

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MEDICO VETERINARIAS**



**Efecto de la lecitina de soya en el semen ovino refrigerado por 36 horas**

**POR:**

**FELIZARDO ARTEAGA ARMENDARIZ**

**TESIS**

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

Torreón, Coahuila, México

Noviembre 2021

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

Efecto de la lecitina de soya en el semen ovino refrigerado por 36 horas

Por:

**FELIZARDO ARTEAGA ARMENDÁRIZ**

TESIS

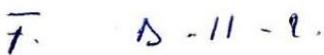
Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial  
para obtener el título de:

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Oscar Angel García  
Presidente

Aprobada por:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Juan Manuel Guillén Muñoz  
Vocal

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Fernando Arellano Rodríguez  
Vocal

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Juan Luis Morales Cruz  
Vocal Suplente

  
\_\_\_\_\_  
MC. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ  
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México

Noviembre 2021



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

Efecto de la lecitina de soya en el semen ovino refrigerado por 36 horas

Por:

**FELIZARDO ARTEAGA ARMENDÁRIZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

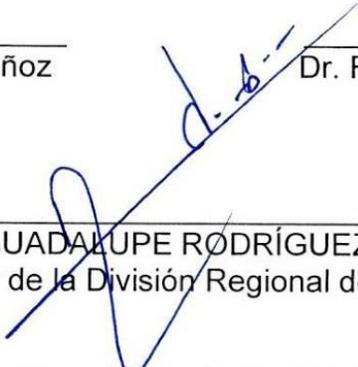
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

Aprobada por el Comité de Asesoría:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Oscar Angel García  
Asesor Principal

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Juan Manuel Guillén Muñoz  
Coasesor

*F. A. - 11 - R.*  
\_\_\_\_\_  
Dr. Fernando Arellano Rodríguez  
Coasesor

  
\_\_\_\_\_  
MC. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ  
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México

Noviembre 2021



## AGRADECIMIENTOS

**A Dios** quien me ha guiado y me ha dado la fortaleza a lo largo de esta etapa de mi vida para seguir adelante.

**A mis padres** por siempre haber estado al pendiente de mí brindándome todo su apoyo económico y emocional a lo largo de mi carrera

**A mi asesor de tesis** al doctor Oscar Ángel García por haberme dado la oportunidad de trabajar a su lado en este proyecto de investigación, además de apoyarme en todo momento en la realización de esta tesis.

**A la universidad** por haberme formado académica y moralmente brindándome todas las herramientas para ser un profesionalista competente

**A mis compañeros y amigos** por compartir sus habilidades y conocimientos, aparte de sus experiencias en el campo de la medicina veterinaria

## **DEDICATORIA**

A mis Padres Eugenio Arteaga y Yudiria Armendariz por siempre creer en mí y haberme forjado como la persona que soy en la actualidad pues sin ellos no lo habría logrado, han sido la base de mi formación, han aportado grandes cosas a mi vida. Les agradezco por todo, en especial por ser los principales benefactores de mi carrera.

A mi Hermano Elizardo Arteaga por estar siempre conmigo y motivarme cada día a ser una mejor persona

A mi familia y amigos que de una u otra forma me extendieron su mano para concluir esta meta.

A mi futura esposa y madre de mi hijo por haber estado conmigo en los buenos y malos momentos motivando me a seguir adelante y concluir esta meta tan importante para los dos.

## 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 de liposomas (Optixcell®; YH) sobre la calidad seminal del semen ovino refrigerado a 5°C por 36 h. El semen fue colectado de 7 carneros de la raza Dorper adultos. Después de la colección, el semen fue evaluado inmediatamente y diluido con Andromed® y Optixcell (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 36 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) ( $20\pm 3.28\%$ ), MOLC ( $84.77\pm 3.49$ ); y EINM ( $53\pm 2.12\%$ ). La MOT y MOP disminuyeron progresivamente después del proceso de refrigeración ( $P>0,05$ ). Los resultados demuestran que valores de motilidad espermática fueron mayores durante todo el proceso de refrigeración en el semen diluido con Andromed®. 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 36 h.

**Palabras claves:** CASA, Lecitina de soya, Semen refrigerado, Ovino, Carnero

## INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	i
DEDICATORIA .....	ii
RESUMEN .....	iii
I.- INTRODUCCION .....	1
HIPÓTESIS.....	3
OBJETIVO .....	3
II.- REVISION DE LITERATURA .....	4
2.2 Uso de la yema de huevo como diluyente.....	5
2.3 Criopreservacion de semen ovino .....	6
2.4 Cambios en la membrana espermática .....	8
2.5 Especies reactivas de oxígeno.....	10
2.6 Espermatogénesis en el macho.....	11
2.7 Recolección del semen. ....	12
2.7.1. Uso de la vagina artificial (VA).....	14
2.8. Análisis de la calidad seminal .....	15
2.8.1. Análisis macroscópico.....	16
2.8.2. Volumen.....	16
2.8.3. Aspectos Físico .....	16
2.8.4 Análisis microscópico .....	17
2.8.5 Movilidad masal.....	17
2.8.6. Motilidad individual .....	17
2.9.0 Concentración espermática .....	18
2.9.1 Morfología seminal.....	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1 Localización y animales .....	20
3.2 Manejo de los animales.....	20
3.3 Recolección y procesamiento del semen .....	21
3.4 Diluyentes y proceso de criopreservación .....	21
3.5 Análisis estadístico .....	22
V. RESULTADOS.....	23
VI. DISCUSION .....	26
VII. CONCLUSION .....	29
VII. LITERATURA CITADA .....	30

