

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



EFEECTO DE LA REMOCIÓN DEL PLASMA SEMINAL SOBRE LA VIABILIDAD
DEL SEMEN CAPRINO CRIOPRESERVADO CON UN DILUYENTE A BASE
DE LIPOSOMAS O YEMA DE HUEVO

Tesis

Que presenta FORTUNATO NAVA JOACHIN
como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Torreón, Coahuila

Diciembre 2024

EFFECTO DE LA REMOCIÓN DEL PLASMA SEMINAL SOBRE LA VIABILIDAD
DEL SEMEN CAPRINO CRIOPRESERVADO CON UN DILUYENTE A BASE
DE LIPOSOMAS O YEMA DE HUEVO

Tesis

Elaborada por FORTUNATO NAVA JOACHIN como requisito parcial para
obtener el grado de Maestro en Ciencias en Producción Agropecuaria con la
supervisión y aprobación del Comité de Asesoría

F. A-11-2


Dr. Fernando Arellano Rodríguez
Director de Tesis



Dr. Alan Sebastián Alvarado Espino
Asesor



Dr. Óscar Ángel García
Asesor



Dra. Ma. Guadalupe Calderón Leyva
Asesor



Dra. Dalia Ivette Carrillo Moreno
Jefe del Departamento de Postgrado



Dr. Antonio Flores Naveda
Subdirector de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

A Dios, Por darme salud, dar me una vida llena experiencias, conocimientos y lo más importantes conocer a personas que me ayudaron con mi formación, agradezco de que medio la esperanza y fortaleza de lograr mi nuevo grado en mi vida profesional.

A mis Padres., Fortunato Nava y Odilia Joachin. Por estar hay siempre que los necesito, darme los mejores consejos de no rendirme y seguir adelante cada vez que me siento, por su inmenso amor que me dan y cariño los quiero mucho por ser excelentes padres porque nunca estoy solo los amos.

A mis hermanos. Ángel, Naty, Brenda, Dania y mi pequeña Bexani. Desde el fondo de mi corazón, les agradezco por siempre estar allí para mí, escuchándome, comprendiéndome y brindándome su amor y consejo. Sin ustedes, mi vida no sería lo mismo y estoy eternamente agradecido.

A Mis Apreciables Amigos. Liliana Hernández, Irving Mena, Jonathan, Daniel Padrón, Andrés, Luciano, Karyme, Denia Vargas, Patricia Solano, Saul Rojas, Guadalupe Hermenegildo, Lupis Fuente, Yuli, Selene y Aurelia Nájera. Cuando miro hacia atrás en los momentos difíciles de mi vida, me doy cuenta de que ustedes han estado allí para mí en cada paso del camino, ofreciendo su apoyo incondicional y ánimo. Han sido mi roca en momentos de incertidumbre y mi fuente de fortaleza cuando he necesitado levantarme después de una caída.

A Mis Profesores. *EL Dr. Alan Sebastián Alvarado Espino, Dra. Ma. Guadalupe Calderón Leyva, Dra. Ma. Ángeles de Santiago Miramontes, Dra. Dalía, Dr. Oscar Ángel García y el Dr. Fernando Arellano Rodríguez.* Ahora que ha llegado el momento de la despedida, quiero que tenga bien claro la alta estima que tengo por todos por ustedes, porque han sabido transmitir no solo sus conocimientos.

Al Posgrado en Ciencias en Producción Agropecuaria, Gracias por darme esta maravillosa oportunidad de crecer profesionalmente y haberme ayudado a generar el mayor conocimiento y las mejores experiencias dentro de mi formación y permitirme culminar una meta que desde hace tiempo me propuse.

DEDICATORIA

A Dios por verme dado la fortaleza y salud de poder concluir la maestría que me ayudara en mi vida profesional que gran oportunidad porque me ayudó a conocer personas muy valiosas en mi vida.

A mis padres a mis queridos padres que cada día son la razón por seguir adelante que dios me permite tenerlos con vida, y deja ver mis logros como profesionalmente, por darme la vida y apoyar cada una de mis daciones que he tomado a lo largo de mi vida, agradezco por todo su amor que me demuestran los amo muchos padres.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Generalidades de los caprinos	3
2.2. Características del semen caprino	4
2.2.1. Plasma seminal	4
2.3. Importancia de la crioconservación	7
2.3.1 Diluyentes del semen.....	8
2.3.2. Crioprotectores	10
2.3.3. Los liposomas como crioprotectores.....	11
2.3.4. Crioprotectores penetrantes	13
2.3.5 Crioprotectores no penetrantes	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1. Localización del estudio y animales experimentales	15
3.2. Colección y procesamiento del semen	16
3.3. Variables evaluadas	17
3.4. Análisis estadístico	18
IV. RESULTADOS	19
V. DISCUSIÓN.....	21
VI. CONCLUSIÓN.....	24
VII. LITERATURA CITADA	25

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Viabilidad y motilidad espermática obtenida en el semen caprino criopreservado con un diluyente a base de liposomas o yema de huevo con o sin plasma seminal.....	20
---	----

RESUMEN

Efecto de la remoción del plasma seminal sobre la viabilidad del semen caprino criopreservado con un diluyente a base de liposomas

Fortunato Nava Joachin

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Producción Agropecuaria,
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Fernando Arellano Rodríguez

Director de tesis

El objetivo evaluar el efecto de la remoción del plasma seminal sobre la viabilidad, motilidad y funcionalidad de los espermatozoides caprinos criopreservados, utilizando un diluyente a base de liposomas y otro en yema de huevo. Se utilizaron 4 machos cabríos adultos de la raza Alpino-francés. El semen se recolecto atreves vagina artificial. Cada eyaculado se dividió en cuatro fracciones iguales, una de las cuales contenía plasma seminal (SP+) y otra a la que se le removió el plasma seminal (SP-). Una vez removido el plasma seminal el semen con y sin plasma seminal se diluyeron con un diluyente a base de liposomas (Optixcell®) o a base de yema de huevo (Optidyl®) formando cuatro tratamientos experimentales con una concentración de 100×10^6 espermatozoides/mL: 1) SP+/OX (Con plasma seminal más diluyente Optixcell®), 2) SP-/OX (Sin plasma seminal más diluyente Optixcell®), 3) SP+/OP (Con plasma seminal más diluyente Optidyl®) y 4) SP-/OP (Sin plasma seminal más diluyente Optidyl®). Se realizó un protocolo de criopreservación, las evaluaciones se realizaron macro y microscópicamente también a través del Sistema CASA (Androvision, Minitube, Alemania). Los resultados se muestran una diferencia significativa en la viabilidad del semen entre tratamientos ($P=0.0027$) y el proceso de congelamiento ($P=0.0001$). En el semen fresco (SF) la viabilidad fue mayor en el SP+/OX que en el diluido con SP-/OP ($P<0.05$) al igual que en el semen descongelado Se concluyó que el semen caprino, no requiere lavado seminal por centrifugación utilizando diluyente a base de liposomas para su criopreservación.

Palabras clave: Fosfolipasa A, Plasma seminal, Criopreservación.

ABSTRACT

Effect of seminal plasma removal on the viability of goat semen cryopreserved with a liposome-based extender

Fortunato Nava Joachin

To obtain the degree of Master of Science in Agricultural Production,
Antonio Narro Autonomous Agrarian University.

