



Evaluación de tres dilutores comerciales sobre el semen de ovino post-congelación

Evaluation of three commercial extenders on post-freezing sheep semen

Avaliação de três diluidores comerciais em sêmen ovino pós-congelação

Janneth Elizabeth Paucar-Quito ^I

chichochachi116@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0002-8492-6507>

Juan Carlos Alvarado-Alvarado ^{II}

jalvaradoa@ucacue.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0002-7240-179X>

Andrés Leonardo Moscoso-Piedra ^{III}

amoscosop@ucacue.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0002-4017-0165>

Manuel Esteban Maldonado-Cornejo ^{IV}

mmaldonadoc@ucacue.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0002-1507-2280>

Correspondencia: chichochachi116@gmail.com

Ciencias de la Salud
Artículo de Investigación

* **Recibido:** 19 de noviembre de 2024 * **Aceptado:** 02 de diciembre de 2024 * **Publicado:** 29 de enero de 2025

- I. Universidad Católica De Cuenca, Ecuador.
- II. Universidad Católica De Cuenca, Ecuador.
- III. Universidad Católica De Cuenca, Ecuador.
- IV. Universidad Católica De Cuenca, Ecuador.

Resumen

La cría de ovinos tiene un impacto significativo en la economía del país, sin embargo, en esta industria suelen mantener prácticas de manejo tradicionales, lo que resta competitividad internacional, por esto es primordial mejorar la producción ovina mediante la mejora genética de animales con alto potencial productivo y reproductivo. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la eficiencia de tres dilutores comerciales, Ovixcell, Andromed y Triladyl sobre la calidad espermática del semen ovino postcongelación. De acuerdo a los parámetros de cada casa comercial en semen de carneros de las razas Katahdin, Pelibuey y Dorper, con 15 extracciones, 5 por cada ovino, para un total de 45 muestras, evaluadas mediante microscopia tradicional por tinción, fluorescencia, pH, además se incluyeron parámetros cinéticos evaluados mediante el sistema CASA, todas las variables fueron evaluadas en dos intervalos, en semen fresco recién diluido y postcongelación. En los análisis de permeabilidad y progresividad en semen fresco diluido, Triladyl obtuvo resultados eficientes ($p < 0.05$), mientras que en cinética Andromed y Triladyl lograron un impacto notable ($p < 0.05$), al analizar los parámetros mencionados en postcongelación Triladyl obtuvo resultados significativos ($p < 0.05$) mientras que los otros testigos rotaron, Ovixcell en segundo lugar demostrando mejor resistencia a la criopreservación ($p < 0.05$) ante Andromed, el cual ha evidenciado un descenso significativamente drástico, indicando alta mortalidad en semen descongelado. Se concluye que el diluyente Triladyl preserva mejor las características funcionales del esperma ovino al proteger la membrana plasmática, conservando la vitalidad y brindando mayor protección ante las consecuencias de la criopreservación.

Palabras clave: ovino; esperma; diluyente; crio preservación.

Abstract

Sheep breeding has a significant impact on the country's economy, however, this industry often maintains traditional management practices, which reduces international competitiveness, so it is essential to improve sheep production through genetic improvement of animals with high productive and reproductive potential. The objective of this research was to evaluate the efficiency of three commercial extenders, Ovixcell, Andromed and Triladyl on sperm quality of post-freezing sheep semen. According to the parameters of each commercial house in semen from rams of the Katahdin, Pelibuey and Dorper breeds, with 15 extractions, 5 for each sheep, for a total of 45 samples, evaluated by traditional microscopy by staining, fluorescence, pH, in addition kinetic

parameters evaluated by the CASA system were included, all variables were evaluated in two intervals, in fresh semen recently diluted and post-freezing. In the permeability and progressiveness analyses in fresh diluted semen, Triladyl obtained efficient results ($p < 0.05$), while in kinetics Andromed and Triladyl achieved a notable impact ($p < 0.05$). When analyzing the mentioned parameters in post-freezing Triladyl obtained significant results ($p < 0.05$) while the other controls rotated, Ovixcell in second place demonstrating better resistance to cryopreservation ($p < 0.05$) before Andromed, which has shown a significantly drastic decrease, indicating high mortality in thawed semen. It is concluded that the Triladyl extender better preserves the functional characteristics of ovine sperm by protecting the plasma membrane, preserving vitality and providing greater protection against the consequences of cryopreservation.

Keywords: ovine; sperm; extender; cryopreservation.

Resumo

A ovinocultura tem um impacto significativo na economia do país, no entanto, esta indústria mantém muitas vezes práticas de manejo tradicionais, o que reduz a competitividade internacional, pelo que é essencial melhorar a produção de ovinos através do melhoramento genético de animais com elevado potencial produtivo e reprodutivo. O objetivo desta investigação foi avaliar a eficiência de três diluidores comerciais, Ovixcell, Andromed e Triladyl na qualidade espermática do sêmen ovino pós-congelado. De acordo com os parâmetros de cada casa comercial em sêmen de carneiros das raças Katahdin, Pelibuey e Dorper, com 15 extracções, 5 para cada ovelha, para um total de 45 amostras, avaliadas por microscopia tradicional por coloração, fluorescência, pH, para além de Foram incluídos parâmetros cinéticos avaliados pelo sistema CASA, todas as variáveis foram avaliadas em dois intervalos, em sêmen fresco, recentemente diluído e pós-congelamento. Nas análises de permeabilidade e progressividade em sêmen fresco diluído, o Triladyl obteve resultados eficientes ($p < 0,05$), enquanto que na cinética o Andromed e o Triladyl obtiveram um impacto assinalável ($p < 0,05$), ao analisarem os parâmetros referidos no pós-congelamento o Triladyl obteve resultados significativos . descongelado. Conclui-se que o diluente Triladyl preserva melhor as características funcionais do esperma ovino, protegendo a membrana plasmática, preservando a vitalidade e proporcionando uma maior proteção contra as consequências da criopreservação.

Palavras-chave: ovelhas; esperma; mais fino; criopreservação.

Introducción

La importancia de la criopreservación de espermatozoides es crucial tanto para salvar especies y razas en peligro como para mejorar genéticamente razas productivas, en Ecuador incluido otros países Andinos, las políticas gubernamentales han priorizado a los programas que conservan el material genético local (Moreno et al., 2019). La crioconservación facilita la reproducción al permitir el transporte del espermatozoide a grandes distancias e incluso su uso post mortem del progenitor, sin embargo, esta técnica puede afectar la viabilidad y actividad de los espermatozoides debido a posibles daños durante el proceso (Saha et al., 2022). Los espermatozoides han demostrado presentar en mayor grado sensibilidad hacia la congelación, para contrarrestar este efecto y mejorar la fertilidad del semen, se introdujo el uso de dilutores, unos a base de proteína animal, vegetal y otros a base de azúcares, todos actuando como agentes criopreservantes (González et al., 2022), pues nivelan las concentraciones de sal, controlan la contracción celular, previenen la formación de hielo al interior de las células y disminuyen la fracción congelada de la solución (Saha et al., 2022). Si bien se han utilizado varios dilutores para congelar el semen ovino, no hay un análisis bien establecido que determine que diluyente produce los mejores resultados en la fase de descongelación (Cely et al., 2021).

