por otro lado, Stornelli y De La Sota (2005), indicaron que el sistema CASA es costoso y necesita una exacta calibración. Además, afirmaron que la motilidad es uno de los muchos atributos de un espermatozoide fértil, y este es el más frecuentemente usado para determinar la función espermática.

La aparición de los sistemas CASA, abrió un nuevo campo de estudio de la calidad de los espermatozoides, ya que se ha automatizado y simplificado el proceso, lo que ha permitido evaluar varios parámetros como lo son la concentración, morfología y movimiento espermático. El sistema CASA, establece de una manera efectiva medidas cuantitativas del movimiento individual de los espermatozoides, por lo que se pueden obtener medidas correctas de la motilidad espermática que proporcionan información acerca del estado funcional del axonema y de las membranas espermáticas (Mortimer, 2000).

Estudios realizados como el de Kuster (2005), mediante el sistema CASA evaluó, en semen bovino parámetros tales como la concentración espermática y determinó que muestras con concentraciones mayores a $50 - 100 \times 10^6$ esp/mL, limitaron la capacidad del dispositivo para realizar el análisis, o arrojar resultados erróneos. por consiguiente, el sistema CASA es una herramienta para evaluar el semen de una manera estándar, debemos tener en consideración que existen factores que afectan el desempeño correcto del equipo.

Consecuentemente, Countri *et al.*, (2009), señalaron que la disponibilidad de esta herramienta nos resulta útil para comparar objetivamente la motilidad y morfología como también mejorar nuestro conocimiento y capacidad para manipular los espermatozoides. Sin embargo, existen otros factores que debemos tomar en consideración antes de la utilización de estos analizadores como son los efectos de la velocidad de los fotogramas y el número de fotogramas por campo sobre la motilidad del semen, efecto de la temperatura de descongelación, efecto del tiempo de análisis; ya que estas podrían alterar los resultados sobre los patrones de movimiento y la velocidad espermática.

1.9. Metodologías de congelación

1.9.1. Dilución

El objetivo de la dilución del eyaculado es aumentar el volumen y mantener una concentración espermática oportuna para darle servicio al mayor número de hembras posibles. Según Gómez *et al.*, (2023), al obtener la muestra, primero se debe realizar una dilución 1:1. Después de cinco minutos, dependiendo de la concentración espermática de la eyaculada medida o estimada, se puede agregar una o dos

porciones más del medio diluyente para que la dilución final de envío sea de 1:2 o 1:3, es decir, una porción de semen por dos o tres porciones del medio diluyente. Para evitar el choque frío, el diluyente debe agregarse al semen y precalentarse a 37 ° C. (Alvarenga *et al.*, 2016).

1.9.2. Refrigeración del semen

El semen puede mantenerse en un estado líquido a bajas temperaturas, las cuales pueden ser entre los 10 a 15°C o bien a 5°C. De esta forma se puede mantener y prolongar la capacidad fecundante al reducir la motilidad y el metabolismo de forma reversible (Mara *et al.*, 2007; Cebrián *et al.*, 2010).

Ashrafi *et al.*, (2011), enfatizaron en sus trabajos de investigación que cuando el semen haya sido diluido a la concentración requerida, se necesita llevar a una temperatura de 15°C o 5°C siguiendo la curva de enfriamiento de -0.2°C o -0.3°C/min. Este proceso debe ser realizado mediante un baño termostático programado, y en caso de no disponer de él, la refrigeración hasta 5°C puede hacerse colocando las muestras en un frigorífico o recipiente con hielo.

1.9.3. Equilibración y Congelación

El procedimiento de la congelación se hace en dos pasos: la refrigeración y la congelación. Un punto que se debe considerar importante antes de empezar este proceso es el método de adicionar el crioprotector. Se puede añadir directamente el glicerol en un solo paso de igual manera se puede agregar en una porción dividida al diluyente, en el momento que la muestra diluida haya alcanzado los 5°C y posteriormente añadirlo gradualmente al semen (Anel *et al.*, 2003).

La etapa de enfriamiento es la duración en la que se lleva a cabo la adaptación del espermatozoide a un metabolismo disminuido, a temperatura de 5°C, posteriormente cuando el semen diluido haya alcanzado los 5°C, se recomienda mantenerlo a esta temperatura durante un periodo de 1 o 2 horas, este proceso es conocido como equilibración. Los espermatozoides estarán en contacto con el glicerol en este periodo pre-congelación, permitiendo que el glicerol ingrese dentro de las células espermáticas logrando establecer un equilibrio entre la concentración intra y extracelular, no solamente del glicerol, sino de todos los componentes osmóticamente activos (Salamon y Maxwell, 2000; Cebrián *et al.*, 2010).

La congelación se inicia en vapores de nitrógeno líquido, ya sea de forma manual o mecanizada. La velocidad a la que se congela el semen es regulada por la relación entre la distancia entre las pajuelas y el nivel de nitrógeno líquido. Las pajuelas son expuestas al vapor nitrógeno líquido con una duración de 10 a 20 minutos y posteriormente son depositados directamente en el nitrógeno líquido (-196°C) (Dorado *et al.*, 2009). Se debe tener en cuenta en base a la velocidad de congelación, que, si la verdad es excesivamente rápida, existe la formación de cristales de la membrana plasmática. Y si ocurre lo contrario, que la velocidad sea excesivamente lenta, hay formación de cristales de hielo, pero comienzan en el exterior de la célula, lo cual producirá una salida de agua desde el interior de la célula, para intentar compensar el aumento de la osmolaridad en el medio extracelular por ende la célula se deshidrata. La velocidad considerada optima de congelación esta entre 10°C y 80°C/minuto y varia por cada especie y tipo de envase. (Cebrián *et al.*, 2010).

1.9.4. Almacenamiento

Sadeghi *et al.*, (2020), señala que posterior a la congelación, el semen debe ser almacenado en un tanque con nitrógeno líquido a temperatura de -196°C , asegurando la viabilidad y la calidad del semen por largos periodos de tiempo.

1.9.5. Descongelación de semen

El manejo adecuado de la pajuela es esencial para mantener la viabilidad y fertilidad óptimas del esperma. Los programas de inseminación artificial han demostrado una correlación significativa entre las características de viabilidad después de la descongelación y la fertilidad del esperma criopreservado.

Los inseminadores descongelan el semen de acuerdo con su experiencia, debido a la presencia de protocolos muy diversos como: agua a 35 a 37°C , agua a 5°C , ambos con periodos de exposición variables, guardarlo en el bolsillo hasta que alcance la temperatura corporal, introducirlo en el útero de la vaca. No obstante, gran cantidad de estos son inapropiados y no conducen a una fertilidad aceptable (Tríbulo *et al.*, 2008).

Bernardi *et al.*, (2015), señalaron que el tiempo que tarda en descongelarse depende del tamaño y la forma del recipiente en la que se envasaron los espermatozoides, su composición, el recipiente de descongelación, la temperatura utilizada y el tiempo que permanecen almacenados a esa temperatura.

Investigaciones anteriores indican que un manejo adecuado de la pajuela es esencial para mantener la viabilidad y fertilidad óptimas del esperma. Los programas de inseminación artificial han demostrado una correlación significativa entre las

características de viabilidad después de la descongelación y la fertilidad del esperma criopreservado. Estudios publicados recomiendan generalmente que las pajuelas deben ser descongeladas en agua tibia de 35 a 37°C por periodos cortos de tiempo controlados de 30 a 25 segundos. Otros estudios, compararon la fertilidad obtenida al utilizar semen descongelado a 37°C con distintos tiempos de inmersión en el baño; los mejores resultados se obtuvieron al extender el tiempo en que la pajuela se sumerge en el agua caliente entre 30 y 60 segundos (Decuadro, 2010).

1.10. Factores que afectan la viabilidad espermática durante el proceso de criopreservación.

El proceso de congelación-descongelación seminal afecta considerablemente la integridad estructural y funcional de los dominios de las membranas, produciéndose un efecto deletéreo que menoscaba los resultados de la valoración de motilidad, vitalidad y viabilidad espermática post descongelación (Rubio *et al.*, 2009).

Durante la criopreservación, los espermatozoides son sometidos a fuertes cambios de temperatura, formación de cristales de hielo y diferentes tipos de estrés (físico, osmótico y oxidativo), que pueden dañar la calidad del esperma y la fertilidad (Ezzati *et al.*, 2020; Watson, 1995).

Watson (2000), indicó que la cantidad de células que sobreviven a los protocolos de criopreservación depende de la capacidad de agregar y eliminar osmóticamente agentes criopreservantes, incluido la congelación y descongelación.

1.10.1. Daños en la membrana plasmática

Hernández y Carillo (2015), señalaron que los espermatozoides participan en el reconocimiento y transporte de moléculas; Esta función permite que los espermatozoides adapten su metabolismo a su entorno, proporcionando un sistema de reconocimiento molecular para el ovocito.

La capacidad de la membrana plasmática para prevenir daños estructurales durante la criopreservación puede estar relacionada con la fuerza del enlace entre el colesterol y los ácidos grasos y la membrana (Hammerstedt *et al.*, 1990). Grötter *et al.*, (2019), señalaron que la resistencia de la membrana plasmática ante posibles daños estructurales durante el proceso de crioconservación podría estar vinculada al colesterol y a los ácidos grasos, así como a la fuerza de las conexiones entre los distintos elementos de la membrana. Esto puede provocar problemas como hinchazón y disrupción, variaciones en la fluidez, alteraciones en el flujo de calcio, cambios en la composición lipídica y modificaciones en la actividad enzimática, afectando así la fertilidad de los toros en programas de inseminación artificial (Rubio *et al.*, 2009).

En este aspecto, Viñán (2017), señaló que la criopreservación causa diferentes tipos de estrés, especialmente causado por el frío como el estrés osmótico y oxidativo, peroxidación lipídica y formación de cristales de hielo, esto lleva a la reducción de la fertilidad, porque afectan estructuras de la membrana celular, funciones de los orgánulos como mitocondrias, fragmentación del ADN y potencial de membrana.

1.10.2. Daños en la membrana mitocondrial

La función mitocondrial es esencial para la viabilidad de los espermatozoides, no solo desde la perspectiva del metabolismo, sino también para mejorar el

almacenamiento de espermatozoides en estado líquido y congelado (Peris *et al.*, 2020). Sieme *et al.*, (2008), mencionaron que en el interior de la célula existen áreas separadas por membranas, tales como las mitocondrias y el acrosoma, cuyas funciones probablemente son influenciadas por las condiciones de criopreservación.

Existe una fuerte correlación entre la astenozoospermia y el porcentaje de defectos mitocondriales después de la descongelación (Ozkavukcu *et al.*, 2008). La apoptosis es inducida por la liberación de citocromo C mitocondrial, que se sabe que está asociado con efectos negativos de la criopreservación (Gille y Nohl, 2001).

