

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MEDICO VETERINARIAS



Calidad del semen refrigerado por 72 horas utilizando lecitina de soya y yema de huevo

POR:

RUBÍ CIELO MOTA MORA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México

Noviembre 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Calidad del semen refrigerado por 72 horas utilizando lecitina de soya y yema de huevo

Por:

RUBÍ CIELO MOTA MORA

TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por:



Dr. Oscar Ángel García
Presidente



Dr. Juan Luis Morales Cruz
Vocal



Dr. Juan Manuel Guillén Muñoz
Vocal



Dra. Ma. Guadalupe Calderón Leyva
Vocal Suplente



MC. JOSÉ LUIS FCO. SANDOVAL ELÍAS
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México

Noviembre 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Calidad del semen refrigerado por 72 horas utilizando lecitina de soya y yema de huevo

Por:

RUBÍ CIELO MOTA MORA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Oscar Angel Garcia
Asesor principal



Dr. Juan Luis Morales Cruz
Coasesor



Dr. Juan Manuel Guillén Muñoz
Coasesor



MC. JOSÉ LUIS FCO. SANDOVAL ELÍAS
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México

Noviembre 2022

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor principal EL DR. Oscar Ángel García: por brindarme el apoyo necesario, por resolver cada una de mis dudas, por la paciencia y el empeño a este trabajo de tesis, por darme la oportunidad de formar parte de un equipo de trabajo, me llevo muchos aprendizajes adquiridos en el tiempo brindado a este proyecto.

A el M.C J Guadalupe Rodríguez Martínez Durante mis 5 años de carrera, por el apoyo y comprensión que siempre me brindo, me llevo muy buenos recuerdos de todo lo vivido

A mis profesores. Que todos los días se tomaron un minuto de la clase para resolver cada una de mis dudas, se preparaban día con día para llegar al aula con las ganas de transmitirme sus conocimientos y sus habilidades.

DEDICATORIA

A mis Padres Ma.Guadalupe Eloisa Mora Castillo y J.Ludovico Mota Montoya por a ver me brindado todo el apoyo a lo largo de estos años para mi formación como profesionista, persona, ser humano y como hija, por todos los días de trabajo incansables que rindieron para poder llevarme de la mano, el apoyo moral y amor a mi persona, por creer siempre en mí y poner todas sus esperanzas en este ser humano, gracias a ellos hoy soy todo lo que me han formado para sobresalir en cada situación de la vida. Quienes me han enseñado que debes amar todo lo que haces, por darme esa seguridad y fortaleza para demostrarme más que nada a mí misma de que estoy hecha, que puedo ser capaz de lograr todos los sueños y metas que me proponga, gracias a ellos he podido formar mi propio criterio, ellos que han sido mi motor de cada día, este logro más que nada es para ellos que se lo ganaron por el trabajo arduo que han hecho para mí. Son el motor de mi vida quienes me impulsan desde lo mas profundo de cada situación, quienes me dan esa fortaleza que se necesita para superar cada obstáculo o batalla que se sienta a lo largo del camino, agradezco infinitamente por todos los elogios para construir mis metas.

A mi Hermano: Gamaliel Mota Mora, Un compañero de vida, con quien compartí sueños y proyectos a futuro por ese cariño incondicional por cuidar de mi en cada instante.

A mi Tía: Rosario Margarita Mora Olvera, Quien fue una segunda madre para mí, que me ayudo en momentos inolvidables, por cada corrección, consejo y palabra de sabiduría que me enseñó, porque también se aprende luchando día con día, quien me vio crecer, esa persona que me enseñó mucho de la vida, quien me dio armas y motivos para defenderme ante cualquier adversidad junto a mis padres, por el empeño que me ha puesto para hacerme una persona de bien.

A mis seres querido que partieron antes de tiempo, quienes creyeron fielmente que podía llegar lejos, esas personas que pusieron su esperanza en mí, a las personas que están esperándome en casa, que no se han rendido ni un momento que siguen esperándome pese a las dificultades de la vida.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA.....	ii
RESUMEN	v
I.- INTRODUCCION	1
HIPOTESIS	2
OBJETIVO.....	2
II.-REVISION DE LITERATURA.....	3
Sistema reproductor del macho.	3
2.1. Anatomía del espermatozoide.....	4
2.2 Avances en la crio preservación del semen.....	5
2.3 Desafíos de la crio preservación de semen ovino.....	6
2.4. Composición de la membrana plasmática.	7
2.5 yema de huevo como diluyente.....	8
2.6. Daños a la membrana plasmática.....	9
2.6. Prueba de host.....	11
2.7. Especies reactivas de oxígeno.....	12
2.8. Sistema casa.....	13
III. MATERIAL Y MÉTODOS	15
3.1 Localización y animales	15
3.2 Manejo de los animales	15
3.4 Diluyentes y proceso de crioconservación	16
3.5 Análisis estadístico.....	16
IV. RESULTADOS.....	17
V. DISCUSIÓN	20

VI. CONCLUSIÓN	22
VII. CITAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue comparar el efecto de un diluyente a base del 1% de lecitina de soya (Andromed®; LS) y un diluyente a base del 20% de yema de huevo (Optidyl®; YH) sobre la calidad seminal del semen ovino refrigerado a 5°C por 72h. El semen fue colectado de 7 carneros de la raza Dorper adultos. Después de la colección, el semen fue evaluado inmediatamente y diluido con LS y OP (semen fresco; SF) y posteriormente fue refrigerado de 37°C a 5°C por 2h (semen refrigerado, SR) después del que semen fue equilibrado (5°C) fue evaluado cada 12 h por 72 h. La motilidad total (MOT= 49%), la motilidad progresiva;(MOP=44%;), no mostro diferencias (P>0.05), La motilidad rápida (MOR) fue del 11% vs 35% para el OP y LS, respectivamente (P>0,05). %), La motilidad lenta (MOLT) (20±3.28%), MOLC (84.77±3.49); y EINM (53±2.12%). La MOT y MOP disminuyeron progresivamente después del proceso de refrigeración y congelación (P>0,05). Los resultados demuestran que valores de motilidad espermática fueron similares durante todo el proceso de refrigeración después del equilibrio del semen a 5°C (2 h) independientemente del diluyente utilizado. Los resultados de este estudio demuestran que el uso del diluyente a base de lecitina de soya es eficiente para proteger el semen de carnero de refrigerado por 72 h.