## I.- INTRODUCCION

El uso de diluyentes tradicionales incluyen la yema de huevo (YH) que es agregada al semen para la criopreservación de la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides durante la crioconservación (Lima-Verde *et al.*, 2017), debido a que protege al esperma de los daños inducidos por la crioconservación durante el enfriamiento, congelación y descongelación, lo anterior, debe a su contenido de fosfolípidos, colesterol y proteínas de baja densidad que ayudan en la resistencia del shock por frío (Andrabi *et al.*, 2008; Akçay *et al.*, 2012; Sieme *et al.*, 2016), en asociación con otros componentes (Amirat *et al.*, 2004). Los fosfolípidos de la YH reemplazan a los fosfolípidos de la membrana espermática con mayor facilidad para mantener la estructura y función de la membrana plasmática durante el proceso de crioconservación (Sieme *et al.*, 2016).

Por otra parte, varios estudios han mostrado que la YH de huevo de varias especies difiere en su contenido de ácidos grasos, fosfolípidos y colesterol, lo que resulta en diferentes efectos en el proceso de criopreservación sobre los espermatozoides (Singh *et al.*, 2013). Además de que existe evidencia que contienen algunos componentes indeseables (hormonas esteroideas y sus moléculas precursoras) que se consideran perjudiciales para la integridad del espermatozoide (Lima-Verde *et al.*, 2017). Lo anterior, ha llevado a que en los últimos años, existan opiniones frecuentes en contra del uso de la YH debido a la gran variabilidad de sus componentes, lo que hace que la evaluación de sus beneficios sea compleja (Kulaksız *et al.*, 2010), además se ha tratado de evitar el uso de diluyentes de origen

animal, ya que podrían ser una posible ruta de transmisión de enfermedades (Lima-Verde *et al.*, 2017). Por lo anterior, se han utilizado sustitutos de la YH químicamente definidos sin ser de origen animal (El-Sisy *et al.*, 2016; Gamal *et al.*, 2016), elaborados en a base de lecitina de soya o liposomas y que pueden ser alternativas potenciales para la criopreservación del semen ovino (Akhter *et al.*, 2012). Debido a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue comparar el efecto de un diluyente a base de lecitina de soya (Andromed®) o liposomas (Optixell®) sobre motilidad espermática del semen ovino refrigerado por 36 horas.

### **HIPÓTESIS**

El diluyente a base y lecitina de soya (Andromed®) conservara la motilidad espermática del semen ovino refrigerado por 36 horas.

### **OBJETIVO**

Comparar el efecto de un diluyente a base de lecitina de soya (Andromed®) o liposomas (Optixell®) sobre motilidad espermática del semen ovino refrigerado por 36 horas.

## II.- REVISION DE LITERATURA

### 2.1 Avances en la criopreservacion del semen

La criopreservación del semen es técnica de rutina que es utilizada para preservar la capacidad de fertilización de los espermatozoides para que puedan almacenarse fácilmente y transportarse durante más tiempo (Khaliq *et al.*, 2017). Sin embargo, el éxito de la IA con semen congelado depende principalmente de la técnica de criopreservación de esperma (Wang *et al.*, 2015). Los procesos de criopreservación del semen en particular (enfriamiento, congelación y descongelación) son las causas principales del choque frío, la formación de cristales de hielo intracelulares y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). La criopreservación del semen se ha convertido en un aspecto importante de la industria ganadera, donde la inseminación artificial (IA) es la técnica más ampliamente aplicada para facilitar la utilización y distribución extensiva del semen (Miguel-Jimenez *et al.*, 2020). Mediante el uso de semen criopreservado, se puede utilizar el espermatozoide de los mejores reproductores para inseminar a miles de hembras en todo el mundo. Aunque, actualmente la criopreservación del semen en toros ha avanzado en comparación con el semen de otras especies. Sin embargo, todavía existen importantes lagunas en las bases de conocimiento y tecnología (revisado por Ugur *et al.*, 2019).

La viabilidad de los espermatozoides después de la descongelación sigue siendo baja y difiere significativamente entre las especies y razas de reproductores (Kulaksız *et al.*; 2010; Ugur *et al.*, 2019). Por otra parte, el proceso de criopreservación del semen puede resultar en un mayor estrés oxidativo (EO) en los

espermatozoides debido a la peroxidación de lípidos de la membrana durante el proceso de congelación, lo que conduce a la producción de oxidantes como las ROS, mayor cantidad de fragmentación del ADN y alteración en la estructura de los fosfolípidos de la membrana plasmática que pueden inducir una capacitación prematura o exocitosis acrosómica (Miguel-Jiménez *et al.*, 2020).

Las fallas en las técnicas de criopreservación son debilidades importantes porque están impidiendo avances tanto en la ciencia fundamental de los gametos de mamíferos como en la biotecnología reproductiva. Se han desarrollado varios diluyentes y se han complementado con productos químicos para reducir el daño criogénico o el estrés oxidativo con distintos niveles de éxito. Se han descubierto conocimientos más detallados sobre la morfología y función de los espermatozoides mediante la aplicación de herramientas avanzadas en biología molecular y celular moderna (Kulaksız *et al.*; 2010).

## **2.2 Uso de la yema de huevo como diluyente**

La yema de huevo YH o leche son los diluyentes tradicionales que se agregan al semen para preservar la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides durante el almacenamiento (Lima-Verde *et al.*, 2018). Los diluyentes a base de YH se han utilizado durante mucho tiempo para la criopreservación de esperma entre especies de ganado. En realidad, es el contenido de lecitina de la YH entera lo que proporciona crioprotección a los espermatozoides, mientras que al mismo tiempo contiene agentes anticrioprotectores como hormonas esteroides y gránulos de yema que son inevitables cuando se usa la YH entera.