Fernando Arellano Rodríguez

Thesis director

The objective was to evaluate the effect of seminal plasma removal on the viability, motility and functionality of cryopreserved goat spermatozoa, using a liposome-based extender and an egg yolk-based extender. Four adult male goats of the French Alpine breed were used. Semen was collected through an artificial vagina. Each ejaculate was divided into four equal fractions, one of which contained seminal plasma (SP+) and another from which the seminal plasma was removed (SP-). Once the seminal plasma was removed, the semen with and without seminal plasma were diluted with a liposome-based diluent (Optixcell®) or an egg yolk-based diluent (Optidyl®) forming four experimental treatments with a concentration of 100×10^6 sperm/mL: 1) SP+/OX (with seminal plasma plus Optixcell® diluent), 2) SP-/OX (without seminal plasma plus Optixcell® diluent), 3) SP+/OP (with seminal plasma plus Optidyl® diluent) and 4) SP-/OP (without seminal plasma plus Optidyl® diluent). A cryopreservation protocol was carried out, and evaluations were performed macro and microscopically also through the CASA System (Androvision, Minitube, Germany). The results show a significant difference in semen viability between treatments ($P=0.0027$) and the freezing process ($P=0.0001$). In fresh semen (SF) viability was higher in SP+/OX than in the diluted with SP-/OP ($P<0.05$) as well as in thawed semen. It was concluded that goat semen does not require seminal washing by centrifugation using a liposome-based diluent for cryopreservation.

Keywords: *Phospholipase A, Seminal plasma, Cryopreservation.*

I. INTRODUCCIÓN

La criopreservación de semen caprino es una técnica específica en programas de reproducción asistida, ya que ayuda a preservar la viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides durante períodos prolongados manteniendo la capacidad de fecundación de los espermatozoides al descongelarlos (Salamon y Maxwell, 2000, Souza *et al.*, 2019). El proceso de congelación y descongelación suele deteriorar negativamente la motilidad y viabilidad espermática, disminuyendo su potencial reproductivo (Câmara *et al.*, 2011).

Los diluyentes tradicionales para la criopreservación del semen caprino están elaborados a base de yema de huevo, leche descremada o su combinación (Bustani Y Baiee, 2021). Sin embargo, el plasma seminal de los machos caprinos contiene una enzima esta estructura coagulante de yema de huevo (EYCE) que interactúa con componentes específicos de la leche desnatada o la yema de huevo, lo que hace que los diluyentes que contienen estas sustancias se perjudiciales para los espermatozoides de los machos cabríos afectando la motilidad, viabilidad y la capacidad de fertilidad de las células espermáticas (Paulenz *et al.*, 2005). Es por ello que, dentro de las recomendaciones para la criopreservación de los espermatozoides es necesaria la extracción del plasma seminal (SP), con el proceso de lavados antes de la dilución del semen para mejorar la calidad y la fertilidad (Silva *et al.*, 2019).

Si bien la remoción del SP puede mejorar la viabilidad de las células reproductivas del macho cabrío al reducir el daño oxidativo y minimizar los efectos de proteínas potencialmente perjudiciales para los espermatozoides (Malo *et al.*, 2017; Holt, 2000). Esta práctica es difícil en condiciones de campo además de consumir tiempo. Sin embargo, otros estudios sugieren que la remoción del plasma seminal no siempre presenta beneficios significativos y, en algunos casos, puede no afectar la viabilidad del semen, lo que sugiere que su efecto depende de otros factores como el tipo de diluyente y las condiciones de almacenamiento (Fukui *et al.*, 2008; Medeiros *et al.*, 2002).

El uso de medios de criopreservación que contienen liposomas es una nueva estrategia para la criopreservación para espermatozoides sin tener que centrifugar el plasma seminal. Los liposomas son nanovesículas esféricas con una sola bicapa lipídica que se produce artificialmente a través de la interrupción de las membranas plasmáticas mediante sonicación (Saadeldin *et al.*, 2020).

Este tipo de diluyente a base de liposomas han sido evaluados en otras especies con buenos resultados (Singh *et al.*, 2018) y debido a que no contiene yema de huevo o leche no sería necesaria la remoción del plasma seminal. El presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de la remoción del plasma seminal sobre la viabilidad, motilidad y funcionalidad de los espermatozoides caprinos criopreservados, utilizando un diluyente a base de liposomas y otro en yema de huevo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades de los caprinos

Los caprinos pertenecen al grupo de animales rumiantes que son el principal ganado que se ha desarrollado en explotaciones marginales en zonas semidesérticas y áridas, haciendo una comparación con los demás rumiantes de producción agropecuaria estos no pueden prosperar, puesto que los caprinos tienen una capacidad de adaptar en lugares rústicos estos rumiantes pueden vivir en lugares de poca vegetación o desechos de restos de siembras agrícolas como maíz, sorgo, avena etc., los caprinos su distribución es mundial encontrándose en diversas altitudes y climas variados (*Meza-Herrera et al., 2022*).

Los caprinos son una especie de animales rumiantes considerados de fácil manejo, los cuales tienen la capacidad de adaptarse en todos los sistemas de que los mantengan, en pastoreo (extensivo), estabulados (intensivo) o de ambas manera (mixto) una capacidad sorprendente en la parte de su alimentación consumen hasta el 60% de materia orgánica en descomposición, por lo cual son los caprino son animales que tienen una función que pocos rumiantes, aportan grandes resultados y muy favorables en la productividad que 100% aceptable, en entorno difícil (*Ngoma et al., 2016*).

México cuenta con una cantidad sorprendente de producción de cabezas de ganado caprino con un total de de 8 840 467 cabezas de caprinos (SIAP, 2024). La distribución de los caprinos corresponde a los estados con mayor población de cabras Guerrero, Oaxaca y Puebla al sur; y San Luis Potosí, Nuevo León, Coahuila de Zaragoza y Zacatecas al centro– norte (INEGI, 2023).

2.2. Características del semen caprino

El eyaculado de rumiantes caprinos se caracteriza por su peculiar color blanco o amarillento, ya que en ocasiones tiende a verse de otro aspecto dado que puede ser el mismo individuo, considerando una característica muy peculiar es el volumen tiene una capacidad de eyaculando con promedio de 1.2 ml, aunque esto va dependiendo de la edad así como también la condición que tenga el animal, se dice que es uno de los rumiantes más sorprendentes ya que su cantidad de células eyaculadas es sorprendente es de 3.5 hasta 6 millones de espermatozoides por mililitro esto se debe a la consistencia del eyaculado que sus propiedades del plasma seminal nutren adecuadamente la cantidad de células eyaculadas, estas especies tienen esta característica que los hace único con un eyaculado sorprendente(Boeta *et al*, 2018).

2.2.1. Plasma seminal

Es una mezcla acuosa a lechosa de color cremoso que es expulsada de las glándulas accesorias del aparato reproductor del macho, esta se encarga de la capacitación, notición maduración de la célula espermática, se describe como un líquido neutro e isotónico, compuesto que está en su mayor parte constituido en su totalidad por agua (75%), sus componentes son orgánicas así como (fructosa, sorbitol, inositol, ácido cítrico, glicerilfosforilcolina, fosfolípidos, prostaglandina y proteínas) y sustancias inorgánicas sodio, potasio y cloro) que estas tienden a interactuar como protectores y les brindan nutrientes a los espermatozoides. Se han encontrado que SP tiene una característica muy específica la cual tiene la capacidad de controlar el movimiento del espermatozoides ya que con este medio energético promueve la capacidad de fertilización de los mismo, también tiene la función de proteger en el momento de la criopreservación donde les da los nutrientes adecuados.(Muiño-Blanco *et al.*, 2008).