PALABRAS CLAVE: Yema de Huevo, Lecitina de Soya, Crio Preservación, Motilidad, Host

I.- INTRODUCCION

El uso de semen ovino crio preservado para la inseminación convencional enfrenta algunos obstáculos técnicos y biológicos, lo que muestra desventajas por consecuencia, mejorar la calidad espermática del semen después de la crio preservación, es un reto actual para la diseminación de material con alto valor genético (Torres- Ruda **et al.**,2019). No obstante, se tiene que considerar que el resultado de fertilidad del semen crio preservado, dependen de las características originales del semen fresco, de los diluyentes, de la técnica de crio preservación y de la eficiencia en el proceso de inseminación artificial (Cabrera V. **et al.**,2010), el semen obtenido del carnero con una motilidad superior a 85% y menos de 10% de espermatozoides anormales se considera de alta calidad (Cabrera V. **et al.**,2011), la elección adecuada del diluyente es crucial para el éxito de la crio preservación de semen en cualquier especie(Caldevilla M.**et al.**, 2020). El uso tradicional de diluyentes incluye a la yema de huevo (YH) para preservar la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides (Lima-Verde **et al.**, 2017), la YH protege al espermatozoide de los daños inducidos durante el enfriamiento, congelación y descongelación (Andrabi et al., 2008; Akçay et al., 2012; Sieme et al., 2016), por otra parte, estudios han demostrado que la YH tanto de pato, codorniz y gallina, poseen diferentes componentes de ácidos grasos, fosfolípidos y colesterol, lo que resulta en diferentes procesos de crio preservación (Singh et al., 2013), si bien la yema de huevo, empleada de rutina en numerosos protocolos de congelamiento de diversas especies, presenta algunas limitantes en su uso. En primer lugar, al ser un compuesto de origen animal, representa un potencial riesgo de contaminación de las dosis inseminantes, pudiendo entonces participar en la transmisión de enfermedades (Caldevilla M. **et al.**, 2020; Lima-Verde **et al.**, 2017), por esta razón, los diluyentes comerciales hoy en día llevan proteína vegetal (la lecitina de soya) como protector en la crio preservación (Hernández-Corredor **et al.**, 2014) y que pueden ser alternativas potenciales para el semen (Akhter et al., 2012). Dados los antecedentes anteriores escritos el objetivo del trabajo es comparar el efecto de un diluyente a base de yema de huevo (Optidyl®) y lecitina de soya (Andromed®) sobre motilidad espermática del semen ovino refrigerado por 72 horas.

HIPOTESIS

El diluyente a base de lecitina de soya (Andromed®) conservara la motilidad espermática del semen ovino refrigerado por 72 horas.

OBJETIVO

Comparar el efecto de un diluyente a base de lecitina de soya (Andromed®) y yema de huevo (Optidyl®) sobre motilidad espermática del semen ovino refrigerado por 72 horas.

II.-REVISION DE LITERATURA

Sistema reproductor del macho.

El aparato genital del macho esta constituido por los testículos, epidídimo, glandulas accesorias, sistema de conductos y el pene, los testículos descienden durante la vida fetal a un divertículo pendular del abdomen llamado escroto, la piel que lo cubre es delgada y elástica, presenta pelos finos y diseminados (caprino) o lana (ovinos) , provista de glándulas sudoríparas y sebáceas, adherido a la cara interna de la piel se encuentra el dartos, estructura muscular que da origen al tabique escrotal, el cual divide al escroto en dos bolsas, la túnica vaginal envuelve las gónadas y epidídimo, además de proteger y alojar los testículos, el escroto permite mantenerlos a una temperatura de entre 4-7°C por debajo de la temperatura interna corporal lo que es indispensable para que se efectuó la espermatogénesis. La regulación de la temperatura se realiza a través del intercambio de calor a nivel plexo pampiniforme, entre la sangre venosa y arterial, por la capacidad del dartos al contraerse y acercar las gónada al cuerpo durante periodos fríos o bien relajarse y alejarlas durante periodos calurosos(G.Aisen.,2000), los testículos son órganos pares derecho e izquierdo, situados en las regiones inguinal y púbica alojados en posición vertical en el escroto, forma ovoidea, tamaño variable, de 7,5 a 11 cm. por 4.,7 cm. por 4,7 cm (Quintero Nuñez.,1993). El testículo tiene dos funciones fundamentales, la producción de espermatozoides o espermatogénesis y la síntesis y secreción de las hormonas sexuales o esteroidogénesis, estos procesos tienen lugar en compartimentos separados, los cuales son morfológica y fisiológicamente distintos (G.Aisen.,2000), dentro de estas cavidades se encuentran los túbulos seminíferos. Los túbulos son largos cilindros en forma de herradura ambos extremos se unen a la rete testis (red testicular) que se ubica en el polo superior del órgano. Esta red es un sistema de tubos interconectados que reciben, por un lado, el producto de todos los túbulos seminíferos y, por su extremo superior, originan otros conductos que salen del testículo por orificios en la albugínea denominados “túbulos eferentes”, estos túbulos desembocan en el epidídimo. Entre los túbulos seminíferos quedan espacios dentro de los lobulillos que se conocen como “intersticios” estos espacios contienen células del tejido conectivo y las células de Leydig o

intersticiales. Las células intersticiales producen testosterona, esencial para el sostenimiento de la espermatogénesis (Castellón **et al.**,2018). Aunque anatómicamente separados, ambos compartimentos están íntimamente conectados a través de mensajes químicos, en una comunicación bidireccional fundamental, lo que asegura la normal producción de espermatozoides, por lo tanto existe una regulación endocrina en la que participan hipotálamo e hipófisis, como reguladores neuroendocrinos (G.Aisen.,2000).

2.1. Anatomía del espermatozoide.

El espermatozoide es una célula móvil, altamente compartimentada y de tipo terminal, muchas de las funciones de otros tipos celulares están ausentes y otras, al contrario, están muy desarrolladas. Así, por ejemplo, la síntesis de proteínas (u otras moléculas celulares), mientras que su velocidad de desplazamiento es muy marcada(Castellón **et al.**,2018), es el gameto masculino, se produce en el epitelio de los túbulos seminíferos de los testículos, en un proceso fisiológico denominado espermatogénesis (Ledezma.,2018), el gameto masculino ha evolucionado hasta llegar a ser diferente a los demás tipos de células(Rodríguez **et al.**,2018) .Los espermatozoides maduros son células altamente diferenciadas, cuya función es transportar información genética del macho, al gameto femenino(García **et al.**, 2012) con la particularidad de poseer una cabeza, constituida principalmente por un núcleo que aporta material genético, su cromatina se ha condensado a fin de disminuir su volumen para facilitar la movilidad y proteger al genoma de daños. La cabeza se encuentra rodeada por una envoltura denominada acrosoma que está rodeado por una membrana externa y una interna, la membrana acrosomal se asocia con la membrana plasmática que recubre el acrosoma y la interna esta plegada la membrana nuclear. El Cuello (pieza de unión), es corto y contiene el centriolo proximal, la cola o flagelo es quien permite realizar los movimientos para su traslación (Ledezma.,2018), entre la membrana acrosómica interna, unida a la membrana plasmática, y la membrana acrosómica externa está el contenido acrosómico que contiene la carga enzimática. Las cuales incluyen: hialuronidasa, acrosina, las dos más importantes; esterases, neuraminidasa, fosfatasa ácida, fosfolipasas A y B, arilsulfatasa, colagenasa que actúan en los mecanismos de

penetración y fertilización de los ovocitos (Allende et al; 2020), no todos los espermatozoides son iguales y no todos llevan los procesos de capacitación y reacción acrosomal al mismo tiempo dentro del aparato reproductor de la hembra (Avalos Rodríguez **et al.**, 2018). En general es aceptado que el líquido seminal, producido por las glándulas sexuales accesorias: ampollas de los conductos deferentes, vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales o de Cowper, adicionado durante la eyaculación, es un vehículo que estimula el metabolismo del esperma y provee la energía requerida para su pasaje a través del útero. La producción del plasma seminal, regulada por los andrógenos, posee numerosos componentes que incluyen: ácido cítrico, fructosa y otros azúcares libres, glicoproteínas y proteínas (albúmina, globulinas, etc.), fosforilcolina y prostaglandinas. (Allende.,2020)