La YH ha sido el componente más común de los diluyentes desde que se descubrió su acción protectora contra el choque frío en espermatozoides de toro suspendido en una solución tampón fosfato. Los diluyentes basados en 20% de YH se utilizan comúnmente para criopreservar el esperma de toros, búfalo y cerdos (Bathgate *et al.*, 2006). Aunque se sabe que la YH previene el daño celular durante la criopreservación, la presencia de sustancias en gránulos de yema incluyendo lipoproteínas de alta densidad (LDL, por sus siglas en inglés) y minerales inhiben respiración de las células espermáticas y reducir su motilidad (Moussa *et al.*, 2002). Sin embargo, las LDL de la YH protegen a los espermatozoides del daño cubriendo la membrana espermática durante la congelación y descongelación. Aunque la mayoría de los diluyentes incluyen YH sola, algunas se complementan con glicerol, y hay algunas preocupaciones sobre la bioseguridad y la posibilidad de que el contenido del huevo pudiera alterar la estructura y fisiología de los espermatozoides (revisado por Ugur *et al.*, 2019).

### **2.3 Criopreservación de semen ovino**

Diferentes factores son responsables del grado de éxito en el proceso de criopreservación del semen, siendo el más importante la composición del diluyente (Khaliq *et al.*, 2017). Las técnicas de criopresevación para el almacenamiento del semen en algunas especies pueden afectar la calidad postdescongelación, por ejemplo en el carnero tiene muchas ventajas, pero el proceso de congelación y descongelación induce ciertos efectos perjudiciales, en términos de estructura del esperma, daño bioquímico y funcional, lo que resulta en una reducción de la

motilidad del espermatozoide, la integridad de la membrana y la capacidad de fertilización (Salomon y Maxwell, 2000).

En el caso del semen ovino congelado, la fertilidad es baja, cuando se usa en IA, lo anterior, debido a que el espermatozoide ovino es más sensible al estrés térmico por el frío que el de otras especies como, bovino, conejo o el hombre (Cardozo *et al.*, 2009). El proceso de criopreservación y descongelación induce severos cambios a los espermatozoides en mamíferos debido a estrés térmico, mecánico, químico y osmótico, entre los que se encuentran cambios morfológicos en la organización, fluidez, permeabilidad y composición lipídica de la membrana del espermatozoide y la correspondiente pérdida de fertilidad del eyaculado (Cardozo *et al.*, 2009).

Lo anterior, explica porque los procesos de congelación y descongelación pueden provocar cambios ultraestructurales de los espermatozoides, particularmente en la membrana plasmática y las membranas acrosómicas externas, lo que resulta en una alteración a la función mitocondrial y una disminución de la motilidad (revisado por Layek *et al.*, 2016). Además, el proceso de criopreservación resulta en un mayor EO en los espermatozoides debido a la peroxidación de lípidos de la membrana durante el proceso de congelación, lo que conduce a la producción de oxidantes como especies reactivas de oxígeno (ROS), mayor cantidad de fragmentación del ADN y alteración de las estructuras de los fosfolípidos de la membrana plasmática, que pueden inducir una capacitación prematura o exocitosis acrosómica (Miguel-Jiménez *et al.*, 2020).

## 2.4 Cambios en la membrana espermática

La membrana plasmática actúa como barrera estructural e interface de comunicación con el medio extracelular, transmitiendo señales bioquímicas originadas de interacciones entre el ligando y receptor. La integridad de la MP es de vital importancia para el correcto funcionamiento del espermatozoide. El modelo básico de las membranas biológicas según Singer y Nicholson es la de una bicapa lipídica conformada por glicoproteínas y glicolípidos unidos por interacciones no covalentes, su fluidez y permeabilidad selectiva son cualidades muy importantes que se deben a su composición de abundantes fosfolípidos y proteínas asociadas (Carvajal-Serna *et al.*, 2018).

La evaluación de la calidad de los espermatozoides después de la descongelación generalmente se realiza mediante análisis de motilidad, que es útil pero muy subjetivo y no suficiente para proporcionar una imagen de calidad del semen. Se ha indicado que la morfología de los espermatozoides, la concentración de espermatozoides y la motilidad de los espermatozoides son los tres componentes principales de la evaluación de rutina de la calidad de los espermatozoides (Sutkeviciene *et al.*; 2009). Los espermatozoides sufren alteraciones estructurales y funcionales relacionadas con el criodañó. Es de destacar que la criopreservación 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 (De Las Mercedes Carro *et al*; 2020).

La principal causa de lesiones celulares en la criopreservación 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 (Ledezma *et al.*, 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 criolesión de los espermatozoides durante la congelación que es causada principalmente por el choque frío, el estrés osmótico, la formación de cristales de hielo y el daño oxidativo (Kulaksiz *et al.*, 2010).

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. Sin embargo, la pérdida de esteroides producida por la criopreservación tiene un impacto significativo en la viabilidad de los espermatozoides al inducir un estado de capacitación prematuro que acorta la vida útil de los espermatozoides (De las Mercedes Carro *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, 2019).

## **2.5 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 O<sub>2</sub> y formar especies reactivas de oxígeno, como el superóxido principal, el peróxido de hidrógeno y el hidroxilo (revisado por Ortega *et al.*, 2020) Durante la criopreservación, 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). El mecanismo exacto de la generación y la función ROS no han sido completamente caracterizado en espermatozoides. Sin embargo, 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).