1.10.3. Daños en la morfología espermática.

Wolley y Richardson (1978), señalaron que la crioconservación causa cambios en la morfología de los espermatozoides, incluidos daños en las mitocondrias, el acrosoma y la cola del espermatozoide, ya que la entrada incontrolada de líquido en los espermatozoides puede alterar la osmolaridad celular y provocar la deformación de la estructura de la membrana, alterando la morfología del esperma.

Hezavehei *et al.*, (2018), señalaron que los defectos de la cabeza y la cola, como cola enrolladas y sueltas, se observan con frecuencia después de la congelación de los espermatozoides. Goshme *et al.*, (2021), estudiaron las anomalías morfológicas del espermatozoide bovino, utilizando porta objetos teñidos con eosina-nigrosina, quienes encontraron que el 5,4% de los espermatozoides eran anormales después de 214 días de almacenamiento. Por otro lado, se ha publicado que el daño criogénico a la cabeza del espermatozoide y al flagelo puede ocurrir de forma independiente (Zhu y Liu, 2000).

La cabeza, la pieza intermedia o la pieza principal pueden presentar anomalías en los espermatozoides con morfología anormal. En función de los tipos de anomalías, estos gametos generalmente tienen un menor potencial fertilizante y también pueden tener ADN anormal (Helo, 2023).

II.METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1. Ubicación Geográfica

La presente investigación se realizó en el laboratorio del Centro de Investigación en Biotecnología Agropecuaria (CIBA), Facultad de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad de Panamá, Provincia de Chiriquí, corregimiento de Chiriquí. Se encuentra situado en entre 8.2321 y -82.1952 (figura 1), a 10 metros sobre el nivel del mar. La temperatura promedio anual es de 25°C, humedad entre 87.0 a 95.0% y precipitación pluvial de 140.22 mm.



Figura 1. Ubicación del Centro de Investigación de Biotecnología Agropecuaria (CIBA).

2.2. Unidades Experimentales y tratamientos.

Para este estudio se utilizó un toro reproductor, cruzado (F1 Simmental x Gyr), con 3 años de edad, peso promedio de 589 kilos. El semental se encontraba en estado de semiconfinamiento y una dieta a base de pasturas, concentrado y ensilaje, el cual fue sometido a tratamientos sanitarios (vacunación y desparasitación), y al examen clínico correspondiente que certificó su buen estado sanitario para esta investigación.

Se realizaron tres colectas de semen con un intervalo de descanso de cuatro días. Se utilizaron como tratamientos dos diluyentes, Triladyl (60% agua destilada, 20% yema de huevo y 20% triladyl) y Optidux (OptiXcell 2 de IMV Technologies ($\frac{1}{3}$) y Agua ultrapura ($\frac{2}{3}$)).

2.3. Colección de semen mediante electro eyaculación

El proceso se inició al colocar el animal en la manga de sujeción para prevenir movimientos bruscos y garantizar la seguridad del recolector, se higienizó la zona perineal, prepucio y pene, para evitar el riesgo de contaminación, se insertó el electrodo previamente lubricado con aceite mineral en el recto del animal, dirigiéndolo ligeramente hacia abajo y haciendo movimientos rotatorios, después de insertado completamente el electrodo, colocamos la cola en medio del mando (en forma de U) de este y se sujeta con la misma mano que sujeta la cola (Peralta, 2006).

2.4. Preparación de los diluyentes

Los diluyentes utilizados en esta investigación fueron Triladyl y Optidux. Los diluyentes se prepararon siguiendo las indicaciones del fabricante. El Triladyl es un concentrado para la preparación de un diluyente para su uso de un paso. Está basado en Tris, glicerol, ácido cítrico, fructuosa, antibióticos y agua bidestilada. Este diluyente puede ser preparado a temperatura ambiente.

Para su preparación se utilizó los siguientes materiales y equipos:

Concentrado Triladyl

Agua bidestilada

Yema de huevo fresco

Papel toalla

Antibióticos.

Filtro de papel

Para la preparación de 100 mL de la solución madre de Triladyl:

20 mL (20%) de Triladyl.

60 mL (60%) de agua bidestilada, mezclar estos dos componentes perfectamente antes de añadir la yema de huevo.

20 mL (20%) de yema de huevo (sin membrana vitelina).

Se deposita esta solución en una probeta graduada de 100 mL.

Mezclar con una varilla estéril evitando la formación de espuma, durante 3 a 5 minutos, después vaciar la mezcla en un matraz de Erlenmeyer, filtrar la muestra y almacenarlo en un recipiente estéril y se refrigerado hasta su empleo.

Para la utilización en la dilución de semen se procedió a colocarlo en baño maría a 37°C en el CIBA, perfectamente protegido en un recipiente térmico hasta su uso.

Para el Optidux, solo contemplo colocarlo en baño maría a 37°C, para ser añadido al semen.

2.5. Dilución de semen

Para la dilución del semen recolectado, se realizó una pre-dilución 1:1 (Diluyente: Semen) directamente en el recipiente de recolección. Posterior se

evaluación la concentración espermática, y se procedió a realizar una dilución final de 3:1 (Diluyente: Semen).

2.6. Empaquetado en las pajuelas.

Se procedió a envasar las muestras de semen diluido en pajuelas de 0.5 cc.

2.7. Refrigeración y equilibración mediante caja isotérmica.

En esta investigación para la refrigeración de las pajuelas de semen, fue sugerido la técnica de enfriamiento en un cooler de foam (isotérmico) desarrollada por (Aparicio, 2022). Se realiza una cámara a lo interno del foam con hielo, monitoreando la temperatura con un termómetro digital con microsonda, marca Traceable, bajando la temperatura a 4°C por un período de tiempo de 3 horas, utilizando parrillas que mantienen las pajuelas a 4cms. de altura, para lograr la equilibración de los espermatozoides.

2.8. Congelación mediante caja isotérmica.

Para su congelación fueron expuestas a vapores de nitrógeno en un recipiente isotérmico a 4 cm, con el propósito de que las pajillas de semen no tocaran directamente el nitrógeno líquido (NL), sino para que fueran congeladas por lo vapores, por 15 minutos y luego ser sumergidas en nitrógeno líquido para posterior congelación, siendo colocadas en gobelets y estos en bastones identificados según la fecha de congelación, posteriormente fueron introducidos y almacenados en un tanque de nitrógeno hasta su uso.

2.9. Descongelación de las pajuelas

Las pajuelas fueron criopreservadas en nitrógeno líquido para su posterior análisis post descongelado. Se procedió a descongelar las pajuelas. para realizar las pruebas microscópicas, utilizando los procedimientos descritos a continuación.

2.10. Análisis Seminal

Los indicadores de calidad espermática microscópica (vigor, motilidad total y progresiva, morfologías normales, viabilidad espermática), siendo evaluados post descongelación en pajillas criopreservadas durante 2 meses de conservación en Nitrógeno líquido, según la metodología descrita en el Procedimiento de Operación Estándar (POE) L-002 (Reátegui, 2015). Para las evaluaciones se utilizó un microscopio de contraste de fase Marca Leica, en aumentos de 40x a 400x (Gómez y Migliorisi, 2007).

2.10.1. Características microscópicas

2.10.1.1. Motilidad total

La motilidad total se evaluó colocando una gota de semen puro sobre un portaobjeto atemperado de 36 - 37°C, sobre una platina térmica y observa a 40 aumentos (lupa), evaluando la presencia de la onda omega. Se debe evaluar cerca del borde de la gota, donde la profundidad de esta es menor y es más fácil de observar, tomándose los resultados en porcentajes en base a los remolinos (0 al 100%). Considerándose Muy bueno =80-100% de células móviles. Bueno = 60-79% de células móviles. Regular = 40-59% de células móviles. Pobre = menos de 40% de células móviles (Gómez y Migliorisi, 2007).

2.10.1.2. Motilidad individual progresiva

La motilidad individual se evaluó de forma subjetiva, mediante la observación visual de una muestra de semen en un microscopio de contraste de fases y platina a 37°C. En el eyaculado de los rumiantes, dada su elevada concentración espermática se podrá realizar la motilidad individual, que se define como el movimiento progresivo de los espermatozoides en línea recta o hacia adelante observados en la muestra (Adaptado de Muiño, 2008).

Para la observación de la motilidad se usará porta y cubre objetos estériles atemperado a 37 °C, para la preparación de las muestras, una gota de semen diluido de 10µl fue examinada a (100x) en contraste de fase, Se debe examinar un campo y evaluar de manera subjetiva los espermatozoides que se desplazan en línea recta de manera progresiva, siendo estos los que cruzan el campo de observación. Los espermatozoides que rotan en círculo o que progresan de manera oscilante, se consideran que presentan movimientos anormales. Los datos de esta fueron expresados en porcentaje, (Adaptado de Gómez y Migliorisi (2007).

2.10.1.3. Vigor

El vigor o el movimiento de los espermatozoides fue clasificado den escala de cero (ausente) a cinco (máximo), según los parámetros de evaluación descritos por Jasko (1994).

El vigor de los espermatozoides se evaluó al mismo tiempo que la motilidad individual progresiva, y consistió en la velocidad de movimiento de los espermatozoides y clasificada bajo escala, que se describe a continuación:

Tabla 2. Escala para la evaluación del vigor de los espermatozoides.

Grado	Nivel de movimiento
5	Movimiento progresivo muy rápido (difícil de seguir visualmente)
4	Movimiento progresivo rápido
3	Movimiento progresivo continuo a velocidad lenta
2	Movimiento lento de cola con algo de movimiento progresivo
1	Leve movimiento de cola sin desplazamiento progresivo
0	Sin movimiento

Fuente: Ax *et al.*, 2000.

2.10.1.4. Viabilidad espermática (vivos y muertos)

El procedimiento más habitualmente utilizado según Puelles (2019), para “la valoración de los espermatozoides vivos se es la tinción vital, que nos permitió diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos, debido a la permeabilidad de la membrana plasmática a los colorantes vitales; por tanto, aquellas células que presentaban una membrana plasmática funcional no permiten el paso del colorante, mientras que si esta alterada el mismo penetra en el interior de la célula.

Se utilizó para ello la tinción con eosina. Se colocaron 20 μ l de eosina y posteriormente se añadió 10 μ l de semen, mezclando el conjunto durante 10 segundos y a partir de esta mezcla se realizó un frotis. Después de transcurrir 15 segundos y logrado el secado total del frotis, se inició el conteo de espermatozoides de vivos (sin

coloración) y espermatozoides muertos (teñidos de color rosa). Se contabilizaron 200 espermatozoides en total y se estimó el porcentaje respectivamente de vivos y muertos (Adaptado de Ávalos *et al.*, 2018).