2.2 Avances en la crio preservación del semen.

La congelación de espermatozoides se inicia de forma experimental con previsión de utilizarla en inseminación artificial (IA) en el año 1949. En esta fecha Polge y colaboradores, descubrieron el efecto positivo del glicerol como crio protector añadido a los medios de congelación. El vacuno fue la especie donde se consiguieron mejores resultados, la resistencia al frío de sus espermatozoides permitió obtener partos en vacas inseminadas artificialmente con semen descongelado (IAC). La técnica se difundió con facilidad por la mejora en la descendencia de producción de leche y carne, en el resto de las especies no se tuvo esta expansión, y los modelos de congelación eran copiados de los utilizados en vacuno (Sánchez., 2007). La crio preservación del semen se ha convertido en un aspecto importante de la industria ganadera, para facilitar la utilización y distribución extensiva del semen (Miguel-Jiménez **et al.**,2020), despertando en los ganaderos el interés de mejorar los sistemas de explotación y calidad genética de sus rebaños, las ventajas de la inseminación artificial incrementa debido a la disponibilidad de carneros con alto valor genético y posibilidad de crio preservar semen para permitir un uso más racional (Cabrera.V **et al.**, 2011). Con esta actividad se busca la estabilización de las células a temperaturas criogénicas donde se detienen las actividades metabólicas, permitiendo la preservación por tiempo

indefinido (Montoya-Páez **et al.**,2020), en especies como el bovino, porcino, caprino y ovino (Valverde **et al.**,2020). En la actualidad existen en el mercado diluyentes comerciales, los cuales se debe de preparar según las especificaciones de laboratorio (Cardozo **et al.**, 2009), si bien se sabe se han realizado estudios para aumentar el porcentaje de células viables post-descongelación, donde se han incluido, diluyentes, tiempos de refrigeración, tasas de dilución, concentraciones, concentraciones de glicerol y tiempos de equilibrio (Diaz **et al.**, 2015) desarrollado diluyentes en base a amortiguadores de pH (tris, ácido cítrico), azúcares de bajo peso molecular (fructuosa, glucosa)(Guerrero.V.,2009) los diluyentes comerciales hoy en día llevan proteína vegetal (la lecitina de soya) lo que los hace un crioprotector con menor riesgo posible de enfermedades (Hernández Corredor **et al.**,2014)

2.3 Desafíos de la criopreservación de semen ovino.

Según Hammerstedt en 1990 indica que la criopreservación del semen involucra una serie de pasos en las cuales se manejan los siguientes: 1) dilución, 2)crioprotección, 3)refrigeración y congelamiento,4) almacenamiento y descongelado (citado por Morales **et al.**,2013).En el proceso de criopreservación y descongelación existen una inducción de cambios severos hacia el espermatozoide mamífero (Cardozo **et al.**,2009). Se ha intentado encontrar crioprotectores que no afecten en mayor escala la célula, reduciendo el daño, para la conservación, transporte y calidad del semen (Bedoya **et al.**,2015). Crister observo que los espermatozoides descongelados motiles con membranas intactas no mantienen su viabilidad y capacidad fecundante durante tanto tiempo como los espermatozoides de semen fresco, esto se relaciona con los cambios semejantes a la capacitación inducidos por los procesos de congelación en células espermáticas (Stornelli **et al.**, 2005).La calidad de semen ovino es baja cuando se utiliza en inseminación artificial, pues se sabe que el espermatozoide ovino es más sensible al estrés térmico por frio, comparado con el de otras especies como el bovino, conejo o el hombre, además de que el proceso de criopreservación y descongelación causan estrés térmico, mecánico, químico y osmótico entre ellos también se encuentran cambios morfológicos, en la organización, fluidez, permeabilidad y composición lipídica de la

membrana del espermatozoide (Cardozo **et al.**,2009).Se ha demostrado que esto responde, en parte, a la composición lipídica de sus membranas plasmáticas, ya que una mayor relación ácidos grasos poliinsaturados (fosfolípidos)/saturados (colesterol) da lugar a una membrana plasmática más compacta y permeable, con la consiguiente mayor resistencia a los daños ocasionados por la crio preservación (Ledezma A **et al.**,2013), el uso del semen ovino para la inseminación cervical (IAC)de manera convencional enfrenta obstáculos tecnológicos y biológicos, mostrando una gran desventaja en el desempeño que se logra a través de la inseminación artificial (IA) en consecuencia mejorar la calidad espermática del semen después de la crio preservación es un reto para la diseminación de material genético con alto valor(Torres-Ruda **et al.**,2009). Un aumento en las tasas de concepción puede lograrse mejorando los métodos de crio preservación tratando de prevenir o minimizar la ocurrencia de eventos que desestabilizan a las membranas (Stornelli **et al.**,2005).

2.4. Composición de la membrana plasmática.

La membrana plasmática Actúa como barrera e interfase de comunicación con el medio extracelular, transmitiendo señales bioquímicas originadas entre el ligando y el receptor (Cardozo **et al.**,2009). El modelo básico según Singer y Nicholson es de una bicapa lipídica conformada por glicoproteínas y glicolípidos unidos por interacciones no covalentes, su fluidez y permeabilidad selectiva son importantes, debido a su abundancia de fosfolípidos en un 30-50% y proteínas(Ledezma.,2018). La membrana plasmática o plasmalema: de constitución lipídica, cubre toda la superficie espermática y su estructura varía de acuerdo a las diferentes regiones: superficie acrosómica, segmento ecuatorial, límite entre la superficie acrosómica y la región post acrosomal, cola, la pieza intermedia es la más prominente (Allende **et al.**; 2020). La distribución de los lípidos en la membrana plasmática (MP) ha sido ampliamente estudiada en la gameta masculina por su rol en la fisiología espermática, la MP presenta una importante regionalización de sus componentes, donde cada uno de ellos se encuentra asociados con otros constituyendo micro dominios o subdominios de membrana (sDM). El colesterol, el gangliósido GM1 y la proteína caveolina 1, tres importantes componentes de estos sDM, se encuentran

ya desde la espermatogénesis y experimentan cambios durante la maduración espermática, la capacitación y la reacción acrosomal. Caveolina 1, está presente durante los primeros estadios del espermatogénesis, posiblemente asociado al metabolismo del colesterol, como en otros tipos celulares (Castellón **et al**;2018)

2.5 yema de huevo como diluyente.