## **2.6 Espermatogénesis en el macho**

La espermatogénesis es el proceso de producción de esperma por el epitelio seminífero durante el cual las células madre espermatogoniales generan espermatozoides, que diferencian, multiplican y generan espermatozoides. Esto ocurre dentro de los túbulos seminíferos, que son el componente principal del parénquima testicular en los testículos del semental (Carleton, 2011).

En el macho comienza en la pubertad cuando los testículos segregan grandes cantidades de testosterona (T4) y así las células Sertoli de los testículos desarrollan túbulos seminíferos en cuya formación participan las células germinales primordiales que a través de sucesivas mitosis originan espermatogonias que ocupan un sitio bajo membrana basal de túmulos seminíferos y que darán lugar al espermatofito primario, célula a partir de la cual comienza la meiosis en el hombre y continúa sin interrupción hasta la formación de espermatozoides. Las células obtenidas al concluir la meiosis I, reciben el nombre de espermatofito secundario y al concluir la meiosis II dan lugar a 4 células denominadas espermáticas, que sufren cambios dramáticos en su forma y organización interna para finalmente formar el espermatozoide, que está constituido por: cabeza, porción intermedia y cola. La cabeza queda desposeída de citoplasma y está ocupada por el núcleo haploide extremadamente condensado y por una vesícula denominada acrosómica, situada por delante de la envoltura nuclear y que está llena de enzimas hidrolíticas. La porción intermedia contiene grandes mitocondrias que son fuente de energía requerida para velocidad de traslación de espermatozoides. Por su parte la cola contiene microtúbulos cuya disposición permitirá su rápido desplazamiento desde la red de tubos del testículo hasta las trompas uterinas, sitio en el que debe alcanzar y fecundar el óvulo (Murgadas *et al.*, 2009).

## **2.7 Recolección del semen.**

Los métodos comunes de recolección de semen son el electroeyaculador y la vagina artificial (VA), esta última con ventajas en cuanto a concentración de semen y bienestar animal. El método más recomendado para la recolección de semen es la VA, ya que permite obtener eyaculados con alta motilidad y concentración espermática. No produce stress en los animales, siendo el método de elección para programas de congelamiento seminal de alta frecuencia de colectas. En contraposición, cuando el semen es colectado por electroeyaculación, los machos se ven sometidos a condiciones de stress; por lo tanto, sólo se recomienda su empleo cuando no puedan ser entrenados para la recolección con vagina artificial, y para su utilización en IA con semen fresco. Usualmente se obtienen eyaculados de mayor volumen debido a una sobrestimulación de las glándulas seminales, productoras del plasma seminal, pero con una menor concentración espermática. Así mismo es frecuente la contaminación con orina (Cueto *et al.*, 2016).

La forma más sencilla es utilizar como estímulo hembras en estro y acostumbrar a los machos a la presencia y manipulación por parte del humano, este proceso puede llevar una o dos semanas. No obstante, los machos también pueden aprender a montar objetos inanimados, lo que facilita su manejo y evita la necesidad de contar con hembras que se manipulen hormonalmente. Sin embargo, para lograrlo se requiere de un proceso más largo y de la utilización de algunas técnicas de habituación y condicionamiento. (Aguirre *et al.*, 2005).

Luego de su recolección, es importante que el semen se mantenga protegido de los cambios bruscos de temperatura, contacto con el agua y metales, radiación solar directa e impurezas. Por lo tanto, todo el material que entre en contacto con el

eyaculado deberá ser de vidrio o de plástico, estará limpio y seco, y a la misma temperatura que el semen (Cueto *et al.*, 2016).

### **2.7.1. Uso de la vagina artificial (VA)**

La vagina artificial provee estimulación térmica (temperatura) y mecánica (presión) para producir la eyaculación. Consiste en un tubo externo rígido, caño de polipropileno térmico (17 cm x 5.5 cm) y una camisa interna de látex. La misma se repliega y asegura sobre los extremos del tubo mediante bandas elásticas formando, entre el tubo y la camisa, un compartimento hermético para el agua. A uno de los extremos de la vagina, se adosa un tubo colector.

La vagina se carga con 40-60 ml de agua caliente a 50 °C o más, según las pérdidas de calor que se produzcan hasta el momento de su utilización, siendo importante que la temperatura interior de la misma al momento de la eyaculación sea de aproximadamente 40 °C. En ambientes muy fríos pueden disminuirse las pérdidas de calor protegiendo el conjunto con una funda exterior, y al tubo recolector previamente templado, con un estuche de telgopor. El acondicionamiento final de la vagina se logra por el agregado de aire a la cámara de agua con el fin de estrechar la luz vaginal a aproximadamente 1 cm de diámetro. La vagina cuenta con una válvula lateral que facilita esta operación.

Asegurada la oveja en el brete de sujeción, el operador se ubicará del lado derecho del macho de modo que su mano diestra sujete la vagina con el extremo abierto frente al prepucio, en un ángulo de 45° con respecto al piso, debiendo estar preparado para una monta y eyaculación veloz. Cuando la macho monta, el operador debe desviar el pene lateralmente para enfrentarlo a la vagina artificial. Un

"golpe" del animal hacia arriba y hacia adelante indica que la eyaculación ha ocurrido. Inmediatamente después del salto, el tubo de recolección se protege con la mano de los cambios bruscos de temperatura y se coloca en un baño termostático a 36 °C. La frecuencia con la cual se puede obtener semen de un carnero depende de su líbido, condición corporal y temperamento.

Es importante evitar la contaminación del semen recolectado, con polvo u otra suciedad. Por lo tanto, la recolección del semen se hará en un lugar limpio y libre de polvo (Cueto *et al.*, 2016).