2.10.1.5. Morfología espermática

Se colocó una gota de 15 μ l del semen descongelado sobre un portaobjetos, posteriormente se contaron 200 espermatozoides por muestra, para determinar el porcentaje de espermatozoides normales y anómalos y de éstos cuales poseen patologías de tipos primarias y secundarias (Adaptado de Hidalgo *et al.*, 2005).

2.10.1.6. Prueba de incubación o termorresistencia

Esta prueba consiste en la descongelación 2 pajuelas de la misma congelación simultáneamente. A la hora 0, se vacía el contenido de una de ellas en un tubo de ensayo que contiene un volumen de solución fisiológica equivalente al de la pajuela, y la otra pajuela permanece en el baño María y es diluida en el momento de efectuar las determinaciones correspondientes a la hora 2, incubándose a 37°C y serán evaluados los siguientes parámetros (motilidad total, progresiva, vivos y muertos y vigor. (Adaptado de Pérez, 2006).

2.11. Diseño y análisis estadístico

Se evaluó el efecto de dos diluyentes comerciales, Triladyl-Yema de Huevo y Optidux-Liposomas Sintéticos, sobre la calidad del semen post descongelación en un toro reproductor, con tres extracciones realizadas en intervalos de cuatro días. Las muestras fueron analizadas mediante parámetros microscópicos como vigor espermático, motilidad total, motilidad progresiva, viabilidad y morfología espermática, a 0 y 2 horas post descongelación. El diseño experimental incluyó tres repeticiones por

tratamiento (diluyente y tiempo), y los datos se analizaron con la prueba de Chi-cuadrado, considerando diferencias estadísticamente significativas con valores de $p < 0.05$. Los resultados fueron representados mediante gráficos de barras con proporciones e intervalos de confianza para identificar diferencias significativas entre diluyentes.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Viabilidad espermática

Los resultados de viabilidad espermática post descongelación obtenidos por los diluyentes A (Triladyl-Yema de huevo) y B (Optidux-Liposomas sintéticos), se muestran en la figura 2 y evidenciaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.02$) entre las medias de los dos diluyentes a las cero horas post descongelado entre los tratamientos, mostrando para el A:32.3 por ciento y para el B:29.2 por ciento de espermatozoides vivos.

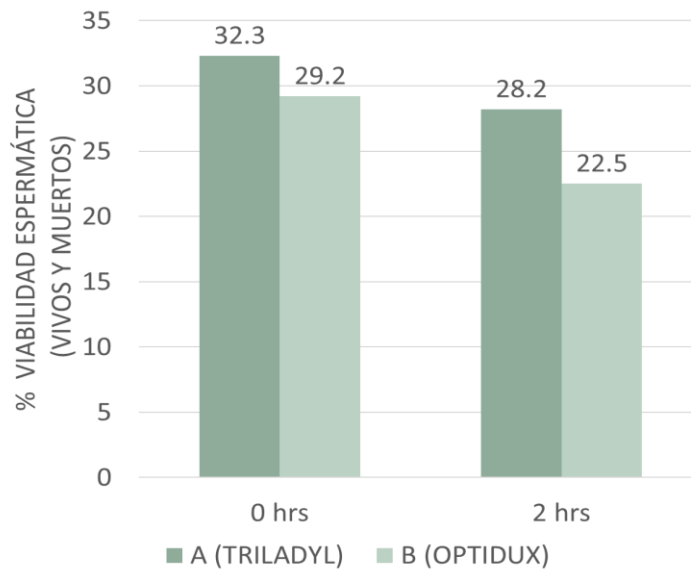


Figura 2. Porcentajes medios de viabilidad espermática, A y B indican diferencias significativas entre diluyentes a los distintos tiempos de evaluación, siendo $p < 0.02$ a las 0 horas y $p < 0.007$ a las 2 horas post descongelación.

Nuestros resultados, difirieron con los publicados por Ramón (2013), quien encontró que con el diluyente Triladyl logró una mejor relación espermatozoides vivos/muertos 51.8% ($p < 0.05$), en comparación a los diluyentes Trehalosa (33.85%) y

sacarosa (31.85%) ($p < 0.09$), en este estudio los resultados alcanzados por el Triladyl fueron superiores a los nuestros, mientras que los otros dos crioprotectores evaluados mostraron resultados similares a los alcanzados en nuestro estudio con el Triladyl. A nuestro criterio planteamos que es posible que la diferencia entre los resultados de este autor y los nuestros pueden deberse a un efecto racial o individual del toro empleado. De acuerdo con lo antes planteado, Moncayo (2016), evaluó el porcentaje de espermatozoides vivos en tres razas bovinas (Holstein, Pizán y Pardo Suizo), dando como resultado que el semen de raza Pizán con Triladyl presentó un mayor número de espermatozoides vivos (82%) de un total de 100 espermatozoides contabilizados, con respecto a las otras razas evaluadas. Esta raza es considerada como criolla, proveniente de los andes ecuatorianos y de origen *Bos taurus*, por lo que su alto grado de adaptación pudiera influir en su gran capacidad de resistencia seminal a las bajas temperaturas.

Córdova *et al.*, (2020), publicó porcentajes de 74.5, 74.5 y 72.5% para las razas Charolais, Brahman y Simbrah respectivamente, no encontrando diferencias estadísticas a la descongelación del semen de diferentes razas.

En los resultados obtenidos para los espermatozoides vivos y muertos después de ser sometidos a incubación por dos horas post-descongelación (A:28.2 y B:22.5 por ciento), mostraron una diferencia altamente significativa ($p < 0.007$), entre los diluyentes evaluados. Nuestros resultados difieren a los publicados por Medina *et al.*, (2008), quienes encontraron que la viabilidad espermática presentó un descenso durante el periodo de incubación, siendo a la hora 0 de 70.6 ± 1.9 % y de 57.8 ± 3.2 % para la hora 4. No obstante, solo se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la viabilidad

determinada en las 4 horas de incubación (57.8 ± 3.2 %) con respecto a las 2 primeras horas (68.69 ± 2.4).

3.2. Motilidad total

Los resultados de motilidad obtenidos al comparar el efecto obtenidos por los diluyentes A (TRILADYL-Yema de huevo) y B (OPTIDUX-Liposomas sintéticos) evaluados post descongelación se muestra en la figura 3 y no evidenciaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) para las fuentes evaluadas.

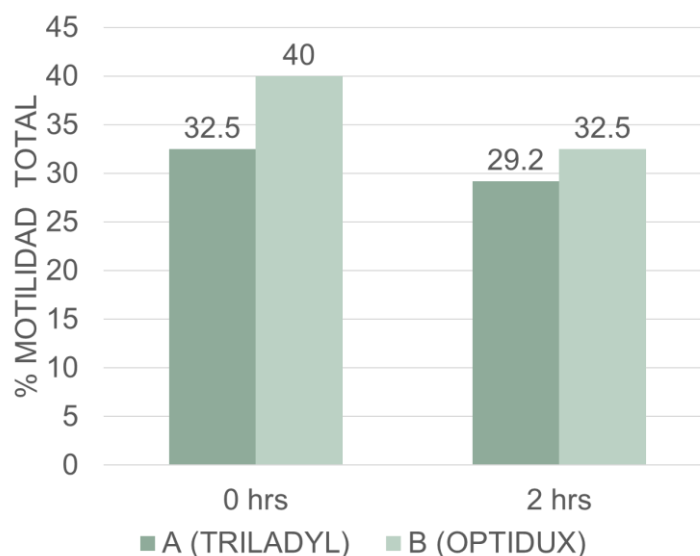


Figura 3. *Porcentajes medios de motilidad total, A y B indican que no existen diferencias estadísticas significativas entre los diluyentes a los distintos tiempos de evaluación.*

En los resultados obtenidos para motilidad total post descongelación se determinó que no existieron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos A y B. A pesar de esto se apreciaron valores a las 0 horas post

descongelación para A:32.5 y B:40.0 por ciento. Sin embargo, a las 2 horas post descongelación, los valores fueron para A: 29.2 y B:32.5 por ciento.

Dichos resultados concuerdan con Carballo *et al.*, (2005), quienes encontraron en su investigación que el semen diluido con Triladyl mostró una motilidad post descongelación un 30.8%, comparado con el diluido con Andromed que aportó solo un 23.8% de motilidad post descongelación.

Sin embargo, hubo diferencias con los resultados de Jiménez *et al.*, (2020), quienes que obtuvieron una motilidad total mayor después de la descongelación en los espermatozoides criopreservados con Triladyl® (60,1 ± 2,3 %) y Andromed® (58,6 ± 2,4 %) en comparación con los otros extensores.

Nuestros resultados en cuanto a la motilidad postdescongelación con Liposomas concuerdan con los resultados publicados por Murphy *et al.*, (2018), quienes lograron una motilidad total de 41.93 y 59 por ciento cuando emplearon diluyentes Andromed® y Optixcell®. Sin embargo, nuestros resultados difieren con los de Lima *et al.*, (2018), quienes no encontraron diferencias significativas, pero hallaron una motilidad total de 57.8 por ciento para el diluyente Andromed® y 58.9 por ciento para Optixcell®. Por otro lado, estos resultados difieren también con los de Janett *et al.*, (2005), ya que el AndroMed®, presentó en semen bovino, mejores valores para motilidad total con 66.7%, comparado con el Bioxcell® con 60.9%, mientras que el Triladyl® brindó los resultados más bajos con 52.4%.

Las diferencias encontradas entre los hallazgos de las investigaciones antes mencionadas podrían deberse al método de criopreservación, la concentración

espermática por pajuelas, factores genéticos y de raza, método de descongelación y prácticas de manejo de los toros que podrían afectar la calidad de los espermatozoides (Morell *et al.*, 2018). En este mismo aspecto, Vélez *et al.*, (2014), encontró diferencias significativas en cuanto a las diferentes razas evaluadas, siendo valores para Brahman rojo ($70,83 \pm 21,35$), Brahman Blanco ($68,53 \pm 20,45$), Simmental ($64,06 \pm 25,64$), Simmental x cebú ($75,21 \pm 17,66$) y Romosinuano ($73,08 \pm 23,14$), lo que indica que el encaste racial juega un papel importante en cuanto a esta variable.

De acuerdo con los resultados publicados de Medina *et al.*, (2008), mostraron un mayor porcentaje de espermatozoides con motilidad total en la hora 0 de incubación (49.7 ± 4.7 %) y este porcentaje disminuyó significativamente a la hora 1 y 2 (19.1 ± 2.1 y 23.3 ± 1.9 %, respectivamente). Aunque a la hora 4 de incubación el semen mostró porcentajes mucho más bajos (36.8 ± 3.0 %), éstos no evidenciaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

Sobre este aspecto, nuestros resultados concuerdan con lo publicado por Barth (2018), quien señaló que el semen a utilizar debe tener, según las recomendaciones de la NAAB (National Association of Animal Breeders, USA), puede perder de 25% de células motiles a un vigor 3 (0=sin movimiento, 5=movimiento rápido donde es difícil seguir una célula) inmediatamente después del descongelado y un 15% de células motiles a un vigor 2 luego de 2 horas de incubación a 37°C , ya que nuestros valores medios de motilidad total se encuentran en un rango adecuado según lo señalado por este autor.