Describe que el plasma seminal, es una fuente de vinculo de transporte para las células espermáticas, se caracteriza como uno de los componentes más complejo derivado de los testículos, el epidídimo y las glándulas accesorias. (Ramírez Ramírez, 2023).

Al momento cuando se realiza la colecta semen para criopreservar unos de los puntos importante es tener muy preciso, según el método de recolección utilizado, tienden a tener diferentes propiedades, como la cantidad de eyaculado, sustancias y la morfología de los espermatozoides, comúnmente son encontradas en otras investigaciones, que el método de colección por la vagina artificial tiene la capacidad de mayor durabilidad a diferentes cambios bruscos de temperaturas, de lo contrario el método por el electro eyaculador tiende a bajar su calidad y viabilidad de los espermatozoides en diferentes procesos la criopreservación. (Souza *et al.*, 2019).

La congelación de semen cabrío realmente es considerado uno de los casos más complicados en la actualidad así como años anteriores, se ha descubierto que lo ocasiona las propiedades del contenido plasmático estas enzimas se denomina (EYCE, fosfolipasa A2), se desarrollan y son expulsadas por las glándulas accesorias del tractore productor del macho caprino, esta tiene una interacción negativa con diluyentes a base de origen animal como leche desnatada y yema de huevo entre otros diluyentes, estos son los principales componentes de los diluyentes que se utilizan el diferentes procesos de criopreservación, sin embargo los diluyentes ese origen contienen unas enzimas y proteínas que causan que el espermatozoide tenga una menor motilidad, otra de las aficiones es en la integridad de la membrana plasmática así como también el acrosoma del espermatozoide disminuyendo la posibilidad de tener una buena criopreservación. Es por esto que se recomienda hacer lavados mediante la contribución del plasma seminal separando a los espermatozoides utilizando medios adecuados, así tener menos reducción y muerte espermática (Chakravarty *et al.*, 2022).

La enzima fosfolipasa A2 tiene una caracterización que hidroliza los fosfolípidos que contiene la yema de huevo en específicos los ácidos grasos insaturados también liso fosfolípidos, que son tóxicos para los espermatozoides. Cuando se utiliza leche desnatada como diluyente, la incubación de espermatozoides epididimarios de cabra con plasma seminal recolectado durante la temporada no reproductiva vincula a una disminución significativa de la motilidad y viabilidad.(Dias *et al.*, 2017).

En animales como rumiantes en específico las cabras, muestran variaciones en los componentes bioquímicos del plasma seminal durante las estaciones seca y lluviosa. También se encontraron cambios en el semen cuando fue sometido a enfriamiento con diluyente que contenía yema de huevo, la motilidad de las células espermáticas se vio afectada negativamente en la estación seca del año.

Esto ocurrió por mayor actividad y presencia de la fosfolipasa A2 presente en el plasma seminal durante la estación seca, lo que sugiere que esta enzima desencadenó la reducción de la viabilidad del esperma.(Aguar *et al.*, 2013)

Otros estudios una amplia variabilidad individual en la congelación del semen de cabra, y la composición del plasma seminal puede afectar la congelabilidad de los espermatozoides. En este estudio, se identificaron 41 metabolitos diferenciales entre el SP. de caprino con máxima y mínima congelabilidad del semen mediante análisis metabolómico. Por lo tanto, la congelabilidad de los espermatozoides se vio afectada directamente por los aminoácidos del plasma seminal de cabra.(Xu *et al.*, 2023)

2.3. Importancia de la crioconservación

La crioconservación del esperma es el proceso de conservación de esperma a temperaturas extremadamente bajas, generalmente en nitrógeno líquido. El manejo del semen crioconservado para inseminar cabras y otras especies, así se protege a los animales del estrés relacionado con el transporte, reduce los costos de transporte y conserva la valiosa genética de las cabras, disminuye la propagación de infecciones sexuales (Thiangthientham *et al.*, 2024).

Las nuevas biotecnologías de las cuales más sobresalientes en estos últimos años es la crioconservación de semen ya que busca divulgar la crioconservación de espermatozoides en cierto proceso indeterminado. Estas estrategias reproductivas, están relacionadas con inseminación de los animales, ya que tienen la capacidad de distribuir la genética de ciertas razas de animales de excelente características que se requieren en la producción agropecuaria o productivo. de estúpida procedencia o fin zootécnico. La crioconservación tiende a ser más económico para los productores, se ahorra costos de alimentación y manejo de los sementales como también enfermedades a sus animales (da Silva *et al.*, 2021).

Una de las atribuciones de la crioconservación se considera una de las mejores herramientas en la biotecnología reproductiva, existe un conocimiento limitado sobre los procesos celulares y los ajustes moleculares que permiten a las células soportar los múltiples estreses a los que están expuestas durante la crioconservación (Özden Çiftçi and Kaya, 2024).

2.3.1 Diluyentes del semen

Los diluyentes son considerado uno de los elementos utilizados de manera cotidiana para dar protección, alimentación y aportación energética para el manejo de distintos protocolos de congelación en los choque térmicos sin embargo juegan un papel muy importante evitando cambios en el pH por lo cual pueden resultar dañinos, también tienden a funcionar como inhibidor del crecimiento bacteriano, cabe recalcar que el medio de dilución juega un papel muy importante para tener un excelente proceso de criopreservación lo que indica tener a una buena calidad seminal (Hameed *et al.*, 2024).

Para obtener una congelación adecuada dependerá las propiedades y cualidades que con tenga los diversos diluyentes también el protocolo de criopreservación para tener una buena viabilidad espermática al momento de la descongelación, los distintos medios de criopreservación de desarrollan a base de origen vegetal y animal entre estos están la yema de huevo y leche, las cuales tiende a tener propiedades o estructuras interactúan con algunas enzimas y proteínas del plasma de los machos caprino, tiende a coagular la yema de huevo (Sharma *et al.*, 2023).

Al considerar plasma seminal (PS) se describe como fluido biológico complejo que incluye múltiples secreciones de las glándulas reproductoras masculinas y una cantidad menor de secreciones epididimarias. Las diversas investigaciones describe que los avances en las tecnologías reproductivas han revelado que el PS puede inhibir y estimular la función de los espermatozoides a través de acciones multifuncionales de componentes orgánicos e inorgánicos (Amiri, 2022).

Es por loque algunos investigadore recomiendan en particular en el semen de caprino que es adecuado la eliminación del plasma seminal porque contiene una enzima secretada por la glándula bulbouretral conocida como enzima fosfolipasa A. es por eso que se realizan lavados antes de la dilución del semen en la actualidad se sugiere estas estrategias o protocolos para tener excelente resultados de la calidad seminal de caprinos congelado-descongelado cuando se utilizan diluyentes que contienen leche o yema de huevo (Silva *et al.*, 2019).

También es recomendable que se utilicen diluyentes a base de liposoma ya que estos permiten una mejor congelación porque contiene una mezcla de fosfolípidos, ácidos grasos y lipoproteínas de baja densidad, que protege las membranas de las células espermáticas al restaurar los fosfolípidos perdidos durante el choque térmico, lo que con este diluyente no es necesario eliminar el plasma seminal. Uno de ellos por su nombre comercial Optixcell® se ha utilizado como diluyente para el almacenamiento de camello, ya que este contiene liposomas que se ha informado que son beneficios para la criopreservación de semen y ha funcionado muy bien con otras especies (Al-Bulushi *et al.*, 2019).