## **2.8. Análisis de la calidad seminal**

Es de suma importancia que el tiempo que transcurra entre la obtención del semen y el agregado del diluyente sea el menor posible. La observación del color del semen, así como la apreciación de su motilidad masal, son importantes para decidir si se procederá a la utilización del eyaculado. El volumen y concentración espermática deben ser estimados antes de su utilización, para realizar una correcta dilución según el volumen y el número de espermatozoides totales a inseminar por dosis. El volumen promedio del eyaculado del carnero es de 2 ml (0.7-3 ml), y su concentración varía entre 2000-6000 millones de espermatozoides/ml. La dilución del semen para la IA se lleva a cabo por razones técnicas y biológicas:

- Razones técnicas: incrementar el volumen de eyaculado para inseminar un mayor número de hembras.

- Razones biológicas: proveer a los espermatozoides, nutrientes y protección de las temperaturas de enfriamiento y congelamiento.

### **2.8.1. Análisis macroscópico**

El análisis macroscópico consiste en la evaluación del semen a través de la observación visual en el recipiente donde se haya recolectado el seme para determinar todas las características, como es el volumen, aspectos físicos.

### **2.8.2. Volumen**

El volumen del semen se mide utilizando un tubo de recolección graduado. Cuando la recolección se realiza con vagina artificial, normalmente se obtiene un volumen de eyaculado de aproximadamente 1 ml; éste varía según la edad, el tamaño y la condición corporal del animal, la frecuencia de colección y la destreza del operador.

### **2.8.3. Aspectos Físico**

El color del semen debe ser blanco-lechoso o cremoso pálido. El color rojizo indica la presencia de sangre, así como los colores grises o marrones indican contaminación o infección, debiéndose desechar el eyaculado y proceder a la revisión del macho. (Cueto *et al.*, 2016).

#### **2.8.4 Análisis microscópico**

El análisis macroscópico se realiza con la ayuda de un microscopio para determinar la calidad seminal, lo que se evalúa es la movilidad masal, morfología, motilidad, concentración espermática.

#### **2.8.5 Movilidad masal**

La valoración de la movilidad implica la estimación subjetiva de la viabilidad de los espermatozoides. Para su evaluación se utiliza un microscopio de luz (4X Y 20X). la evaluación de la movilidad espermática es en extremo susceptible a las condiciones ambientales (como el exceso de calor o frio), es necesario proteger el semen de agentes o situaciones perjudiciales antes del análisis (Balcázar y Porras).

Evaluación de la movilidad en masa o vigor: el semen sin diluir indica el comportamiento de los espermatozoides en su propio liquido de las glándulas accesorias. Se observa en el microscopio de la luz en el objetivo de 4X, donde se aprecia en un extremo de la gota del eyaculado una serie de sombras que asemejan “olas” y con base en su vigor se ofrece una calificación (Jerez *et al.*, 2016).

#### **2.8.6. Motilidad individual**

Luego de homogeneizar el eyaculado por agitación del tubo de recolección, se retira una gota de semen con micropipeta y se coloca sobre un portaobjeto templado (sobre platina térmica) para su observación microscópica con 100 aumentos. Se podrá tener una idea de la calidad seminal por la velocidad con que se hacen y

deshacen las ondas (motilidad masal). La motilidad masal se estima por el vigor del movimiento de las ondas en una escala subjetiva entre 0 y 5 (0, mínimo; 5, máximo). Para proceder al congelamiento de un eyaculado, se recomienda que su motilidad masal sea igual o mayor de 4 (Cueto *et al.*, 2016).

### **2.9.0 Concentración espermática**

La concentración espermática está definida como el número de espermatozoides por unidad de volumen, expresada normalmente en millones por ml de eyaculado (esp/mL). Los diferentes métodos utilizados para su cálculo varían en función de la palidez y exactitud. Son varios los métodos que permiten determinada la concentración espermática. Entre ellos, figuran el recuento de la cámara de Neubauer y el método del fotocolorímetro. Ambos métodos son precisos y si bien el fotocolorímetro permite un recuento más rápido, su costo es mas elevado que la cámara de Neubauer (Delgado.,2013).

### **2.9.1 Morfología seminal**

La morfología espermática se refiere al estudio de la forma de la forma del espermatozoide y permite determinar las posibilidades que tiene una célula espermática para fertilizar. El objetivo de esta evaluación es eliminar aquellos espermatozoides no ideales para la reproducción. La presencia de altos porcentajes de formas anormales parece estar asociada con inmadurez sexual, procesos degenerativos y patológicas. Las anomalías encontradas en los

espermatozoides se clasifican en dos: anormalidades primarias y secundarias. Las primeras ocurren durante el proceso de espermatogénesis y pueden ocurrir a nivel del acrosoma (pérdida del borde apical, con abultamiento, arrugado, incompleto, desdoblado), cabeza (piriforme, flagelado, lanceolado, irregular, angosta, cabeza doble, macrocéfalo, microcéfalo), cuello (fractura, retroacción, con presencia de gota citoplasmática) y cola (corta, doble, retorcida, con presencia de gota citoplasmática). Las anormalidades secundarias ocurren durante el transporte de los espermatozoides desde el túbulo seminífero y/o epidídimo hasta su salida por la uretra durante la eyaculación. En este tipo de anormalidades tenemos cabezas sueltas, acrosoma desprendido, etc. (Delgado.,2013).