3.3. Motilidad individual progresiva

Para la variable de motilidad individual progresiva de las muestras obtenidas post descongelación no se mostraron diferencias ($p < 0.05$), figura 4), sin embargo, se obtuvo valores medios inferiores para el tratamiento A (27.5 por ciento) respecto al B (35 por ciento), evaluados a las 0 horas post descongelación. Mientras que, los valores medios evaluados a las 2 horas post descongelación fueron de 25.8 por ciento para el tratamiento A y 27.5 por ciento para el tratamiento B.

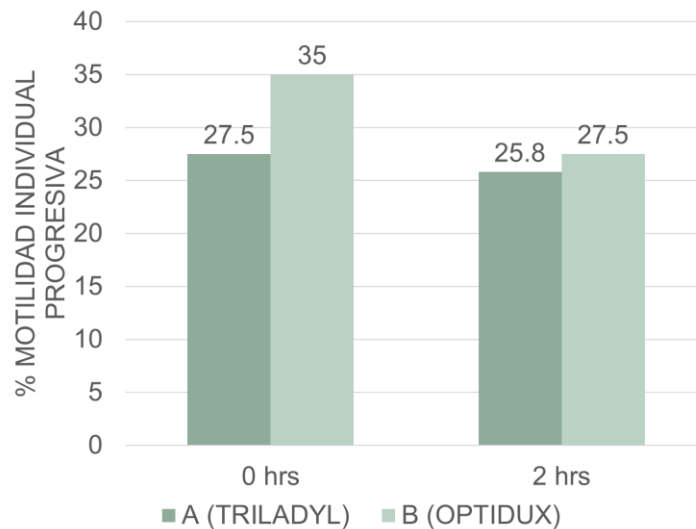


Figura 4. *Porcentajes medios de motilidad progresiva, A y B indican que no existen diferencias estadísticas significativas entre los diluyentes a los distintos tiempos de evaluación.*

Los valores mínimos aceptables según las normas ISO 9002 para semen bovino post descongelado a las 0 y 2 horas, puede perder un 25 y 15 por ciento de células móviles, por lo cual los resultados obtenidos en nuestra investigación se encuentran por encima de dichos valores. De acuerdo con datos publicados por Carballo *et al.*, (2009), quienes encontraron mayor porcentaje de motilidad con semen criopreservado

con diluyente que tenía lipoproteínas de origen animal (30.8 por ciento) en contraste al utilizado que poseía lecitina de soya (23.8 por ciento), con respecto a este resultado, hay similitudes con los valores obtenidos en nuestro estudio. Sin embargo, los mismos difieren con Caldevilla *et al.*, (2020), quienes encontraron que semen equino post descongelación la motilidad total y progresiva fueron significativamente mayores (36 ± 20 , $p < 0,05$), que poseían yema de huevo respecto al Andromed (17 ± 11).

En este mismo aspecto, Cabrera y Pantoja (2012), obtuvieron en sus resultados valores de motilidad progresiva post descongelación de 4 toros se encontraban entre 60 a 70%, mientras que Quispe (2018) publicó valores a las 0 y 2 horas post descongelación, de 75.5 y 45.3 por ciento, respectivamente. La diferencia existente en cuanto a estos autores puede deberse a que en el primer caso solo realizó evaluación a las 0 horas post descongelado y por ello el porcentaje fue mayor, también se pudiera considerar el protocolo de descongelación empleado y la evaluación subjetiva, ya que esta puede variar los resultados en dependencia de la experiencia individual del investigador que realizó la misma.

Por otro lado, cabe mencionar que nuestros resultados de motilidad individual progresiva en el uso de diluyente a base de liposomas concuerdan con Murphy *et al.*, (2018), quienes evaluaron cinco toros de la raza Holstein Friesian donde encontraron diferencias significativas para la motilidad progresiva de 31.7% y 45.7%, para Andromed® y Optixcell®. Sin embargo, difieren con los datos publicados por Bernilla (2024), quien en su investigación señaló para la variable de motilidad individual, los diluyentes y los toros evaluados no evidenciaron diferencias estadísticas significativas, sin embargo, observó que la motilidad fue mayor cuando se empleó Optixcell (62,0%),

con respecto al Triladyl (61.7%) y Andromed (51.3%). Seguidamente, Gálvez (2002), en su investigación determinó que no existe diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el Andromed y Optixcell, con valores de 64.27 y 66.34% respectivamente. Sin embargo, Janett *et al.*, (2005), señalaron que el Andromed presento valores de 33.1%, en comparación con Bioxcell y Triladyl, de 31.0 y 23.5% respectivamente.

De acuerdo con los datos publicados por Medina *et al.*, (2008), no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las horas de incubación; sin embargo, a la hora 2 se encontraron los valores más altos (26.5 ± 3.0 %) y a la hora 4 los más bajos (18.2 ± 1.6 %), lo que indicó que nuestros valores son similares a los presentados por estos autores.

3.4. Vigor

Los valores obtenidos para el vigor entre los dos tratamientos no mostraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$, figura 5), pero se encontró apreció una pequeña diferencia matemática en los valores medios para los tratamientos A:2.2 y B:2.6 en una escala de 1 a 5, evaluados post descongelación a las 0 horas. Mientras que, para el vigor evaluado a las 2 horas post descongelación se observaron valores para el tratamiento A:1.6 y para el B:1.5.

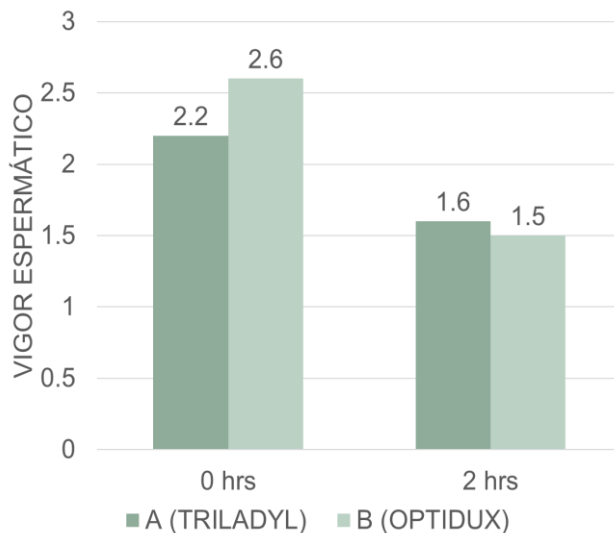


Figura 5. *Porcentajes medios de vigor a las 0 y 2 horas no presentan diferencias estadísticas significativas entre los diluyentes A y B en los distintos tiempos de evaluación.*

Nuestros resultados, tienen coincidencias con los publicados por Ribeiro *et al.*, (2014), quienes encontraron en una evaluación de la criopreservación de espermatozoides extraídos de la cola del epidídimo al utilizar dos métodos de congelación, para el método convencional $2,1 \pm 0,8$; en una escala de 0 a 5. En estudios publicados por Moncayo (2016), se encontró un vigor de 3 en el semen evaluado post descongelación en un toro de la raza Holstein con Triladyl, con respecto a las razas Pardo suizo y Pizán donde alcanzaron solamente valores de 2 para ambas razas. Sin embargo, este mismo autor encontró un vigor de 2 post descongelación para el toro de la raza Pardo Suizo con la utilización de Andromed, con respecto a la raza Holstein y Pizán, que solo lograron valor de 1.

Por otro lado, Catena y Cabodevila (1999), plantearon que un semen de buena calidad, recientemente descongelado, debe tener normalmente un vigor de 3 a 4, pero

al ser evaluado a 2 horas post descongelación, estos valores disminuyen hasta valores mínimos de 2, lo cual coincide con nuestros resultados.

3.5. Morfologías

La evaluación de los espermatozoides normales en las muestras obtenidas postdescongelación no mostraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$, figura 6), alcanzaron valores para el tratamiento A:82.3 por ciento y B:83.3 por ciento de espermatozoides normales evaluados a las 0 horas post descongelación. Mientras que para los tratamientos A:80 y B:83 por ciento de espermatozoides normales evaluados post descongelación a las 2 horas.

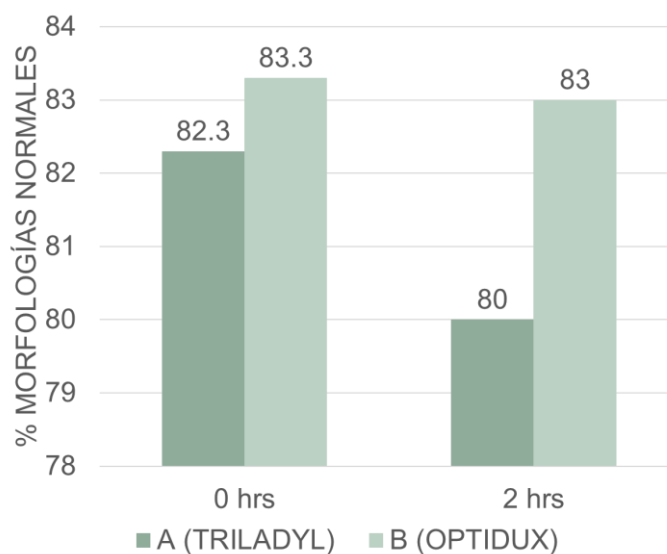


Figura 6. *Porcentajes medios de espermatozoides normales entre el diluyente A y el diluyente B indican que no existe diferencias estadísticas en los tiempos de evaluación.*

Nuestros resultados son consistentes con los publicados por Ramón (2013) quien indicó que no se encontraron diferencias estadísticas significativas en el

porcentaje de espermatozoides normales ($p < 0.05$) entre semen sin congelar y semen descongelado.

En este mismo aspecto, Morojon y Morojon (2015), encontraron un valor mínimo de 86% de espermatozoides normales en toros de la raza Brahman, Gyr y razas cruzadas, lo que es una tasa superior a la observada en nuestro estudio.

En esta misma línea, Vejarano *et al.*, (2015), encontraron una cantidad de espermatozoides normales como promedio fue 86% en toros de diferentes razas, mientras que Montes *et al.*, (2012), en encontraron un 83% de espermatozoides normales, evidenciando un 17% de anomalías espermáticas. En este mismo aspecto, en estudios publicados por Al-Makhzoomi *et al.*, (2008), encontraron valores de 83,7% para espermatozoides normales y menos del 15% en formas anormales.

Nuestros resultados superan los encontrados por Quispe (2018), quien en resultados publicados encontraron un valor promedio de 79.1% de espermatozoides normales, indicando que se encuentra por encima del umbral crítico, lo que sugiere que podría tener una capacidad fertilizante adecuada.