Componentes que debe tener un diluyente:

- ✓ Debe de estar constituido por soluciones que permitan mantener una presión osmótica adecuada, uno de ellos son los Tris, citrato entre mas variedades.
- ✓ Tiene que disponer de grandes partes energéticas, una de las principales que debe de aportar es la glucosa o fructosa.
- ✓ Requiere tener uno de los ingredientes importantes, esenciales que debe de tener son los antibióticos las cuales disminuyen la propagación de agentes patógenos.
- ✓ De acuerdo con diversos autores recomiendan que debe de poseer agentes crioprotectores del cual describen los penetrantes que se caracterizan por tener menos peso molecular y no penetrantes tienen un peso más superior, las más adecuados son el glicerol y el etilenglicol pertenecientes a los penetrantes, los no penetrantes conocidos como la leche y yema de huevo (Galián *et al.*, 2023, Dorado *et al.*, 2010).

2.3.2. Crioprotectores

Hace más de 200 se realizó la primera criopreservación de semen, utilizando nieve por Lázaro Spallanzani por el año 1776, pero en el año de 1949 descubrieron las propiedades del glicerol el cual se consideró como uno de los crioprotectores de la época, el cual dio un nuevo giro en la parte reproductiva de la criopreservación de las células (Dorado *et al.*, 2010).

Diversas investigaciones han demostrado distintos cambios funcionales y biológicos que enfrentan las células espermáticas crio conservadas en relación con estos eventos de cambio drásticos de temperaturas, uno de los efectos es cuando se descógela sufriendo un desequilibrio en la membrana espermática provocando su ruptura conocida como choque térmico las que tienden afectar al acrosoma, el núcleo, los mitocondrias de los espermatozoides es por ello que es una gran importancia añadir en el diluyente un extensor crioprotector el cual tiene como función recubrir la membrana espermática en cada evento lesivo a las células (Hezavehei *et al.*, 2018).

Los crioprotectores de acuerdo con su composición tienen un papel que lo caracteriza de suma importancia en el periodo de la congelación-descongelación, lo que produce una minimización formando cristales de hielo en el entorno del espermatozoide, reduciendo las alteraciones de cambio de iones y otras sustancias extrañas así evitar dañar la membrana espermática, algunos crioprotectores son dañinos para la célula en dosis muy altas se recomienda tener las concentraciones adecuadas; los mas más relevantes son de dos tipos crioprotectores, penetrantes y no penetrantes (Yeste, 2016).

2.3.3. Los liposomas como crioprotectores.

Una de las estrategias de las biotecnologías reproductivas son los diversos crioprotectores en particular los que están compuestos liposomas funcionan como aditivos crioprotectores en varias especies animales, incluidos equinos (Pillet *et al.*, 2012), búfalos (Medina-León *et al.*, 2019), ovinos (Mortazavi *et al.*, 2020), porcinos y bovinos, se ha encontrado que al momento de la inseminación artificial mejora la fertilidad en diversas especies (Sullivan and Saez, 2013).

Los liposomas son muy importantes en cuanto a su contenido de fosfolípidos (fosfatidilserina, dioleoilfosfatidilcolina, fosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y dimiristoilfosfocolina) y ácidos grasos saturados e insaturados las cuales tienen la capacidad de fusionarse con la membrana plasmática del espermatozoide y reducir el daño a los espermatozoides causado por el protocolo de congelación y descongelación (Ansari *et al.*, 2017).

En carneros se han encontrado los diluyentes a base de liposomas que comprendían fosfatidilcolina de huevo y dipalmitoilfosfatidilcolina utilizados como suplemento con espermatozoides lavados proporcionaron protección inmediata contra el choque frío, como lo indica la preservación de la motilidad (Ansari *et al.*, 2017).

De manera similar, en sementales cabríos describe que los liposomas que comprendían una mezcla de fosfatidilcolina de huevo y fosfatidiletanolamina (llamados liposomas E80) fueron eficientes para preservar la actividad motora de la célula espermática después de la criopreservación (Pillet *et al.*, 2012).

Una de las particularidades pasa lo contrario, en bovinos, los liposomas compuestos de dioleoil-glicero-fosfocolina y dioleoil-glicero-fosfo-glicerol obtuvieron como resultado una mayor supervivencia una vez realizado el proceso de descongelación, motilidad progresiva y reacción acrosómica en comparación con la dioleoil-glicero-fosfocolina sola (Röpke *et al.*, 2011).

Una de las acciones que se caracteriza es el cambio lipídica del periodo de gel durante el enfriamiento y la congelación donde surge una importante acción por lo que es medida composición lipídica de las membranas por lo cual de esta manera da seguimiento, a la fusión de liposomas facilita la transferencia de lípidos y colesterol, esto acelera y dirige la reorganización de los componentes de la membrana celular dade este paso tiene como función que modifique las propiedades fisicoquímicas de la barrera, mejorando así la crioestabilidad de las células espermáticas (Röpke *et al.*, 2011).

OptiXcell[®] se conoce y caracterizado como uno de esos productos comerciales más utilizado como extensor comercial basado en liposomas y actualmente se utiliza para varias especies animales (Abdel-Aziz Swelum *et al.*, 2019).

2.3.4. Crioprotectores penetrantes

Los solutos este grupo de crioprotectores tienen una de las capacidades más estupendas que es penetrar la barrera de la célula que recubre al espermatozoide, tiene la dicha de controlar la cantidad de concentración osmótica en las temperaturas mínimas así disminuyendo la cantidades de electrolitos, en el cual un cambio radical con la difusión y viscosidad del citoplasma provocando la penetración de las capas lipídicas mediante a este proceso produce algunos daños al membrana celular (Yeste, 2016).

Su trabajo es equilibrar el medio, el cual promueve las cantidades iguales dentro y fuera de a la célula, con base este proceso el crioprotector adquieren gran volumen de agua de adentro hacia fuera de la célula, permitiendo minimizar que se transforme hielo intra celular, las cual causas destrucción célula, este grupo soluto son capaces del reordenamiento de las proteínas y lípidos mediante este proceso aumenta el flujo de la barrera, dando a la célula mayor capacidad para que se mantenga en mínimas temperaturas, las cuales cuando están bajas provoca una deshidratación por lo que produce una gran criotolerancia (Tabaresz, 2015).

Uno de los puntos estrictos de un crioproctor de pende la permeabilidad celular este poseso realiza cabios que perjudican a la célula, se sugiere buenas concentraciones y adecuada de la idoneidad de pendiendo el tipo de célula (Yeste, 2016) algunas más utilizados de este grupo son, el dimetilsulfóxido (DMSO), el etilenglicol (ETG), el propilenglicol (PPG) el metanol (MET) y el glicerol.

2.3.5 Crioprotectores no penetrantes

Estas son sustancias que como su nombre lo indica no tienen la capacidad de penetrar el citoplasma de la célula por el gran tamaño que tienen, tienen la calidad de ejercer la actividad de proteger al espermatozoides con una inercia con adictivos estos pueden penetrar a la célula, este grupo de crioproctores no penetrantes tienen la capacidad de deshidratar a la célula, este proceso desencadena que baje la creación de hielo en el exterior del espermatozoide, de esta manera también disminuyen el punto de congelación estas atribuciones son parte del diluyente, su capacidad es proteger la barrera espermática, antes que sufran el shock provocado por el frio así como el protocolo de la descongelación, e principal de estos producto de pende la concentración del diluyente y la cantidad de semen utilizado en los procesos de congelación, como la especie que se va trabajar(Mejías, 2009).