Phillips y Lardy (1939) fueron los primeros en utilizar la yema de huevo para proteger a las células espermáticas de toro del choque térmico al enfriarse, esta protección fue explicada por el efecto de fosfolípidos y lipoproteínas en la yema de huevo. Salisbury et al. (1941) mejoraron los medios mediante el uso de yema de huevo con citrato de sodio, lo que permitió el uso de semen a 5°C durante un máximo de tres días (Hernández **et al.**,2017). Los diluyentes son sustancias hidrosolubles de baja toxicidad, tienen como principal función la protección de la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides, para que un diluyente sea efectivo deberá contener sustancias similares a las del plasma seminal. Existen numerosos reportes sobre la crio preservación de semen en diferentes especies que utilizan yema de huevo de diferentes aves con la finalidad de encontrar un mejor protector del espermatozoide durante el proceso de congelación/descongelación (Durand **et al.**,2020). La YH ha sido el componente más común de los diluyentes desde que se descubrió su acción protectora contra el choque frío en espermatozoides(Strzezek **et al.**,2015). Se sabe que la yema de huevo y la caseína de leche actúan como un secuestrante de las proteínas del plasma seminal de manera que previene y minimiza los daños a la membrana que protege a el espermatozoide en el proceso de conservación, actuando en conjunto las (LDL) con los con los fosfolípidos y el colesterol que esta pose dentro de su composición (Durand **et al.**,2020). Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son el principal componente en los diluyentes con yema de huevo, evitando la perdida de fosfolípidos de la membrana, aumentando la tolerancia al frio y reduciendo las lesiones durante la crio presrvación (Montoya- Pérez **et al.**,2020. Las fracciones lipoproteicas de los fosfolípidos de la YH protegen a los espermatozoides contra el choque frío durante la estabilización de la integridad de la membrana espermática. Distintas técnicas de laboratorio y con distintos constituyentes lipídicos individuales

aislados de la YH se ha podido demostrar que los mecanismos de unión de los lípidos a la membrana espermática son especialmente soportados por las fracciones de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Hasta el momento, la naturaleza de la interacción de las lipoproteínas de la YH con la membrana espermática no ha podido ser perfectamente clarificado (Strzezek **et al.**,2015). También debemos mencionar que la YH además de funcionar como un excelente crio protector y diluyente del semen debido a su origen (origen animal) contiene hormonas propias del animal tales como la progesterona, la cual en condiciones naturales es la responsable de la inducción a la capacitación espermática y se cree que por eso puede llegar a provocar la reacción acrosomal prematura dando como resultado una menor capacidad de fertilidad (citado por Morales **et al.**, 2013)

2.6. Daños a la membrana plasmática.

La membrana plasmática de espermatozoides mamíferos es una estructura dinámica que participa en reconocimiento y transporte de moléculas, antes y después de la eyaculación sufren diferentes cambios que afectan la capacidad fecundante, dichos eventos ocurren durante el proceso de fertilización: capacitación, reacción acrosomal y fusión del espermatozoide a la superficie del ovocito.(Ortega **et al.**,2003) Los daños en la membrana espermática alteran su función metabólica causando una capacitación espermática prematura, los espermatozoides no sobrevivirán mucho tiempo en el tracto reproductivo de la hembra(Ruiz G **et al.**, 2015), su conformación anatómica en ovinos difiere de las demás especies, internamente este órgano es muy tortuoso debido a la presencia de anillos que se proyectan hacia el lumen disminuyendo el diámetro de su luz. Además, el ostium o abertura de cada anillo es muy pequeño (2,7 mm) y no se encuentra alineado concéntricamente con el del anillo adyacente, esto hace que el paso de los catéteres de inseminación convencionales y, en consecuencia, la deposición del semen dentro del útero sea muy dificultoso (Ledezma A **et al.**,2013). Se cree que sólo los espermatozoides motiles se alojan en las criptas de la mucosa endocervical; los muertos son eliminados, bien por fagocitosis o por el movimiento del mucus cervical hacia la vagina. Luego se puede concluir que el transporte de los

espermatozoides por el mucus cervical se divide en tres fases: un transporte inicial rápido un almacenamiento de las gametas en las criptas una fase final de prolongada eliminación. La duración de esta última no se conoce con exactitud, pero se ha informado de la presencia de espermatozoides con motilidad en el mucus cervical 48 a 72 horas posteriores al coito, (Allende **et al.**,2020) dando como resultado alteraciones estructurales y funcionales relacionadas con el frío daño, es de destacar que la crio preservación modifica la composición lipídica de la membrana espermática. La disminución de la temperatura induce transiciones de fase y agrupamiento de los lípidos de la membrana espermática que alteran las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína. En particular, el contenido de esteroides se ha asociado con la criolerancia a los espermatozoides (Mercedes Carro **et al.**, 2020). La principal causa de lesiones celulares en la crio preservación es el daño sufrido por la membrana plasmática. Inicialmente se suponía que el choque frío se asociaba con la composición lipídica de la bicapa de la membrana (revisado por Urgur **et al.**, 2018). A su vez existe diferencia entre especies, la membrana plasmática de los espermatozoides ovinos difiere de las otras especies, ya que el espermatozoide ovino posee niveles elevados de fosfolípidos y ácidos grasos poliinsaturados y niveles bajos de colesterol. La relación ácidos grasos poliinsaturados/saturados (fosfolípidos/colesterol) podría influir en la sensibilidad de la membrana plasmática al daño debido a las bajas temperaturas (Ledesma.,2018). La crioconservación da como resultado una pérdida del 40-50% de los espermatozoides viables totales en un proceso de congelación-descongelación basado en la rutina que conduce a una reducción en la fertilidad y grandes pérdidas económicas asociadas a la fertilidad. La reducción en la viabilidad del espermatozoide y la disminución en la fertilidad se deben a la crio lesión de los espermatozoides durante la congelación que es causa principalmente por el choque frío, el estrés osmótico, la formación de cristales de hielo y el daño oxidativo (Kulaksiz **et al.**,2017). El colesterol es un componente lipídico importante de las membranas con un papel bien conocido en la modulación del orden de los lípidos de la membrana. Compartimentan los procesos celulares y juegan un papel importante en la señalización celular y la interacción de los gametos, en los

espermatozoides, la salida de esteroides tiene un papel fisiológico en el proceso de maduración extra testicular de los espermatozoides conocido como capacitación (Mercedes **et al.**, 2020). Cuando la temperatura se reduce durante el proceso de enfriamiento, las restricciones de movimiento lateral fosfolípido inducen un cambio de líquido a la fase de gel haciendo que la membrana se vuelva más rígida y frágil, los cambios de fase que afectan a las membranas lipídicas llevan a la separación de la fase lipídica; por lo tanto, las proteínas se agrupan irreversiblemente (revisado por Ugur **et al.**,2019).

2.6. Prueba de host.

En los últimos años, se ha prestado más atención a evaluar la integridad de la membrana de los espermatozoides, ya que es de importancia fundamental en el proceso de fertilización (Roa Talluri **et al.**,2012) La evaluación del semen en las diferentes especies incluye diversos parámetros macroscópicos (volumen, color) y microscópicos (concentración, motilidad y viabilidad), pero son los valores obtenidos a partir de un espermatograma básico, no son indicadores de fertilidad, sino que son indicadores de funcionalidad del macho, así como de su ciclo hormonal y espermatogénico. En este sentido la evaluación de la integridad funcional y estructural de la membrana plasmática, así como la integridad acrosomal pueden representar indicadores de funcionalidad de los espermatozoides ovinos, de esta manera Didion y Graves (1986) diseñaron la técnica de doble tinción que permite evaluar en simultaneo la viabilidad espermática con la integridad acrosomal para diferentes especies domésticas (Santini **et al.**, 2004). Estudios hechos por Drevius y Eriksson demostraron la capacidad de el espermatozoide mamífero para captar agua en un medio hiposmotico (Guillen y Moreno., 2008). La prueba HOST se utilizó más tarde en la evaluación de la calidad del esperma de los perros, toro, carneros, jabalíes, sementales (Roa Talluri **et al.**,2012), diversos eventos ocurren durante el proceso de fertilización, todos ellos requieren de la actividad bioquímica de la membrana y por lo tanto es muy importante evaluar la estructura e integridad