Saha et al (2022) describe que es una práctica fundamental para el avance en las tecnologías reproductivas. Consiste en aplicar temperaturas excesivamente bajas para provocar a la célula una pausa vital durante largos periodos de tiempo, este método es primordial para preservar espermatozoides, aunque puede llegar a afectar la membrana plasmática provocando daños permanentes, muerte de la célula e infertilidad, además hay que tener en cuenta que el éxito de la crioconservación es dependiente del tipo de dilutor empleado (Duque & Castaño., 2018). La criopreservación de semen ovino a diferencia de otros mamíferos resulta un proceso complejo pues este es más susceptible a choques térmicos, lo que provoca mayor daño celular (Saha et al., 2022). Durante el proceso de enfriamiento, el hielo extracelular provoca que el espermatozoide permanezca en un ambiente hipertónico, ya que al existir fracciones no congeladas provoca la salida de agua de las células, es decir, en un intento por equilibrar solutos, se deshidrata, al descongelar este proceso se revierte enfrentando condiciones hipotónicas que favorecen el ingreso de agua, provocando su hinchazón, contrariamente a la congelación rápida donde la deshidratación es menor pero forma cristales de hielo intracelular causando altos índices de mortalidad (Sharafi,

2022), sumado a que por el daño celular provocado por la temperatura se genera una disminución sobre la calidad espermática (Akhtar & Quingshan, 2022), llegando a comprometer la integridad del ADN, mediado por las protaminas P1 Y P2 encargadas de brindar protección al material genético, que al sufrir daños parecen interferir entre los puentes de disulfuro de la cisteína, llegando afectar su función y fertilidad (Ortiz et al., 2022).

La relación entre los Criopreservantes y dilutores se centra en la presunción de roles complementarios, pero operan de manera distinta, ambos deben cumplir la función de proteger al esperma durante la congelación (Duque & Castaño, 2018). El daño provocado por la criopreservación afecta la estructura y función de los espermatozoides, comúnmente debido a factores como el estrés térmico, osmótico y oxidativo, para disminuir estos efectos se incorporan crioprotectores, cuya función es atenuar el daño celular durante el protocolo de congelación y descongelación, aparte de prevenir la formación de cristales de hielo (Ozimic et al., 2023).

Los dilutores aumentan el volumen del semen, ayudan a conservar la viabilidad (Guerrero et al., 2009), y facilitan a cumplir las dosis necesarias, su principal objetivo es mantener la capacidad de fecundación, al mismo tiempo que aportan nutrientes esenciales para efectuar el mecanismo de metabolización, protegen contra el shock térmico, controlan la presión osmótica, regulan el pH e impiden el desarrollo de microorganismos (Cando-Carrasco et al., 2023).

Se conoce presentaciones de dilutores, los de un paso hace referencia a los que ya contienen crioprotector en su formulación, mientras que los diluyentes de dos pasos, se añade primero el diluyente sin crioprotector y después del enfriamiento se agrega el diluyente que ya incluye crioprotector, lo que reduce el estrés de los espermatozoides aumentando notablemente la supervivencia espermática, características que con los dilutores de una sola etapa corren alto riesgo (Saha et al., 2022).

En relación a la composición de los diluyentes Nisfimawardah et al. (2023) indica que Andromed está elaborado sin compuestos de origen animal, contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, glicerina, agua bidestilada y antioxidantes. Ovixcell esta formulado principalmente por lecitina de soya (Arbulu, 2019), incluye electrolitos, agua pura, sal, azúcar, glicerol, antibióticos y ciertos componentes que se desconocen pues estos no figuran en la lista del fabricante (Nisfimawardah et al., 2023).

A Triladyl se le debe añadir su compuesto principal que es la yema de huevo (Torres & Corredor, 2015), también contiene un buffer sintético metil aminometano (TRIS), ácido cítrico, fructosa, agua

bidestilada, glicerol, para Andromed y Triladyl se describen antibióticos similares 5 mg de tilosina, 25 mg de gentamicina, 15 mg de lincomicina y 30 mg de espectinomicina (Nisfimawardah et al., 2023).

En este contexto, los dilutores con azúcares son incluidos como nutrientes, el azúcar debe ser agregado en la formulación sin excepción, ya que se convierte rápidamente en energía, favoreciendo a la motilidad espermática, esta energía externa es fundamental para que las células mantengan la capacidad de moverse, los monosacáridos más usados son la glucosa y la fructosa, estas son especialmente importantes ya que se transforman en lactato y piruvato (Alomar, 2023), compuestos cruciales para mejorar significativamente la motilidad, viabilidad y mantener la integridad de la membrana plasmática (Kamal, 2023), así mismo los espermatozoides al ser sensibles a la criopreservación y sufrir daños son susceptibles a disminuir la fertilidad (Moura et al., 2022). Los monosacáridos actúan mediante sus moléculas que al penetrar en las células espermáticas generan movimiento flagelar dado por la glicolisis y la fosforilación oxidativa de la mitocondria (Luzko et al., 2018).

Un compuesto disacárido muy conocido es la trehalosa, esta se destaca por su capacidad de producir hiperosmolaridad para impulsar la salida de agua de las células, sin penetrarla, lo que no permite la formación de cristales de hielo dentro de ellas, al mismo tiempo, asegura el equilibrio osmótico y brinda una protección adicional a los espermatozoides *frente a los daños causados por cambios de temperatura* (Chen et al., 2004).

Por otro lado, los dilutores con Buffer incluyen la protección de pH en el medio es crucial para preservar las funciones vitales, ya que tanto la actividad enzimática y las reacciones químicas celulares dependen de su capacidad de mantenerse controlado dentro del rango específico (Fiñana et al., 2021).

El pH en el carnero se sitúa entre 6,5 y 7,0 (Condori & Kantuta, 2021). A medida que los espermatozoides envejecen, como resultado de la glucolisis el ácido láctico se concentra en gran cantidad, lo que reduce el pH intracelular, este descenso los inmoviliza afectando la motilidad, para evitarlo, es crucial estabilizar el pH del medio mediante tampones (Reyes et al., 2021), estos contribuyen a contrarrestar los efectos tóxicos del ácido láctico, manteniendo la viabilidad de las células (Duque & Castaño, 2018).

Entre los tampones de uso frecuente se encuentra el trisfosfato hidroximetil aminometano (TRIS), y fosfato salino, aunque este último no es adecuado para la congelación debido al contenido

prominente de sodio lo que provoca alteraciones en las bombas de sodio potasio, como resultado su alta toxicidad dentro de las células espermáticas, pese a todos los beneficios que ofrecen los tampones, los extenders que en su formulación son enriquecidas con azúcar, carecen de un buffer de pH (Fernández et al., 2009).

El amortiguador de pH más usado es la yema de huevo, este actúa como un buffer al adherirse a la membrana, formándose como una especie de capa protectora gracias a su alta concentración de lipoproteínas, fosfolípidos y lecitinas, moléculas clave para efectuar su capacidad protectora contra el choque térmico (Saha et al., 2022).

Asimismo, en relación a los dilutores con medios orgánicos (Salifu et al. (2022) sostiene que los diluyentes al contener algún tipo de medio orgánico, por su origen natural, pueden llegar a ser menos tóxicos, aportando una protección eficiente para preservar la viabilidad espermática.

Un medio orgánico común más usado es la yema de huevo, este ayuda a prevenir el daño oxidativo (Sheshtawy et al., 2017), gracias a sus nutrientes como vitamina E, Selenio, estos protegen la membrana plasmática (Czelej et al., 2023). Sin embargo, el riesgo de contaminación microbiana por el uso de medios orgánicos es alta, con organismos como *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, aunque se ha demostrado que estos no son una amenaza al momento de inseminar debido a la acción de los antibióticos formulados en el diluyente (Duque & Castaño, 2018).