Los crioprotectores no penetrantes se consideran como moléculas compuesto energéticos como glucosa, almidones, dextranos etc., los cuales se encuentran en las propiedades de la leche y yema de huevo, este grupo no puede brindar protección por sí mismo a las células espermáticas, de los daños provocados por la criopreservación, requieren partes de los penetrantes para tener buenos resultados de lo contrario tendría menor efecto lo que conlleva a una mala calidad del proceso de criopreservación. (Yeste, 2016).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización del estudio y animales experimentales

El experimento se realizó en el norte de México, en el Centro de Investigación en Producción Animal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (26° de Latitud Norte y 104° de Longitud Oeste), en el periodo de la temporada reproductiva (agosto-septiembre). Las coordenadas de la investigación fueron en una altitud 1120 msnm, con una precipitación media anual de 230 mm y con temperatura promedio de 24 °C, máxima de 41 °C en mayo y junio, y mínima de -1 °C en diciembre y enero (CONAGUA, 2015).

Se manejaron 4 sementales caprino adultos de la raza Alpino-francés de 1.5 a 2 años de edad que pesaban 75.0 ± 0.32 kg y tenían una condición corporal de 3.5 ± 0.10 unidades; escala 1 – 5 puntos). Los sementales recibieron su ración alimenticia en la mañana y en la tarde (8:00 h y 18:00 h con una dieta basada en heno de alfalfa (18% PC, 1.95 Mcal de EM) y 100 g de pellets de línea comercial (21% PC, 1.7 Mcal EM) cubriendo los porcentajes que requieren los animales de acuerdo a su etapa productiva (NRC, 2007). Los sementales tenían agua fresca y limpia a libitum, así como minerales.

3.2. Colección y procesamiento del semen

El semen fue extraído y colectado por la mañana (8:00 a 10:00 h) cada 4 d, durante 4 semanas. Se utilizó una hembra en estro, para estimular al macho así extraer el semen. La muestra se recolectó mediante una vagina artificial estándar para ovinos y caprinos, esta con una temperatura de 38 °C para mantener vivas las células. En total se recolectaron 64 eyaculados. Una vez obtenido la muestra de semen se mantuvo sumergida rápidamente en baño maría con una temperatura 37 °C donde se procedió a realizar su evolución macro y microscópico esto se realizó en los primeros 10 minutos después de la recolección. Los eyaculados se analizaron subjetivamente y solo cuando las muestras presentaban un volumen ≥ 0.5 mL, una motilidad ≥ 60 % y una concentración $\geq 2500 \times 10^6$ se agruparon y utilizaron para el experimento.

Las muestras de semen se separaron en cuatro fracciones similares, una de ellas contenía plasma seminal (SP+) y otra a la que se le removió el plasma seminal (SP-). La remoción del plasma seminal se realizó de acuerdo con (Silva et al., 2019). El semen se diluyó (1:9, v/v) en una solución de lavado (Ringer Lactato) y se centrifugaron dos veces a 1, 500 rpm por 5 min. Una vez removido el plasma seminal el semen con y sin plasma seminal se diluyeron con un diluyente a base de liposomas (Optixcell®) o a base de yema de huevo (Optidyl®) formando cuatro tratamientos experimentales con una concentración de 100×10^6 espermatozoides/mL: 1) SP+/OX (Con plasma seminal más diluyente Optixcell®), 2) SP-/OX (Sin plasma seminal más diluyente Optixcell®), 3) SP+/OP (Con plasma seminal más diluyente Optidyl®) y 4) SP-/OP (Sin plasma seminal más diluyente Optidyl®). Los diluyentes se adicionaron al semen a una temperatura de 37 °C e inmediatamente después de la dilución se refrigeraron por 2 h hasta alcanzar una temperatura de 4° C y después de este tiempo permanecieron por otras 2 h más. Después de la refrigeración el semen se empajillo en pajillas de 0.25 mL fueron selladas con alcohol polivinílico. Las pajillas de colocaron a 7 cm del nitrógeno líquido (NL, -140 °C) por 10 min y después se sumergieron directamente en el NL (-196°C) y se resguardaron hasta su análisis (Morrell et al., 2022).

3.3. Variables evaluadas

La viabilidad espermática (VE; %), su análisis se realizó utilizando la técnica de tinción con eosina-nigrosina (Chakravarty *et al.*, 2022), se sometieron aproximadamente 200 células espermáticas por cada frotis utilizando un microscopio óptico, enfocando con el objetivo de 100X, se procedió a un cálculo mediante a el porcentaje de células vivas las cuales (no se tiñeron) y de células muertas (teñidas de color rosa). Desde que se dio inicio las evaluaciones fueron analizadas siempre por el mismo evaluador calificado. Para la evolución cinética de los espermatozoides se realizó utilizando el Sistema CASA (Androvision, Minitube, Alemania). Se colocó una alícuota de 5.0 μ L de la muestra en un portaobjeto precalentado a 37 °C, se cubrió con un cubreobjeto y se evaluaron mediante una microscopia de contraste de fase (eclipse 50i, Nikon, Japón). Las estimaciones de las motilidades espermáticas se realizaron en cinco campos microscópicos aleatorios no consecutivos para cada muestra por el mismo operador (Hernández Corredor *et al.*, 2018). Así mismo se evaluaron las siguientes variables: motilidad total (TM; %), motilidad progresiva (PM; %), Motilidad rápida (%), Motilidad lenta (%), Motilidad local (%) Espermatozoides inmóviles (%). Las muestras se evaluaron al adicionar el diluyente (fresco), durante la refrigeración (4 °C) y después de la criopreservación (semen congelado). Las pajillas se descongelaron sumergiéndolas en agua atemperada a 37° C durante 40 s.

3.4. Análisis estadístico

Los datos fueron examinados y analizados mediante el procedimiento Modelo Lineal General (GLM). Las medias que se obtuvieron de las evaluaciones de las muestras de semen se realizaron mediante una comparación utilizando una prueba de t. donde se tomó en cuenta la utilización de distintos procesos de criopreservación y la interacción de diluyente a base de liposomas con la remoción del plasma seminal. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis designado el paquete estadístico SAS V9.1 (SAS, 2005). Las diferencias que se presentaron se les considero significativas cuando conservaban un valor de $P \leq 0.05$.

IV. RESULTADOS

La presentación de resultados se puede observar en el cuadro 1. Se observó una diferencia significativa en la viabilidad del semen entre tratamientos ($P=0.0027$) y el proceso de congelamiento ($P=0.0001$). En el SF la viabilidad fue mayor en el SP+/OX que en el diluido con SP-/OP ($P<0.05$) al igual que en el semen descongelado ($P<0.05$). Con respecto a la motilidad total, progresiva, rápida, lenta, local y espermatozoides inmóviles no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, ni la interacción tratamiento por tiempo ($P>0.05$). En el tiempo la viabilidad, la motilidad total, progresiva, rápida y espermatozoides inmóviles tuvo una diferencia significativa ($P<0.0001$). En todos los tratamientos luego del congelamiento y descongelamiento disminuyeron significativamente con respecto al semen fresco y refrigerado ($P<0.05$). Sin embargo, en la motilidad lenta y local de acuerdo al tiempo no se observa diferencias significativas ($P>0.05$).

Cuadro 1. Viabilidad y motilidad espermática obtenida en el semen caprino criopreservado con un diluyente a base de liposomas o yema de huevo con o sin plasma seminal.