funcional de la misma. Para ello existen distintas pruebas, que valoran la respuesta osmótica de la membrana: Test de Resistencia Osmótica (ORT), Test de Resistencia Hiperosmótica (HRT) y Test de Endosmosis (HOST) (González **et al.**, 2007). El test hipoosmótico (Th) es una prueba de rutina y es de gran importancia en tecnologías de reproducción asistida (H Vásquez C **et al.**, 2011). El test Hipoosmótico o test de Endosmosis (HOST) está orientado a estimar la integridad funcional de la membrana de los espermatozoides, la que está directamente relacionada con la capacidad fecundante. (Castillo **et al.**, 2018). Esta prueba consiste en someter los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, lo que causa una entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica intracelular con la del medio extracelular, para que esta respuesta se produzca, la MP del espermatozoide debe estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente (bioquímicamente activas) (Guillen y Moreno.,2008), provocando en el espermatozoide funcionalmente normal una dilatación y enrollamiento del flagelo (Castillo **et al.**, 2018). Los espermatozoides se agrupan en 7 categorías según la forma que adquiera el flagelo tras el tes de HOST, los espermatozoides funcionalmente viables presentan una membrana integral y funcional, se hinchara gracias a la activación de canales iónicos, por el contrario los funcionalmente no viables permanecerán intactos categoría (A), (Velarde.,2018)

2.7. Especies reactivas de oxígeno.

Para que los espermatozoides puedan realizar funciones y lograr el objetivo que es la fecundación, se requiere energía del trifosfato de adenosina (ATP). Durante el metabolismo energético se almacena en forma de electrones de alta energía que se dirigen a la cadena de transporte de electrones, compuesta por cinco proteínas supramoleculares. En este proceso, se produce un radical intermedio que eventualmente es capaz de transferir este electrón desapareado al O₂ y formar especies reactivas de oxígeno, como el superóxido principal, el peróxido de hidrógeno y el hidroxilo (Araujo **et al.**, 2017), durante la crio preservación, cualquier

cambio en la fluidez de la membrana mitocondrial puede dar lugar a la liberación de ROS y cambios en el potencial de membrana (Javed **et al.**, 2019). Estas moléculas son procesos altamente reactivos y desencadenantes de los espermatozoides que conducen a la degradación y disminución de la calidad celular, sin embargo, estas mismas moléculas que a menudo se consideran grandes villanos, también participan en mecanismos que culminan en la fertilización y formación de cigotos (Araujo **et al.**, 2017). Aunque en los niveles apropiados de estas moléculas juegan un papel importante en la fisiología de los espermatozoides, a saber, la capacitación y la reacción acrosómica, son perjudiciales a la función espermática a altas concentraciones debido a la toxicidad. El mecanismo exacto de la generación y la función ROS no han sido completamente caracterizado en espermatozoides, se sabe que estas moléculas son productos de reducción incompleta de oxígeno, y la toxicidad se asocia con la inactivación de proteínas debido a la ionización, la peroxidación lipídica y el daño en el ADN (revisado por Ugur **et al.**, 2019). El efecto sobre la motilidad espermática de ROS, disminuyendo la flexibilidad y por lo tanto el movimiento de la cola. La membrana del esperma es vulnerable a este tipo de daño, ya que contienen grandes cantidades de ácidos grasos insaturados, las ROS dañan directamente a las mitocondrias, disminuyendo la energía disponible e impedir la movilidad del espermatozoide, su efecto sobre la motilidad espermática es debido a una cascada de eventos que resultan en una disminución en la fosforilación de las proteínas del axonema y por consecuencia la inmovilización de esperma, ambos procesos están asociados con la reducción en la fluidez de membrana (Córdova **et al.**, 2017).

2.8. Sistema casa.

Los sistemas de análisis seminal asistidos por computadora (Computer-Assisted Sperm Analysis, CASA) inicialmente desarrollados en la década de los 80 del siglo XX, proporcionan una evaluación más objetiva de la movilidad de los espermatozoides que la estimación visual, así como información de variables cinéticas. Los dispositivos de evaluación computarizada generalmente consisten en

un microscopio de contraste de fase negativo, que permite observar los espermatozoides blancos sobre un fondo oscuro. Con esta técnica, la cabeza de los espermatozoides permanece visible, independientemente de su movimiento (Valverde **et al.**,2021). La evaluación de la calidad seminal permite estimar el potencial reproductivo del macho mediante una muestra del eyaculado, con el surgimiento de los sistemas computarizados de análisis seminal (Computer Assisted Semen Analysis, CASA), se ha logrado una mayor estandarización de las evaluaciones, debido a que los desarrolladores de sistemas CASA han establecido configuraciones específicas para algunas especies de interés zootécnico. No obstante, estos deben ser validados para cada especie. El análisis de la movilidad espermática se basa en parámetros de cinética (Barquero **et al.**,2021).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

General

Todos los métodos y manejo de las unidades experimentales utilizadas en este estudio fueron en estricto acuerdo con los lineamientos para el uso ético, cuidado y bienestar de animales en investigación a nivel internacional (FASS, 2010) y nivel nacional (NAM, 2002) con número de referencia de aprobación institucional UAAAN-UL con clave 38111- 425501002-2431.

3.1 Localización y animales

El presente estudio se realizó en el mes de junio en el norte de México, en un sistema de producción intensivo de ovinos (25° N, 103°O). El clima de la región es semidesértico, con una precipitación pluvial promedio anual de 203 mm y una temperatura que oscila entre 6° C y 37° C (en invierno y verano, respectivamente).

3.2 Manejo de los animales

Se utilizaron 5 machos ovinos adultos de la raza Dorper de 2 a 4 años de edad con fertilidad probada (utilizados en monta natural). Los carneros fueron alimentados dos veces al día (1000 y 1800 h) con sobranate de ganado lechero (17% PC y 1.5 EM), y tuvieron sales minerales y agua a libre acceso y tuvieron un periodo de adaptación durante 3 semanas previas al periodo de estudio.

3.3 Recolección y procesamiento del semen

El semen se recolectó de 5 carneros una vez por la mañana (0800 h) durante dos días consecutivos con una vagina artificial atemperada a 37° C y utilizando una oveja estrogenizada con 2 mg de cipionato de estradiol vía intramuscular, 24 h antes de ser expuesta a los carneros como estímulo para realizar la colecta.

Después de cada extracción, el semen fue colocado a baño maría (37° C) e inmediatamente fue llevado a laboratorio para su análisis objetivo en el sistema CASA.

3.4 Diluyentes y proceso de crioconservación

Para el proceso de crioconservación se utilizaron 2 diluyentes: 1), Optidyl®, producto comercial; CRYO-VET, Francia), a base de un 20% de yema de huevo con lipoproteína de baja densidad y 2), Andromed®, producto comercial; Minitube, Alemania), a base del 1% de lecitina de soya libre de proteína de origen animal.

Las muestras de semen fueron sometidas a dos procesos para su evaluación: Uso directo (semén fresco, SF); enfriado de 37 °C a 5 °C, durante 2 horas (semén refrigerado, SR) y posteriormente se mantuvieron durante 72 horas en refrigeración.

En cada uno de los estados de conservación (SR) el semen se analizó cada 12 para evaluar el porcentaje de motilidad espermática [motilidad total; MOT, motilidad progresiva;(MOP), motilidad rápida; (MOR), motilidad lenta; (MOLT), motilidad local (MOLC) y espermias inmóviles (EINM), utilizando sistema computarizado de análisis seminal (Computer Assisted Semen Analysis, CASA; Minitube, Alemania)].