### **III. MATERIALES 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 cuatro 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 sobranje 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 7 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 criopreservación**

Se utilizaron dos diluyentes comerciales: AndroMed® (1% de lecitina de soya, LS); OptiXell® (a base de liposomas, LP), en semen fresco (SF) y después fue enfriado de 37 a 5 °C durante 2 h; semen refrigerado (SR).

Para el proceso de criopreservación se utilizaron 2 diluyentes: 1), a base del 1% de lecitina de soya (Andromed®, LS Minitube, libre de proteína de origen animal y 2) Optixell®, producto comercial (CRYO-VET, Francia), a base de liposomas.

Las muestras de semen fueron sometidas a dos procesos para su evaluación: Uso directo (semen fresco, SF); enfriado de 37 °C a 5 °C, durante 2 horas (semen refrigerado, SR) y posteriormente se mantuvieron durante 36 h 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 espermas 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 diluentes, 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  $P \leq 0.05$ .

## V. RESULTADOS

Los resultados de motilidad espermática del semen ovino al ser diluido con Andromed® u Optixell® posteriormente evaluado cada 12 h por un periodo de 36 h se muestran en el cuadro 1. Al analizar los efectos de los dos diluyentes en el SF, no se observaron diferencias significativas en la MOT siendo del 53% ( $P>0.05$ ). Al igual que para las otras variables evaluadas [ MOP (55%), MOR (38%), MOLT (15%), MOL (4%), EINM (41%)] no se observó diferencias ( $P>0,05$ ). Sin embargo, a partir de las 12 h de refrigeración el promedio de MOT (57% vs 32%) para el Andromed® y Optixell®) respectivamente ( $P<0.05$ ), observándose una disminución considerable a las 36 h de refrigeración en el semen diluido con Optixell® (47% vs 14%) para el Andromed® y Optixell®) respectivamente ( $P<0.05$ ).

Mientras que los EINM fueron mayores en el diluyente Optixell® al final del periodo de refrigeración (52% vs 86% para el semen diluido con Optixell® y Andromed® respectivamente ( $P>0.05$ ).

Cuadro 1. Efecto de dos diluyentes (Andromed®; 1% de LS o Optixell®; liposomas) sobre la motilidad espermática del semen ovino refrigerado durante un periodo de de 36 h a 5 °C.

Horas	Diluyentes	MOT (%)	MOP (%)	MOR (%)	MOLT (%)	MOL (%)	EINM (%)
SF							
	Andromed®	57 <sup>a</sup>	54 <sup>a</sup>	35 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	43 <sup>a</sup>
	Optixell®	60 <sup>a</sup>	58 <sup>a</sup>	42 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	40 <sup>a</sup>
SR							
12h	Andromed®	57 <sup>a</sup>	53 <sup>a</sup>	34 <sup>b</sup>	18	3 <sup>a</sup>	43 <sup>a</sup>
	Optixell®	32 <sup>a</sup>	28 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	13	4 <sup>a</sup>	68 <sup>a</sup>
24 h	Andromed®	56 <sup>a</sup>	51 <sup>a</sup>	32 <sup>a</sup>	19 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	44 <sup>a</sup>
	Optixell®	23 <sup>bc</sup>	20 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	9 <sup>b</sup>	3 <sup>a</sup>	77 <sup>b</sup>
36 h	Andromed®	47 <sup>ab</sup>	43 <sup>a</sup>	25 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	53 <sup>b</sup>
	Optixell®	14 <sup>c</sup>	11 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	8 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	86 <sup>b</sup>

Figura 1. Promedio general de la MOT de semen ovino refrigerado con Andromed® a base del 1% de LS o Optixell® a base de liposomas durante un periodo de de 36 h a 5 °C.

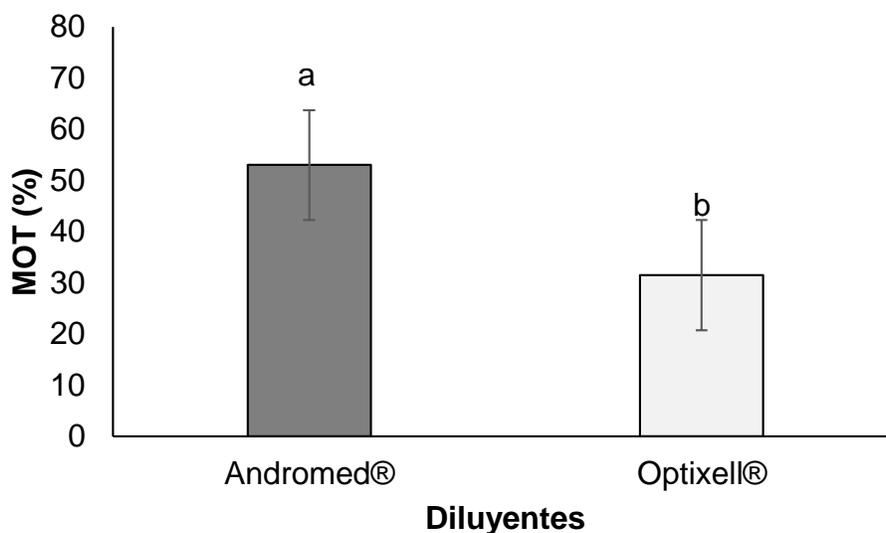
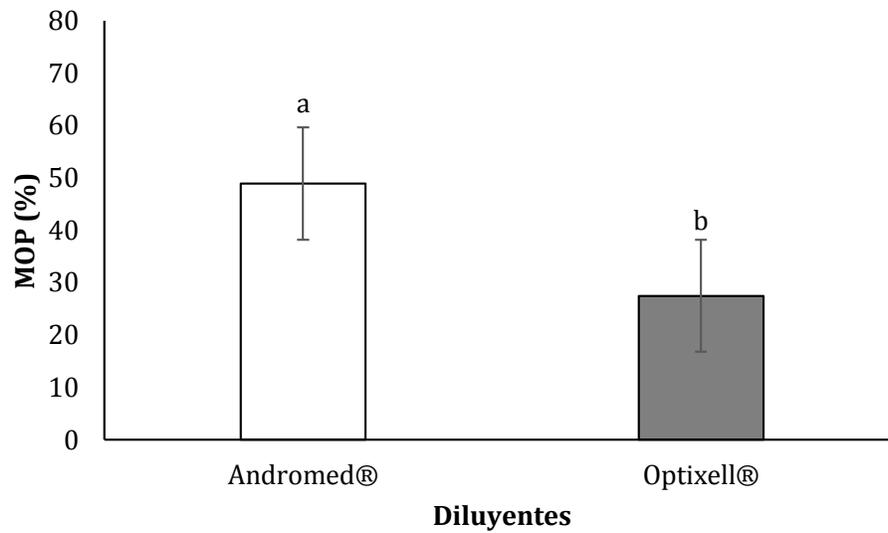