Estos estudios publicados reflejan una variabilidad en los resultados sobre la cantidad de espermatozoides normales, en este mismo aspecto respaldan los evidenciados en nuestra investigación en los tratamientos A y B para esta variable.

Por otro lado, según Evans y Maxwell (1989), el semen de rumiantes puede tener menos del 15% a 20% de espermatozoides morfológicamente anormales para ser considerado normal y con buena capacidad fertilizante. Ellos advierten que, si la

proporción de espermatozoides morfológicamente normales es inferior al 60%, la fertilidad se ve afectada negativamente.

Por otro lado, Medina *et al.*, (2008), demostraron que la morfología espermática no presentó diferencias significativas ($p>0.05$) en cada una de las horas de incubación analizadas, sin embargo, se encontraron valores de 95.2 ± 0.5 para las 0 horas y 93.8 ± 1.1 para las 2 horas de incubación en semen de verracos congelados.

IV.CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, el diluyente Optidux, el cual posee liposomas en su constitución, brindo mejores resultados in vitro en la calidad seminal post descongelación que el otro diluyente evaluado, para las variables observadas menos en la viabilidad espermática, ya que el diluyente a base de yema de huevo presento mejores resultados para dicha variable.

El efecto crioprotector de los liposomas permitió conservar más eficientemente la motilidad seminal y evitó más daños morfológicos que el diluyente que utilizó yema de huevo, por lo que obtuvo mejores rendimientos en la prueba de incubación (termorresistencia).

V. RECOMENDACIONES

La utilización del Optidux permite una facilidad de uso en campo, puesto que, no requiere ninguna preparación adicional como los diluyentes a base de yema de huevo.

Simplificando la aplicación en fincas y eliminando la necesidad de equipos de laboratorio para su preparación y disminuye las posibilidades de contaminación en la manipulación.

Este diluyente permite reducir el riesgo de transmisión de enfermedades emergentes, como lo son la gripe aviar o vacas locas, al no contener proteína animal (yema de huevo o leche) y la posibilidad de reducir el riesgo de contaminación bacteriana en las pajuelas de semen.

BIBLIOGRAFÍA

- Agüero, G. (2012). *Evaluación de las Características Seminales de Sementales Bovinos mediante el Analizador Seminal Computarizado (CASA)*. [Tesis de Grado, Universidad Central de Venezuela]. Repositorio Institucional UCV. http://saber.ucv.ve/bitstream/10872/3292/1/T026800002626-0-Tesis_Final_Gloria_Aguero-000.pdf
- Aisen, E. G., Medina, V. H., & Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *theriogenology*, *57*(7), 1801-1808. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00653-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00653-2)
- Akhter, S., Ansari, M. S., Andrabi, S. M. H., Ullah, N., y Qayyum, M. (2008). Effect of antibiotics in extender on bacterial and spermatozoal quality of cooled buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Reproduction in Domestic Animals*, *43*(3), 272–278. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00890.x>
- Akhter, S., Ansari, M. S., Andrabi, S. M. H., Rakha, B. A., Ullah, N., y Khalid, M. (2012). Soya-lecithin in extender improves the freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reproduction in domestic animals*, *47*(5), 815-819. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01973.x>
- Al-Makhzoomi, A. K., Lundeheim, N., Håård, M., y Rodríguez, H. (2008). Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. *Theriogenology*, *70*(4), 682-691. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.049>

- Almela, L. (2014). *Aportaciones a la crioconservación de gametos masculinos en la raza bovina murciano levantina: recongelación de espermatozoides*. [Tesis doctoral, Universidad de Murcia]. Repositorio institucional CARM. <https://dspace.carm.es/jspui/bitstream/20.500.11914/1005/1/Tesis%20Laura%20Almela%20Veracruz%5b1%5d.pdf>
- Althouse, G. (2008). Sanitary procedures for the production of extended semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(2): 374-378. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01187.x>
- Althouse, G., Pierdon, C., y Lu, K. (2008). Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen. *Theriogenology* 70(8): 1317–1323. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.010>
- Alvarenga, M. A., Papa, F. O., y Neto, C. R. (2016). Advances in stallion semen cryopreservation. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 32(3), 521-530. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.003>
- Anel, L., De Paz, P., Alvarez, M., Chamorro, C. A., Boixo, J. C., Manso, A., ... y Anel, E. (2003). Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology*, 60(7), 1293-1308. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00140-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00140-7)
- Anel-Lopez, L., Riesco, M. F., Montes-Garrido, R., Neila-Montero, M., Boixo, J. C., Chamorro, C., ... y Anel, L. (2021). Comparing the effect of different antibiotics in Frozen-Thawed Ram sperm: Is it possible to avoid their addition? *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.656937>

Aparicio, N. (2022). Uso de cajas isotermicas de foam para la equilibración de semen refrigerado de 3 a 5°C. Profesor titular de la cátedra de Andrología e Inseminación artificial del Departamento de Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá.

Ashrafi, I., Kohram, H., Najjian, H., Bahreini, M., y Mirzakhani, H. (2011). Effect of controlled and uncontrolled cooling rate on motility parameters of cryopreserved ram spermatozoa. *BMC Research Notes*, 4(547), 1-6.
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-547>

Aurich, C., y Spersger, J. (2007). Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 67(5), 912-918 pp.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.11.004>

Ávalos, A., González, J., Vargas, A. y Herrera, J. (2018). *Recolección y manipulación seminal in vitro*. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana].
Repositorio Institucional XOC.
<https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/46929>

Ax, R. L., Dally, M., Didion, B. A., Lenz, R. W., Love, C., Varner, D. D., ... y Bellin, M. E. (2000). Semen evaluation. *Reproduction in farm animals*, 5, 363-375.
<https://doi.org/10.1002/9781119265306.ch25>

Barszcz, K., Wiesetek, D., Wąsowicz, M., y Kupczyńska, M. (2012). Bull Semen Collection and Analysis for Artificial Insemination. *Journal of Agricultural Science*, 4(3) 1-10. <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v4n3p1>

- Barth, A., Thundahill, J., y Mapletoft, R. (2003). Importancia de la calidad seminal y el uso de FIV para el estudio de efectos espermáticos. En *Simposio Internacional de Reproducción Animal–INRA*.
- Barth, A. D. (2018). The use of bull breeding soundness evaluation to identify subfertile and infertile bulls. *Animal*, 12(s1), 158-164. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000538>
- Benítez, J.A., Navarrete, R., Lemus, C., Rueda, M., Arias, T., Orozco, M., y Hernández J.A. (2009). Cambios de la motilidad en la prueba de termorresistencia empleando diferentes diluyentes para la criopreservación de semen porcino. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 16(1), 31-36. https://aramara.uan.mx/bitstream/123456789/357/1/cambios%20de%20la%20motilidad%20en%20la%20prueba%20de%20termoresistencia%20empleando%20diferentes%20diluyentes%20para%20la.pdf?utm_source=chatgpt.com
- Bhattacharya, S. (2018). Cryoprotectants and Their Usage in Cryopreservation Process. *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*, 2(2), 7-19. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80477>
- Bergeron, A., y Manjunath, P. (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, 73(10), 1338–1344. <https://doi.org/10.1002/mrd.20565>
- Bernardi, S. F., Di Prinzio, M., Maglione, D., Rinaudo, A., y Marini, P. R. (2015). Efecto del protocolo de descongelación de semen sobre el porcentaje de preñez en

bovinos lecheros. *Revista veterinaria*, 26(1), 27-32.

<https://doi.org/10.30972/vet.261243>

Bernilla, C. D. (2024). *Evaluación espermática, según tres diluyentes comerciales, en toros de la raza Gyr*. [Tesis de Grado, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo].

Repositorio Institucional UNPRG.

<https://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/12495>

Boiso, I. (2001). Principios básicos de criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 27(2), 127-131.

https://revista.asebir.com/assets/revistaASEBIR_DIC22...pdf

Bousseau, S., Brillard, J. P., Marquant-Le Guienne, B., Guerin, B., Camus, A., Y Lechat, M. (1998). Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin-based diluents. *Theriogenology*, 50(5), 699-706.

[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00175-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00175-7)

Brass, K. (2001). Inseminación artificial en la especie equina. En *Biotechnología de la Reproducción*; Palma, G., Ed.; Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria: Balcarce, Argentina, 525–561.

Brogliatti, M. (2008). Inseminación artificial a tiempo fijo. *Centro de Inseminación Artificial La Argentina Chica*, 25(46), 22-25.

<https://www.produccion-animal.com.ar/>

- Cabrera, P., y Pantoja, C. (2012). Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Revista de investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(2), 192-200. <https://doi.org/10.15381/rivep.v23i2.899>
- Caldevilla, M.; Ferrante, A. y Neild, D. (2020). Utilización de un medio con lecitina de soja para congelar semen equino. *InVet*, 22(1), 41-49 pp. <https://www.scielo.org.ar/pdf/invet/v22n1/v22n1a06.pdf>
- Carballo, D., Canseco, R., Garcia, R., y Montiel, F. (2005). *Comparación de dos diluyentes para criopreservar semen de bovino bajo condiciones de campo húmedo*. [Tesis de Grado, Universidad Veracruzana]. Repositorio Institucional UV. <https://www.uv.mx/veracruz/cienciaanimal/files/2013/11/Comparacion-de-dos-diluyentes-comerciales-para-preservar-semen-bovino.pdf>
- Carpio, V. (2015). *Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen bovino: yema de huevo vs leche descremada*. [Tesis de Grado, Universidad Politécnica Salesiana]. Repositorio Institucional UPS. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7955/1/UPS-CT004815.pdf>
- Castelo, T., Frota, T. y Silva, A. (2008). Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Vet Bras*; 2(3), 67-75. <https://doi.org/10.21708/avb.2008.2.3.885>
- Catena M., y Cabodevila J. (1999). Evaluación de Semen Bovino Congelado.
- Cebrián, P.J.A., Muiño-Blanco, M.T., Pérez-Pé, R., Casao, G.A., y Palacios, R.C., 2010. Manejo del semen e inseminación artificial. En: Abecia, M.A., y Forcada, M.F. (Eds.) Manejo reproductivo en ganado ovino. *Servet*, España, 113-144.