3.5 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) usando el procedimiento Modelo Lineal General (GLM). Las medias obtenidas de los parámetros seminales fueron comparadas usando una prueba de t. El ANOVA de las medidas repetidas fue realizado comparando los resultados a los diferentes diluyentes, los estados del proceso de crioconservación y la interacción de estos. Todos los datos fueron analizados utilizando el paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc. Cary. NC. USA, V9.1). Las diferencias fueron consideradas significativas a un valor de $P \leq 0.05$.

IV. RESULTADOS

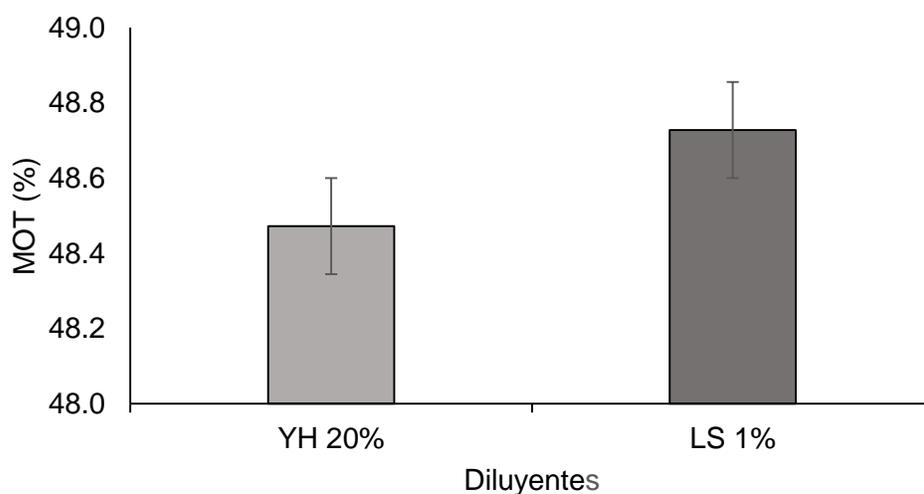
Los resultados de motilidad espermática de semen ovino evaluado durante 72 al ser diluido con Optidyl® o Aandromed® y posteriormente evaluado cada 12 h son resumidos en el cuadro 1.

Al analizar los efectos de los dos diluyentes sin importar el tiempo de refrigeración del semen, no se observaron diferencias significativas en cada una de las variables evaluadas ($P>0.05$). El promedio de MOT (48%) general no mostro diferencias para ambos diluyentes ($P>0.05$). Al igual, que el promedio general para la MOP (44%) para ambos diluyentes ($P>0,05$). Sin embargo, la MOR fue mayor en el diluyente a base del 1% de LS a las 2 h del inicio de la evaluación (11% vs 35%) para el Optidyl® y Andromed®, respectivamente ($P<0,05$), la MOTL (35% vs 15%) para el diluyente el Optidyl y Andromed®, respectivamente ($P<0,05$). Independientemente del diluyente agregado [MOT ($49\pm 0.28\%$), MOLT ($20\pm 3.28\%$), MOLC (84.77 ± 3.49); y EINM ($53\pm 2.12\%$). La MOT y MOP disminuyeron progresivamente después del proceso de refrigeración y congelación ($P>0,05$). Los valores evaluados fueron similares durante todo el proceso de refrigeración después del equilibrio del semen a 5°C (2 h) independientemente del diluyente utilizado.

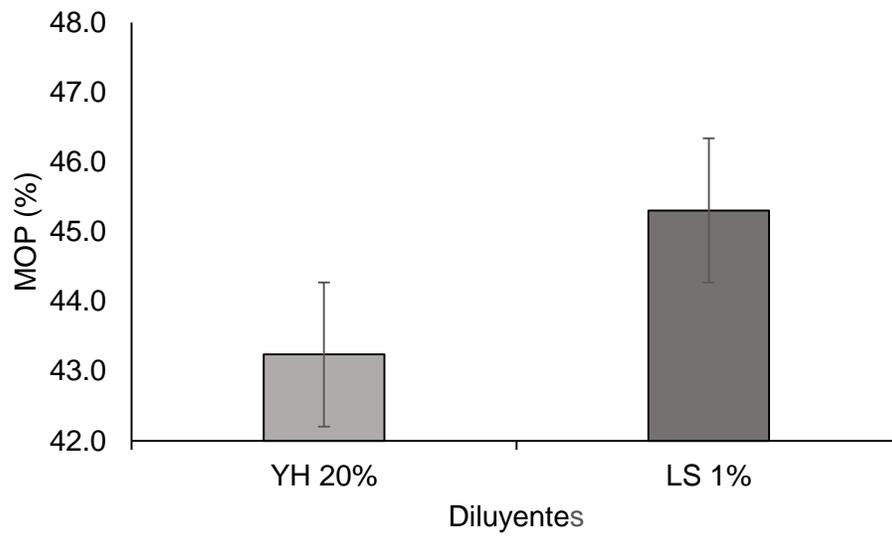
Efecto de dos diluyentes (Optidyl®; 20% de YH o Andromed®; 1% de LS) sobre la motilidad espermática del semen ovino refrigerado durante un periodo de de 72 h a 5 °C.

Horas	Diluyentes	MOT (%)	MOP (%)	MOR (%)	MOLT (%)	MOL (%)	EINM (%)
2	YH 20%	57 ± 6 ^a	46 ± 8	11 ± 2	35 ± 7	11 ± 2	42 ± 6
	LS 1%	58 ± 8 ^a	53 ± 9	35 ± 8	15 ± 3	5 ± 1	42 ± 8
12	YH 20%	52 ± 8 ^a	45 ± 9	24 ± 7	21 ± 2	6 ± 0	56 ± 8
	LS 1%	53 ± 9 ^a	50 ± 9	29 ± 8	20 ± 5	3 ± 0	62 ± 9
36	YH 20%	48 ± 9 ^a	44 ± 9	20 ± 5	23 ± 5	6 ± 1	50 ± 9
	LS 1%	48 ± 7 ^a	44 ± 7	24 ± 6	19 ± 4	4 ± 1	52 ± 7
72	YH 20%	36 ± 8 ^a	38 ± 8	21 ± 4	16 ± 4	6 ± 0	56 ± 7
	LS 1%	38 ± 6 ^a	34 ± 6	22 ± 5	12 ± 2	4 ± 0	62 ± 6

Promedio general de la MOT de semen ovino refrigerado con Optidyl® (20% de YH o Andromed® (1% de LS) durante un periodo de de 72 h a 5 °C.



Promedio general de la MOP de semen ovino refrigerado con Optidyl® (20% de YH o Andromed® (1% de LS) durante un periodo de de 72 h a 5 °C.



V. DISCUSIÓN

El uso de diluyentes en base a lipoproteínas de baja densidad (LDL) es una alternativa viable a para la crioconservación de semen equinos (Pillet et al., 2012), toros (Ansari et al., 2016; Murphy et al., 2018), búfalo (Kumar et al., 2015) y venado (Stewart et al., 2018). En el presente estudio se evaluó el efecto de un diluyente base a lecitina de soya (Andromed®) sobre la calidad del semen de carnero, conservado mediante refrigeración por 72 h.