Figura 2. Promedio general de la MOP de semen ovino refrigerado con con Andromed® a base del 1% de LS o Optixell® a base de liposomas durante un periodo de de 36 h a 5 °C.



## VI. DISCUSION

En el presente estudio se evaluó el efecto de un diluyente a base LS soya (Andromed®) sobre la calidad del semen de carnero, conservado mediante refrigeración por 36 h. Los resultados del presente estudio muestran que el diluyente (Andromed®) a base LS mantuvo la calidad de los espermatozoides durante el proceso de refrigeración por 36 h. Sin embargo, nuestros resultados son contrarios a los reportados por Salmani *et al.* (2013) quienes mencionan que la LS no es capaz de evitar la peroxidación lipídica que ocurre durante el proceso de enfriamiento del espermatozoide. Por otro parte, Konyak *et al.* (2018) encontraron una motilidad espermática significativamente menor, respecto al diluyente a base del 1% de lecitina de soya.

De acuerdo con nuestros resultados encontrado en el diluyente a base a LS, no se conoce con exactitud el mecanismo exacto a través del cual los diluyentes basados en plantas protegen el esperma durante el proceso de refrigeración y congelación, pero se cree que los fosfolípidos de las plantas protegen a los espermatozoides mediante un enlace reversible, ya que 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 fueron diferentes en el semen refrigerado por 36 h cuando fue diluido con el diluyente Andromed®. Lo anterior, es probable que se deba a que la lecitina de soya ayudo a disminuir la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados protegiendo la membrana

celular del espermatozoide evitando los cambios en la fluidez de la membrana espermática (Kaeoket *et al.*, 2008), 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.* 2017). Lo anterior, pudo haber evitado que los espermatozoides fueran atacados por las ROS, lo que resulta en la disminución de la motilidad y la viabilidad espermatozoides (Thagilou *et al.*, 2017).

Por otra, parte los resultados encontrados en nuestro estudio respecto al diluyente a base de liposomas (Optixell®) mostro una menor MOT, MOP y EINM. Lo que está de acuerdo con los resultados encontrados en semen de caballos que muestran que después de ser congelado la motilidad seminal es menor cuando es preservado con diluyente en base de 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 (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 LS, 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). Lo anterior, coincide con nuestros resultados encontrados en el semen diluido con LS al 1% y refrigerado por 36 h

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 de liposomas. Lo anterior, pudo deberse a que durante el proceso de

crioconservación el nivel de ácidos grasos polinsaturados disminuyó en el diluyente a base de liposomas debido probablemente a una peroxidación lipídica (Kaeoket *et al.*, 2008). Sin embargo, otros resultados muestran que no existe diferencias significativas al usar uno u otro diluyente ya sea base de origen vegetal o animal (Fleisch *et al.*, 2016).

Por otra parte, la protección de la membrana plasmática es importante ya que esta regula una gran cantidad de funciones espermáticas directamente relacionadas con la 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; Belala *et al.*, 2016). Se cree que la lecitina de soya actúa de manera similar a las lecitinas de la YH o la leche, mientras que los liposomas (Belala *et al.*, 2016) son moléculas químicamente definidas que pueden transferir lípidos y colesterol (u otras moléculas de interés) al plasma de los espermatozoides membrana (Ansari *et al.*, 2016).

## **VII. CONCLUSION**

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 refrigerado por 36 h.

## VII. LITERATURA CITADA

- 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.
- Akhter, S., Ansari, M. S., Andrabi, S. M. H., Rakha, B. A., Ullah, N., & Khalid, M. (2012). Soya-lecithin in extender improves the freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reproduction in domestic animals*, 47(5), 815-819.
- 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.
- 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.
- Ansari, M. S., Rakha, B. A., & Akhter, S. (2017). Cryopreservation of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in AndroMed® extender; in vitro and in vivo evaluation. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(6), 992-997.
- Bathgate, R., Maxwell, W. M. C., & Evans, G. (2006). Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(1), 68-73.
- Belala, R., Delay, J., Amirat, L., Ropers, M. H., Le Guillou, J., Anton, M., ... & Bencharif, D. (2016). The benefits of liposomes for chilling canine sperm for 4 days at 4 C. *Animal reproduction science*, 168, 100-109.
- 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.
- Carvajal-Serna, M., Cardozo, J. A., Grajales-Lombana, H., Cebrian-Perez, J. A., & Muino-Blanco, T. (2018). Sperm quality and seminal plasma proteins in three sheep breeds under high altitude and tropical conditions (No. ART-2018-107590).
- de Las Mercedes Carro, M., Peñalva, D. A., Antollini, S. S., Hozbor, F. A., & Buschiazzi, J. (2020). Cholesterol and desmosterol incorporation into ram sperm membrane before cryopreservation: Effects on membrane biophysical properties and sperm quality. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1862(9), 183357.