Variable	Tiempo(h)	SP+/OX	SP-/OX	SP+/OP	SP-/OP
Viabilidad (%)	Fresco	84.26 ±2.75 a f	82.80 ±2.75 ab f	82.26±2.76 ab f	74.00±2.77 b f
	Refrigerado	76.66±3.28 a f	73.66±3.28 a f	75.26±3.28 a f	70.73±3.28 a f
	Descongelado	51.80±3.69 a g	43.26±3.69 ab g	38.60±3.69 ab g	37.40±3.69 b g
Motilidad total (%)	Fresco	64.2±4.42 a f	63.68±4.42 a f	70.67±4.42 a f	65.54±4.42 a f
	Refrigerado	61.63±3.89 a f	69.06±3.89 a f	76.18±3.89 a f	65.42±3.89 a f
	Descongelado	40.10±4.64 a g	38.38±4.64 a g	35.04±4.64 a g	38.45±4.64 a g
Motilidad progresiva (%)	Fresco	63.26±5.83 a f	57.25±5.83 a f	68.88±5.83 a f	63.78±5.83 a f
	Refrigerado	59.92±3.98 a f	66.76±3.98 a f	73.75±3.98 a f	62.41±3.98 a f
	Descongelado	36.90±4.47 a g	36.00±4.47 a g	31.19±4.47 a g	35.51±4.47 a g
Motilidad rápida (%)	Fresco	46.14±5.42 a f	41.37±5.24 a f	53.26±5.24 a f	44.31±5.24 a f
	Refrigerado	43.78±4.94 a f	44.48±4.94 a f	51.86±4.94 a f	41.06±4.94 a f
	Descongelado	21.67±3.50 a g	18.85±3.50 a g	17.34±3.50 a g	18.51±3.50 a g
Motilidad lenta (%)	Fresco	15.94±1.84 a f	15.88±1.84 a f	15.62±1.84 a f	15.46±1.84 a f
	Refrigerado	16.13±2.65 a f	22.31±2.65 a f	21.88±2.65 a f	21.35±2.65 a f
	Descongelado	15.22±1.86 a f	17.15±1.86 a f	13.15±1.86 a f	17.01±1.86 a f
Motilidad local (%)	Fresco	1.25±1.52 a f	6.42±1.52 a f	1.78±1.52 a f	2.60±1.52 a f
	Refrigerado	1.72±0.51 a f	2.27±0.51 a f	2.42±0.51 a f	3.00±0.51 a f
	Descongelado	3.20±0.83 a f	2.37±0.83 a f	3.83±0.83 a f	2.92±0.83 a f
Espermatozoides inmóviles (%)	Fresco	35.48±4.44 a f	36.31±4.44 a f	29.32±4.44 a f	33.60±4.44 a f
	Refrigerado	38.36±3.89 a f	30.93±3.89 a f	23.82±3.89 a f	34.57±3.89 a f
	Descongelado	59.89±4.64 a g	61.61±4.64 a g	64.95±4.64 g	61.54±4.64 a g

ab Literales desiguales entre columnas difieren a $P \leq 0.05$

fg Literales desiguales entre filas difieren a $P \leq 0.05$

Donde SP+/OX (Con plasma seminal más diluyente Optixcell®), SP-/OX (Sin plasma seminal más diluyente Optixcell®), SP+/OP (Con plasma seminal más diluyente Optidy®) y SP-/OP (Sin plasma seminal más diluyente Optidy®)

V. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio mostraron que la viabilidad de los espermatozoides criopreservados con un diluyente a base de liposomas con o sin plasma seminal fue mayor que en los diluidos con un diluyente a base de yema de huevo sin SP. Similarmente el proceso de congelamiento independientemente del tipo de diluyente afecta significativamente la viabilidad y motilidad de los espermatozoides. La criopreservación es un método de preservar la motilidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides por tiempo indefinido (Najafi *et al.*, 2020). En caprinos resulta particularmente desafiante debido a que en el plasma seminal se encuentra la enzima EYCE la cual al interaccionar con los lípidos de los diluyentes a base de yema de huevo o leche desnatada lo que hace que los diluyentes que contienen estas sustancias sean perjudiciales para los espermatozoides de los machos cabríos afectando la viabilidad y fertilidad (Paulenz *et al.*, 2005). Adicionalmente, el contenido de la yema de huevo es muy variable en diferentes huevos, además de ser una potencial fuente de contaminación microbiana debido a su origen animal (Tar *et al.*, 2021).

Los liposomas son vesículas artificiales que contienen al menos una bicapa de lípidos con propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas (Stremersch *et al.*, 2016). Protegen a los espermatozoides al fusionarse a la membrana plasmática de los espermatozoides y transferir lípidos y colesterol entre los liposomas y la membrana plasmática de los espermatozoides (Tar *et al.*, 2021); Stremersch *et al.*, 2016). Los diluyentes a base de liposomas han sido utilizados con eficacia en diferentes especies animales, incluido toros, ovinos, ciervos, búfalos, equinos, camellos y caprinos (Singh *et al.*, 2017; Miguel-Jimenez *et al.*, 2020; Al-Bulushi *et al.*, 2019). Como alternativa a la yema de huevo o leche desnatada. En el presente estudio, los espermatozoides diluidos con liposomas más plasma seminal tuvieron una mejor viabilidad, que los diluidos con un diluyente a base de yema de huevo sin plasma seminal. Estos resultados son similares a los reportados por Singh *et al.* (2017) quienes concluyeron que los diluyentes a base de liposomas son más eficaces en mantener la viabilidad de los

espermatozoides. Sin embargo, en nuestro estudio la motilidad total, progresiva, rápida, lenta, local y espermatozoides inmóviles no se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

Diversos estudios han mencionado que la motilidad y viabilidad de los espermatozoides diluidos con yema de huevo mejoran cuando el plasma seminal es removido antes de la congelación (Leboeuf *et al.*, 2000). Sin embargo, aunque es un procedimiento muy utilizado en diversos países los resultados son contradictorios y dependiendo de la época del año, la concentración de la yema de huevo en el diluyente o las condiciones de almacenamiento ((Fukui *et al.*, 2008; Medeiros *et al.*, 2002; Cabrera *et al.*, 2005). En nuestro estudio, en los espermatozoides diluidos con Optidyl® sin plasma seminal la viabilidad fue menor que en los diluidos con Optidyl® con plasma o con Optixcell® con y sin plasma seminal. Los anterior es similar a lo observado por Neila-Montero *et al.*, 2024) quienes mencionan que la remoción del plasma seminal en ovinos resulta dañina para la sobrevivencia y fertilidad in vitro e in vivo de los espermatozoides a largo plazo. Adicionalmente, es probable que el efecto positivo del plasma seminal podría deberse a la edad de los sementales ya que los animales jóvenes todavía están en desarrollo del sistema reproductivo con una menor producción de EYCE en comparación con los animales adultos, que ya tienen las glándulas bulbouretrales bien desarrolladas Tahar *et al.*(2024) y el daño de remover el plasma seminal es mayor que el dejarlo al proporcionar protección contra el estrés inducido por la manipulación y algunos mecanismos selectivos del tracto reproductivo de la hembra (Leahy *et al.*,2019).

Finalmente, el proceso de criopreservación afecto negativamente la viabilidad y motilidad de los espermatozoides independientemente del tratamiento. Al momento de diluir los espermatozoides y disminuir la temperatura a 4 °C tanto la viabilidad como la motilidad se mantuvieron similares. Sin embargo, luego del congelamiento/descongelamiento disminuyeron significativamente. La criopreservación provoca la formación de cristales de hielo causando el daño de la membrana celular (Tar *et al.*, 2021). Además, la criopreservación ocasiona un

mayor estrés oxidativo en las células espermáticas por motivo de la peroxidación lipídica de la barrera que cubre a la célula en el transcurso de la criopreservación este proceso induce a producir de las especies reactivas de oxígeno (ROS), la que promueve la fragmentación del ADN así como la alteración de las estructuras químicas de fosfolípidos de la capa o barrera plasmática, lo que realiza a una capacitación prematura o exocitosis acrosómica (Jimenes *et al.*,2020).