Los resultados del presente estudio sugieren que la composición de los diluyentes utilizados en este estudio no afectó la calidad de los espermatozoides durante el proceso de refrigeración por 72 horas. Sin embargo, estos resultados son contrarios a los reportados en equinos (Pillet et al., 2012) y cérvidos (Stewart et al., 2018); en los cuales se muestra una mayor calidad seminal cuando se utilizan diluyentes a base de YH.

El mecanismo exacto a través del cual los diluyentes basados en plantas protegen el esperma del daño al congelar no ha sido del todo entendido, pero se cree que los fosfolípidos de las plantas protegen a los espermatozoides mediante lípidos y fosfolípidos de enlace reversible, se fusionan con la membrana plasmática del esperma, estabilizando así la membrana durante el proceso de congelación y posterior a la descongelación (Murphy et al., 2018).

En este estudio, los valores de la motilidad espermática no fueron diferentes en el semen refrigerado por 72 h cuando fue diluido con el diluyente Andromed® u Optidyl®. En efecto, es probable que ambos diluyentes durante el proceso de crioconservación ayudaron a disminuir la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados protegiendo la membrana celular del esperma a través de cambios en la fluidez de la membrana espermática (Kaeoket et al., 2008; Wathes et al., 2007), además han sido probados como una estrategia potencial para minimizar el efecto del daño en la crioconservación en el verraco (Maldjian et al., 2005) y espermatozoides de toro (Kaka et al., 2015; Kaka et al 2017). Lo anterior, puede resultar en que los espermatozoides son atacados por especies de oxígeno reactivo,

lo que resulta en la disminución de la motilidad y la viabilidad espermatozoides congelados (Thagilou et al., 2017). Además, estos resultados también difieren a lo reportado por Thagilou et al. (2017) quienes reportaron el porcentaje medio de motilidad espermática de semen ovino diluido con YH y refrigerado por 3 h ($35,6 \pm 1,8\%$) fue significativamente menor que el grupo control ($43.1 \pm 1.8\%$).

Sin embargo, en caballos, existe evidencia que en semen después de ser congelado la motilidad seminal es mayormente preservada cuando este se ha diluido con diluyente en base a yema de huevo que con liposomas (Pillet et al., 2012). Una posible explicación a estas diferencias observadas en la motilidad espermática entre especies en los diferentes estudios puede ser debido a la diferente composición de los diluyentes en base a yema de huevo y lecitina de soya y a la diferencia entre especies, especialmente cuando se considera la composición lipídica de la membrana plasmática (Kumar et al., 2015). En efecto, en semen de carneros diluido con LS al 1% presentaron mayor viabilidad espermática, comparado con los de 2% de lecitina, y además que el rango 1 a 1.5% de LS en el diluyente mostraron mejores características del semen después de la preservación (Forouzanfar et al., 2010).

Al respecto, bajo nuestras condiciones experimentales la sobrevivencia espermática se mantuvo en el semen refrigerado y diluido con LS en comparación con el semen diluido a base YH. Lo anterior, pudo deberse a que durante el proceso de crioconservación el nivel de ácidos grasos polinsaturados disminuyeron en el CY debido probablemente a una peroxidación lipídica (Cerolini et al., 2001; Kaeoket et al., 2008). Efectivamente, en un estudio se demostró que cuando el semen ovino es diluido con yema de huevo el porcentaje de integridad de la membrana espermática disminuye significativamente (Taghilou et al., 2017). Sin embargo, estos resultados son similares a los reportados por Fleisch et al. (2016) que no encontraron diferencias significativas al usar uno u otro diluyente ya sea base de origen vegetal o animal.

La membrana plasmática, regula una gran cantidad de funciones espermáticas directamente relacionadas con el potencial de fertilidad, y los diluyentes deben de brindar protección contra los daños criogénicos. En conjunto, los resultados aquí

mostrados y los datos de la literatura muestran que el nivel de protección de un diluyente depende fuertemente de varios factores y del procesamiento del semen (Fleisch et al., 2016). En el caso particular los diluyentes Andromed® pueden proteger la membrana plasmática a través de vesículas artificiales compuestas por una o varias capas biológicas de lípidos concéntricos, que tienen la capacidad de encapsular moléculas (Pillet et al., 2012; Elhissi et al., 2015; Belala et al., 2016).

VI. CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio nos permiten concluir que el uso del diluyente a base de lecitina de soya es eficiente para proteger el semen de carnero de refrigerado por 72 h.

VII. Citas bibliográficas

Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gérard, O., Courtens, J. L., & Anton, M. (2004). Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 61(5), 895-907.

Cardozo, J., Grasa, P., Muiño, M. T., & Cebrián, J. Á. (2009). Adición de proteínas del plasma seminal ovino durante la congelación del espermatozoide y efectos sobre su motilidad y viabilidad. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 10(1), 51-59.

Bedoya, L. V. O., Muñoz, J. M. M., & Echeverry, J. C. Descripción de nuevas tecnologías en la criopreservación de semen ovino Description of new technologies in the cryopreservation of ram semen.

Torres-Ruda, F., Manjarrez, C. I., Carvajal-Serna, M., & Grajales-Lombana, H. A. (2019). Efecto de la adición de antioxidantes en los diluyentes para la preservación de semen ovino. *Revista de Medicina Veterinaria*, 1(38), 101-109.

EQUINO, C. S. (2020). Utilización de un medio con lecitina de soja para congelar semen equino. *InVet*, 22(1), 41-49.

Díaz, R., Torres, M. A., Painemil, S., Martins, S. M., FC, A., De Andrade, S. B., & Sepúlveda, N. EFECTO DEL DILUYENTE Y TIEMPO DE EQUILIBRIO SOBRE LA MOTILIDAD E INTEGRIDAD DE MEMBRANA POST-DESCONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CARNERO.

Lima-Verde, I. B., Johannisson, A., Ntallaris, T., Al-Essawe, E., Al-Kass, Z., Nongbua, T., ... & 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.

Corredor, L. H., Dorado, J., Moreno, A. Q., Ortiz, I., Buzón, A., Corzo, M., & Hidalgo, M. (2014). Efecto de dos diluyentes a base de lecitina de soja sobre parámetros

morfométricos en semen caprino. Revista Sennova: Revista del Sistema de Ciencia, Tecnología e Innovación, 1(1), 30-43.

Andrabi, S. M. H., Ansari, M. S., Ullah, N., Anwar, M., Mehmood, A., & Akhter, S. (2008). Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 104(2-4), 427-433.

Akçay, E., Kulaksız, R., Daşkin, A., Çebi, Ç., & Tekin, K. (2012). The effect of different dilution rates on post-thaw quality of ram semen frozen in two different egg-yolk free extenders. *survival*, 9(10), 11.

CABRERA V, Próspero; ORELLANA CH, Javier y PANTOJA A, César. Efecto de dos dilutores sobre la motilidad e integridad de la membrana espermática en semen congelado de ovinos. *Rev. investig. vet. Perú* [online]. 2010, vol.21, n.2, pp.154-160. ISSN 1609-9117

Membrillo-Ortega, A., Córdova-Izquierdo, A., Hicks-Gómez, J. J., Valencia-Méndez, J. J., & Castillo-Juárez, H. (2011). Efecto de la adición de antioxidantes en el diluyente de semen de macho cabrío antes de congelar y después de descongelar. *Revista Veterinaria*, 22(2), 85-90.