Es por esto que se ha creado medios orgánicos vegetales como la caña de azúcar, su extracto contiene minerales, vitaminas, azúcares, además de ofrecer propiedades antimicrobianas, citoprotectoras y antioxidantes (Salifu et al., 2022). Todos estos compuestos han mostrado mejorar notablemente la conservación del espermatozoide cuando se incorporan en diluyentes, además fuentes vegetales como remolachas son ricas en azúcares por lo que ayudan en la respiración celular y brindan un equilibrio osmótico a los espermatozoides, también se incluyen las frutas como naranja, piña y manzana que contienen altos niveles de vitamina C, y en general estos medios están compuestos por ácidos fenólicos y flavonoides, los cuales tienen potentes efectos antioxidantes (Bozzi et al., 2023).

Por otro lado, los crioprotectores penetrantes sustituyen el fluido interno por la sustancia protectora, es decir se deshidratan y se rehidratan, lo que provoca una contracción celular y protege al espermatozoide de daños causados por la formación de hielo al exterior de la célula, el más común es el glicerol (Duque & Castaño, 2018). En general el tamaño de las moléculas de este grupo es

inferior a 100 daltons, forman enlaces de hidrógeno con el agua, esto es clave para ejercer sus propiedades, deben atravesar la membrana biológica con facilidad ser solubles en agua a bajas temperaturas, y ser poco tóxicos, mientras que el grupo de los no penetrantes actúan extracelularmente, son moléculas más grandes, compuestas por dímeros, trímeros o polímeros, estos compuestos promueven la vitrificación mediante el mecanismo del grupo penetrante aunque su efecto es exclusivamente extracelular y con menos intensidad, entre los más utilizados se encuentran el polietilenglicol, la rafinosa, trehalosa, la sacarosa (Whaley et al., 2021), la lecitina de soja es conocida por mantener la estructura de la célula estable (Crespilho et al., 2012).

También dentro de este grupo se incluye a la yema de huevo, este protege a la membrana acrosómica, celular, las mitocondrias, preserva la motilidad y resguarda a las células del choque térmico, mientras que los crioprotectores penetrantes se inclinan a ser efectivos en proteger la cinética, morfología y motilidad (Saratsi, 2024), los no penetrantes son menos tóxicos para los espermatozoides, esto por su cantidad similar en moles (Amini, 2023).

En cuanto a la espermiograma tradicional Maside et al. (2023) da a conocer que la estandarización de este tipo de análisis sigue siendo compleja, varios factores de confusión dificultan obtener resultados contundentes, los análisis de la estructura se mide según la apariencia, morfología, concentración e integridad de la membrana plasmática, los análisis funcionales incluyen motilidad, viabilidad y actividad mitocondrial. Estas son técnicas centradas específicamente para la evaluación manual mediante microscopia tradicional, aunque demanda una cantidad significativa de tiempo y recursos (Kathrin et al., 2018).

La prueba de eosina nigrosina permite diferenciar entre espermatozoides vivos y muertos, estos últimos al tener la membrana plasmática comprometida tiñen el fondo, mientras que los espermatozoides vivos no adquieren color (Tanga et al., 2021). El yoduro de propidio evalúa la viabilidad, es un fluorocromo que no puede atravesar la membrana celular funcional intacta, solo penetra aquellos que tienen la membrana dañada pronunciándose con una fluorescencia roja en ellos, en cambio la rodamina se utiliza para estudiar la actividad de la membrana mitocondrial, este reactivo si es permeable por lo que ingresa y emite fluorescencia verde en las células, la cual es más intensa en las mitocondrias que funcionan correctamente (Maside et al., 2023).

En el sistema tradicional el análisis de fluorescencia usando rodamina y yoduro de propidio evidencian mayor confianza (Whitesell et al., 2020). Host es un análisis de hinchazón hipo osmótico se emplea para valorar la integridad funcional de las membranas, solo las células con la

membrana funcional intacta mantienen el equilibrio interior y exterior de la célula de esta manera tiene el poder de responder a cambios en su entorno, al ser sometido a condiciones hipo osmóticas, las células absorben líquido, lo que provoca la hinchazón y enrollamiento de la cola, este suceso indica una membrana en buen estado (Prochowska et al., 2022).

El sistema CASA (Computer Assisted Semen Analysis) permite rastrear el recorrido de cada espermatozoide, siendo capaz de llevar a cabo un análisis fisiológico a partir de la capacidad de avance progresivo (Guillén et al., 2021). Evalúa variables de cinética como vitalidad, concentración, es eficaz al medir motilidad, ofrecen mayor exactitud en los resultados, lo que por ende determina una evaluación precisa de la muestra, siguen siendo poco aprovechados a pesar de que este avance tecnológico ya fue introducido (Singh et al., 2021), también evalúa la velocidad promedio de los espermatozoides en un tiempo determinado, la oscilación, rectitud y linealidad, así como la frecuencia de batida del flagelo y el movimiento lateral de la cabeza del espermatozoide (Akhtar & Quingshan, 2022).

Este análisis computarizado mejora su exactitud en 2005 donde se agrega FASTCLUS un enfoque no jerárquico, donde se implementa pseudo F, pseudo t2 y el criterio cúbico clusterizado, esto permite una mejor clasificación de los sub grupos espermáticos (Corredor et al., 2018), permitiendo analizar con precisión, rapidez y de manera objetiva diversos parámetros del semen, además de identificar alteraciones sutiles en las características espermáticas que no pueden detectarse mediante espermiograma tradicional (Rijsselaere et al., 2012).

Materiales y métodos

El estudio se realizó en Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Cuenca, provincia del Azuay, Cantón Cuenca, con su localización en el kilómetro 2½ de la Panamericana Norte. Ejecutando la evaluación de tres tipos de dilutores comerciales, Andromed, Ovixcell y Triladyl, en semen de ovino de las razas Dorper, Katahdin y Pelibuey, con 5 extracciones por ovino para un total de 45 muestras para el estudio completo. Para analizar las variables se realizo un Diseño de Bloque completamente al azar (DBCA), con un nivel de significancia ($p < 0,05$), los grupos fueron comparados con la prueba de TUKEY, los resultados de la media y la desviación estándar se analizaron en el programa JAMOVİ PROJECT 2022.

Materiales

Con una vagina artificial de IMV Technologies lavada, secada y armada, se colocó un volumen de 40 a 60 ml de agua entre 45 - 47 °C, esta fue protegida a una temperatura corporal de 37 - 38 °C hasta llegar a la granja y colectar el semen, por la válvula introducimos aire provocando que el revestimiento de látex se estreche al ancho del dedo índice, el esperma fue colectado en tubos Falcon de 15ml y resguardado con la mano para evitar contaminación y cambios drásticos de temperatura.

Al llegar al laboratorio con una micropipeta de 100/1000 µl se midió el volumen seminal, inmediatamente realizamos el conteo de espermatozoides en el fotómetro Minitube especial para ovinos, este parámetro fue evaluado con 5 microlitros de semen, por último, en un portaobjetos ya estabilizado a 37 °C se colocó 5 microlitros de esperma previamente homogenizado, esto para medir la motilidad masal.

Dentro de la cabina de flujo laminar y materiales estériles se preparó la predisolución de los 3 diluyentes comerciales, Andromed a una razón de 1:4, una parte de diluyente y 4 partes de agua ultra pura, Ovixcell 1:1, una parte de agua ultra pura y una parte de diluyente, Triladyl 1:1:3 una parte de diluyente, una de yema y 3 partes de agua ultra pura, la yema fue cuidadosamente extraída con papel filtro y su contenido fue succionado desde dentro de su membrana con una jeringa de 3ml, esto para evitar la contaminación con la clara.