VI. CONCLUSIÓN

Se concluye que la crioconservación del semen caprino, no requiere del lavado o remoción del plasma seminal por centrifugación al diluirse con un diluyente a base de liposomas. Es necesario realizar más estudios en los que se evalué el efecto de la remoción del SP en animales adultos y diferentes épocas del año, así como comparar la fertilidad in vivo.

VII. LITERATURA CITADA

1. ABDEL-AZIZ SWELUM, A., M. SAADELDIN, I., BA-AWADH, H., G. AL-MUTARY, M., F. MOUMEN, A., N. ALOWAIMER, A. & ABDALLA, H. J. A. 2019. Efficiency of commercial egg yolk-free and egg yolk-supplemented tris-based extenders for dromedary camel semen cryopreservation. 9, 999.
2. AGUIAR, G., VAN TILBURG, M., CATUNDA, A., CELES, C., LIMA, I., CAMPOS, A., MOURA, A. & ARAUJO, A. J. A. B. D. M. V. E. Z. 2013. Sperm parameters and biochemical components of goat seminal plasma in the rainy and dry seasons in the Brazilian Northeast: the season's influence on the cooling of semen. 65, 6-12.
3. AL-BULUSHI, S., MANJUNATHA, B. M., BATHGATE, R., RICKARD, J. P. & DE GRAAF, S. P. 2019. Liquid storage of dromedary camel semen in different extenders. *Animal Reproduction Science*, 207, 95-106.
4. AMIRI, B. J. S. R. R. 2022. Factors influencing seminal plasma composition and its relevance to succeed sperm technology in sheep: an updated review. 215, 106759.
5. ANSARI, M. S., RAKHA, B. A., AKHTER, S. J. A. S. P. & REPORTS 2017. Cryopreservation of bull semen in OptiXcell® and conventional extenders: Comparison of semen quality and fertility. 35.
6. Boeta, M., Balcázar, A., Cerbón, J., Hernández, M. J., Hernández, C. J., Páramo, R., ... & Zarco, L. (2018). *Fisiología reproductiva de los animales domésticos*. México: FMVZ–UNAM.
7. BUSTANI, G. S. & BAIEE, F. H. J. V. W. 2021. Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. 14, 1220.
8. CABRERA, F., GONZALEZ, F., BATISTA, M., CALERO, P., MEDRANO, A. & GRACIA, A. J. R. I. D. A. 2005. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (*Capra hircus*). 40, 191-195.

9. CÂMARA, D., SILVA, S., ALMEIDA, F., NUNES, J. & GUERRA, M. J. T. 2011. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. 76, 342-350.
10. CHAKRAVARTY, H., SINHA, S., BORPUJARI, D., DEKA, B. C., BISWAS, R., DUTTA, M. & BORAH, B. 2022. Effect of Centrifugation Regime on Cryopreservation of Beetal Buck Semen. Indian Journal of Animal Research.
11. CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). (2011). Estadísticas del Agua en México Edición 2014.
12. DA SILVA, E. C. B., DE LIMA, R. A. & GUERRA, M. M. P. 2021. Goat semen freezing: the two faces of the coin.
13. DIAS, J. C. O., VELOSO, C. M., SANTOS, M. C. D. R. S., SILVEIRA, C. O., IGLESIAS, E., FURTADO, P. H. & DE OLIVEIRA DONZELE, R. F. M. J. M.-S. J. 2017. Seasonal variations in the seminal plasma composition of male goats. 1, 34-40.
14. DORADO, J., MUNOZ-SERRANO, A. & HIDALGO, M. J. A. R. S. 2010. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. 121, 115-123.
15. FUKUI, Y., KOHNO, H., TOGARI, T., HIWASA, M., OKABE, K. J. J. O. R. & DEVELOPMENT 2008. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. 54, 286-289.
16. GALIÁN, S., PEINADO, B., ALMELA, L., POTO, Á. & RUIZ, S. 2023. Post-Thaw Quality of Spermatozoa Frozen with Three Different Extenders in the Murciano Granadina Goat Breed. Animals [Online], 13.
17. HAMEED, N., AKHTER, S., SOUZA-FABJAN, J. M. G., ZUBAIR, M., IRFAN-UR-REHMAN KHAN, M. J. T. A. H. & PRODUCTION 2024. Effects of different extenders, storage temperatures, and antioxidant supplementation on chilled semen quality: a review. 56, 85.
18. HERNÁNDEZ CORREDOR, L., CAMARGO RODRÍGUEZ, O., SILVA TORRES, A., MONTOYA PÁEZ, J. D. & QUINTERO MORENO, A. 2018. Effects of cryopreservation on sperm subpopulations in goats.

19. HEZAVEHEI, M., SHARAFI, M., KOUCHESFAHANI, H. M., HENKEL, R., AGARWAL, A., ESMAEILI, V. & SHAHVERDI, A. J. R. B. O. 2018. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. 37, 327-339.
20. HOLT, W. J. A. R. S. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. 62, 3-22.
21. INEGI. 2023. Resultados definitivos. Censo.2022 Agropecuario. 34-42. https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/ca/2022/doc/ca2022_rdNAL.pdf
22. LABBÉ, C. & LEBOEUF, B. 2000. Role of plasma membrane cholesterol on sperm resistance to cryopreservation.
23. LEAHY, T., RICKARD, J. P., BERNECIC, N. C., DRUART, X. & DE GRAAF, S. P. J. R. 2019. Ram seminal plasma and its functional proteomic assessment. 157, R243-R256.
24. MALO, C., CRICHTON, E. G. & SKIDMORE, J. A. J. C. 2017. Optimization of the cryopreservation of dromedary camel semen: Cryoprotectants and their concentration and equilibration times. 74, 141-147.
25. MARTÍNEZ DURAN, J., DUVERGER-TELLEZ, O., INTERIAN-ALVAREZ, L., DENIS-GARCÍA, R. & PALACIOS-ESPINOSA, A. J. R. M. C. 2022. Efecto de diferentes concentraciones de Albúmina Sérica Bovina en la congelabilidad del semen caprino. 27, e2632-e2632.
26. MARTÍNEZ, J., DUVERGER TELLEZ, O., DÍAZ MARTÍNEZ, N., INTERIAN ALVAREZ, L., DENIS GARCÍA, R. & PALACIOS ESPINOSA, A. 2022. Effect of the sperm membrane protector on the freezability of goat semen.
27. MEDEIROS, C., FORELL, F., OLIVEIRA, A. & RODRIGUES, J. J. T. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? 57, 327-344.
28. MEDINA-LEÓN, A. Z., DOMÍNGUEZ-MANCERA, B., CAZALEZ-PENINO, N., CERVANTES-ACOSTA, P., JÁCOME-SOSA, E., ROMERO-SALAS, D. & BARRIENTOS-MORALES, M. J. A. J. O. V. S. 2019. Cryopreservation