- Curbelo, M., y Rodriguez, Z. (2013). *Relevamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en Uruguay*. [Tesis de Grado, Universidad de la República].
Repositorio Institucional UNNOBA.
<https://repositorio.unnoba.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/23601/469/TFG%20-%20Tamara%20Anah%C3%AD%20Londra%20Lic.%20en%20Gen%C3%A9tica.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Crespilho, A. M., Sá Filho, M. F., Dell'Aqua, J. A., Nichi, M., Monteiro, G. A., Avanzi, B. R., Martins, A., y Papa, F. O. (2012). Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin-based extenders. *Livestock Science*, 149(1–2), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.05.011>
- Córdova, C., Guerra, J. E., Iglesias, A. E., Huerta, R., Méndez, M., Gómez, A., y Belloda, J. L. (2020). Efecto de la raza del toro de carne sobre la calidad espermática de semen descongelado. *Agro Productividad*, 13(8), 11-12. <https://doi.org/10.32854/agrop.vi.1721>
- Countri, A., Valorz, C. y Faustini, M. (2009). Effect of semen preparation on CASA results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*, 74(3), 424-435. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.025>
- De Armas R. (2022) Curso de Biotecnologías Reproductivas [Video]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=qTS7OSsyZSM&t=36s>
- Decuadro H, G. (2010). Manejo del semen en un programa de IATF: aspectos críticos para preservar la fertilidad (*Ponencia*). 5º Jornadas TAURUS de Reproducción Bovina.

https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=2480517&pid=S1668-3498201100020000300010&lng=es

Dorado, J., Hidalgo, M., Muñoz, A., y Rodríguez, I. (2009). Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. *Animal Reproduction Science*, 112(1–2), 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.005>

Duarte, C. (2008). *Efecto de la aplicación de oxitocina sobre la calidad seminal en bovinos en el trópico húmedo*. [Tesis de grado, Universidad Veracruzana].

Elhissi, A., Phoenix, D., y Ahmed, W. (2014). Some approaches to large-scale manufacturing of liposomes. In *Emerging Nanotechnologies for Manufacturing Elsevier Science*, 402–417. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-28990-0.00015-4>

Gamal, A., El-Nattat, W. S., El-Sheshtawy, R. I., y El-Maaty, A. M. A. (2016). Substitution of egg yolk with different concentrations of soybean lecithin in tris-based extender during bulls' semen preservability. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(6), 514-518. <https://doi.org/10.1016/j.apjr.2016.10.011>

Graham, J. (2001). Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*, 68(3-4), 239-247. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00160-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00160-9)

El-Sisy, G. A., El-Badry, D. A., El-Sheshtawy, R. I., y El-Nattat, W. S. (2018). Effects of *Phoenix dactylifera* pollen grains extract supplementation on post-thaw quality

of Arabian stallion semen. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 21(1):40-49. <https://doi.org/10.15547/bjvm.1044>

Evans, G., y Maxwell, W.M.C. (1989). Manejo y valoración del semen. inseminación artificial de ovejas y cabras. Ed. Acribia, 95-107.

Fernández, A., Gonzalvo, M. D., Clavero, A., Ruíz de Assín, R., Zamora, S., Roldán, M., ... y Castilla, J. A. (2009). Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen. *Revista Asebir*, 14(1), 17-25 pp. <https://revista.asebir.com/assets/asebir-junio-2009.pdf>

Fernández, F. (2013). Evaluación de dos diluyentes para la conservación de semen ovino yema de huevo vs lecitina de soya. [https://www.academia.edu/4366411/evaluaci%
c3%93n_de_dos_diluyentes_pa
ra_la_conservaci%
c3%93n_de_semen_ovino_yema_de_huevo_vs_lecitina_d
e_soya](https://www.academia.edu/4366411/evaluaci%c3%93n_de_dos_diluyentes_para_la_conservaci%c3%93n_de_semen_ovino_yema_de_huevo_vs_lecitina_de_soya)

Fiume, Z. (2001). Final report on the safety assessment of Lecithin and Hydrogenated Lecithin. *International Journal of Toxicology*, 20, 21-45. <https://doi.org/10.1080/109158101750300937>

Freitas, C. D. P., Crespilho, A. M., Papa, F. O., y Dell'Aqua J, J. A. (2009). Metodología de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 33(4), 213-222. <https://doi.org/10.1590/S1413-95962000000200010>

- Gadea, J. (2003). Review: semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1(2), 27. <https://doi.org/10.5424/sjar/2003012-17>
- Gálvez, J. (2022). *Evaluación de dilutores a base de lecitina de soya y liposomas sobre la criopreservación de espermatozoides de toros*. [Tesis de grado, Universidad Nacional Agraria La Molina]. Repositorio Institucional UNALM. <http://45.231.83.156/bitstream/handle/20.500.12996/5263/galvez-suasnabar-josue-amador.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gamal, A., El-Maaty, A. M. A., y Rawash, Z. M. (2016). Comparative blood and seminal plasma oxidant/antioxidant status of Arab stallions with different ages and their relation to semen quality. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(5), 428-433. <https://doi.org/10.1016/j.apjr.2016.07.006>
- Gille, L., y Nohl, H. (2001). The ubiquinol/bc1 redox couple regulates mitochondrial oxygen radical formation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 388(1), 34–38. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2257>
- Gómez, C. (2011). El examen de compra en los sementales. *Equine Medicine, Improve Ibérica*. Modulo 13.
- Gómez, D., Cortés, M., y Martínez, J. (2023). Guía del manejo del semen bovino durante su colecta y envío para procesos de criopreservación de pajillas seminales. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia)*. <https://doi.org/10.21930/agrosavia.analisis.7406436>

- Gómez, V., y Migliorisi, L. (2007). *Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes*. [Cátedra Reproducción Animal, Universidad Nacional de La Plata]. Repositorio Institucional UNLP. https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_caprina/produccion_caprina/76-evaluaciondeaptitudreproductivacarnero.pdf
- González, A., y Pallares, J. (2014). *Eficiencia comparativa entre dos diluyentes para la criopreservación de semen en toros brahmán en el departamento de Antioquia*. [Trabajo de pregrado, Universidad La Salle]. Repositorio Institucional ULS. <https://repository.lasalle.edu.co>
- Goshme, S., Asfaw, T., Demiss, C., y Besufekad, S. (2021). Evaluation of motility and morphology of frozen bull semen under different thawing methods used for artificial insemination in North Shewa zone, *Ethiopia*. *Heliyon*, 7(10), e08183. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08183>
- Gualancañay, B. (2012). *Manejo de toros Donadores de Semen*. *Bachelor's thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*. [Trabajo de Grado, Escuela Superior Politécnica De Chimborazo]. Repositorio Institucional ESPOCH. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2124/1/17T1094.pdf>
- Güngör, Ş., Aksoy, A., Yeni, D., Avdatek, F., Öztürk, C., Ataman, B., ... y Akalin, P. (2016). Combination of Cysteamine and Lipoic Acid Improves the Post-Thawed Bull Sperm Parameters Sisteamin ve Alfa Lipoik Asit Kombinasyonunun Dondurulmuş Çözdürülmüş Boğa Spermaları Parametreleri Üzerine Etkisi.

Kocatepe Veterinary Journal Kocatepe Vet J, 9(2), 88-96.

<https://doi.org/10.5578/kvj.23105>

Hallak, J., Sharma, R. K., Wellstead, C., y Agarwal, A. (2000). Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of TEST-yolk buffer and glycerol. *International Journal of Fertility and Womens Medicine*, 45(1), 38-42 pp. 2000_IJF_Cryopreservation_Human_Spermatozoa_Comparison_TEST_Yolk_Buffer_Glycerol-libre.pdf

Helo, S. (2023). Morfología espermática anormal: ¿Qué significa? *Mayo Clinic*. <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/male-infertility/expert-answers/sperm-morphology/faq-20057760>

Hernández, A. (2017). El pequeño mundo de los liposomas. *Biol. On-line*; 6 (2), 2339-5745. http://revistes.ub.edu/index.php/b_on/index.

Hernández, C. M. (2020). *Evaluación de la concepción en cabras utilizando semen criopreservado*. [Trabajo de grado, [Trabajo de Grado, Escuela Superior Politécnica De Chimborazo]. Repositorio Institucional ESPOCH. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/14228/1/17T01619.pdf>

Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H. M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaeili, V., y Shahverdi, A. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive BioMedicine Online*, 37, 327-339. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>

Hidalgo, O., Tamargo, M. y Díez, C. 2005. Análisis del semen bovino: *Revista Tecnología Agroalimentaria*. 2ed. 39-43,

https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_toros/50-semen.pdf

Howard, J. y Pace, M. (1998). Impact of sperm morphology on fertility: A retrospective study. *Fertility and Sterility*, 70(2), 319-323 pp.

IMV-Technologies Spain. (2020). OPTIXcell. <https://www.imv-technologies.es/producto/optixcell#brochures>

Janett, F., Keo, S., Bollwein, H., Hässig, M., y Thun, R. (2005). Comparison of AndroMed®, Bioxcell® and Triladyl® extender for cryopreservation of bull semen. *Schweiz Arch Tierheilk*, 147, 62.
<http://www.researchportal.ch/unizh/p5601.htm>

Januskauskas, A., Johannisson, A., y Rodriguez, H. (2003). Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, 60(4), 743-758.
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00050-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00050-5)

Jasko, D. (1994). Procedures for cooling and freezing of semen. *Ars Veterinaria*, 10 (2), 156-165.

Jasko, D. J., Bedford, S. J., Cook, N. L., Mumford, E. L., Squires, E. L., y Pickett, B. W. (1993). Effect of antibiotics on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 40(5), 885-893.
[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90356-A](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90356-A)

Jiménez, S., Del Alamo, M. M., Álvarez-Rodríguez, M., Hidalgo, C. O., Peña, A. I., Muiño, R., Rodríguez-Gil, J. E., y Mogas, T. (2020). In vitro assessment of egg

yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders for cryopreservation of dairy bull semen. *Animal Reproduction Science*, 215, 1-12.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106315>

Kandelousi, M., Arshami, J., Naserian, A. A., y Abavisani, A. (2013). The effects of addition of omega-3, 6, 9 fatty acids on the quality of bovine chilled and frozen-thawed sperm. *Open Veterinary Journal*, 3(1), 2226-4485.
<http://www.openveterinaryjournal.com>

Kuster, C. (2005). Sperm concentration determination between hemacytometric and CASA systems: Why they can be different?. *Theriogenology*. 64(3): 614-617.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.047>

Guillou, J. L., Ropers, M., Gaillard, C., David-Briand, E., Van Leeuwen-Ibarrola, J., Desherces, S., Schmitt, E., Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Anton, M., y Tainturier, D. (2015). Sequestration of bovine seminal plasma proteins by different assemblies of phosphatidylcholine: A new technical approach. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 140, 523–530.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.11.034>

Lima, V. I. B., Johannisson, A., Ntallaris, T., Al-Essawe, E., Al-Kass, Z., Nongbua, T., ... y Morrell, J. M. (2018). Effect of freezing bull semen in two non-egg yolk extenders on post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(1), 127-136. <https://doi.org/10.1111/rda.13080>

López, J. (2005). Criopreservación de semen. *R VET*.
<https://www.reproduccionveterinaria.com/tecnologias-y-biotecnologias-de-la->

reproduccion/colecta-y-criopreservacion-de-semen/criopreservacion-de-semen/

López, M., Urbano, A., y Cárdenas, M. (2012). Manual de laboratorio para el análisis del semen. *OmniaScience Scholar*, 1, 1-129. <http://dx.doi.org/10.3926/oss.5>

Lossada, M. (2013). *Evaluación de dos diluyentes alternativos para la preservación de semen porcino bajo condiciones de refrigeración*. [Tesis de maestría, Universidad del Zulia, Venezuela]. Repositorio Institucional UFPS. <https://repositorio.ufps.edu.co/bitstream/handle/ufps/4371/1630448.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Mara, L., Dattena, M., Pilichi, S., Sanna, D., Branca, A. y Cappani, P. (2007). Effect of different diluents on goat semen fertility. *Animal Reproduction Science*, 102(1-2), 152-157. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.02.007>

Martínez, G., López, R., y García, M. (2018). Impacto de la inclusión de yema de huevo en diluyentes para la conservación de semen bovino. *Revista de Investigación Agropecuaria*, 25(2), 78-86 pp.