La proporción de solución madre se determinó, tomando en cuenta que la motilidad masal fue de 95%, incluyendo el valor del volumen y la concentración del esperma, se calculó las soluciones de cada diluyente para llegar a los 50 millones de espermatozoides, el resultante se dosifico para pajillas de 0,25cc y se restó la predilucion.

Una vez calculado se homogeneizo en tubos eppendorf previamente rotulados tomando el semen puro y las soluciones de manera cuidadosa, estos estuvieron a 37 °C a baño maría antes de la mezcla, fueron empajilladas tres muestras para cada diluyente, en total 135 pajillas para el estudio completo, selladas adecuadamente con alcohol polivinílico para evitar el desbordamiento y rotuladas por raza de ovino, dilutor y fecha.

Sujetando la pajilla de su extremo se colocó en la rampa alineándolas de forma horizontal para ser estabilizadas durante dos horas, ya preparada la cámara de congelación con nitrógeno líquido se introdujo las pajillas a los vapores de nitrógeno por 12 minutos para, pasado este tiempo las pajillas

fueron introducidas por completo en nitrógeno líquido para posteriormente llevarlos al termo criogénico.

Las repeticiones fueron descongeladas un mes después a 37 °C por un tiempo de 40 segundos, se eliminó todo rastro de humedad de la pajilla y se depositó la muestra en tubos eppendorf, las muestras fueron colocadas inmediatamente en la platina térmica a 37°C para evitar impactos bruscos de temperatura y finalmente volver a evaluar los siguientes parámetros que se detallan a continuación.

El pH fue analizado en papel tornasol colocando microgotas de 1µL para semen puro y post congelación, con la que revelo la coloración de pH transcurrido aproximadamente 1 minuto después de colocar la muestra.

Se evidenció la viabilidad de los espermatozoides con cada diluyente, aplicando una microgota al extremo de la placa de 3µL de reactivo y 3µL de esperma para realizar el frotis, para esta prueba se hizo uso del lente de 40x, contemplando a los espermatozoides sin coloración como vivos y para los espermatozoides con coloración como muertos.

La integridad de la membrana fue valorada microscópicamente con lente de 40x usando 100µL de reactivo con 20µL de semen homogeneizadas en un tubo eppendorf, fueron colocados a incubación en la platina térmica a 37°C durante 45 minutos, transcurrido este lapso de tiempo retiramos y analizamos, haciendo uso de un cubre y porta objetos colocamos 5µL de muestra, donde se pudo observar espermatozoides con cola lisa y enrollada, este último grupo está relacionado con el buen estado de la membrana.

La viabilidad también fue evaluada mediante fluorescencia, tomando 50µL de semen y 1µL del reactivo, la muestra fue colocada en tubos eppendorf protegidos con aluminio e incubadas en la platina térmica por 5 minutos, una vez transcurrido el tiempo de incubación retiramos, tomamos 5µL de muestra, realizamos el frotis y analizamos con lente 100x, disco #1.

Examinamos la actividad mitocondrial mediante fluorescencia, tomando 1µL de rodamina 123 y 50µL de semen, una vez colocada la muestra en el tubo eppendorf se incubo por 5 minutos en la platina térmica, retiramos de incubación, tomamos 5µL de la muestra y realizamos el frotis, se empleó el lente de 100x, disco #3 para su análisis.

Para el análisis de semen asistido por ordenador se incluyeron indicadores como la motilidad progresiva (PR), la motilidad no progresiva (NP), espermatozoides inmóviles (IM), velocidad con trayectoria curvilínea (VCL), la velocidad promedio (VAP), la velocidad con trayectoria rectilínea

(VSL), la rectitud en porcentaje (STR), la linealidad en porcentaje (LIN), la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y la frecuencia rectilínea de batida del flagelo (BCF). Para esta evaluación se rotulo un porta objetos diferente para cada diluyente por nombre, colocamos 5µL de cada muestra y protegimos la microgota con un cubre objetos, tanto como para análisis de semen fresco diluido como para la post-congelación las muestras fueron evaluadas inmediatamente, capturando 3 campos por muestra.

Resultados

Una vez consideradas las muestras homogéneas de los tres ovinos donadores se procedió a realizar el análisis de varianza de las diferencias entre los tratamientos de Andromed, Ovixcell y Triladyl para las variables de permeabilidad, progresividad y la cinética espermática evaluadas en semen fresco con el diluyente donde se pudo observar lo siguiente:

Tabla 1: Análisis de semen fresco diluido

TRATAMIENTO	ANDROMED	OVIXCELL	TRYLADIL	Valor
N	15	15	15	p
EOSINA	82.5+/- 7.69 ^b	75.5+/- 11.4 ^c	95.3+/- 3.75 ^a	< .001
HOST	44.1+/- 8.14 ^b	19.3+/- 8.23 ^c	79.6+/- 18.2 ^a	< .001
YODURO	77.5+/- 4.84 ^b	69.4+/- 8.00 ^c	84.3+/- 3.96 ^a	< .001
RODAMINA				
MOTILIDAD	3.97+/- 0.289 ^b	3.35+/- 0.239 ^c	4.75+/- 0.177 ^a	< .001
PH	7.00+/- 0.00 ^a	7.00+/- 0.00 ^a	7.00+/- 0.00 ^a	
PROGRESIVOS	55.4+/- 8.73 ^b	35.7+/- 9.92 ^c	83.7+/- 7.85 ^a	< .001
NO				
PROGRESIVOS	41.4+/- 10.9 ^b	41.6+/- 13.8 ^a	15.8+/- 7.33 ^c	< .001
INMOVILES	3.19+/- 3.20 ^b	22.7+/- 19.4 ^a	0.438+/- 1.12 ^c	< .001
VCL	157+/- 25.2 ^a	85.4+/- 34.4 ^b	153+/- 29.3 ^a	< .001
VAP	84.5+/- 13.3 ^a	44.8+/- 21.8 ^b	86.7+/- 18.9 ^a	< .001
VSL	55.4+/- 12.9 ^a	31.7+/- 19.0 ^b	60.5+/- 16.5 ^a	< .001
STR	61.1+/- 7.40 ^a	55.9+/- 8.80 ^b	64.8+/- 6.64 ^a	0.016
LIN	34.3+/- 5.62 ^a	29.6+/- 8.68 ^b	38.1+/- 5.73 ^a	0.009
ALH	3.67+/- 0.488 ^a	2.05+/- 0.520 ^b	3.46+/- 0.472 ^a	< .001
BCF	15.0+/- 3.27 ^a	10.2+/- 5.30 ^b	15.5+/- 3.40 ^a	< .001

Para la prueba de Eosina, el test de Host, Yoduro de propidio y Rodamina se presentaron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) con valores < 0.001 , detallados en la tabla 1, donde en secuencia alfabética cada literal difiere de los otros tratamientos, siempre a favor del Triladyl, seguido por Andromed y finalmente Ovixcell.

En cuanto a progresividad, con una variación estadística de ($p < 0.05$) con valores < 0.001 , destacan a Triladyl, continuado por Andromed y por último Ovixcell.

Se revelo un pH inicial de (7.00+/-0.00) en semen fresco evaluado sin diluyente, en cuanto a la motilidad antes de congelar esta evidencia una diferencia de ($p < 0.05$) con resultados < 0.001 claramente favoreciendo a Triladyl, sucedido por Andromed y por último Ovixcell.