- of horse semen with a liposome and trehalose added extender. 51, 119-123.
29. MEJÍAS, N. G. 2009. Evaluación y criopreservación de espermatozoides como herramienta para la conservación de felinos amenazados: Aplicación en el caso del lince ibérico, (" *Lynx pardinus*"), Universidad Complutense de Madrid (Spain).
30. MEZA-HERRERA, C., NAVARRETE-MOLINA, C., LUNA-GARCÍA, L., PÉREZ-MARÍN, C., ALTAMIRANO-CÁRDENAS, J., MACÍAS-CRUZ, U., DE LA PEÑA, C. G. & ABAD-ZAVALETA, J. J. S. R. R. 2022. Small ruminants and sustainability in Latin America & the Caribbean: Regionalization, main production systems, and a combined productive, socio-economic & ecological footprint quantification. 211, 106676.
31. MORRELL, J. M., MALALUANG, P., NTALLARIS, T. & JOHANNISSON, A. J. A. 2022. Practical method for freezing buck semen. 12, 352.
32. MORTAZAVI, S.-H., ESLAMI, M. & FARROKHI-ARDABILI, F. J. A. R. S. 2020. Comparison of different carrier-compounds and varying concentrations of oleic acid on freezing tolerance of ram spermatozoa in tris-citric acid-egg yolk plasma semen diluent. 219, 106533.
33. MUIÑO-BLANCO, T., PÉREZ-PÉ, R. & CEBRIÁN-PÉREZ, J. J. R. I. D. A. 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. 43, 18-31.
34. NAJAFI, A., KIA, H. D., MEHDIPOUR, M., HAMISHEHKAR, H. & ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M. J. T. 2020. Effect of quercetin loaded liposomes or nanostructured lipid carrier (NLC) on post-thawed sperm quality and fertility of rooster sperm. 152, 122-128.
35. NGOMA, L., KAMBULU, L. & MWANZA, M. J. J. O. H. E. 2016. Factors Influencing goat's semen fertility and storage: A Literature Review. 56, 114-125.
36. ÖZDEN ÇİFTÇİ, Y. & KAYA, E. J. C. 2024. Perspective: Transcriptomics of Cryopreserved Cells. 45, 329-339.

37. PAULENZ, H., SOLTUN, K., ÅDNØY, T., BERG, K. A. & SÖDERQUIST, L. 2005. Effect of different extenders on sperm viability of buck semen stored at room temperature. *Small Ruminant Research*, 59, 89-94.
38. PAULENZ, H., SOLTUN, K., ÅDNØY, T., BERG, K. A. & SÖDERQUIST, L. 2005b. Effect of different extenders on sperm viability of buck semen stored at room temperature. *Small Ruminant Research*, 59, 89-94.
39. PILLET, E., LABBE, C., BATELLIER, F., DUCHAMP, G., BEAUMAL, V., ANTON, M., DESHERCES, S., SCHMITT, E. & MAGISTRINI, M. J. T. 2012. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *77*, 268-279.
40. RAMÍREZ RAMÍREZ, D. A. 2023. Uso de crioprotectores que permitan optimizar el manejo del plasma seminal en la criopreservación del semen caprino: Revisión sistemática.
41. RÖPKE, T., OLDENHOF, H., LEIDING, C., SIEME, H., BOLLWEIN, H. & WOLKERS, W. J. T. 2011. Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. *76*, 1465-1472.
42. SAADELDIN, I. M., KHALIL, W. A., ALHARBI, M. G. & LEE, S. H. J. A. 2020. The current trends in using nanoparticles, liposomes, and exosomes for semen cryopreservation. *10*, 2281.
43. SALAMON, S. & MAXWELL, W. M. C. J. A. R. S. 2000. Storage of ram semen. *62*, 77-111.
44. SHARMA, K., RANJAN, R. & GUPTA, S. 2023. Role of IGF-1 in goat semen freezing: a review.
45. SIAP. 2024. Población ganadera. Inventario 2023 Caprino Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. https://nube.siap.gob.mx/poblacion_ganadera/. Fecha de consulta 08 de agosto de 2024.
46. SILVA, H. V. R., SILVA, A. R., DA SILVADA, L. D. M., COMIZZOLI, P. J. B. & BIOBANKING 2019a. Semen cryopreservation and banking for the conservation of neotropical carnivores. *17*, 183-188.

47. SILVA, R. A. J. A., BATISTA, A. M., ARRUDA, L. C. P., SOUZA, H. M. D., NERY, I. H. D. A. V., GOMES, W. A., SOARES, P. D. C., SILVA, S. V. & GUERRA, M. M. P. 2019b. Concentration of soybean lecithin affects short-term storage success of goat semen related with seminal plasma removal. *Animal Reproduction Science*, 16, 895-901.
48. SINGH, A., KUMAR, A., HONPARKHE, M., KAUR, S., KAUR, H., GHUMAN, S. & BRAR, P. 2018. Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of buffalo bull semen frozen in egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders. 53, 195-202.
49. SOUZA, C. V. D., BRANDÃO, F. Z., SANTOS, J. D. R., ALFRADIQUE, V. A. P., SANTOS, V. M. B. D., MORAIS, M. C. D. C., RANGEL, P. S. C., SILVA, A. A. D. & SOUZA-FABJAN, J. M. G. 2019. Effect of different concentrations of l-carnitine in extender for semen cryopreservation in sheep. *Cryobiology*, 89, 104-108.
50. STREMERSCHE, S., VANDENBROUCKE, R. E., VAN WONTERGHEM, E., HENDRIX, A., DE SMEDT, S. C. & RAEMDONCK, K. J. J. O. C. R. 2016. Comparing exosome-like vesicles with liposomes for the functional cellular delivery of small RNAs. 232, 51-61.
51. SULLIVAN, R. & SAEZ, F. J. R. 2013. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. 146, R21-R35.
52. TABAREZ, R., ABIGAIL 2015. *Optimización del protocolo de crioconservación de semen caprino de la raza autóctona en peligro de extinción Blanca de Rasquera*, Universitat Autònoma de Barcelona.
53. TABAREZ, R., ABIGAIL 2015. Optimización del protocolo de crioconservación de semen caprino de la raza autóctona en peligro de extinción Blanca de Rasquera, Universitat Autònoma de Barcelona.
54. TAHAR, B. B., AMAR, A. A., AMMAR, S. S., MOHAMMED, H. S., REDHA, B. A., MOKHTARIA, K. & RACHID, K. J. F. V. 2024. EFFECTS OF TIME STORAGE, EGG YOLK CONCENTRATION AND SEMEN WASHING ON SPERM MOTILITY IN ARBIA BUCKS. 68, 36-43.

55. TAR, M., TOWHIDI, A., ZEINOALDINI, S., ZHANDI, M., MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, A. & MOAZENI ZADEH, M. H. J. A. 2021. Effects of different ultrastructures of lecithin on cryosurvival of goat spermatozoa. 53, e14183.
56. THIANGTHIENTHAM, P., KALLAYANATHUM, W., JUNTAUTSA, S. & LEETHONGDEE, S. J. A. R. S. 2024. Sesame oil as a partial substitute for egg yolk in goat semen extenders. 107500.
57. XU, B., BAI, X., ZHANG, J., LI, B., ZHANG, Y., SU, R., WANG, R., WANG, Z., LV, Q. & ZHANG, J. J. F. I. V. S. 2023. Metabolomic analysis of seminal plasma to identify goat semen freezability markers. 10, 1132373.
58. YESTE, M. J. T. 2016. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability
59. FUKUI, Y., KOHNO, H., TOGARI, T., HIWASA, M., OKABE, K. J. J. O. R. & DEVELOPMENT 2008. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. 54, 286-289.
60. MIGUEL-JIMENEZ, S., DEL ALAMO, M. M. R., ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M., HIDALGO, C. O., PEÑA, A. I., MUIÑO, R., RODRÍGUEZ-GIL, J. E. & MOGAS, T. J. A. R. S. 2020. In vitro assessment of egg yolk-, soya bean lecithin-and liposome-based extenders for cryopreservation of dairy bull semen. 215, 106315.