Medina, V. M., Perez, B. A., y Cruz, P. E. (2008). Efecto de la incubación postdescongelación sobre la calidad de espermatozoides crioconservados de cerdo. *Orinoquia*, 12(2), 149-161. <https://doi.org/10.22579/20112629.124>

Meena, GS., Raina, VS., Gupta, AK., Mohanty, T., y Bishist, R. (2010). Comparative performance of biociphos and egg yolk-based extenders for buffalo semen

cryopreservation. *Indian Journal of Animal Sciences*, 80 (5): 414-417.
<https://epubs.icar.org.in/index.php/IJAnS/article/view/178>

Melo, M. (2020). *Actualización En Los Diferentes Protocolos Utilizados En La Criopreservación Del Semen Caprino (Capra Aegagrus Hircus)*. [Trabajo de Grado, Universidad De Cundinamarca]. Repositorio Institucional UC.
<https://repositorio.ucundinamarca.edu.co/collections/d87de1c9-ac82-4b8c-8cbe-dec2feeed6be>

Miguel, S., Del Alamo, M., Alvarez, M., Hidalgo, C., Peña, A., Muino, R., ... y Mogas, T. (2020). In vitro assessment of egg yolk-, soya bean lecithin-and liposome-based extenders for cryopreservation of dairy bull semen. *Animal Reproduction Science*, 215. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106315>

Minitube. (2012). Manual Triladyl ® Diluyente de Semen Bovino.

Miró, M. (2015). Gestión de la reproducción en el macho.

Moncayo, S. A. (2016). *Evaluación de la calidad seminal de reproductores bovinos antes y después del proceso de criopreservación*. [Trabajo de Grado, Universidad Politécnica Salesiana]. Repositorio Institucional UPS.
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/11654/1/UPS-QT09284.pdf>

Montes, J., Torres, M., Rugeles, C., Almanza, R., y Guimarães, J. (2012). Inducción in vitro de la reacción acrosómica con heparina en semen congelado de toros brahman y gyr. *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica*, 15(2), 431-436. <https://doi.org/10.31910/rudca.v15.n2.2012.844>

- Moo, M. T. (2019). *Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados en la dieta sobre la congelación del semen ovino*. [Tesis Doctoral, Tecnológico Nacional de México]. Repositorio Institucional TECHMN. https://conkal.tecnm.mx/images/posgrado_new/repositorio%20institucional%20de%20tesis%20y%20trabajo%20terminal/20162018_maximiliano%20tun%20moo.pdf
- Morales, S., Cabrera, P., Pantoja, C., García, D., y Solis, N. (2013). Evaluación de la carga bacteriana en pajillas de semen congelado de toros del Banco Nacional de Semen. *Científica*, 10(1), 28-36. <https://www.researchgate.net/publication/293488152>
- Morillo, M., Salazar, S., y Castillo, E. (2012). Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. *Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas*, 1, 30-44. http://sian.inia.gob.ve/pdfpnp/Eval_poten_repro_macho%20bovino.pdf
- Morojon, D., y Morojon, L. (2015). *Evaluación de la calidad Seminal en toros reproductores en invierno y verano en el departamento del Cesar*. [Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba]. Repositorio Institucional UCO. <https://hdl.handle.net/20.500.12516/1838>
- Morrell, J. M., y Wallgren, M. (2014). Alternatives to antibiotics in semen extenders: A review. *Pathogens*, 3(4), 934-946. <https://doi.org/10.3390/pathogens3040934>
- Mortiner, S. (2000). CASA-Practical aspects. *Journal of Andrology*. 21, 515- 524. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb02116.x>

- Muiño, R. (2008). Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas. Universidad Santiago de Compostela.
- Muiño, R., y Peña, A. (2009). Estudio comparativo de tres diluyentes: Andromed®, Biociphos Plus® y Biladyl®. Evaluación de la supervivencia y longevidad espermáticas post-descongelación de espermatozoides bovinos. *XXXIX Jornadas de Estudio. XIII Jornadas sobre producción Animal*, 1, 714-716. <https://doi.org/10.23857/pc.v10i1.8829>
- Murphy, E. M., O'Meara, C., Eivers, B., Lonergan, P., y Fair, S. (2018). Comparison of plant-and egg yolk-based semen diluents on in vitro sperm kinematics and in vivo fertility of frozen-thawed bull semen. *Animal Reproduction Science*, 191, 70-75. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.010>
- Ochoa, G., Y Ortega, R. (2008). *Evaluación in vitro e in vivo de semen porcino conservado en diluyentes de larga duración*. Instituto de Investigaciones Porcinas.
- Olivera, A., y Nicolás, J. (2009). Manual de evaluación de semen en bovinos.
- Ozkavukcu, S., Erdemli, E., Isik, A., Oztuna, D., y Karahuseyinoglu, S. (2008). Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 25(8), 403–411. <https://doi.org/10.1007/s10815-008-9232-3>
- Páez, E., y Corredor, E. (2014). Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *Ciencia y agricultura*, 11(2), 49-59. <https://doi.org/10.19053/01228420.3837>

Palacios, C. J. (2005). Técnicas para la evaluación de la capacidad fecundante de espermatozoides. [Tesis de Postgrado]

Peláez, J., Breininger, E., Alegre, B., Peña, F.J. y Domínguez, J.C (2006). In vitro evaluation of the quality and fertilizing capacity of boar semen frozen in 0.25 ml straws. *Reprod Domest Anim.* 41(2), 153-61. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00659.x>

Peralta, J. A. (2006). *Efecto de la velocidad del descenso de la temperatura sobre la movilidad posdescongelado del semen de bovino.* [Trabajo de Grado, Universidad Veracruzana]. Repositorio Institucional UV. <https://www.redalyc.org/pdf/636/63633881001.pdf>

Pérez, B., López, E., y Álvarez, M. (2016). Semen diluents in domestic animal species: A review. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(4), 353-361. <https://doi.org/10.1111/rda.12717>

Peréz, J. (2006). *Efeito da adição fracionada de Dimetil formamida e das curvas de congelamento na viabilidade in vitro pós-descongelamento do espermatozoide eqüino.* [Tesis de maestría, Universidade Federal de Minas Gerais]. Repositorio Institucional UFMG. https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/LGPD6NCFWH/1/disserta_ao_jair_perez_os_rio.pdf

Pérez, J. y Merino, M. (2015). Definición de Agua Destilada.

Pérez, M. (2005). Manual práctico de “Procesamiento del semen”.

- Palomino, L., Camacho, J., Huanca, W., y Falcón, N. (2001). Conservación de semen caprino en los dilutores citrato-yema y leche-descremada yema. *Rev Inv Vet Perú*, 12(1).
https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/veterinaria/v12_n1/conser_semen.htm
- Prado, E., y Pérez, R. (2005). Flora bacteriana del semen de toro antes y después de la congelación. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 6(10), 1-8 pp.
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101005.html>
- Perry, G., & Patterson, D. (2008). *Determinación de la fertilidad reproductiva de toros padres. Department of Animal Sciences. Missouri*, 71(638):52-59.
www.produccion-animal.com.ar
- Ptáček, M., Stádníková, M., Savvulidi, F., y Stádník, L. (2019). Ram Semen Cryopreservation Using Egg Yolk or Egg Yolk-free Extenders: Preliminary Results. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 50(2), 96-103.
<https://doi.org/10.2478/sab-2019-0014>
- Puelles, O. (2019). *Morfología y morfometría del espermatozoide de vicuña (Vicugna vicugna mensalis)*. [Trabajo de Grado, Universidad Nacional De San Antonio Abad Del Cusco]. Repositorio Institucional UNSAAC.
https://repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12918/4614/253T20190596_TC.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Quispe, G. (2018). *Evaluación comparativa de la calidad seminal y funcional de semen crio preservado comercial de origen nacional en bovinos lecheros de tres centros de colección seminal*. [Trabajo de Grado, Universidad Católica de Santa

<https://repositorio.ucsm.edu.pe/server/api/core/bitstreams/14b74e5c-bccc-4c67-8aff-e79c9c077dd0/content>

Ramón, J. (2013). *Evaluación de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (trilady) en la congelación de semen bovino*. [Tesis de Maestría, Universidad de la Cuenca]. Repositorio Institucional UCUENCA. <https://rest-dspace.ucuenca.edu.ec/server/api/core/bitstreams/1d9f3274-2597-42fb-89d7-77664a4f10f0/content>

Raseona, A. M., Ajao, O. A., Nethengwe, L. D., Madzhe, L. R., Nedambale, T. L., y Barry, D. M. (2017). Viability of bull semen extended with commercial semen extender and two culture media stored at 24 °C. *South African Journal of Animal Sciences*, 47(1), 49- 55, <https://doi.org/10.4314/sajas.v47i1.8>

Ribeiro, A., Munita, L., Yumi, M., Mello, M., y Ferreira de Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de medicina veterinaria*, 46(1), 31-38. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2014000100005>

Rivera, M., y Ramírez, A. (2019). Significance of sperm vigor in the assessment of bovine semen quality: Insights and applications. *Journal of Animal Science*, 97(5), 215-230. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/4596>

Rubio, J., Quintero, A., y González, D. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de

toros. *Revista Científica*, 19(4), 382-389.

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S079822592009000400010&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0798-2259

Reátegui, J. (2015). Determinación de la calidad del semen criopreservado comercial utilizado en hatos lecheros, implicancia en la fertilidad e impacto en variables productivas. *Vicerrectorado de Investigación*. Universidad Católica de Santa María.