En lo que concierne a los parámetros cinéticos de igual modo tuvieron diferencias estadísticas ($p < 0.05$), para VCL, VAP, VSL, ALH Y BCF con valores < 0.001 , STR con valores de 0.016 y LIN con un valor de 0.009, evidenciando a los dilutores Andromed y Triladyl con resultados superiores al Ovixcell.

Tabla 2: Análisis de semen post congelación

TRATAMIENTO	ANDROMED	OVIXCELL	TRYLADIL	Valor
N	15	15	15	p
EOSINA	14.3+/- 9.95 ^c	35.9+/- 15.1 ^b	59.6+/- 7.79 ^a	$< .001$
HOST	15.5+/- 3.02 ^c	35.6+/- 5.50 ^b	58.7+/- 6.59 ^a	$< .001$
YODURO	57.1+/- 2.83 ^c	63.1+/- 3.25 ^b	71.3+/- 4.89 ^a	$< .001$
RODAMINA	60.3+/- 2.05 ^c	63.6+/- 2.67 ^b	74.1+/- 3.07 ^a	$< .001$
MOTILIDAD	1.59+/- 0.431 ^c	2.62+/- 0.610 ^b	3.69+/- 0.594 ^a	$< .001$
PH	6.00+/- 0.00 ^b	5.50+/- 0.00 ^c	7.00+/- 0.00 ^a	
PROGRESIVOS	11.8+/- 6.22 ^c	26.0+/- 5.98 ^b	48.6+/- 7.08 ^a	$< .001$
NO PROGRESIVOS	19.7+/- 5.63 ^b	37.9+/- 14.8 ^a	42.0+/- 10.3 ^a	$< .001$
INMOVILES	68.5+/- 10.4 ^a	36.0+/- 18.4 ^b	9.38+/- 8.01 ^c	$< .001$
VCL	36.5+/- 14.2 ^c	54.3+/- 19.6 ^b	73.2+/- 23.2 ^a	$< .001$
VAP	19.6+/- 9.16 ^a	29.1+/- 9.04 ^a	44.4+/- 13.5 ^b	$< .001$
VSL	13.7+/- 8.26 ^a	19.5+/- 6.74 ^a	32.6+/- 10.7 ^b	$< .001$
STR	52.7+/- 10.2 ^c	59.2+/- 6.30 ^b	65.2+/- 7.15 ^a	0.002
LIN	30.2+/- 12.4 ^a	36.8+/- 8.72 ^a	42.8+/- 10.8 ^b	0.022
ALH	1.11+/- 0.264 ^c	1.51+/- 0.397 ^b	1.79+/- 0.424 ^a	$< .001$
BCF	3.35+/- 2.34 ^c	6.11+/- 2.48 ^b	10.5+/- 3.38 ^a	$< .001$

Al medir el análisis de varianza de las muestras postcongelación se reveló diferencias entre los dilutores Andromed, Ovixcell y Triladyl para la permeabilidad, progresividad y la cinética.

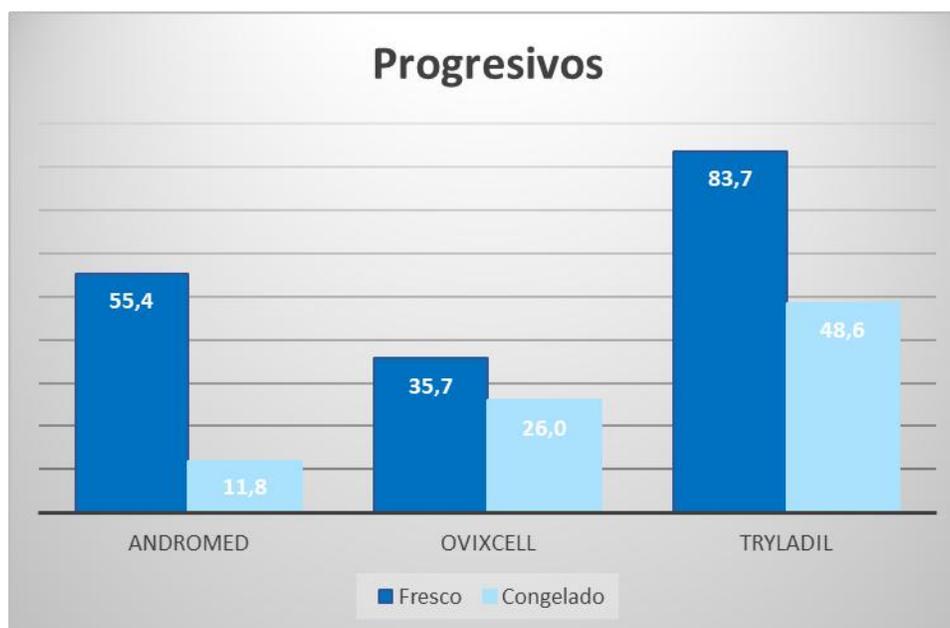
Se pudo observar que para para Eosina, Host, Yoduro de propidio y Rodamina hubo diferencias estadísticas ($p < 0.05$) con valores < 0.001 , detallados en la tabla 2, donde en secuencia alfabética cada literal difiere de los otros tratamientos, adjudicando siempre resultados positivos para Triladyl, seguido por Ovixcell y finalmente Andromed.

Con respecto a la progresividad con una variación estadística ($p < 0.05$) con valores < 0.001 resaltan en primer término a Triladyl, seguido de Ovixcell y por último Andromed.

El pH del Triladyl se mantuvo (7.00 ± 0.00) mientras que del Andromed bajó a (6.00 ± 0.00) y del Ovixcell descendió a (5.50 ± 0.00), en cuanto a la motilidad postcongelación con una diferencia de ($p < 0.05$) con resultados < 0.001 , evidentemente favoreciendo en primer plano a Triladyl, continuando con Ovixcell y por último Andromed.

Con respecto a los parámetros cinéticos de igual modo tuvieron diferencias estadísticas ($p < 0.05$), para parámetros como VCL, VAP, VSL, ALH Y BCF con valores < 0.001 , para STR con resultados de 0.002 y LIN con una puntuación de 0.022, siempre destacando de manera positiva al diluyente Triladyl, seguido por Ovixcell y por último Andromed.

Ilustración 1: PR en fresco y congelado, Andromed, Ovixcell y Triladyl



Para finalizar, se evidencia en la figura 3 las diferencias entre semen fresco y congelado, donde se puede observar una decaída radical de los valores, pese a esto se puede constatar que en cuanto a vitalidad el Triladyl con 48,6% mantiene la calidad del esperma ovino, llama la atención el efecto de estos criopreservantes y su cambio sobre el semen fresco.

Discusión

El espermiograma tradicional se cataloga como impreciso y sesgado, este tiene varias limitantes en cuanto a variabilidad y movilidad, en consecuencia, afectan la objetividad de las evaluaciones, para esto se incluyó el sistema casa ya que obtiene análisis precisos logrando sustituir a los análisis tradicionales (Valverde & Madrigal, 2018).