343963591_EFECTO_CRIOPROTECTOR_DE_LA_YEMA_DE_HUEVO_DE_DIFERENTES_ESPECIES_SOBRE_LA_CALIDAD_ESPERMATICA_DE_CARNEROS_EN_CONDICIONES_DEL_ALTIPLANO_PERUANO(Durand 2020)

https://www.3tres3.com/articulos/congelacion-de-semen-en-porcino-historia-y-evolucion_1767/#:~:text=La%20congelaci%C3%B3n%20de%20espermatozoides%20se,a%20los%20medios%20de%20congelaci%C3%B3n. (Sanchez 2007)

Ledesma, A., Manes, J., Alberio, R., & Osbor, F. (2013). ¿ Es posible mejorar la fertilidad del semen ovino criopreservado mediante la adición de plasma seminal. *Taurus*, 59, 16-21.

Bedoya, L. V. O., Muñoz, J. M. M., & Echeverry, J. C. Descripción de nuevas tecnologías en la criopreservación de semen ovino Description of new technologies in the cryopreservation of ram semen.

Campi, S., González, L., Blasi, C., Suhevic, J., Bonet, S., & Cisale, H. (2007). Comparación entre distintos tiempos de lectura en el test de endósmosis. © Avances en Tecnología Porcina, 2007, núm. 4, p. 48-54.

Vázquez, J. M., Martínez, E., Martínez, P., & Roca, J. EL TEST DE ENDOSMOSIS COMO PRUEBA PARA EVALUAR LA INTEGRIDAD FUNCIONAL DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LOS ESPERMATOZOIDES DE VERRACO.

Monteiro da Silva, D., Pineda, J. S., & Junior, J. A. D. A. (2015). Biotecnología y Reproducción. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 28, 38-57.

Castillo, M., Cerutti, D. A., Gómez, M. B., & Cisale, H. (2018). Implicancias del Test de Endósmosis en la evaluación del semen de carnero preservado en condiciones de campo. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal, 26(3-4)

HYPO-OSMOTIC SEWELLING TEST (HOS) FOT QUALITY EVALUATION OF FRESH AND FROZEN SEMEN IN HORSES 2012 (Thirumala Roa Talluri, A. Arangasamy, Sanjay Kumar Ravi, and Y. Pal.)

[ESTUDIO DE LA INTEGRIDAD DE MEMBRANA E INTEGRIDAD ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES DE OVINO 2011.pdf](#) (Santini 2004)

Montoya-Páez, J. D., Giraldo-León, M., & Duque-Cortes, J. E. (2020). Evaluación de tres concentraciones de yema de huevo centrifugada en la criopreservación de semen bovino. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 31(2).

Ccoñas Vera, P. I. (2018). Efecto del dilutor tris con yema de huevo de codorniz sobre características espermáticas epididimarias en refrigeración de toros criollos post mortem.

Avalos, S. M., Deras, F. G. V., Leyva, M. G. C., Villarreal, V. C., Muñoz, J. G., & García, O. Á. (2021). Determinación de la calidad del semen criopreservado con lecitina de soya o yema de huevo, en machos cabríos. Abanico veterinario, 11(1), 18.

Barquero, V., Víquez, L., Calderón-Calderón, J., & Valverde, A. (2021). Frecuencia de fotogramas óptima para evaluar la cinética espermática de verracos con un sistema CASA-Mot. *Agronomía Mesoamericana*, 32(1), 1-18.

Arbaiza Barnechea, M. D. (2020). Efecto de la criopreservación en fragmentación del ADN, viabilidad, motilidad y cinética espermática en toros Brown Swiss empleando sistema casa.

Analisis cimtrica morfocimetrica subpoblación casa Valverde, A., Castro-Morales, O., Madrigal-Valverde, M., & Soler, C. (2019). Análisis de subpoblaciones cinéticas y morfométricas de espermatozoides con sistemas CASA: revisión. *Revista de Biología Tropical*, 67(6), 1473-1487.

Hernández-Corredor, L., Quintero-Moreno, A., Camargo-Rodríguez, O., & Rojas-López, M. (2017). Evaluacion de la integridad funcional y estructural de espermatozoides caprinos criopreservados mediante diluyentes comerciales. *Revista Científica*, 27(1), 35-43.

de Araujo, E. A. B., Silva, L. F. M. C., de Oliveira, S. N., Dalanezi, F. M., de Andrade Jr, L. R. P., de Souza, F. F., ... & Papa, F. O. (2017). ACTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES ON SPERMATOZOA/ACCION DE OXIGENO EN ESPECIES REACTIVAS EN LOS ESPERMATOZOIDEOS/ACAO DAS ESPECIES REATIVAS DE OXIGENIO NOS ESPERMATOZOIDEOS. *Veterinária e Zootecnia*, 24(1), 70-84.

Izquierdo, A. C., Espinosa-Cervantes, R., guerra Liera, J. E., Iglesias-Reyes, A. E., Crispín, R. H., Villa-Mancera, A. E., ... & Denis, B. E. R. DEL ESTRÉS OXIDATIVO.

Avalos, S. M., Deras, F. G. V., Leyva, M. G. C., Villarreal, V. C., Muñoz, J. G., & García, O. Á. (2021). Determinación de la calidad del semen criopreservado con lecitina de soya o yema de huevo, en machos cabríos. *Abanico veterinario*, 11(1), 18.

Martha Olivera^{1,2}, MV, Dr Sci Agr; Tatiana Ruiz^{1,2}, MV, Ms, PhD; Ariel Tarazona^{1,2}, Z, Ms; Carlos Giraldo^{1,2}, MV, Ms.¹Fisiología y Biotecnología de la Reproducción, ²Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, A.A 1226, Medellín, Colombia.

molivera@carios.udea.edu.co(Recibido: 23 de junio, 2006; aceptado: 14 de septiembre, 2006)

http://www.intermedica.com.ar/media/mconnect_uploadfiles/a/i/aisen.pdf

http://cmvsf2.org/web/wp-content/uploads/2021/03/Fisiolog%C3%ADa-esperm%C3%A1tica_Allende-y-Arisnabarreta_2020_compressed.pdf

http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_40.pdf

http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_50.pdf

<http://www2.mdp.edu.ar/images/eudem/pdf/biologia%20de%20la%20gameta%20masculina.pdf>

file:///E:/articulos%20tesis/Fisiolog%C3%ADa-esperm%C3%A1tica_Allende-y-Arisnabarreta_2020_compressed.pdf

<http://www.rhaprofesional.com/potencial-seleccion-espermatozoides-geneticamente-equilibrados-basados-la-prueba-hinchazon-hipo-osmotica-portadores-reordenamientos-cromosomicos/>

<https://www.redalyc.org/pdf/3718/371838849008.pdf>

<https://www.revistanefrologia.com/es-biologia-membrana-celular--articulo-X021169959400663X>

https://www.researchgate.net/publication/267636969_Criopreservacion_de_semen_ovino_empleando_diferentes_dilutores_y_combinaciones_de_agentes_crioprotectores_permeantes_y_no_permeantes

<https://tecnocientifica.com.mx/libros/40-Inseminaci%C3%B3n-artificial-animal.pdf>

https://editorial.unam.edu.ar/images/documentos_digitales/e28-Transporte_de_Membrana_Plasmatica.pdf

Vedoya, M. C. J. TRANSPORTE DE MEMBRANA PLASMÁTICA.