Roof, D. J., Bowley, S., Price, L. L., y Matsas, D. J. (2012). Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology*, 77(2), 412-420.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.08.015>

Rutter, B., y Russo, A. F. (2006). Bases para la evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *Agro-Vet*, 1, 270.
<https://canuelas.gob.ar/biblioteca/index.php/rutter-bruno/bases-para-la-evaluacion-de-la-aptitud-reproductiva-del-toro>

Sadeghi, S., Del Gallego, R., García C, B., Gómez, E. A., Yániz, J. L., Gosálvez, J., ... y Silvestre, M. A. (2020). Effect of sperm concentration and storage temperature on goat spermatozoa during liquid storage. *Biology*, 9(9), 300.
<https://doi.org/10.3390/biology9090300>

Salamon, S., y Maxwell, W. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 77–111. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00155-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00155-x)

- Sarabia, L. (2015). *Estudio de la calidad seminal en jóvenes*. [Tesis doctoral, Universidad de Murcia]. Repositorio Institucional UM. <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/326745/TLSC.pdf;jsessionid=5C80E9FC5AFC215DA8754DA99EBFCE0A?sequence=1>
- Sieme, H., Harrison, R. A. P., y Petrunkina, A. M. (2008). Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Animal Reproduction Science*, 107(3–4), 276–292. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.05.001>
- Silva, J., Torres, M., y Sánchez, E. (2019). Composición de diluyentes para la conservación de semen bovino. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 45(3), 423-435 pp.
- Singh, A. K., Kumar, A., Honparkhe, M., Kaur, S., Kaur, H., Ghuman, S. P. S., y Brar, P. S. (2018). Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of buffalo bull semen frozen in egg yolk-, soya bean lecithin-and liposome-based extenders. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(1), 195-202 pp. <https://doi.org/10.1111/rda.13092>
- Smith, R., y Johnson, M. (2018). Impacto de la temperatura en la viabilidad espermática: Implicaciones en la criopreservación. *Revista de Investigación en Reproducción Animal*, 40(2), 50-65 pp.
- Stornelli, M. A., y Sota, R. L.. (2006). Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. *Analecta veterinaria*, 26, 15-22 pp. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/11194>

- Stradaioli, G., Noro, T., Sylla, L., y Monaci, M. (2007). Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology*, 67(7), 1249-1255. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.01.009>
- Talini, R., Kozicki, L., Gaievski, Polo, G., Lima, L., Santiago, J., Segui, Weiss, R., y Galan, T. (2019). Bovine semen thermoresistance tests and their correlation with pregnancy rates after fixed-time artificial insemination. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia*, 71(6), 2085–2092. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10994>
- Tello, L. (2017). Efecto del consumo residual de alimento (RFI) sobre la fertilidad en toretes Angus y Hereford en el Estado de Chihuahua. [Trabajo de Grado, Escuela Superior Politécnica De Chimborazo]. Repositorio Institucional ESPOCH. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7763/1/17T1501.pdf>
- Thibier, M., y Guerin, B. (2000). Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 233-251 pp. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00161-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00161-5)
- Tríbulo H., Cutaia L., y Bó G. (2008). *Curso de Biotecnología Reproductiva* [ponencia]. 10° Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina. <https://iracbiogen.com/wp-content/uploads/2021/06/RESUMEN-10-Simposio-Internacional-de-Reproduccion-Animal-2013.pdf>

- Torelló, M., Clerch, A. V., y Del Pozo C, A. (2002). Liposomas (I). Conceptos generales y relación con las estructuras cutáneas. *Offarm: farmacia y sociedad*, 21(9), 188-190. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-liposomas-i-conceptos-generales-relacion-13038745>
- Torres, J., y Durán, S. (2014). Phospholipids: properties and health effects. *PubMed*, 31(1), 76-83. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.1.7961>
- Moo, M. (2019). *Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados en la dieta sobre la congelación del semen ovino*. [Tesis de Maestría, Tecnológico Nacional de México]. Repositorio Institucional TNM. https://conkal.tecnm.mx/images/posgrado_new/repositorio%20institucional%20de%20tesis%20y%20trabajo%20terminal/2016-2018_maximiliano%20tun%20moo.pdf
- Underwood, L., Solocinski, J., Rosiek, E., Osgood, Q., y Chakraborty, N. (2019). Active modulation of Hydrogen bonding by sericin enhances cryopreservation outcomes. *bioRxiv*, 1-43. <https://doi.org/10.1101/773721>
- Valdez, D. (2013). *Efecto del dodecil sulfato iónico adicionado a un diluyente libre de yema de huevo sobre la calidad del semen ovino congelado*. [Tesis de Maestría, Universidad de la Cuenca]. Repositorio Institucional UCUENCA. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/500>
- Varela, A. V., Piagentini, M., y León, C. (2018). Efecto del diluyente triladyl en la congelación de semen bovino sobre los parámetros de motilidad espermática

post descongelación. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(1), 130-138. <https://doi.org/10.15381/rivep.v33i6.22758>

Vásquez, F., y Vásquez E, D. (2007). Espermograma y su utilidad clínica. *Revista Salud Uninorte*, 23(2), 220-230. <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v23n2/v23n2a09.pdf>

Vejarano, O. A., Sanabria, R. D., y Trujillo, G. A. (2005). Diagnóstico de la capacidad reproductiva de toros en ganaderías de tres municipios del alto Magdalena. *Revista MVZ Córdoba*, 10(2), 648-662. <https://doi.org/10.21897/rmvz.469>

Vélez C, L., Rugeles P, C., y Vergara G, O. (2014). Efecto de la raza sobre las características reproductivas de toros manejados en sistemas extensivos. *Revista Científica*, XXIV (4), 341-346. <https://www.redalyc.org/pdf/959/95931404002.pdf>

Veloz, D. (2017). *Evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistema CASA (análisis seminal asistido por computadora) y su respuesta con la fertilidad por inseminación artificial*. [Tesis de maestría, Universidad de la Cuenca]. Repositorio Institucional UCUENCA. <https://rest-dspace.ucuenca.edu.ec/server/api/core/bitstreams/cd0da128-bf67-4c50-9322-f6887fd7b14e/content>

Vidal, A., Batista, A, Da Silva, E., Gomes, W., Pelinca, M., Silva, S., y Guerra, M. (2013). Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm

cryopreservation. *Small ruminant research*, 109(1), 47-51.

<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.07.022>

Vilanova, F. T. L., y Ballarales, B. P. P. (2005). La evaluación andrológica: justificación y métodos. Manual de Ganadería Doble Propósito. C. González-Stagnaro, E. Soto-Belloso (eds.) Ediciones Astro Data, SA Maracaibo-Venezuela, 8(1), 498-503.

http://avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manualganaderia/seccion6/articulo18-s6.pdf

Viñán, H. P., Paucar, J. E., y Alvarado, E. (2019). Adición de metil- β -ciclodextrina cargada de colesterol sobre la criopreservación de semen de toros Holstein Friesian. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(4), 1611-1618. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i4.17159>

Viotti, G. (2011). *Procesamiento del semen bovino para la inseminación artificial*. [Trabajo de Grado, Universidad de la República]. Repositorio Institucional UDELAR.

<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/19819/1/FV-29377.pdf>

Watson, P. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, 60, 481-492. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00099-3)

- Walters, E. M., Benson, J. D., Woods, E. J., y Critser, J. K. (2009). The history of sperm cryopreservation. *Sperm banking: Theory and practice*, 1, 1-10. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139193771.002>
- Westbury, H. (2001). Newcastle disease virus: an evolving pathogen?. *Avian pathology*, 30(1), 5-11. <https://doi.org/10.1080/03079450020023131>
- Wysokińska, A. (2022). Animal Reproduction: Semen Quality Assessment. *Animals*, 12(21), 2905. <https://doi.org/10.3390/ani12212905>
- Woolley, D. M., y Richardson, D. W. (1978). Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing. *Journal of Reproduction and Fertility*, 53(2), 389–394. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0530389>
- Yániz, J. L., Marco-Aguado, M. A., Mateos, J. A., y Santolaria, P. (2010). Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15 C. *Animal Reproduction Science*, 122(1-2), 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.006>
- Yeste, M. (2016). Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, 85(1), 47-64. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.047>
- Yeste, M. (2017). State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. *Animal Reproduction (AR)*, 14(1), 69-81 pp. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR895>

- Yildiz, C., Bozkurt, Y., y Yavas, I. (2013). An evaluation of soybean lecithin as an alternative to avian egg yolk in the cryopreservation of fish sperm. *Cryobiology*, 67(1), 91–94 pp. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.05.008>
- Yotov, S., Karadaev, M., Atanasov, A., Fasulkov, I., Antonov, A., y Kistanova, E. (2019). Effect of Extenders Containing Glycerol and Egg Yolk on Motility and Viability of Chilled Ram Semen collected during Non-Breeding Season. *Int.J. Curr.Microbiol. App.Sci*, 8(5), 588-596. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.805.068>
- Zhu, WJ y Liu, XG (2000). Daño criogénico a la integridad de la membrana plasmática en las regiones de la cabeza y la cola del esperma humano. *Asian Journal Andrology*, 2(2), 135–138. <http://www.asiaandro.com/archive/1008-682X/2/135.htm>

ANEXOS

Figura 1. Toro reproductor con sonda introducida en el recto para realizar la colección del semen.

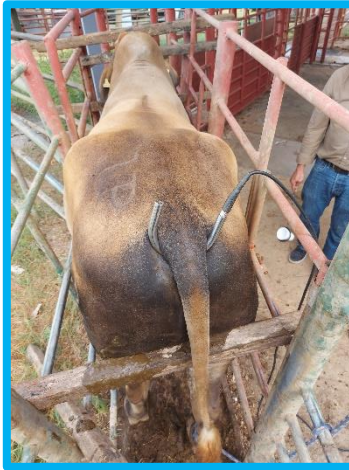


Figura 2. Pajuelas colocadas en la caja de hielo para su refrigeración y equilibración.



Figura 3. Sellado de pajuelas de 0.5 cc con alcohol polivinílico clorhídrico.



Figura 4. Pajuelas colocadas para congelación a vapor sobre nitrógeno líquido en la caja de hielo seco.



Figura 5. Espermatozoide muerto (A) y espermatozoide vivo (B) utilizando la tinción eosina observado en el microscopio a 40x.

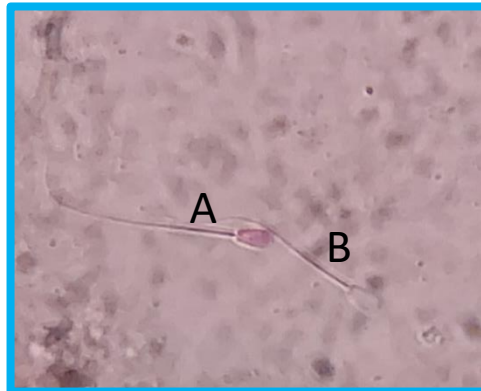


Figura 6. Pipeta con 20 μ l de eosina siendo añadida a 10 μ l de semen descongelado para su posterior observación para determinación de espermatozoides vivos y muertos.