En nuestro estudio el diluyente más efectivo fue el Triladyl. Al parecer los diluyentes a base de yema de huevo demuestran mayor eficacia en comparación a otros diluyentes vegetales. (Saratsi, 2024) evidencia que al comparar a Steridyl, mismo que ya contiene yema esterilizada en su formulación, con otros diluyentes, este proporcionó una mayor eficacia en la conservación de las cualidades vitales de los espermatozoides, así mismo (Barbas, 2023) formularon un diluyente a base de yema de huevo nombrado EZN S - EXT donde, (Fernandes et al., 2021) alude que este diluyente conservo mejor el esperma descongelado, de igual manera (Rimi et al., 2023) recalca que Triladyl evidencio un mayor número de espermatozoides vivos post-congelación y con la mejor tasa de concepción, siendo determinado como el más efectivo para la crioconservación de semen en cabras, (Hurtado, 2023) asegura que Triladyl destaco, al ser superior sus índices de motilidad antes y después de la congelación, como el diluyente más efectivo para preservar el semen, tal cual lo verifica (Izquierdo et al., 2023) en ovinos de raza Suffolk Inglés, donde en 0 horas la motilidad y viabilidad fueron superiores con Triladyl.

(Muiño & Peña, 2009) Insiste en que estos resultados pueden deberse a las lipoproteínas de la yema, estas protegen a la membrana del espermatozoide, durante la congelación y post congelación, además de tener un alta compatibilidad con las proteínas del plasma seminal, estas últimas al eyacular se adhieren a la membrana de los espermatozoides, siendo la razón fundamental de la pérdida de colesterol y fosfolípidos, esto es grave ya que debilita la integridad de la membrana y lo hace más débil al frio, por lo tanto, las lipoproteínas de la yema se juntan a las proteínas del plasma seminal y bloquean este impacto nocivo. Ayudando a preservar la integridad de la membrana (Czelej et al., 2023).

En cuanto al pH en nuestro estudio si se encontró diferencias post-congelación entre los diluyentes, siendo Triladyl el único en mantener su valor inicial, tal cual el estudio de (Izquierdo et al., 2023) donde Triladyl mantiene su pH, colocándolo en primer lugar como una alternativa eficaz para conservar semen ovino. Según (Martínez et al., 2020) en su estudio con 5 dilutores certifica que hay una relación entre el pH y el número de espermatozoides móviles, resalta que en un pH bajo los espermatozoides carecen de movilidad sin embargo estos van presentado movimiento conforme mejora el pH con otros diluyentes, así lo confirma (Paez et al., 2020) donde al incluir yema de huevo afirma que esta potencia la velocidad de los espermatozoides.

Las diferencias de pH entre los testigos pueden deberse a que Triladyl contiene yema la cual actúa como buffer. Esta al suministrar lipoproteínas de baja densidad como colesterol y triglicéridos (Paez et al., 2020), protege a la membrana mitocondrial, las mitocondrias al liberar ATP son las responsables del movimiento espermático cualquier daño compromete la motilidad de los espermatozoides y disminuye su potencial fertilizante (Quispe et al., 2023).

Nuestro estudio también incluyo a los dilutores Andromed y Ovixcell formulados a base de activos vegetales, estos fueron introducidos a la industria del comercio con el propósito de reducir contaminaciones con microorganismos, lo que puede suceder con la yema, pero pese a esto, la adición de yema a los dilutores ha demostrado ser más efectiva tras la descongelación (Paez et al., 2020).

Los diluyentes usados en nuestro estudio contienen glicerol punto clave ya que, en nuestra investigación se hace mención al declive inmediato de la motilidad progresiva en semen fresco recién diluido. (Sharafi, 2022) añade que el daño en las células espermáticas suele ser significativa al introducir el agente crioprotector, es decir al inicio y también al final del proceso, aunque también puede ocurrir durante las fases de congelación y descongelación a ritmos lentos o moderados.

Esta situación puede estar relacionada a que este componente es altamente toxico para las células dependiendo la temperatura y concentración, este daña la membrana e influye negativamente en su funcionalidad, probablemente porque el glicerol atraviesa la membrana celular cuando se añade a 30 °C, en la solución madre, mientras que al ser añadido el dilutor con glicerol después de ser equilibrado, al encontrarse a una temperatura de 4°C no penetra y disminuye su toxicidad, por lo que es mínima la pérdida de espermatozoides antes de la criopreservación (Saha et al., 2022).

En Ecuador se evaluó únicamente mediante microscopia tradicional, Andromed, Ovixcell y Triladyl donde este último fue el más efectivo sin embargo se discute los resultados post-congelación con Andromed y Ovixcell ya que en nuestro estudio estos diluyentes rotaron, Andromed indicando un declive significativo, suceso que en el estudio de (Pozo, 2015) no pasa. Existen sucesos similares (Fernandes et al., 2021) evidencia a Ovixcell con el valor más bajo en semen fresco diluido, pero en post-congelación esto cambia, es curioso el descenso considerable de Andromed indicando alta mortalidad, así mismo (Mujitaba et al., 2024) evaluaron Andromed, Ovixcell y Bioxcell todos a base de un componente vegetal donde Andromed evidencia el último lugar, con alta mortalidad.

Estas diferencias pueden deberse a la relación de la disolución, así lo expone (Ortiz et al., 2022) recalcando que ya se ha mencionado en varios estudios la importancia de manejar adecuadamente proporciones para asegurar la preservación de la estructura y función de las células, además (Maside et al., 2023) menciona que es imprescindible considerar que los resultados de motilidad pueden llegar a diferir según las condiciones del laboratorio en el que se realiza el estudio, ya que en cuanto a cinética el tipo de cámara de conteo, duración de las grabaciones de video y generalmente el tiempo de incubación, influyen directamente en las mediciones, así como es probable que sea debido a resultados inexactos por microscopia tradicional (Prochowska et al., 2022) coloca como referencia a las células que se exponen a condiciones hipoosmóticas, estas exhiben variadas formas de hinchazón, que van desde un ligero enrollamiento al final de la cola hasta un enrollamiento completo que involucra la pieza intermedia, algunas células con defectos como colas enrolladas o dobladas en el semen puro pueden parecerse a estos patrones de hinchazón, lo que puede llevar a una categorización incorrecta contándolas como hinchadas.

Sin embargo el declive de los extensores post-congelación a base de componentes vegetales puede estar ligado a la proveniencia, estructura y función de sus fosfolípidos en su formulación, así como las variaciones de agentes como el glicerol, tampones o azúcares, pueden afectar las cualidades de estos medios (Saratsi, 2024). La lecitina de soja pese a tener lipoproteínas similares a las presentes en las membranas de los mamíferos, como la fosfatidilcolina, ácidos grasos oleico, palmítico y esteárico (Oke & Paliyath, 2010), además de tener menor viscosidad frente a Tris o yema de huevo (Thun et al., 2002), está probada que no aporta una protección suficiente, lo que al descongelar provoca una viabilidad inferior frente a los dilutores con yema de huevo. (Crespilho et al., 2012).

Conclusiones

Al evaluar los extender mediante microscopia tradicional y sistema CASA, los hallazgos evidenciados en esta investigación revelan que el diluyente a base de yema de huevo Triladyl preserva mejor las características funcionales del esperma ovino, además de ser el único de los dilutores que conservo su pH inicial de 7 asociado positivamente con la movilidad espermática, este dilutor brinda mayor protección ante las consecuencias que provoca la criopreservación, frente a dilutores a base de fosfolípidos vegetales, estas revelaciones evidencian un alto potencial para programas de mejoramiento genético, ya que al incluir el sistema CASA nos permitió una evaluación más precisa, además de distinguir y deducir el cómo y porque varían las respuestas, lo que proporciona una base más sólida para programas, investigaciones y practicas futuras de mejoramiento genético en ovinos.