- El-Sisy, G. A., El-Badry, D. A., El-Sheshtawy, R. I., & El-Nattat, W. S. (2018). Effects of Phoenix dactylifera pollen grains extract supplementation on post-thaw quality of Arabian stallion semen. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 21(1).
- Fleisch, A., Malama, E., Witschi, U., Leiding, C., Siuda, M., Janett, F., & Bollwein, H. (2017). Effects of an extension of the equilibration period up to 96 hours on the characteristics of cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 89, 255-262.
- Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S. M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L., ... & Nasr-Esfahani, M. H. (2010). In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 73(4), 480-487.
- Gamal, A., El-Maaty, A. M. A., & Rawash, Z. M. (2016). Comparative blood and seminal plasma oxidant/antioxidant status of Arab stallions with different ages and their relation to semen quality. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(5), 428-433.
- 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.
- Javed, M., Tunio, M. T., Abdul Rauf, H., Bhutta, M. F., Naz, S., & Iqbal, S. (2019). Addition of pomegranate juice (*Punica granatum*) in tris-based extender improves post-thaw quality, motion dynamics and in vivo fertility of Nili Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Andrologia*, 51(8), e13322.
- Jerez, R., González, N., Olaciregui, M., Luño, V., de Blas, I., & Gil, L. (2016). Use of soy milk combined with different cryoprotectants for the ram semen cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 134, 34-38.
- Kaeoket, K., Tantiparinyakul, K., Kladkaew, W., Chanapiwat, P., & Techakumphu, M. (2008). Effect of different antioxidants on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. *Thai J Agri Sci*, 41(1-2), 1-9.
- Kaka, A., Haron, W., Yusoff, R., Yimer, N., Khumran, A. M., Memon, A. A., ... & Ebrahimi, M. (2017). Frozen-thawed quality of bull semen after combined supplementation of docosahexaenoic acid and alpha linolenic acid into tris based semen extender. *Pakistan Journal of Zoology*, 49(6).
- Khaliq, k., Ahmad, N., Sattar, A., Shehzad, W., Hussain, M., & Andrabi, S. I. (2017). Comparison of the cryoprotective effect of quail and chicken egg yolk on the freezability of nili-ravi buffalo bull spermatozoa. *Wayamba Journal of Animal Science* 1541 -1548, 2017.
- Konyak, P., Mandal, A., Mondal, M., Bhakat, C., Das, S. K., Rai, S., ... & Karunakaran, M. (2018). Preservation of black Bengal buck semen in soybean lecithin based chemically defined extender. *Indian Journal of Animal Research*, 52(8), 1151-1154.

- Kulaksız, R., Çebi, Ç., Akçay, E., & Daşkın, A. (2010). The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small ruminant research*, 88(1), 12-15.
- Kumar, P., Saini, M., Kumar, D., Balhara, A. K., Yadav, S. P., Singh, P., & Yadav, P. S. (2015). Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal reproduction science*, 159, 38-45.
- Layek, S. S., Mohanty, T. K., Kumaresan, A., & Parks, J. E. (2016). Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*, 172, 1-9.
- 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.
- Miguel-Jimenez, S., Del Alamo, M. M. R., Álvarez-Rodríguez, M., Hidalgo, C. O., Peña, A. I., Muiño, R., ... & Mogas, T. (2020). In vitro assessment of egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders for cryopreservation of dairy bull semen. *Animal reproduction science*, 215, 106315.
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., & Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 57(6), 1695-1706.
- Murphy, E. M., O'Meara, C., Eivers, B., Lonergan, P., & Fair, S. (2018). Comparison of plant- and egg yolk-based semen diluents on in vitro sperm kinematics and in vivo fertility of frozen-thawed bull semen. *Animal reproduction science*, 191, 70-75.
- Pillet, E., Labbe, C., Batellier, F., Duchamp, G., Beaumal, V., Anton, M., ... & Magistrini, M. (2012). Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology*, 77(2), 268-279.
- Salmani, H., Nabi, M. M., Vaseghi-Dodaran, H., Rahman, M. B., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shakeri, M., ... & Zhandi, M. (2013). Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small ruminant research*, 112(1-3), 123-127.
- Salomon, S., & Maxwell, W. M. C. (2000). Preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci*, 62, 77-111.
- Sieme, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. F. (2016). Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal reproduction science*, 169, 2-5.
- Singh, M. A. H. A. K., Ramteke, S. S., Ghosh, S. K., Prasad, J. K., & Rajoriya, J. (2013). Efficacy of egg yolk from three avian species on semen freezability of Tharparkar bull. *Indian J. Anim. Reprod*, 34(2), 25-28.

- Sutkeviciene, N., Riskeviciene, V., Januskauskas, A., Zilinskas, H., & Andersson, M. (2009). Assessment of sperm quality traits in relation to fertility in boar semen. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51(1), 1-6.
- Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., ... & Memili, E. (2019). Advances in cryopreservation of bull sperm. *Frontiers in veterinary science*, 6, 268.
- Wang, Y. X., You, L., Zeng, Q., Sun, Y., Huang, Y. H., Wang, C., ... & Lu, W. Q. (2015). Phthalate exposure and human semen quality: Results from an infertility clinic in China. *Environmental research*, 142, 1-9.