Referencias

1. Akhtar, M., & Quingshan, M. L. (2 de septiembre de 2022). Efecto de la criopreservación de esperma en animales de granja mediante nanotecnología. *Animals*, 12(17), 2277. doi: <https://doi.org/10.3390/ani12172277>
2. Alomar, M. (2023). Influences of Monosaccharides and Disaccharides Supplementations in Tris Media on the Motility Patterns of Fresh and Chilled Small Ruminant Spermatozoa. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 15(3), 7-15. doi: <https://doi.org/10.22067/ijvst.2023.82141.1247>
3. Amini, M. J. (30 de march de 2023). Technologies for Vitrification Based Cryopreservation. *Bioengineering*, 10(5), 508. doi: <https://doi.org/10.3390/bioengineering10050508>
4. Arbulu, A. (2019). Nuevas estrategias para la criopreservación de esperma ovino mediante el uso de antioxidantes, gradientes y vitrificación. Dialnet. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=236379>
5. Barbas, J. P. (7 de february de 2023). Ram Semen Cryopreservation for Portuguese Native Breeds: Season and Breed Effects on Semen Quality Variation. *Animals*, 13(4). Obtenido de <https://www.mdpi.com/2076-2615/13/4/579>
6. Bozzi, A., Particelli, L., Viana, C., Quirino, C., Andrade, A., Freitas, F., . . . Costa, R. (2023). Addition of orange, pineapple and beet juices as extenders for cryopreservation of

14. Czelej, M., Czernecki, T., Garbacz, K., Wawrzykowski, J., Jamioł, M., Michalak, K., . . . Waśko, A. (11 de september de 2023). Egg Yolk as a New Source of Peptides with Antioxidant and Antimicrobial Properties. *Foods*, 12(18), 3394. doi: <https://doi.org/10.3390/foods12183394>
15. Duque, N., & Castaño, P. (2018). Protocolos de criopreservación de semen bovino. Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad Ciencias de la Salud, Pereira. Obtenido de <https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/4af87dc9-7d24-4bac-95b8-3560ab56f475/content#:~:text=La%20criopreservaci%C3%B3n%20consiste%20en%20utilizar,los%20espermatozoides%20puedan%20ser%20conservados.>
16. Fernandes, M., Hernández, P., Simões, J., & Barbas, J. (2021). Effects of Three Semen Extenders, Breeding Season Month and Freezing–Thawing Cycle on Spermatozoa Preservation of Portuguese Merino Sheep. *Animals*, 11(9). doi: <https://doi.org/10.3390/ani11092619>
17. Fernández, A., Gonzalvo, M., Clavero, A., Assín, R., Zamora, S., Roldán, M., . . . Castilla, J. (14 de junio de 2009). Fundamentos de la criobiología espermatocaria para bancos de semen. *Asebir*. Obtenido de
18. <https://revista.asebir.com/fundamentos-de-criobiologia-espermatocaria-para-bancos-de-semen/>
19. Fiñana, S., Cejudo, A., & Reyes, E. (2021). pH y amortiguadores: Tampones fisiológicos. *bioquímica*. obtenido de <https://www.studocu.com/es-mx/document/universidad-autonoma-de-sinaloa/bioquimica/06-p-h-amortiguadores/34293755>
20. González, E., Castro, F., Espinosa, N., Ek Mex, J., Torres, J., & Correa, J. (22 de diciembre de 2022). Efecto de los diluyentes Ley-Leygo y Triladyl y de dos tiempos de equilibrio en la congelación de semen de verraco. *Rev Inv Vet Perú*, 33(6). Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v33n6/1609-9117-rivep-33-06-e22758.pdf>
21. Guerrero, H., Huanca, W., Raymundo, F., Huerta, S., & Ramos, D. (2009). Uso de dilutores hipertónicos en la criopreservación de semen ovino. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* (1). Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172009000100007#:~:text=La%20finalidad%20de%20diluir%20el,espermatozoide%20por%20un%20tiempo%20mayor.

22. Guillén, J., Sánchez, A., Meléndez, C., Villalobos, D., & Moreno, A. (june de 2021). Crioprocesado de semen ovino: efecto sobre el patrón de motilidad y la distribución de subpoblaciones espermáticas. *Journal of Veterinary Andrology*, 6(1), 19-39. Obtenido de <https://www.ivis.org/sites/default/files/library/andrology/6-1/6-1-3-crioprocesado.pdf>
23. Hurtado, W. (2023). Efecto de tres tipos de dilutores sobre la viabilidad y motilidad espermática en semen congelado de ovinos del trópico en Madre de Dios. Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, Facultad de ingeniería, Puerto Maldonado. Obtenido de <https://repositorio.unamad.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14070/1199/004-2-4-028.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
24. Izquierdo, A., Mancera, A., Vázquez, A., & Sánchez, R. (junio de 2023). Efecto del diluyente sobre calidad espermática del semen ovino refrigerado. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/372362276_Efecto_del_diluyente_sobre_calidad_espermatica_del_semen_ovino_refrigerado#fullTextFileContent
25. Kamal, M. M. (30 de junio de 2023). Effects of glucose and trehalose on tris-citric acid-egg yolk-fructose diluents for semen cryopreservation in goat. *Journal of advanced veterinary and animal research*, 10(2), 169–177. doi: <https://doi.org/10.5455/javar.2023.j666>
26. Kathrin, M., Grunewald, E., Schiller, J., & Paasch, U. (25 de september de 2018). Automated semen analysis by SQA Vision® versus the manual approach - A prospective double-blind study. *First international journal of andrology*. doi: <https://doi.org/10.1111/and.13149>
27. Luzko, N., Azcurra, M., Benitez, N., Miragaya, M., & Stornelli, M. (14 de febrero de 2018). Criopreservación seminal en equinos: Efecto de la Trehalosa sobre la célula espermática. *Scientiamericana, Revista Multidisciplinaria*, 5(1). doi: <http://dx.doi.org/10.30545/scientiamericana.2018.abr.5>
28. Martínez, M., García, S., Kjelland, M., & Márquez, H. (25 de Febrero de 2020). Efecto del pH de cinco soluciones extensoras sobre la movilidad espermática en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). *Hidrobiológica*. Obtenido de https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972018000200171

29. Maside, C., Recuero, S., Huetos, A., Maynou, J., & Yeste, M. (marzo de 2023). Revisión por invitación de la junta de animales: una actualización sobre los métodos para la evaluación de la calidad del semen en cerdos, desde la granja hasta el laboratorio. *Animal*, 17(3). doi: <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100720>
30. Moreno, J., Diego, A., & Lucero, G. (2019). Criopreservación de espermatozoides en especies domésticas y silvestres: estado actual de los avances tecnológicos. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 3(2), 19. Obtenido de <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/33941/1/documento.pdf>
31. Moura, T., Arruda, L., Arujo, R., Silva, R., Oliveira, A., Tobal, L., . . . Guerra, M. (febrero de 2022). Un diluyente que contiene dimetilformamida añadida con sacarosa mejora la calidad in vitro tras la congelación/descongelación de espermatozoides de semental. *Revista de Ciencias Veterinarias Equinas*, 109. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103825>
32. Muiño, R., & 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. *Aida*, 714-716. Obtenido de https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2009/comunicaciones/2009_Rep_24.pdf
33. Mujitaba, M. A., Kútvölgyi, G., Radnai Szentpáli, J., Debnár, V. J., Tokár, A., Vass, N., & Bodó, S. (20 de April de 2024). The Influence of Three Commercial Soy Lecithin-Based Semen Extenders and Two Spermatozoa Concentrations on the Quality of Pre-Freeze and Post-Thaw Ram Epididymal Spermatozoa. *Animals*, 14(8), 1237. doi: <https://doi.org/10.3390/ani14081237>
34. Nisfimawardah, L., Firmawati, A., Ihsan, M., Susilawati, T., & Wahjuningsih, S. (2023). Semen cryopreservation quality and sperm kinematics of saanen goats using different diluents. *World's Veterinary Journal*, 13(2), 1-2. Obtenido de [https://wvj.science-line.com/attachments/article/77/WVJ%2013\(2\),%20300-309,%20June%2025,%202023.pdf](https://wvj.science-line.com/attachments/article/77/WVJ%2013(2),%20300-309,%20June%2025,%202023.pdf)
35. Oke, M. J., & Paliyath, G. (enero de 2010). Efecto de la lecitina de soja en la mejora de la calidad de los zumos y salsas de frutas. *Investigación alimentaria internacional*, 43(1), 232-240. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996909002865>

37. Ortiz, I., Catalán, J., Gil, J., Miró, J., & Yeste, M. (noviembre de 2022). Avances en la criopreservación de esperma en animales de granja: bovinos, equinos, porcinos y ovinos. *Ciencia de la reproducción animal*, 246. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904>
38. Ozimic, S., Ban-Frangez, H., & Stimpfel, M. (29 de may de 2023). Sperm Cryopreservation Today: Approaches, Efficiency, and Pitfalls. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(6), 4716-4734. doi: <https://doi.org/10.3390/cimb45060300>
39. Paez, J., Leon, M., & Cortes, J. (junio de 2020). Evaluación de tres concentraciones de yema de huevo centrifugada en la criopreservación de semen bovino. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(2). Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172020000200027
40. Pozo, J. (2015). Preservación de semen ovino mediante vitrificación y congelamiento lento, utilizando diferentes diluyentes comerciales. Tesis pregrado, escuela superior politécnica de Chimborazo, facultad de ciencias pecuarias, Riobamba. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/5256/1/Trabajo%20de%20Titulaci%C3%B3n.pdf>
41. Prochowska, S., Nizański, W., & Fontbonne, A. (31 de marzo de 2022). Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST) for Feline Spermatozoa: The Simplified Procedure and the Aspect of Sperm Morphology. *Animals*, 12(7), 903. doi: <https://doi.org/10.3390/ani12070903>
42. Quispe, Y., Medina, J., Rivas, E., Gerra, U., Durand, M., & Aranibar, M. (27 de febrero de 2023). Efecto de la yema de huevo sobre la calidad de semen descongelado de paco (*Piaractus brachipomus*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 34(1). Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172023000100017
43. Reyes, A., Liera, J., Mancera, E., Mosqueda, M., Vázquez, A., Aparico, P., . . . Sánchez.R. (30 de septiembre de 2021). Características y tipos de diluyentes para la conservación del semen de cerdo. *Avimex, salud animal*. Obtenido de <https://bmeditores.mx/porcicultura/caracteristicas-y-tipos-de-diluyentes-para-la-conservacion-del-semen-de-cerdo/>

44. Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., & Nizanski, W. (24 de diciembre de 2012). Análisis de espermatozoides asistido por ordenador en perros y gatos: una actualización después de 20 años. *Reproducción de Animación Doméstica*. doi: <https://doi.org/10.1111/rda.12057>
45. Rimi, M., Akter, T., Akhtar, M., & Khandoker, M. (diciembre de 2023). Effect of diluters on frozen semen production of Black Bengal Goat. *Bangladesh Journal of Animal Science*, 54(4), 105-113. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/377024400_Effect_of_diluters_on_frozen_semen_production_of_Black_Bengal_Goat
46. Saha, A., Asaduzzaman, M., & Bari, F. (30 de April de 2022). Cryopreservation Techniques for Ram Sperm. *Veterinary Medicine International*, 1. doi: <https://doi.org/10.1155/2022/7378379>
47. Salifu, A., Bautista, J., Rayos, A., Dizon, J., & Sangel, P. (4 de march de 2022). Suitability of Sugarcane Extract as a Local Extender and the Use of Either DMSO or Glycerol as Cryoprotectant for the Cryopreservation of the Banaba Native Breed Chicken (*Gallus gallus domesticus*) Semen. *Philippine Journal of Science*, 152(2), 677-685. Obtenido de https://philjournalsci.dost.gov.ph/images/pdf/pjs_pdf/vol152no2/suitability_of_sugarcane_extract_as_a_local_extender.pdf
48. Saratsi, A. S. (11 de october de 2024). Effect of Three Commercially Available Extenders Containing Phospholipids of Different Sources on Skopelos Buck Liquid-Stored Sperm Quality. *Veterinary Sciences*, 11(10), 494. doi: <https://doi.org/10.3390/vetsci11100494>
49. Sharafi, M. B. (24 de noviembre de 2022). Criopreservación de semen en animales domésticos: una revisión de los desafíos actuales, aplicaciones y estrategias prospectivas. *Animals*, 12(23). doi: <https://doi.org/10.3390/ani12233271>
50. Sheshtawy, R., Nattat, W., & Ali, G. (2017). Cryopreservation of cattle semen using coconut water extender with different glycerol concentrations. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 6(6). Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/320668819_Cryopreservation_of_cattle_semen_using_coconut_water_extender_with_different_glycerol_concentrations
51. Singh, A., Kumar, A., & Bisla, A. (june de 2021). Computer-assisted sperm analysis (CASA) in veterinary science: A review. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 91(6), 419-429. doi: <http://dx.doi.org/10.56093/ijans.v91i6.115435>

52. Tanga, B. M., Qamar, A. Y., Raza, S., Bang, S., Fang, X., Yoon, K., & Cho, J. (23 de abril de 2021). Semen evaluation: methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment — A review. *Animal bioscience*, 34(8), 1253–1270. doi: <https://doi.org/10.5713/ab.21.0072>
53. Thun, R., Hurtado, M., & Janett, F. (febrero de 2002). Comparación de Biociphos-Plus ® y el extensor de yema de huevo TRIS para la criopreservación de semen de toro. *Teriogenología*, 57(3), 1087-1094. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X0100704X>
54. Tobar, K., Álvarez, D., & Franco, L. (5 de Febrero de 2021). Estudios de asociación genómica en ovinos de América Latina. Revisión. *Rev. mex. de cienc. pecuarias*, 11(3). Obtenido de https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242020000300859
55. Torres, A., & Corredor, L. (october de 2015). Motilidad y vitalidad de semen caprino criopreservado en diferentes diluyentes. *Researchgate*, 28. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/293779329_Motilidad_y_vitalidad_de_semen_caprino_criopreservado_en_diferentes_diluyentes
56. Valverde, A., & Madrigal, M. (15 de enero de 2018). Sistemas de análisis computadorizado de semen en la reproducción animal1. *Agronomía Mesoamericana*, 29(2), 469. Obtenido de <https://www.redalyc.org/journal/437/43755165018/43755165018.pdf>
57. Whaley, D., Damyar, K., Witek, R., Mendoza, A., Alexander, M., & Lakey, J. (24 de march de 2021). Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Apex*. doi: <https://doi.org/10.1177/0963689721999617>
58. Whitesell, K., Stefanovsky, D., McDonell, S., & Turner, R. (15 de january de 2020). Evaluation of the effect of laboratory methods on semen analysis and breeding soundness examination (BSE) classification in stallions. *Elsevier*, 142, 67-76. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X19304273>